

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*

методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика *BRCA1* 4153delA/5382insC»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика *BRCA1* 4153delA/5382insC» предназначен для качественного определения генотипа по мутациям 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*, ассоциированным с риском развития рака молочной железы/рака яичников (РМЖ/РЯ), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией кривых плавления в режиме реального времени. Набор может быть применён как вспомогательное средство диагностики при определении наследственных факторов риска развития РМЖ/РЯ и у пациентов с уже выявленным РМЖ/РЯ для уточнения разновидности рака (семейная форма, ассоциированная с мутацией гена *BRCA1*). Набор может быть применён для образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови или Buccal-эпителия.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфического ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности.

Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

В готовой реакционной смеси для ПЦР №1 (ГРС1) присутствуют два ДНК-зонда для детекции мутаций в двух локусах гена *BRCA1*. ДНК-зонд с флуорофором «FAM» специфичен для участка гена, содержащего позицию 4153, и соответствует по нуклеотидной последовательности нормальному аллелю по этому локусу (не содержащему мутацию 4153delA). ДНК-зонд с флуорофором «ROX» специфичен для другого локуса гена *BRCA1* и соответствует по нуклеотидной последовательности аллелю, содержащему мутацию 5382insC.

В готовой реакционной смеси для ПЦР №2 (ГРС2) присутствует ДНК-зонд с флуорофором «HEX», комплементарный аллелю, содержащему мутацию 4153delA. В зависимости от генотипа образца будут фиксироваться разные температуры перехода зонда из связанного состояния в свободное. При наличии мутации 4153delA будет зафиксирован пик с высокой температурой плавления. В отсутствии целевой мутации (в образце есть только нормальные аллели или в целевом локусе присутствует другая мутация) в комплексе матрица-зонд присутствуют несоответствия, и, следовательно, фиксируется более низкая температура плавления. Таким образом, ГРС2 позволяет различить, присутствует или отсутствует в образце целевая мутация 4153delA вне зависимости от присутствия других мутаций в этом же локусе.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) Описание.	Количество
Контрольный образец «Нормальная гомозигота» (KO1) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Контрольный образец «Мутантная гомозигота» (KO2) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР №1 (ГРС1) <i>Лиофилизированная</i>	48 пробирок
Готовая реакционная смесь для ПЦР №2 (ГРС2) <i>Лиофилизированная</i>	16 пробирок
Элюирующий раствор «Генетика» <i>Бесцветная жидкость</i>	2 фл., по 12 мл
Оптическая пленка	1,5 листа
Вкладыш с информацией о диапазонах температур плавления для KO1 и KO2	1 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов (цельной крови, Buccalного эпителия) с использованием наборов реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ГенМаг» производства АО «Вектор-Бест», позволяющих получить концентрацию ДНК человека не менее 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность набора по стандартному образцу предприятия, содержащему образцы с известными генотипами по мутациям 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*, определенными методом секвенирования по Сэнгеру, составляет 100 %.

3.2. Аналитическая чувствительность – минимальное количество ДНК человека, достаточное для получения валидного результата анализа, 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

3.3. Аналитическая специфичность – для оценки аналитической специфичности был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базе нуклеотидных последовательностей ДНК человека и по базам последовательностей вирусов и микроорганизмов, которые могут присутствовать в ротовой полости или в крови. Перекрестно реагирующих нецелевых участков генома человека и вирусов или микроорганизмов обнаружено не было. Возможность перекрестных реакций исключена.

3.4. Диагностическая чувствительность:

- в отношении мутации 4153delA диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией 4153delA в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 21 пациента, составила 100% (интервал 83,9 -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- в отношении мутации 5382insC диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией 5382insC в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 32 пациентов, составила 100% (интервал 89,1 -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Диагностическая специфичность:

- в отношении мутации 4153delA диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации 4153delA в гене *BRCA1*, в клинических

испытаниях, проведенных на образцах от 224 пациентов, составила 100% (интервал 98,4-100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении мутации 5382insC диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации 5382insC в гене *BRCAl*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 213 пациентов, составила 100% (интервал 98,3-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.6. Воспроизводимость результатов:

При тестировании в двух независимых постановках двумя разными операторами на двух сериях набора образцов с разными генотипами в 10 повторях каждый внутрипостановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %.

3.7. Потенциально интерферирующие вещества.

В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах буккального эпителия (муцина до 2 %, крови до 5%) и образцах цельной крови (гемоглобина до 229 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл, триглицеридов до 30 мг/мл, альбумина до 90 мг/мл) на результаты анализа.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по определению мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCAl*, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. Некоторые компоненты (KO1 и KO2) содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор планшетного типа с детекцией флуоресценции в режиме реального времени (с каналами детекции «FAM», «HEX» и «ROX»):

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2T», фирма «BioSan», Латвия или «BioShake iQ» фирма «Analytik Jena», Германия);

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

- встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл (например, фирма SSI, США);
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения ДНК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа подготовить клинические образцы (цельной крови и буккального эпителия) с помощью наборов для выделения ДНК.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов цельной крови и буккального эпителия проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Внимание! С момента окончания центрифугирования (п. 7.2.6 Инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс») до удаления надосадочной жидкости (п. 7.2.7 Инструкции) должно пройти не более 5 минут.

Элюцию образцов проводить элюирующим раствором «Генетика», который является компонентом данного набора.

После вскрытия флакона элюирующий раствор «Генетика» хранить при температуре (2-

8) °C не более 3 месяцев.

6.1.2. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест ГенМаг».

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест ГенМаг».

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °C не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС1 и ГРС2 в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °C не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая КО1 и КО2) пробирок с ГРС1. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

В случае получения в исследуемом образце результата «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота» по каналу «FAM» в ГРС1, необходимо подготовить пробирки с ГРС1 и ГРС2 для подтверждения присутствия в образце целевой мутации 4153delA. Вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу выявленных проб с подозрением на присутствие мутации 4153delA, по одной пробирке для КО1 и КО2) пробирок с ГРС1 и ГРС2. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки (ГРС1 и ГРС2) упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС1 и ГРС2 хранить при температуре (2-8) °C не более 3 месяцев.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °C не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °C не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и детекции кривых плавления в соответствии с инструкцией к прибору.

Протоколы проведения реакции амплификации:

для прибора «CFX96»:

— 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °C – 1 минута.

для прибора «ДТпрайм»:

— 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 13 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °C – хранение.

7.6. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутаций в локусе 4153;

«ROX» – регистрация мутации 5382insC.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

7.9. В случае получения в исследуемом образце результата «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота» по каналу «FAM», для подтверждения присутствия целевой мутации 4153delA необходимо провести повторный анализ такого образца одновременно на ГРС1 и ГРС2.

В каждую пробирку с ГРС1 и ГРС2 дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.10. Повторить пп. 7.3-7.5.

7.11. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутаций в локусе 4153 (ГРС1);

«ROX» – регистрация мутации 5382insC (ГРС1);

«HEX» – регистрация подтверждения мутации 4153delA (ГРС2).

7.12. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.13. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов в ГРС1.

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО1, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО2, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

8.2. Условия анализа и учёта результатов в ГРС2.

Для КО1 в канале детекции «HEX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значение температуры плавления должно находиться в диапазоне температур для КО1, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

Для КО2 в канале детекции «HEX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значение температуры плавления должно находиться в диапазоне температур для КО2, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

8.3. Анализ результатов определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* (ГРС1).

8.3.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.3.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

8.3.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.3.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

Таблица 1

Анализ результатов генотипирования в ГРС1

Ген	Мутация	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
<i>BRCA1</i>	4153delA	«FAM»	N/N	mut/mut (требуется подтверждение)	N/mut (требуется подтверждение)
<i>BRCA1</i>	5382insC	«ROX»	N/N	insC/insC	N/insC

N – норма (отсутствие мутации), mut – мутация 4153delA или другая мутация, расположенная вблизи локуса 4153.

Внимание! В связи с высокой клинической значимостью мутаций в гене BRCA1 рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов по мутации 5382insC.

Ген *BRCA1* жизненно необходим для развития эмбриона, индивиды с наличием наследственных мутаций 5382insC одновременно в двух аллелях в генотипе по литературным данным нежизнеспособны.

В связи с существованием редких нецелевых мутаций, расположенных вблизи целевого локуса 4153 (см. п. 8.6), для образцов с результатом «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота» по каналу «FAM» для подтверждения наличия целевой мутации 4153delA требуется

повторная одновременная постановка на ГРС1 и ГРС2.

8.4. Анализ результатов подтверждения наличия мутации 4153delA в гене *BRCA1* (ГРС2).

8.4.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС2 в канале детекции «HEX» должен фиксироваться один пик плавления и определяться значение температуры плавления.

8.4.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота» (целевая мутация 4153delA отсутствует), если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1.

8.4.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота» (наличие мутации 4153delA подтверждено), если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

Таблица 2

Анализ результатов генотипирования в ГРС2

Ген	Мутация	Канал	ГЕНОТИП	
			«Нормальная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от КО2
<i>BRCA1</i>	4153delA	«HEX»	N/N	N/delA

N – норма (отсутствие мутации).

8.5. Анализ итогового генотипа по мутации 4153delA в гене *BRCA1*.

Определить итоговый генотип по мутации 4153delA в гене *BRCA1* с учетом результатов анализа в ГРС1 (двукратная постановка, результат генотипирования должен совпадать) и ГРС2 в соответствии с данными Таблицы 3.

Таблица 3

Определение генотипа анализируемого образца по мутации 4153delA гена *BRCA1*

ГРС1, канал «FAM»	ГРС1, канал «FAM» (повторная постановка)	ГРС2, канал «HEX»	Результат
N/N	-	-	N/N

N/mut (требуется подтверждение)	N/mut	N/N	N/N (мутация 4153delA отсутствует, один из аллелей содержит нецелевой полиморфизм вблизи локуса 4153)
N/mut (требуется подтверждение)	N/mut	N/delA	N/delA (присутствие мутации 4153delA подтверждено)
mut/mut (требуется подтверждение)	mut/mut	N/N	N/N (мутация 4153delA отсутствует, оба аллеля содержат нецелевые полиморфизмы вблизи локуса 4153)
mut/mut (требуется подтверждение)	mut/mut	N/delA	N/delA (присутствие мутации 4153delA в одном из аллелей подтверждено, второй аллель содержит нецелевой полиморфизм вблизи локуса 4153)*

N – норма (отсутствие мутации), mut – мутация 4153delA или другая мутация, расположенная вблизи локуса 4153.

* Ген *BRCA1* жизненно необходим для развития эмбриона, индивиды с наличием наследственных мутаций 4153delA одновременно в двух аллелях в генотипе по литературным данным нежизнеспособны.

8.6. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °C от значений, полученных для KO1 и/или KO2, либо пики плавления отсутствуют. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту.

Сомнительный результат может быть вызван слишком низкой концентрацией геномной ДНК в реакционной смеси (вследствие неправильного забора материала, ошибок при пробоподготовке или при использовании неподходящего метода выделения ДНК). Количество копий генома человека в выделенном образце ДНК может быть проверено с использованием набора реагентов «РеалБест Валидация образца», выявляющего фрагмент аутосомного уникального гена человека *HMBS*. Если для анализируемого образца значение *Ct* ДНК гена *HMBS* по каналу «ROX» больше 33 или не определяется (то есть содержание в реакционной смеси копий (геном-эквивалентов) ДНК гена *HMBS* менее 250), то это свидетельствует о недостаточном количестве ДНК в выделенном образце. Необходимо провести повторный забор для исследования образца буккального эпителия или провести повторный анализ образца цельной крови, начиная с этапа выделения ДНК.

8.7. Диагностическая значимость.

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2*, при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак гортани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

К настоящему времени выявлены в единичных случаях и описаны в базе данных NCBI редкие мутации вблизи локуса 4153A. Среди них имеются как патогенные (*делеции rs397509130, rs80357727, rs431825404, rs273900721, rs88604018, инсерция rs886040190, приводящие к сдвигу рамки считывания, и нуклеотидные замены rs886040191, rs886040188, приводящие к появлению стоп-кодона и обрыву синтеза белка*), так и мутации с неопределённым клиническим значением (*миссенс-мутации rs80357210, rs80357407, rs745638837, rs769589630, rs55639854, rs775339017, заменяющие аминокислоту в белке, и делеции без сдвига рамки считывания rs80358340 и rs397509129*) или нейтральные (*синонимичная замена rs80356828*).

ГРС1 данного набора в отношении позиции 4153A гена *BRCA1* является скрининговой. При наличии мутации 4153delA у пациента ГРС1 гарантированно выявляет данную мутацию. В редких случаях ГРС1 может выдать результат «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота» в отсутствии целевой делеции 4153delA, но при наличии у пациента другой редкой мутации вблизи целевого локуса. Для подтверждения наличия мутации 4153delA в гене *BRCA1* необходимо использовать ГРС2, которая предназначена для дифференциального определения мутации 4153delA. Данная ГРС высоко специфична - на результат, получаемый с её использованием, не влияют другие мутации вблизи целевого локуса. Обращаем внимание: если в ГРС1 определена мутация 4153delA, а в ГРС2 её наличие не подтверждено, то это свидетельствует о наличии у пациента одной из перечисленных выше или не внесённой в базу данных редких

мутаций, среди которых есть как нейтральные, так и патогенные мутации. Для точной идентификации нецелевой мутации рекомендуется секвенирование фрагмента гена *BRCA1*, включающего область вблизи локуса 4153A.

Более подробно ознакомиться с диагностической значимостью мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* можно в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием BRCA-мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюляндин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюляндина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA1 4153delA/5382insC», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Директор клинических исследований
и дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»
м.п.



Я.Э. Новикова

Прошито в количестве 15 листов
«06» 12 2021 года
Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*

методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления

«РеалБест-Генетика *BRCA1* 4153delA/5382insC»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* методом полимеразной цепной реакции с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика *BRCA1* 4153delA/5382insC» предназначен для качественного определения генотипа по мутациям 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*, ассоциированным с риском развития рака молочной железы/рака яичников (РМЖ/РЯ), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией кривых плавления в режиме реального времени. Набор может быть применён как вспомогательное средство диагностики при определении наследственных факторов риска развития РМЖ/РЯ и у пациентов с уже выявленным РМЖ/РЯ для уточнения разновидности рака (семейная форма, ассоциированная с мутацией гена *BRCA1*). Набор может быть применён для образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови или буккального эпителия.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Таq ДНК-полимеразой.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфического ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности.

Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

В готовой реакционной смеси для ПЦР №1 (ГРС1) присутствуют два ДНК-зонда для детекции мутаций в двух локусах гена *BRCA1*. ДНК-зонд с флуорофором «FAM» специфичен для участка гена, содержащего позицию 4153, и соответствует по нуклеотидной последовательности нормальному аллелю по этому локусу (не содержащему мутацию 4153delA). ДНК-зонд с флуорофором «ROX» специфичен для другого локуса гена *BRCA1* и соответствует по нуклеотидной последовательности аллелю, содержащему мутацию 5382insC.

В готовой реакционной смеси для ПЦР №2 (ГРС2) присутствует ДНК-зонд с флуорофором «HEX», комплементарный аллелю, содержащему мутацию 4153delA. В зависимости от генотипа образца будут фиксироваться разные температуры перехода зонда из связанного состояния в свободное. При наличии мутации 4153delA будет зафиксирован пик с высокой температурой плавления. В отсутствие целевой мутации (в образце есть только нормальные аллели или в целевом локусе присутствует другая мутация) в комплексе матрица-зонд присутствуют несоответствия, и, следовательно, фиксируется более низкая температура плавления. Таким образом, ГРС2 позволяет различить, присутствует или отсутствует в образце целевая мутация 4153delA вне зависимости от присутствия других мутаций в этом же локусе.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Контрольный образец «Нормальная гомозигота» (KO1) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Контрольный образец «Мутантная гомозигота» (KO2) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР №1 (ГРС1) <i>Лيوфилизированная</i>	48 пробирок
Готовая реакционная смесь для ПЦР №2 (ГРС2) <i>Лيوфилизированная</i>	16 пробирок
Элюирующий раствор «Генетика» <i>Бесцветная жидкость</i>	2 фл., по 12 мл
Оптическая пленка	1,5 листа
Вкладыш с информацией о диапазонах температур плавления для KO1 и KO2	1 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов (цельной крови, буккального эпителия) с использованием наборов реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ГенМаг» производства АО «Вектор-Бест», позволяющих получить концентрацию ДНК человека не менее 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

Показания к применению.

Набор может быть применён как вспомогательное средство диагностики при определении наследственных факторов риска развития РМЖ/РЯ и у пациентов с уже выявленным РМЖ/РЯ для уточнения разновидности рака (семейная форма, ассоциированная с мутацией гена *BRCA1*). Набор может быть применён для образцов геномной ДНК человека, выделенной из цельной крови или буккального эпителия.

Противопоказаний к применению медицинского изделия нет (не применимо).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность набора по стандартному образцу предприятия, содержащему образцы с известными генотипами по мутациям 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*, определенными методом секвенирования по Сэнгеру, составляет 100 %.

3.2. Аналитическая чувствительность – минимальное количество ДНК человека, достаточное для получения валидного результата анализа, 250 копий на реакционную пробирку (на 50 мкл препарата выделенной ДНК).

3.3. Аналитическая специфичность – для оценки аналитической специфичности был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базе нуклеотидных последовательностей ДНК человека и по базам последовательностей вирусов и микроорганизмов, которые могут присутствовать в ротовой полости или в крови. Перекрестно реагирующих нецелевых участков генома человека и вирусов или микроорганизмов обнаружено не было. Возможность перекрестных реакций исключена.

3.4. Диагностическая чувствительность:

- в отношении мутации 4153delA диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией 4153delA в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 21 пациента, составила 100% (интервал 83,9 -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- в отношении мутации 5382insC диагностическая чувствительность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов с мутацией 5382insC в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 32 пациентов, составила 100% (интервал 89,1 -100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Диагностическая специфичность:

- в отношении мутации 4153delA диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации 4153delA в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 224 пациентов, составила 100% (интервал 98,4-100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- в отношении мутации 5382insC диагностическая специфичность, вычисляемая как процент правильно определенных образцов без мутации 5382insC в гене *BRCA1*, в клинических испытаниях, проведенных на образцах от 213 пациентов, составила 100% (интервал 98,3-100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.6. Воспроизводимость результатов:

При тестировании в двух независимых постановках двумя разными операторами на двух сериях набора образцов с разными генотипами в 10 повторях каждый внутривосстановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %.

3.7. Потенциально интерферирующие вещества.

В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах буккального эпителия (муцина до 2 %, крови до 5%) и образцах цельной крови (гемоглобина до 229 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл, триглицеридов до 30 мг/мл, альбумина до 90 мг/мл) на результаты анализа.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по определению мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. Некоторые компоненты (КО1 и КО2) содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переносного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор планшетного типа с детекцией флуоресценции в режиме реального времени (с каналами детекции «FAM», «HEX» и «ROX»):

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», АО «Ламинарные системы, Россия»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2Т», фирма «BioSan», Латвия или «BioShake iQ» фирма «Analytik Jena», Германия);
- микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);
- встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл (например, фирма SSI, США);
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения ДНК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа подготовить клинические образцы (цельной крови и буккального эпителия) с помощью наборов для выделения ДНК.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов цельной крови и буккального эпителия проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Внимание! С момента окончания центрифугирования (п. 7.2.6 Инструкции по применению набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс») до удаления надосадочной жидкости (п. 7.2.7 Инструкции) должно пройти не более 5 минут.

Элюцию образцов проводить элюирующим раствором «Генетика», который является компонентом данного набора.

После вскрытия флакона элюирующий раствор «Генетика» хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.1.2. Выделение ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест ГенМаг».

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводить согласно инструкции по применению набора «РеалБест ГенМаг».

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС1 и ГРС2 в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая КО1 и КО2) пробирок с ГРС1. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

В случае получения в исследуемом образце результата «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота» по каналу «FAM» в ГРС1, необходимо подготовить пробирки с ГРС1 и ГРС2 для подтверждения присутствия в образце целевой мутации 4153delA. Вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу выявленных проб с подозрением на присутствие мутации 4153delA, по одной пробирке для КО1 и КО2) пробирок с ГРС1 и ГРС2. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки (ГРС1 и ГРС2) упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС1 и ГРС2 хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и детекции кривых плавления в соответствии с инструкцией к прибору.

Протоколы проведения реакции амплификации:

для прибора «CFX96»:

— 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °C – 1 минута.

для прибора «ДТпрайм»:

— 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 13 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °C – хранение.

7.6. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутаций в локусе 4153;

«ROX» – регистрация мутации 5382insC.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией

флуоресценции в режиме реального времени.

7.9. В случае получения в исследуемом образце результата «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота» по каналу «FAM», для подтверждения присутствия целевой мутации 4153delA необходимо провести повторный анализ такого образца одновременно на ГРС1 и ГРС2.

В каждую пробирку с ГРС1 и ГРС2 дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.10. Повторить пп. 7.3-7.5.

7.11. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутаций в локусе 4153 (ГРС1);

«ROX» – регистрация мутации 5382insC (ГРС1);

«HEX» – регистрация подтверждения мутации 4153delA (ГРС2).

7.12. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.13. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов в ГРС1.

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО1, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значения температур плавления должны находиться в диапазоне температур для КО2, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

8.2. Условия анализа и учёта результатов в ГРС2.

Для КО1 в канале детекции «HEX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значение температуры плавления должно находиться в диапазоне температур для КО1, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

Для КО2 в канале детекции «HEX» должно фиксироваться наличие одного пика

плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. Значение температуры плавления должно находиться в диапазоне температур для КО2, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

8.3. Анализ результатов определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене BRCA1 (ГРС1).

8.3.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.3.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1.

8.3.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

8.3.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

Таблица 1

Анализ результатов генотипирования в ГРС1

Ген	Мутация	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °C от КО1 и КО2
<i>BRCA1</i>	4153delA	«FAM»	N/N	mut/mut (требуется подтверждение)	N/mut (требуется подтверждение)
<i>BRCA1</i>	5382insC	«ROX»	N/N	insC/insC	N/insC

N – норма (отсутствие мутации), mut – мутация 4153delA или другая мутация, расположенная вблизи локуса 4153.

Внимание! В связи с высокой клинической значимостью мутаций в гене BRCA1

рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов по мутации 5382insC.

Ген *BRCA1* жизненно необходим для развития эмбриона, индивиды с наличием наследственных мутаций 5382insC одновременно в двух аллелях в генотипе по литературным данным нежизнеспособны.

В связи с существованием редких нецелевых мутаций, расположенных вблизи целевого локуса 4153 (см. п. 8.6), для образцов с результатом «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота» по каналу «FAM» для подтверждения наличия целевой мутации 4153delA требуется повторная одновременная постановка на ГРС1 и ГРС2.

8.4. Анализ результатов подтверждения наличия мутации 4153delA в гене *BRCA1* (ГРС2).

8.4.1. Для каждого исследуемого образца в ГРС2 в канале детекции «HEX» должен фиксироваться один пик плавления и определяться значение температуры плавления.

8.4.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота» (целевая мутация 4153delA отсутствует), если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО1.

8.4.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота» (наличие мутации 4153delA подтверждено), если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °C от температуры плавления для КО2.

Таблица 2

Анализ результатов генотипирования в ГРС2

Ген	Мутация	Канал	ГЕНОТИП	
			«Нормальная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °C от КО2
<i>BRCA1</i>	4153delA	«HEX»	N/N	N/delA

N – норма (отсутствие мутации).

8.5. Анализ итогового генотипа по мутации 4153delA в гене *BRCA1*.

Определить итоговый генотип по мутации 4153delA в гене *BRCA1* с учетом результатов анализа в ГРС1 (двукратная постановка, результат генотипирования должен совпадать) и ГРС2 в соответствии с данными Таблицы 3.

Таблица 3

Определение генотипа анализируемого образца по мутации 4153delA гена *BRCA1*

ГРС1, канал «FAM»	ГРС1, канал «FAM» (повторная постановка)	ГРС2, канал «HEX»	Результат
N/N	-	-	N/N
N/mut (требуется подтверждение)	N/mut	N/N	N/N (мутация 4153delA отсутствует, один из аллелей содержит нецелевой полиморфизм вблизи локуса 4153)
N/mut (требуется подтверждение)	N/mut	N/delA	N/delA (присутствие мутации 4153delA подтверждено)
mut/mut (требуется подтверждение)	mut/mut	N/N	N/N (мутация 4153delA отсутствует, оба аллеля содержат нецелевые полиморфизмы вблизи локуса 4153)
mut/mut (требуется подтверждение)	mut/mut	N/delA	N/delA (присутствие мутации 4153delA в одном из аллелей подтверждено, второй аллель содержит нецелевой полиморфизм вблизи локуса 4153)*

N – норма (отсутствие мутации), mut – мутация 4153delA или другая мутация, расположенная вблизи локуса 4153.

* Ген *BRCA1* жизненно необходим для развития эмбриона, индивиды с наличием наследственных мутаций 4153delA одновременно в двух аллелях в генотипе по литературным данным нежизнеспособны.

8.6. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °C от значений, полученных для KO1 и/или KO2, либо пики плавления отсутствуют. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту.

Сомнительный результат может быть вызван слишком низкой концентрацией геномной ДНК в реакционной смеси (вследствие неправильного забора материала, ошибок при пробоподготовке или при использовании неподходящего метода выделения ДНК). Количество копий генома человека в выделенном образце ДНК может быть проверено с использованием

набора реагентов «РеалБест Валидация образца», выявляющего фрагмент аутосомного уникального гена человека *HMBS*. Если для анализируемого образца значение Ct ДНК гена *HMBS* по каналу «ROX» больше 33 или не определяется (то есть содержание в реакционной смеси копий (геном-эквивалентов) ДНК гена *HMBS* менее 250), то это свидетельствует о недостаточном количестве ДНК в выделенном образце. Необходимо провести повторный забор для исследования образца буккального эпителия или провести повторный анализ образца цельной крови, начиная с этапа выделения ДНК.

8.7. Диагностическая значимость.

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2*, при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак гортани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

К настоящему времени выявлены в единичных случаях и описаны в базе данных NCBI редкие мутации вблизи локуса 4153A. Среди них имеются как патогенные (делеции *rs397509130*, *rs80357727*, *rs431825404*, *rs273900721*, *rs88604018*, инсерция *rs886040190*, приводящие к сдвигу рамки считывания, и нуклеотидные замены *rs886040191*, *rs886040188*, приводящие к появлению стоп-кодона и обрыву синтеза белка), так и мутации с неопределённым клиническим значением (миссенс-мутации *rs80357210*, *rs80357407*, *rs745638837*, *rs769589630*, *rs55639854*, *rs775339017*, заменяющие аминокислоту в белке, и делеции без сдвига рамки считывания *rs80358340* и *rs397509129*) или нейтральные (синонимичная замена *rs80356828*).

ГРС1 данного набора в отношении позиции 4153A гена *BRCA1* является скрининговой. При наличии мутации 4153delA у пациента ГРС1 гарантированно выявляет данную мутацию. В редких случаях ГРС1 может выдать результат «Гетерозигота» или «Мутантная гомозигота»

в отсутствии целевой делеции 4153delA, но при наличии у пациента другой редкой мутации вблизи целевого локуса. Для подтверждения наличия мутации 4153delA в гене *BRCA1* необходимо использовать ГРС2, которая предназначена для дифференциального определения мутации 4153delA. Данная ГРС высоко специфична - на результат, получаемый с её использованием, не влияют другие мутации вблизи целевого локуса. Обращаем внимание: если в ГРС1 определена мутация 4153delA, а в ГРС2 её наличие не подтверждено, то это свидетельствует о наличии у пациента одной из перечисленных выше или не внесённой в базу данных редких мутаций, среди которых есть как нейтральные, так и патогенные мутации. Для точной идентификации нецелевой мутации рекомендуется секвенирование фрагмента гена *BRCA1*, включающего область вблизи локуса 4153A.

Более подробно ознакомиться с диагностической значимостью мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* можно в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием *BRCA*-мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюляндин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюляндина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA1 4153delA/5382insC», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobik@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Директор клинических исследований
и дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО»
м.п.



Я.Э. Новикова

Прошито в количестве 16 листов
«12» 04 2022 года
Директор клинических исследований и
дополнительных сервисов Дирекции
ООО «Независима лаборатория ИНВИТРО»

Я. Э. Новикова

