

«СОГЛАСОВАНО»

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор

ООО «НАКФФ»

М.Ю. Лабанок

2022г.



Генеральный директор

ООО «БИОЧИП- ИМБ»

Д.О. Фесенко

2022г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020

версия 1.1

Лист утверждения . .

г. Москва

Изм.

Лист

№ докум.

Подпись

Дата

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020

Москва, 2022г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

- ATM* - (англ. ataxia telangiectasia mutated «мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок») — ген, кодирующий серин/треониновую протеинкиназу, которая рекрутируется и активируется двунитевыми разрывами ДНК;
- BRCA1* - (англ. breast cancer type 1 susceptibility protein «белок восприимчивости к раку молочной железы типа 1») - ген, кодирующий белок BRCA1, участвующий в репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и поддержании генетической стабильности;
- BRCA2* - (англ. breast cancer type 2 susceptibility protein «белок восприимчивости к раку молочной железы типа 2») - ген, кодирующий белок BRCA2, участвующий в репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и поддержании генетической стабильности;
- del* - делеция;
- dup* - дупликация;
- HBsAg* - поверхностный антиген вируса гепатита В;
- ins* - инсерция;
- PALB2* - (partner and localizer of *BRCA2* «партнер и локализатор *BRCA2*») – ген, кодирующий белок, взаимодействующий с *BRCA2* и участвующий в процессе репарации ДНК;
- ВИЧ* - вирус иммунодефицита человека;
- ДНК* - дезоксирибонуклеиновая кислота;
- дНТФ* - дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты;
- МУ* - методические указания;
- ПЦР* - полимеразная цепная реакция;
- РМЖ* - рак молочной железы;
- РПЖ* - рак поджелудочной железы;
- РУ* - регистрационное удостоверение;
- РФ* - Российская Федерация;
- РЯ* - рак яичников;
- СанПин* - санитарные правила и нормы;
- СП* - санитарные правила;
- ТУ* - технические условия;
- УАПК* - комплекс универсальный аппаратно-программный;
- УФ* - ультрафиолет (ультрафиолетовое излучение);
- ЭДТА* - этилендиаминтетрауксусная кислота;

«Набор реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020», далее по тексту- набор реагентов; набор реагентов «ГЕРДА- БИОЧИП»; изделие.

ВВЕДЕНИЕ

Рак поджелудочной железы (РПЖ), рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) являются социально-значимыми заболеваниями. В 2018 году в России было зарегистрировано 15 028 новых случаев РПЖ, 64 544 новых случаев РМЖ и 12 555 новых случаев РЯ¹. РМЖ (21,0%) является ведущей онкологической патологией у женского населения, РЯ занимает девятое место (4,3%). Доля случаев РПЖ среди всех злокачественных новообразований составляет 2,9% у женщин и 3,3% у мужчин².

Продукты генов *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* играют непосредственную роль в репарации повреждений ДНК. Герминальными мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* обусловлены 20–50% наследственных форм РМЖ и 90–95% РЯ у женщин, а также 4–40% РМЖ у мужчин³. При семейных формах РПЖ мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* выявляются в 5% и 17% случаев, соответственно^{4,5}. Мутации в гене *PALB2* встречаются примерно в 1–2% случаев семейного рака молочной железы и в 3–4% случаев семейного РПЖ⁶. Мутациями в гене *ATM* может быть объяснено около 2,4% семейных случаев РПЖ⁷.

В странах Восточной Европы и в России широко распространены определенные мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM*. На основании собственных данных и данных других исследователей о распространенности мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* в Российской Федерации предложена диагностическая панель, включающая 23 мутации в генах *BRCA1* (NM_007294.3: c.66_67AG[1], c.181T>G, c.1961delA, c.3695_3699GTAAA[1], c.3752_3755GTCT[1], c.4035delA, c.5161C>T, c.5251C>T, c.5266dupC), *BRCA2* (NM_000059.3: c.752_753insAG, c.1010_1011insTG, c.2808_2811delACAA, c.5286T>G, c.5586delG, c.5718_5719CT[2], c.5946delT, c.6070C>T, c.6298C>T, c.6998dupT, c.7879A>T), *PALB2* (NM_024675.3: c.172_175delTTGT, c.509_510delGA) и *ATM* (NM_000051.3: c.5932G>T) с целью их диагностики у больных РПЖ, РМЖ и РЯ.

Согласно клиническим рекомендациям Минздрава России всем пациентам с раком поджелудочной железы рекомендуется молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2*⁸. Всем пациенткам с серозными и эндометриоидными карциномами высокой степени злокачественности рекомендовано молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*⁹.

Согласно клиническим рекомендациям определение наиболее частых герминальных мутаций в генах *BRCA1/2* рекомендовано пациенткам с раком молочной железы при отягощенном семейном анамнезе, возрасте младше 45 лет; при тройном негативном фенотипе и возрасте до 60 лет, при первично-множественном опухолевом процессе, а также мужчинам с раком молочной железы¹⁰.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ	5
2. НАИМЕНОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ И СОСТАВ	5
3. СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	5
4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	6
5. НАЗНАЧЕНИЕ	6
6. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	7
7. КРАТНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	7
8. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОТРЕБИТЕЛЬ	7
9. ОПИСАНИЕ ИЗДЕЛИЯ. КОМПЛЕКТНОСТЬ	8
10. АНАЛИТИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ	9
11. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ ЗНАЧЕНИЙ, ЗАДАННЫХ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ	11
12. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
13. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ	15
14. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	20
15. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	20
16. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ	27
17. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ	28
18. УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ	28
19. СРОК ГОДНОСТИ	29
20. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	29
21. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	29
22. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	29
23. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	30
24. ИНФОРМАЦИЯ О НАЛИЧИИ В МЕДИЦИНСКОМ ИЗДЕЛИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, МАТЕРИАЛОВ ЖИВОТНОГО И (ИЛИ) ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	31
25. СВЕДЕНИЯ О СТЕРИЛЬНОСТИ	31
26. ИНФОРМАЦИЯ О ПОРЯДКЕ ОБРАБОТКИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ЕГО ПОВТОРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ	31
27. СВЕДЕНИЯ ОБ ОХРАНЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	31
28. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	31
29. Список используемой литературы:	32

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1. Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020 (далее – набор реагентов, набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП», изделие).

1.2. Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

1.3. Набор реагентов может быть использован в клинично-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике, безопасность работы лабораторий должна быть обеспечена в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

2. НАИМЕНОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ И СОСТАВ

Набор реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020, в составе

1) Комплект № 1 - для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и флуоресцентного маркирования

- Вода - 2 пробирки (по 1500 мкл);
- ПЦР-буфер - 1 пробирка (720 мкл);
- дНТФ - 1 пробирка (60 мкл);
- Полимераза - 1 пробирка (100 мкл);
- Смесь праймеров - 1 пробирка (120 мкл);
- Положительный контроль «К+» - 1 пробирка (70 мкл);
- Отрицательный контроль «К-» - 1 пробирка (70 мкл);

2) Комплект № 2- для проведения гибридизации

Состоит из трех подкомплектов

- Подкомплект 2А
- Гибридизационный компонент №1 - 1 пробирка (1200 мкл);
- Промывочный буфер (x20) - 1 флакон (20 мл);
- Подкомплект 2Б
- Гибридизационный компонент №2 - 1 пробирка (1200 мкл);
- Подкомплект 2В
- Биологические микрочипы - 10 коробок (по 10 шт);

3) Инструкция по применению – 1 шт.

4) Аналитический паспорт – 1 шт.

3. СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) 115522 г. Москва, Каширское ш., д.24.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «БИОЧИП-ИМБ» (ООО «БИОЧИП-ИМБ»).

Адрес компании: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, строение 1, этаж 1, пом. I, ком. 12.
тел. +7(499)135-98-26, +7(499)135-97-61

e-mail: deferos@yandex.ru

Адрес места производства: ООО «БИОЧИП-ИМБ»

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д.32, стр. 1: помещение № I 6-го этажа, комн. 41, 41а, 42, 42а, 43, 43а, 43б; помещение № I 6-го этажа, комн. 38, 39; помещение № I 1-го этажа, комн. 12.

4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика. Только для диагностики in vitro.

5. НАЗНАЧЕНИЕ

5.1. Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для выявления 23 герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе.

5.2. Наименования детектируемых мутаций приведены в Таблице:

Ген	Нуклеотидная замена	АК замена	RS	Геномные координаты	Альтернативное название
BRCA1	NM_007294.3:c.66_67AG[1]	p.Glu23Valfs	rs80357914	17: 43124028-43124029 (GRCh38) 17: 41276045-41276046 (GRCh37)	185delAG 185_186delAG 187delAG NM_007294.3:c.68_69delAG NM_007294.3:c.66_67delAG
	NM_007294.3:c.181T>G	p.Cys61Gly	rs28897672	17: 43106487 (GRCh38) 17: 41258504 (GRCh37)	300T>G
	NM_007294.3:c.1961delA	p.Lys654Serfs	rs80357522	17: 43093570 (GRCh38) 17: 41245587 (GRCh37)	2080delA NM_007294.3:c.1961_1961delA
	NM_007294.3:c.3695_3699GTAAA[1]	p.Val1234Glnfs	rs80357609	17: 43091827-43091831 (GRCh38) 17: 41243844-41243848 (GRCh37)	3819delGTAAA 3819del5 3819_3823delGTAAA NM_007294.3:c.3700_3704delGTAA A
	NM_007294.3:c.3752_3755GTCT[1]	p.Ser1253Argfs	rs80357868	17: 43091772-43091775 (GRCh38) 17: 41243789-41243792 (GRCh37)	3874del4 3875delGTCT 3875_3878delGTCT NM_007294.3:c.3756_3759delGTCT
	NM_007294.3:c.4035delA	p.Glu1346Lysfs	rs80357711	17: 43091496 (GRCh38) 17: 41243513 (GRCh37)	4153delA 4154delA
	NM_007294.3:c.5161C>T	p.Gln1721Ter	rs878854957	17: 43063365 (GRCh38) 17: 41215382 (GRCh37)	5280C>T
	NM_007294.3:c.5251C>T	p.Arg1751Ter	rs80357123	17: 43057078 (GRCh38) 17: 41209095 (GRCh37)	5370C>T
	NM_007294.3:c.5266dupC	p.Gln1756Profs	rs80357906	17: 43057062-43057063 (GRCh38) 17: 41209079-41209080 (GRCh37)	5382insC c.5266insC 5382_5383insC 5384insC 5385insC 5383insC
BRCA2	NM_000059.3:c.752_753insAG	p.Asp252Glufs	отсутствует	13: 32330989-32330989 (GRCh38) 13: 32905126-32905127 (GRCh37)	
	NM_000059.3:c.1010_1011insTG	p.Asp339Leufs	отсутствует	13: 32332488-32332489 (GRCh38) 13: 32906625-32906626 (GRCh37)	
	NM_000059.3:c.2808_2811delACAA	p.Ala938Profs	rs80359351	13: 32337161-32337164 (GRCh38) 13: 32911298-32911301 (GRCh37)	3036delACAA 3034del4 3036_3039delACAA NM_000059.3:c.2806_2809delAAAC
	NM_000059.3:c.5286T>G	p.Tyr1762Ter	отсутствует	13: 32339641 (GRCh38) 13: 32913778 (GRCh37)	
	NM_000059.3:c.5586delG	p.Lys1863Asnfs	отсутствует	13: 32339941 (GRCh38) 13: 32914078 (GRCh37)	
	NM_000059.3:c.5718_5719CT[2]	p.Leu1908Argfs	rs80359530	13: 32340073-32340074 (GRCh38) 13: 32914210-32914211 (GRCh37)	5946delCT 5950_5951delCT 5950delCT NM_000059.3:c.5722_5723delCT
	NM_000059.3:c.5946delT	p.Ser1982Argfs	rs80359550	13: 32340301 (GRCh38) 13: 32914438 (GRCh37)	6174delT
	NM_000059.3:c.6070C>T	p.Gln2024Ter	rs80358844	13: 32340425 (GRCh38) 13: 32914562 (GRCh37)	

Ген	Нуклеотидная замена	АК замена	RS	Геномные координаты	Альтернативное название
	NM_000059.3:c.6298C>T	p.Gln2100Ter	rs746661607	13: 32340653 (GRCh38) 13: 32914790 (GRCh37)	
	NM_000059.3:c.6998dupT	p.Pro2334Thrfs	rs754611265	13: 32346886-32346887 (GRCh38) 13: 32921023-32921024 (GRCh37)	NM_000059.3:c.6997_6998insT
	NM_000059.3:c.7879A>T	p.Ile2627Phe	rs80359014	13: 32362596 (GRCh38) 13: 32936733 (GRCh37)	8107A>T
ILB2	NM_024675.3:c.172_175delTTGT	p.Gln60Argfs	rs180177143	16: 23637886-23637889 (GRCh38) 16: 23649207-23649210 (GRCh37)	NM_024675.3:c.168_171TTGT[1] 172_175delTTGT
	NM_024675.3:c.509_510delGA	p.Arg170Ilefs	rs515726123	16: 23636036-23636037 (GRCh38) 16: 23647357-23647358 (GRCh37)	509_510delGA 508_509delAG
ATM	NM_000051.3:c.5932G>T	p.Glu1978Ter	rs587779852	11: 108312424 (GRCh38) 11: 108183151 (GRCh37)	

5.3. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из периферической крови человека.

5.4. Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для качественного анализа.

5.5. Для диагностики *in vitro*. Только для профессионального применения.

6. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

6.1. Показания к проведению исследования: лица с онкологическим заболеванием (рак поджелудочной железы, рак молочной железы или рак яичников) с целью выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM*.

6.2. Противопоказаний к применению нет (пересадка костного мозга теоретически может влиять на результат анализа, в этом случае будут необходимы дополнительные исследования).

6.3. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

6.4. Возможные побочные эффекты: при использовании специально обученным персоналом, с учетом применения набора реагентов строго по назначению, при соблюдении мер предосторожности при работе с Набором реагентов, описанных в разделе 12, побочные эффекты отсутствуют.

7. КРАТНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для однократного дробного применения по назначению и рассчитан на 100 определений, включая положительные и отрицательные контроли. Один биологический микрочип предназначен для одного определения.

8. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОТРЕБИТЕЛЬ

Предназначенным пользователем является персонал клинико-диагностических лабораторий медицинских учреждений, имеющих лицензию на вид медицинской деятельности: клиническая лабораторная диагностика.

Специалисты с высшим медицинским образованием и квалификацией, соответствующей специальностям «Клиническая лабораторная диагностика», «Генетика», «Онкология» (в соответствии с квалификационными требованиями, установленными Приказом Минздрава России от 8 октября 2015 года N 707н, с изм. на 04.09.2020 г.); специалисты со средним медицинским образованием и квалификацией, соответствующей специальностям «Лабораторная диагностика», «Лабораторно дело» (в соответствии с квалификационными требованиями, установленными Приказом Минздрава России от 10 февраля 2016 года N 83н); специалисты с высшим биологическим образованием и квалификацией, соответствующей

профессиональному стандарту «Специалист в области клинической лабораторной диагностики» (в соответствии с квалификационными требованиями, установленными Приказом Министерства труда и социальной защиты РФ от 14 марта 2018 г. № 145н», окончившие соответствующие курсы специальной подготовки с освоением методов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) III-IV групп патогенности.

Как и в случае любых других диагностических тестов, все результаты анализа необходимо рассматривать совместно с остальной клинической информацией, доступной врачу.

Потенциальным потребителем являются клиничко-диагностические лаборатории онкологических центров.

9. ОПИСАНИЕ ИЗДЕЛИЯ. КОМПЛЕКТНОСТЬ.

9.1. Состав набора реагентов

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Комплект № 1 - для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и флуоресцентного маркирования			
Вода	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1500 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	720 мкл
дНТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	60 мкл
Полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	100 мкл
Смесь праймеров	Прозрачная голубая жидкость	1 пробирка	120 мкл
Положительный контроль «К+»*	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	70 мкл
Отрицательный контроль «К-»	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	70 мкл
Комплект № 2- для проведения гибридизации			
Состоит из трех подкомплектов			
Подкомплект 2А			
Гибридизационный компонент №1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1200 мкл
Промывочный буфер (x20)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	20 мл
Подкомплект 2Б			
Гибридизационный компонент №2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1200 мкл
Подкомплект 2В			
Биологические микрочипы	Черная пластиковая подложка размером с предметное стекло с пластиковой гибридизационной камерой	10 коробок	10 шт

* **Примечание:** Компонент «Положительный контроль «К+»», входящий в Комплект №1 набора реагентов «ГЕРДА- БИОЧИП», содержит ДНК человеческого происхождения. ДНК человеческого происхождения выделена из образца донорской крови с подтвержденным отсутствием маркеров сифилиса (IgG, IgM к *T. pallidum*), гепатита В (HBsAg), ВИЧ (антиген р24, суммарные антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2), гепатита С (IgG, IgM к ВГС) в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 22 июня 2019 г. N 797. При выделении ДНК образец крови донора подвергается инактивации¹¹ нагреванием при 60°C, 12 часов и дополнительной инактивации - лизису клеток крови с последующим протеолизом и получением доступа к геномной ДНК, проводимой с использованием «Комплекта реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года. Комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА предназначена для получения ДНК с целью последующего проведения генетических исследований выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), в качестве лизирующего агента используется гуанидин тиоцианат, который разрушает (инактивирует) вирусные частицы^{12, 13, 14}.

В комплект поставки входит Инструкция по применению – 1 шт. и Аналитический паспорт – 1 шт.

Все компоненты набора реагентов готовы к применению (дополнительно см. п. 15. Проведение анализа).

9.2. Число анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для однократного дробного применения по назначению и рассчитан на 100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных и отрицательных контролей.

9.3. Принцип метода

Метод: мультиплексная ПЦР с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе.

Принцип метода набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» основан на применении мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе.

В ходе ПЦР происходит амплификация целевых фрагментов ДНК с использованием специфичных праймеров, после чего с данных фрагментов синтезируются преимущественно одноцепочечные ПЦР-продукты, содержащие флуоресцентную метку для последующей регистрации результатов гибридизации на биологическом микрочипе.

Биологический микрочип представляет собой пластиковую подложку с иммобилизованными зондами (олигонуклеотидами), специфичными к определенным генетическим вариантам изучаемой ДНК. Регистрация результатов гибридизации проводится с помощью анализа флуоресценции меченного ПЦР-продукта, комплементарно связанного с зондами, иммобилизованными на биологическом микрочипе. Регистрация и интерпретация результатов осуществляется с использованием медицинского изделия «Комплекс универсальный аппаратно-программный (УАПК) для анализа биологических микрочипов по ТУ 9443-004-02699501-2006» (РУ № ФСР 2010/08002 от 13 января 2020г.).

Исследование с использованием набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), мультиплексная полимеразная цепная реакция с одновременным введением флуоресцентной метки в ПЦР-продукт, гибридизация ПЦР-продукта с биологическим микрочипом, регистрация результатов гибридизации.

Реагенты для выделения ДНК не включены в состав набора реагентов. Выделение ДНК проводят с использованием «Комплекта реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года).

9.4. Время проведения анализа (без учета пробоподготовки) – от 22 до 24 часов.

9.5 Целевой анализ 23 герминальные мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* в ДНК, выделенной из цельной периферической крови человека.

10. АНАЛИТИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

10.1 Аналитическая эффективность. Аналитическую чувствительность производитель определял как частоту совпадения обнаружения мутаций в образцах стандартной панели предприятия, содержащих мутации из Таблицы пункта «НАЗНАЧЕНИЕ». Определение частоты совпадения обнаружения мутаций с использованием набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» проводили путем тестирования образцов стандартной панели предприятия, содержащих известные мутации (перечислены в таблице раздела «НАЗНАЧЕНИЕ»).

Мутации (перечислены в таблице раздела «назначение»)	Аналитическая чувствительность (кол-во образцов с выявленными мутациями/кол-во исследуемых образцов), %
23 герминальных мутации (стандартная панель предприятия на основе ДНК человека) О ДНК СПП	100 (23/23)
23 герминальные мутации (стандартная панель предприятия на основе плазмид) О СПП П	100 (23/23)

10.1.1 Предел обнаружения

Определение предела обнаружения производитель проводил в разведениях образцов стандартной панели предприятия, содержащих известные мутации (перечислены в Таблице раздела «НАЗНАЧЕНИЕ»). Исследовали разведения в концентрациях плюс минус 50% от предела обнаружения.

Предел обнаружения – 5 нг/ мкл (10,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку).

При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу набора реагентов. В образцах с недостаточным количеством ДНК (менее 10,0 нг на амплификационную пробирку) после завершения реакции амплификации и гибридизации может регистрироваться недостоверный результат.

10.1.2 Аналитическая специфичность

Определение аналитической специфичности набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» производитель проводил путем тестирования образцов стандартной панели предприятия.

Смесь праймеров, входящая в состав набора реагентов, специфично амплифицирует только целевые локусы генов *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* человеческого генома. Зонды, иммобилизованные на биологическом микрочипе, специфичны только к мутациям, указанным в назначении набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП».

10.1.3 Интерферирующие вещества

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» было проведено исследование влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале. Для проведения испытаний использовались образцы периферической крови, содержащие потенциально интерферирующие вещества (гемоглобин, билирубин общий, общие триглицериды) в пределах физиологических концентраций. Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале, каждое из перечисленных веществ испытывалось в максимальной концентрации, которая, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов, а так же в концентрации, превышающей нормальное содержание этих веществ в биоматериале, с целью установления концентрации, влияющей на результат работы набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП».

Результаты приведены в Таблице:

Интерферирующие вещества	Концентрация, соответствующая верхней границе физиологических концентраций потенциально интерферирующих веществ в биоматериале	Установленные концентрации потенциально интерферирующих веществ, влияющие на результат работы набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП»
Гемоглобин	165 г/л	400 г/л
Билирубин общий	20,5 мкмоль/л	500 мкмоль/л
Триглицериды	2,25 ммоль/л	50 ммоль/л

Каждое вещество добавлялось к образцам периферической крови до достижения заданных концентраций. Такой образец подвергался выделению ДНК («Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующей форме комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года) и генотипированию с помощью набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП». По результатам сравнения генотипов, полученных при использовании набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» и генотипов, полученных секвенированием по Сэнгеру, делался вывод о влиянии потенциально интерферирующих веществ на набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП». Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые соответствуют физиологическим концентрациям в биоматериале, не влияют на способность набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» определять генотип исследуемого образца ДНК. Влияние потенциально интерферирующих веществ на результат работы набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» установлено только при увеличении концентрации веществ до концентраций, превышающих их известную максимальную концентрацию в биоматериале.

10.1.4 Оценка перекрестной реактивности

Не применимо. Последовательность праймеров подбиралась, опираясь на данные базы NCBI. Специфичность праймеров подтверждена на основе поиска гомологичных последовательностей в геноме человека с помощью online инструмента Primer-BLAST [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. По результатам анализа каждая пара праймеров отжигается только в одном месте генома человека, что свидетельствует об их специфичности.

10.2 Клиническая эффективность.

При проведении клинико-лабораторных испытаний набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» (сравнение с результатами, полученными секвенированием методом Сенгера на «Анализаторе генетическом Applied Biosystems 3500, с принадлежностями: варианты исполнений: Applied Biosystems 3500XL», производства "Лайф Текнолоджис Корпорейшн", США, РУ № ФСЗ 2010/07007 от 14 октября 2016 г.) получены следующие диагностические характеристики:

Диагностическая чувствительность: 98,7 % (320/324) CI_{0,05}: 96,86-99,51

Диагностическая специфичность: 100,00% (75/75) CI_{0,05}: 95,12 – 100,0

11. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ ЗНАЧЕНИЙ, ЗАДАНЫХ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ.

Генотип положительного контроля «К+» и образцов ДНК стандартной панели предприятия, которые используются для определения аналитической чувствительности, воспроизводимости, прецизионности анализа с использованием набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП», был определен секвенированием по Сэнгеру.

12. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 26 (Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н).

По токсикологическим показателям безопасности все составные части, входящие в состав набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП», относятся к 4-му классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 (Вредные вещества. Классификация и

общие требования безопасности) за исключением Гибридизационного компонента №2, который относится к 3-му классу опасности.

Только для профессионального применения. Работу следует проводить в специально оборудованном помещении лаборатории, отвечающей требованиям санитарных правил и норм СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». При работе с набором реагентов требуется соблюдать «Инструкцию по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденную Минздравом СССР 17 января 1991 года; ГОСТ Р 52905–2007 (ИСО 15190:2003) «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и требованиям санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

К работе с набором реагентов допускается только квалифицированный специалист, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

Кровь человека, использованная для приготовления положительного контроля «К+», тестирована и считается нереактивной к маркерам возбудителя сифилиса (IgG, IgM к *T. pallidum*), гепатита В (HBsAg), ВИЧ (антиген р24, суммарные антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2), гепатита С (IgG, IgM к ВГС), протестировано тест-системами, зарегистрированными в РФ в установленном порядке) в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 22 июня 2019 г. N 797. Кровь человека инактивирована как указано в п. «24. Информация о наличии в медицинском изделии лекарственного средства для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения».

Ни один из известных методов тестирования не может дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов. По этой причине, с человеческой кровью и всеми ее производными, реагентами и образцами человеческого происхождения, в том числе с Положительным контролем «К+» следует обращаться как с потенциально инфицированным материалом, в соответствии с универсальными мерами предосторожности для переносимых с кровью патогенов, что определено местными, региональными и национальными нормативами.

При работе следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

С целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб, помещений и оборудования необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ.

Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Учитывая специфику проведения анализа с использованием набора реагентов, согласно МУ 1.3.2569—09 лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий перечень последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон (помещений) или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений:

- приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала (рабочая зона 1);

- выделения нуклеиновых кислот (рабочая зона 2);
- проведения реакции амплификации (рабочая зона 3):
- приготовление реакционных смесей (подзона 3а);
- амплификация нуклеиновых кислот (подзона 3б);
- учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот на биологических микрочипах (рабочая зона 4).

Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II-III класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах. Рекомендуется разнесение зон 3а и 3б по разным помещениям.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы, используемые при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Каждая манипуляция после её завершения обязательно должна сопровождаться сменой наконечников для дозаторов. Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств.

Открытие пробирок, содержащих продукты ПЦР, допустимо только в рабочей зоне 4.

При возникновении контаминации в помещениях лаборатории немедленно останавливают работы и проводят мероприятия по ликвидации контаминации, после чего проводят внутрилабораторный контроль качества дезинфекции и проведенной деконтаминации ампликонов путём исследования смывов с рабочих поверхностей оборудования и поверхностей помещений.

Отходы биоматериала (инфицированные или потенциально инфицированные), образцы после пробоподготовки, ПЦР и гибридизации, образующиеся в клиничко-диагностических лабораториях, относятся к классу Г, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Опасные компоненты в наборе реагентов:

Наименование компонента	Опасный компонент	Указание на риски
Гибридизационный компонент №2	Формамид	Токсичен. По токсическому эффекту формамид напоминает диметилформамид: способен проникать через неповреждённую кожу, раздражает кожу и слизистые оболочки, имеет общетоксическое и эмбриотоксическое действие, вызывает поражение печени, нервной и сердечно-сосудистой системы, может накапливаться в организме. При хроническом действии метаболиты формамида имеют гепатотоксический эффект, усиливающийся в присутствии ацетона и этанола.

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно

вымывать руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. С гибридным компонентом №2 следует работать в вытяжном шкафу.

При аварийных ситуациях возможно следующее:

- компоненты набора реагентов, не содержащие опасных веществ: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

- Гибридный компонент №2, содержащий формамид:

Воздействие	Симптомы	Профилактические меры	Первая помощь
Вдыхание	Сонливость, головная боль, тошнота, диарея	Применять вентиляцию, местную вытяжку или средства защиты органов дыхания	Свежий воздух, покой. Обратиться за медицинской помощью
Кожа	Покраснение	Защитная одежда, защитные перчатки	Снять загрязненную одежду. Промыть кожу большим количеством воды или принять душ
Глаза	Покраснение	Использовать маску для лица	Промыть большим количеством воды в течение нескольких минут (снять контактные линзы, если это возможно сделать без затруднений)
Проглатывание	См. вдыхание	Не принимать пищу, напитки и не курить во время работы	Прополоскать рот. Обратиться за медицинской помощью

Избегать попадания Гибридного компонента №2 в окружающую среду. Утилизировать содержимое/контейнер в соответствии с местными, региональными, государственными и международными правилами.

Все промывные растворы следует собирать в специальный контейнер и обрабатывать дезинфицирующими средствами, разрешенными для применения на территории РФ в установленном порядке.

Все твердые отходы следует собирать в специальный контейнер, обеззараживать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Лабораторную посуду многоразового использования и расходные материалы, контактирующие с исследуемыми и контрольными образцами, следует обеззараживать с использованием дезинфицирующих средств, не содержащих активный кислород и хлор, оказывающих негативное воздействие на качество анализа.

Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо протирать 70 % раствором этилового спирта.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;

– по истечению срока годности.

Применять набор реагентов строго по назначению, согласно данной инструкции.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

12.1 Ограничения

– Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

– Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом: ДНК, выделенной из периферической крови человека. Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

– Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала.

– Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

13. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ.

Организация работы ПЦР- лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Перечень рекомендуемого оборудования и материалов для каждой зоны:

13.1. Рабочая зона 1: приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала

13.1.1. Бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты;

13.1.2. Центрифуга для пробирок объемом 5—100 мл до 3 тыс. об./мин.;

13.1.3. Микроцентрифуга/вортекс;

13.1.4. Настольная центрифуга для микропробирок типа Eppendorf (Эппендорф) объемом 1,5—2 мл до 10 000 g;

13.1.5. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °C;

13.1.6. Термостатируемый шейкер;

13.1.7. Установка для фильтрации воды с набором фильтров.

13.1.8. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл.

13.1.9. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 или 2,0 мл типа Eppendorf (Эппендорф).

13.1.10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1 000 мкл.

13.1.11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл;

13.1.12. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °C и от –18 до –25 °C. Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °C, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от –18 до –25 °C.

13.1.13. Морозильная камера на –70 °C (при необходимости, в случае длительного хранения материала).

13.1.14. Емкость с регламентируемым дезинфицирующим раствором.

13.1.15. Емкость с 70 %-м этиловым спиртом.

13.2. Рабочая зона 2: выделение нуклеиновых кислот

- 13.2.1. Бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты;
- 13.2.2. Микроцентрифуга/вортекс;
- 13.2.3. Настольная центрифуга для микропробирок типа Eppendorf (Эппендорф) объемом 1,5—2 мл до 10 000 g;
- 13.2.4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °C;
- 13.2.5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.
- 13.2.6. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл;
- 13.2.7. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл;
- 13.2.8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1 000 мкл;
- 13.2.9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл без фильтра;
- 13.2.10. Штативы для наконечников, микропробирок;
- 13.2.11. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °C и от -18 до -25 °C. Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °C, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от -18 до -25 °C.
- 13.2.12. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °C (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот;
- 13.2.13. Флуориметр, например Qubit 4 Fluorometer (Кьюбит 4 Флуориметр), производства Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США («Инвитроджен», «Термо Фишер Сайнтифик», США), номер по каталогу Q33226;
- 13.2.14. Емкость с дезинфицирующим раствором.
- 13.2.15. Маркеры водостойкие.
- 13.2.16. Пинцет медицинский.
- 13.2.17. Отдельный халат, шапочки, обувь, защитные очки и одноразовые перчатки.
- 13.2.18. Набор для выделения геномной ДНК, зарегистрированный в установленном порядке в Российской Федерации (например, «Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года).

13.3. Рабочая зона 3: проведение реакции амплификации

- 13.3.1. Подзона 3а: приготовление реакционных смесей.
 - 13.3.1.1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс);
 - 13.3.1.2. Микроцентрифуга/вортекс;
 - 13.3.1.3. Настольная центрифуга для микропробирок типа Eppendorf (Эппендорф) объемом 1,5—2 мл; Скорость вращения ротора до 16000 об/мин. (18000g).
 - 13.3.1.4. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл;
 - 13.3.1.5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,2 мл;
 - 13.3.1.6. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа Eppendorf (Эппендорф) объемом 1,5 и 2 мл;

13.3.1.7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл, свободные от РНКаз;

13.3.1.8. Штативы для микропробирок на 0,2, 1,5 и 2 мл;

13.3.1.9. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от -18 до -25 °С. Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от -18 до -25 °С.

13.3.1.10. Емкость для сброса отработанных расходных материалов;

13.3.2. **Подзона 3б:** амплификация нуклеиновых кислот.

13.3.2.1. Программируемый термоциклер для пробирок объемом 0,2 мкл с функцией горячей крышки;

13.4. Рабочая зона 4: учет результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот на ДНК-чипах

13.4.1. Мерный цилиндр объемом 100 мл.

13.4.2. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 или 2,0 мл;

13.4.3. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл;

13.4.4. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл;

13.4.5. Одноразовые наконечники с фильтром для пипеток переменного объема в штативах до 20, 100, 200 и до 1 000 мкл;

13.4.6. Настольная центрифуга для микропробирок типа Eppendorf (Эппендорф) объемом 1,5—2 мл;

13.4.7. Микроцентрифуга/вортекс для пробирок объемом 0,2, 1,5 и 2 мл;

13.4.8. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой (не обязательно);

13.4.9. Вытяжной шкаф, оснащенный УФ-лампами;

13.4.10. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С;

13.4.11. Емкость с дезинфицирующим раствором для сброса отработанных расходных материалов;

13.4.12. Пинцет медицинский;

13.4.13. Отдельный халат, шапочки, защитные очки, обувь и одноразовые перчатки;

13.4.14. Емкость Хеллендаля;

13.4.15. Промывалка лабораторная;

13.4.16. Груша медицинская;

13.4.17. Комплекс универсальный программно-аппаратный УАПК с программным обеспечением по ТУ 9443-004-02699501-2006» (РУ № ФСР 2010/08002 от 13 января 2020г.) (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

Перечень необходимых, но не предоставляемых с набором реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» материалов, реагентов, оборудования, представлен в Таблице:

Перечень необходимых, но не предоставляемых материалов, реагентов, оборудования	Сведения о регистрационном удостоверении
Бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты	«Бокс лабораторный с УФ лампой для проведения полимеразной цепной реакции БЛ-ПЦР по ТУ 9452-009-46482062-2013» (РУ № РЗН 2015/3193 от 16 октября 2015 г.), производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия.
Комплекс универсальный программно-аппаратный	«Комплекс универсальный программно-аппаратный УАПК с программным обеспечением по ТУ 9443-004-02699501-2006»

Перечень необходимых, но не предоставляемых материалов, реагентов, оборудования	Сведения о регистрационном удостоверении
УАПК с программным обеспечением	(ПУ № ФСР 2010/08002 от 13 января 2020г.), производства ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия
Программируемый термоциклер для пробирок объемом 0,2 мкл с функцией горячей крышки	«Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот T100 (T100 Thermal Cycler)» (ПУ № ФСЗ 2012/12788 от 21 июня 2016 г.), производства Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США)
Центрифуга для пробирок объемом 5—100 мл до 3 тыс. об./мин.	«Центрифуга лабораторная многофункциональная 5702 с принадлежностями» (ПУ № ФСЗ 2009/04412 от 11 ноября 2013г.), производства Eppendorf AG, Germany ("Эппендорф АГ", Германия)
Настольная центрифуга для микропробирок типа Eppendorf (Эппендорф) объемом 1,5—2 мл	«Микроцентрифуги серии Microfuge 20 с принадлежностями» (ПУ № РЗН 2018/6735 от 22 января 2018г.), производства Beckman Coulter, Inc., USA («Бекмен Культер, Инк.»), США
Микроцентрифуга – вортекс	Микроспин FV 2400 (BS-010201-AAA, производства BioSan («БИОСАН», Латвия)
Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100°C	«Термостат твердотельный программируемый ДТтерм по ТУ 32.50.50-002-96301278-2018» (ПУ № РЗН 2019/9449 от 26.12.2019), производства ООО "НПО ДНК-Технология", Россия
Термостатируемый шейкер	«Шейкеры-термостаты медицинские серии ST: ST-3М» (ПУ № РЗН 2016/5185 от 26 декабря 2016г.), производства Латвия, SIA "ELMI" (Сиа «ЭЛМИ»)
Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл	«Дозатор пипеточный механический одноканальный или многоканальный Sartorius с принадлежностями в вариантах исполнения: XIII. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Proline Plus с фиксированным объемом дозирования 5 мкл. XIV. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Proline Plus с фиксированным объемом дозирования 10 мкл. XV. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Proline Plus с фиксированным объемом дозирования 20 мкл. XVIII. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Proline Plus с фиксированным объемом дозирования 100 мкл. XIX. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Proline Plus с фиксированным объемом дозирования 200 мкл. XXII. Дозатор пипеточный механический 1-канальный Proline Plus с фиксированным объемом дозирования 1000 мкл.», (ПУ № РЗН 2019/9356 от 12 декабря 2019 года); производства «Sartorius Biohit Liquid Handling Oy» («Сарториус Биохит Ликвид Хандлинг Ой»); Финляндия
Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром	«Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем: 4. Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл, в штативе» (ПУ ФСЗ 2012/12077 от 27.02.2014), производства Axugen, Inc. (Эксиджен, Инк.) США.
Одноразовые наконечники для пипеток переменного	«Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных

Перечень необходимых, но не предоставляемых материалов, реагентов, оборудования	Сведения о регистрационном удостоверении
объема без фильтра	систем: 2. Наконечники универсальные для дозаторов объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл, в штативе» (ПУ ФСЗ 2012/12077 от 27.02.2014), производства Axugen, Inc. (Эксиджен, Инк.) США.
Одноразовые полипропиленовые пробирки типа Eppendorf (Эппендорф) объемом 0,2, 1,5 и 2 мл	«Изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro: 1. Пробирки Safe-Lock с защелкой объемом от 0,5мл до 2,0мл (Safe-Lock tubes 0,5-2,0ml)» (ПУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009), производства Eppendorf AG, Germany ("Эппендорф АГ", Германия).
Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,2 мл	«Изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro: 18. Пробирки для ПЦР 0,2,5мл (Tube PCR 0,2 /0,5 ml)» (ПУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009), производства Eppendorf AG, Germany ("Эппендорф АГ", Германия).
Штативы для пробирок объемом 0,2- 50 мл	«Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro: 15. Штативы для хранения и транспортировки пробирок, криопробирок объемом от 0,2 мл до 50 мл.» (ПУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017), Производства Scientific Specialties Incorporated (SSI), USA ("Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтед (ЭсЭсАй)", США)
Набор для выделения геномной ДНК	«Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ПУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года), производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия
Перчатки медицинские нестерильные	«Перчатки медицинские диагностические одноразовые "Meditech"» (ПУ № РЗН 2014/2231 от 13.01.2015), производства A1 Glove Sdn Bhd., Malaysia ("А1 Глов Сдн Бхд"), Малайзия
Халат, шапочка, бахилы	«Одежда медицинская из нетканного термосклеенного полотна и полимерного материала, одноразовая, нестерильная» (ПУ № ФСЗ 2011/10269 от 13.10.2011), производства «ЛЕБОО ХЕЛСКЭА ПРОДАКТС ЛИМИТЕД», Китай.
Емкость Хеллендаля	«Изделия медицинские для лабораторных исследований стеклянные «APEXLAB»: 22. Емкости для окрашивания предметных стекол» (№ ФСЗ 2011/10371 от 18 августа 2011г.), производства Yancheng Huida Medical Instruments Co., Ltd., (Ян-ченг Хуида Медикл Инструментс Ко., Лтд.), Китай
Емкость для сброса отходов	«Емкости-контейнеры для медицинских отходов классов А, Б, В, Г "ОЛДАНС" по ТУ 9398-002-55058819-2010» (ПУ № ФСР 2010/09367 от 27.02.2014), производства ЗАО «ОЛДАНС», Россия
Флуориметр	Флуориметр Qubit 4 Fluorometer (Кьюбит 4 Флуориметр), производства Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США («Инвитроджен», «Термо Фишер Сайнтифик», США), номер по каталогу Q33226
Холодильник с камерами, поддерживающими	Производитель: Индезит, Италия. Модель: ES 20.

Перечень необходимых, но не предоставляемых материалов, реагентов, оборудования	Сведения о регистрационном удостоверении
температуру от 2 до 8 °С и от -18 до -25 °С.	Кат.№ SB 185.027
Мерный цилиндр объемом 100 мл	-
Груша медицинская	Груша (спринцовка) резиновая мед. А №3, без упаковки, 90-110 мл, ООО «Хем Экспресс», Россия
Пинцет	REXANT (Рексант), Китай
Промывалка лабораторная	Burkle (Бюркле) лабораторная бутылка-промывалка с широким горлышком из жёлтого ПЭНП и защитой от солнца объемом 500 мл, Bürkle GmbH (Бюркле) ГмБХ
Безворсовая салфетка	-
Маркер водостойкий	-

14. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

14.1. Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

14.2. Взятие цельной периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette (Вакуэтт, США) объемом 2,0 или 4,0 мл с антикоагулянтом К2-ЭДТА. Для перемешивания периферической крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2 – 3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

14.3. Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение 6 месяцев.

14.4. Степень фрагментации и деградации ДНК матрицы важна при амплификации. Оптимальной является матрица, хранившаяся не более 1 месяца при +4 °С без заморозки. Не рекомендуется многократно замораживать и размораживать матрицу во избежание ее деградации и фрагментации.

15. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

15.1. Выделение ДНК из периферической крови пациента (Рабочая зона 2)

15.1.1. Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов для выделения ДНК («Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (РУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года), производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

15.1.2. После выделения измерить концентрацию ДНК с помощью флуориметра согласно инструкции по применению прибора.

15.2. Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР (Рабочая зона 3а)

15.2.1. Для работы потребуются следующие реагенты Комплекта №1: Вода, ПЦР-буфер, дНТФ, Полимераза, Смесь праймеров, Отрицательный контроль «К-», Положительный контроль «К+».

15.2.2. Разморозить реагенты на льду:

- Вода;
- ПЦР-буфер;
- дНТФ;

- Смесь праймеров;
- Отрицательный контроль «К-»;
- Положительный контроль «К+»
- Анализируемые образцы ДНК

15.2.3. Тщательно перемешать их на вортексе и удалить со стенок пробирок капли смеси краткосрочным центрифугированием.

15.2.4. Поместить реагенты и анализируемые образцы ДНК в лед, доставая непосредственно перед их добавлением в реакционную смесь. Не рекомендуется многократное размораживание и замораживание реагентов. Полимеразу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

15.2.5. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР, внося в промаркированную пробирку объемом 1,5 мл, следующие реагенты:

Реагент	Объем, мкл
Вода	14,7 мкл x (N+3)*
ПЦР-буфер	6 x (N+3)
дНТФ	0,5 x (N+3)
Полимераза	0,8 x (N+3)
Смесь праймеров	1 x (N+3)

* (N+3) – где N- число анализируемых проб, не считая Положительного контроля «К+» и Отрицательного контроля «К-». Рекомендуется постановка положительного и отрицательного контролей на каждую постановку серии образцов.

15.2.6. Полученную реакционную смесь тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).

15.2.7. Внести по 23 мкл полученной смеси в пробирки (объемом 0,2 мл), промаркированные К-, К+, 1, 2 ..., N.

15.2.8. В пробирку, промаркированную К-, внести 2 мкл Отрицательного контроля «К-», пробирку плотно закрыть.

15.2.9. В пробирку с реакционной смесью, промаркированную К+, внести 2 мкл Положительного контроля «К+», пробирку плотно закрыть.

15.2.10. В пробирки, промаркированные 1, 2,..., N, внести по 2 мкл ДНК соответствующего анализируемого образца. Закрывать пробирки стоит непосредственно после внесения образца ДНК.

Внимание! Концентрация ДНК в анализируемых образцах должна находиться в диапазоне от 5 до 100 нг/мкл.

15.2.11. Сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).

15.3. Амплификация нуклеиновых кислот (Рабочая зона 3б)

15.3.1. Поместить пробирки (п.15.2.11) в амплификатор и провести амплификацию, используя приведенный ниже температурно-временной режим.

Температура, °С	Время, сек.	Количество циклов
95	120	1
95	30	50
65	60	
72	20	
95	20	50
52	30	
72	30	
72	300	1
4	∞	-

15.3.2. В процессе ПЦР у амплификатора должна быть включена функция «горячая крышка».

15.4. Проведение гибридизации (Рабочая зона 4)

15.4.1. Для работы потребуется Комплект №2.

15.4.2. По окончании программы амплификации сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).

15.4.3. Подготовить пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл.

15.4.4. Приготовить смесь для гибридизации: в пробирку объемом 1,5 мл внести Гибридизационный компонент №1 в объеме $10 \times (N+3)$ мкл и Гибридизационный компонент №2 в объеме $10 \times (N+3)$ мкл, где N- количество анализируемых проб.

15.4.5. Тщательно перемешать и сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).

15.4.6. Для каждого анализируемого образца подготовить пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Промаркировать пробирки «К-», «К+», 1, 2,...N, где N – количество анализируемых образцов.

15.4.7. Внести по 20 мкл смеси для гибридизации (п.15.4.5) в промаркированные пробирки (п.15.4.6).

15.4.8. Внести по 20 мкл ПЦР-продукта (п.15.4.2) в соответствующие пробирки, промаркированные в п.15.4.6.

15.4.9. Тщательно перемешать и сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).

15.4.10. Подготовить биологические микрочипы (в количестве N+2) и промаркировать «К-», «К+», 1, 2,...N.

15.4.11. Взять биологический микрочип, промаркированный «К-». Открыть камеру, наклонить чип под углом от 30 до 90 градусов и внести 35 мкл смеси из пробирки «К-» (п.15.4.9) внутрь гибридизационной камеры через нижнее отверстие, после чего плотно закрыть крышку. При заполнении следует избегать образования воздушных пузырей внутри камеры. Аналогичным образом внести смесь из остальных пробирок п.15.4.9 в гибридизационные камеры соответствующих биологических микрочипов.

15.4.12. Заполненные биологические микрочипы инкубировать при 37°C в течение 12-18 часов в суховоздушном термостате.

15.4.13. По окончании гибридизации проводится отмывка биологических микрочипов.

***Предупреждение.** Отмывку биологических микрочипов рекомендуется проводить в вытяжном шкафу, оснащенном УФ-лампой с целью предотвращения контаминации ПЦР-продуктами. Для сброса наконечников дозаторов, использующихся при отмывке, рекомендуется использовать отдельную емкость с крышкой (спецрезервуар), содержащую раствор, вызывающий деградацию ДНК (0,1N раствор соляной кислоты, 3% раствор хлорамина или аналоги). Все наконечники, используемые на данной стадии, должны быть сброшены в данный резервуар.*

15.4.14. Приготовить x1 Промывочный буфер для отмывки биологических микрочипов после гибридизации: 2 мл Промывочного буфера (x20) добавить к 38 мл дистиллированной воды, перемешать и налить в емкость Хеллендаля.

15.4.15. Удалить реакционную смесь через любое из двух отверстий гибридизационной камеры.

Внимание! Наконечник содержит раствор с непрогибризованными ПЦР-продуктами. Незамедлительно сбросить данный наконечник в спецрезервуар, содержащий раствор, вызывающий деградацию ДНК. Для удаления раствора из камеры биологического микрочипа можно использовать вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.

15.4.16. Аккуратно отсоединить гибридизационную камеру от подложки биологического микрочипа. Незамедлительно сбросить гибридизационную камеру в спецрезервуар, содержащий раствор, вызывающий деградацию ДНК.

15.4.17. Биологический микрочип поместить в емкость Хеллендаля с раствором x1 Промывочного буфера (п.15.4.14) так, чтобы область биологического микрочипа, содержащая иммобилизованные ячейки, была погружена в буфер. Инкубировать при комнатной температуре (плюс 18-25⁰С) в течение 10 мин.

15.4.18. Промыть поверхность биологического микрочипа дистиллированной водой над емкостью для отходов. Для промывки биологического микрочипа можно использовать промывалку лабораторную.

15.4.19. Высушить биологический микрочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки, особенно в зоне гелевых ячеек, для просушки можно использовать пустую промывалку (пластиковый диспенсер) или грушу медицинскую. Высушенные биологические микрочипы хранить в сухом темном месте при комнатной температуре.

15.4.20. По окончании отмывки провести облучение ультрафиолетом внутри ПЦР-бокса. Время облучения должно составлять не менее 15 минут.

15.5. Интерпретация результатов анализа (Рабочая зона 4)

15.5.1. Учет результатов проводят с использованием Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов, по ТУ 9443-004-02699501-2006 (РУ № ФСР 2010/08002 от 13 января 2020г.). Регистрацию результатов гибридизации осуществляют в соответствии с Руководством по эксплуатации УАПК.

15.5.2. Произвести запуск программы «ImaGel Studio», версия 1.0 и выше.

15.5.3. Программа содержит три вкладки в правой части окна: «Шаблон», «Снимок» и «Отчет» (Рис.1).

15.5.4. При первом запуске программы выбрать шаблон биологического микрочипа путем нажатия кнопки «Открыть шаблон» и выбора файла с нужным названием, соответствующему сокращенному названию набора реагентов, с расширением «.tpl». При повторных запусках программа автоматически загружает последний загруженный шаблон и отображает его как показано на Рис.1.

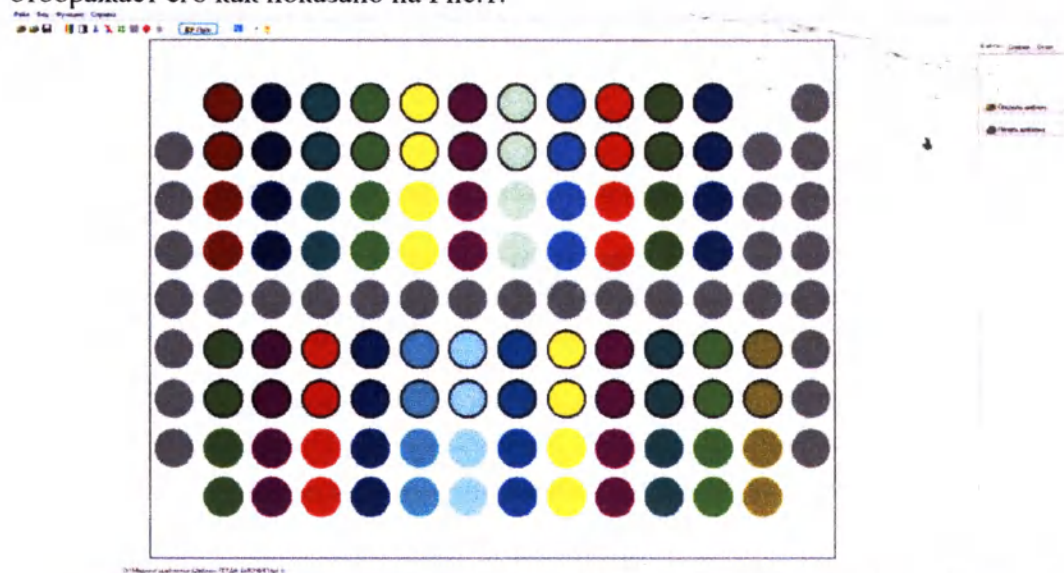


Рисунок 1. Диалоговое окно режима «Шаблон». Загружен шаблон ГЕРДА-БИОЧИП.tpl. При наведении курсора на ячейку выводится информация с обозначением находящегося в ней зонда. Белым цветом обозначены маркерные элементы, содержащие флуоресцентный краситель, которые светятся перманентно.

15.5.5. Анализ результатов гибридизации начинают с отрицательного контроля амплификации. Биологический микрочип «К-» (п.15.4.19) поместить в приемник Комплекса УАПК стороной, содержащей гелевые ячейки, вперед и сверху.

15.5.6. Анализ флуоресцентной картины гибридизации осуществляется в автоматическом режиме. Для этого следует нажать пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части диалогового окна (Рис. 1). При этом происходит возбуждение флуоресценции ячеек биологического микрочипа, получение флуоресцентного изображения, автоматическое наложение шаблона на ячейки биологического микрочипа, обсчет сигналов и выдача текстового сообщения. Программа выдает заключение по каждому из 23 анализируемых маркеров, указывая при этом следующую информацию: название гена, транскрипт, нуклеотидную замену, аминокислотную замену и результат анализа (обнаружена или не обнаружена мутация). В случае обнаружения мутации в гетерозиготном состоянии в соответствующей строке будет выдано сообщение «обнаружена мутация».

15.5.7. При анализе биологического микрочипа «К-» флуоресцентные сигналы должны присутствовать только в ячейках, соответствующих маркерным элементам.

При анализе биологического микрочипа «К-» программой «ImaGel Studio» должно быть выдано следующее сообщение (Рис. 2):

BRCA1 NM_007294.3:c.66_67AG[1] (p.Glu23Valfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.181T>G (p.Cys61Gly) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.1961delA (p.Lys654Serfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.3695_3699GTAAA[1] (p.Val1234Glnfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.3752_3755GTCT[1] (p.Ser1253Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.4035delA (p.Glu1346Lysfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.5161C>T (p.Gln1721Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.5251C>T (p.Arg1751Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA1 NM_007294.3:c.5266dupC (p.Gln1756Profs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.752_753insAG (p.Asp252Glnfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.1010_1011insTG (p.Asp339Leufs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.2808_2811delACAA (p.Ala938Profs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.5286T>G (p.Tyr1762Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.5586delG (p.Lys1863Asnfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.5718_5719CT[2] (p.Leu1908Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.5946delT (p.Ser1982Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.6070C>T (p.Gln2024Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.6298C>T (p.Gln2100Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.6998dupT (p.Pro2334Thrfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
BRCA2 NM_000059.3:c.7879A>T (p.Ile2627Phe) низкий уровень флуоресцентного сигнала
PALB2 NM_024675.3:c.172_175delTTGT (p.Gln60Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
PALB2 NM_024675.3:c.509_510delGA (p.Arg170Phefs) низкий уровень флуоресцентного сигнала
ATM NM_000051.3:c.5932G>T (p.Glu1978Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала.

Примечание: В случае вывода сообщения «Позиции ячеек не найдены. Сделайте это вручную»:

- наведите курсор на левую нижнюю маркерную ячейку;
- кликните правой кнопкой мыши и выберите «Установить ячейку 1,1»;
- кликните правой кнопкой мыши на правую нижнюю маркерную ячейку и выберите «Установить ячейку Nx,1»;
- нажмите последовательно на значки «Коррекция сетки», «Вычислить сигналы», расположенные в правой части окна программы;
- нажмите на вкладку «Отчет» в правом верхнем углу окна программы.

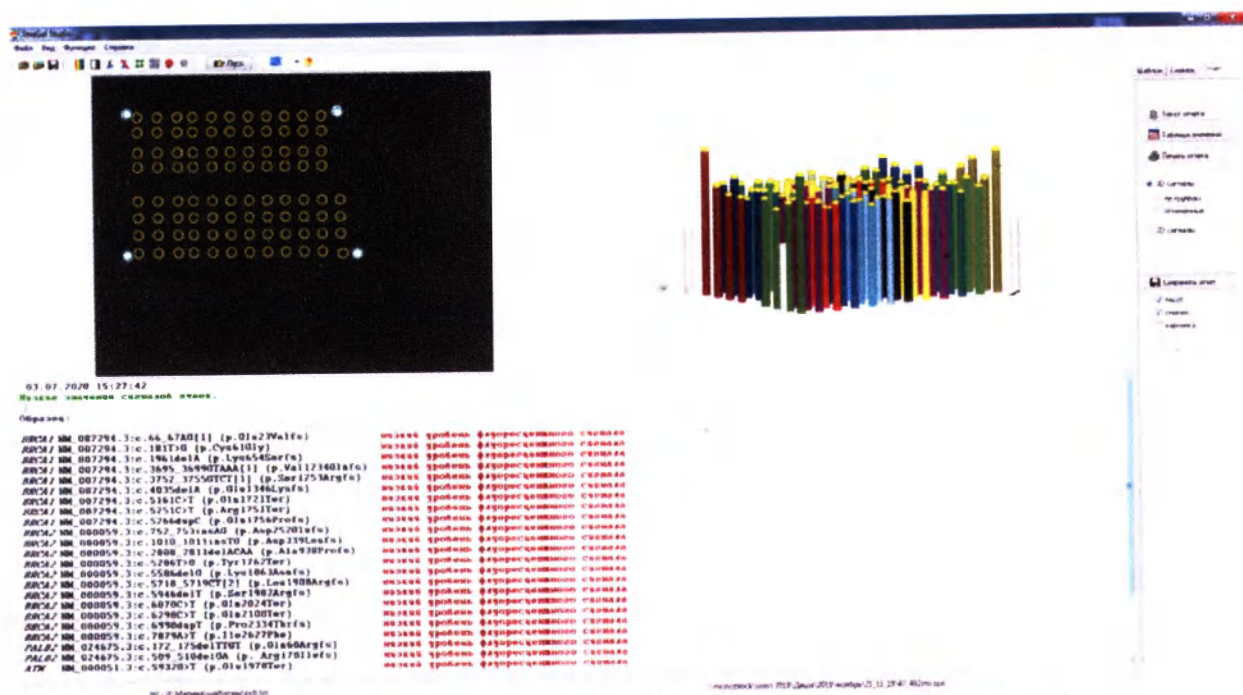


Рисунок 2. Диалоговое окно режима «Отчет» при анализе Отрицательного контроля «К-».

15.5.8. В случае наличия флуоресцентных сигналов в ячейках биологического микрочипа, содержащих зонды, и вывода иного сообщения, например, по одной или нескольким строчкам сообщения вместо «низкий уровень флуоресцентного сигнала» будет выдана надпись: «генотип не определен», «мутация не обнаружена» или «обнаружена мутация», анализ результатов остальных образцов признается недействительным. Данное обстоятельство может свидетельствовать о контаминации реакционной смеси продуктами ПЦР в результате несоблюдения мер предосторожности при работе в лаборатории (см. п.12). Следует провести антиконтаминационные мероприятия и повторить всю процедуру анализа заново. Если после проведения повторного анализа в тех же содержащих зонды ячейках биологического микрочипа «К-», снова наблюдается флуоресцентный сигнал, то это может свидетельствовать о загрязнении продуктами ПЦР реактивов из комплекта №1. Следует сменить реактивы.

15.5.9. При анализе биологического микрочипа, соответствующего Положительному контролю «К+», программой «ImaGel Studio» должно быть выдано следующее сообщение (Рис. 3):

BRCA1 NM_007294.3:c.66_67AG[1] (p.Glu23Valfs) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.181T>G (p.Cys61Gly) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.1961delA (p.Lys654Serfs) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.3695_3699GTAA[1] (p.Val1234Glnfs) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.3752_3755GTCT[1] (p.Ser1253Argfs) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.4035delA (p.Glu1346Lysfs) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.5161C>T (p.Gln1721Ter) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.5251C>T (p.Arg1751Ter) мутация не обнаружена
 BRCA1 NM_007294.3:c.5266dupC (p.Gln1756Profs) **обнаружена мутация**
 BRCA2 NM_000059.3:c.752_753insAG (p.Asp252Glnfs) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.1010_1011insTG (p.Asp339Leufs) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.2808_2811delACAA (p.Ala938Profs) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.5286T>G (p.Tyr1762Ter) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.5586delG (p.Lys1863Asnfs) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.5718_5719CT[2] (p.Leu1908Argfs) мутация не обнаружена

BRCA2 NM_000059.3:c.5946delT (p.Ser1982Argfs) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.6070C>T (p.Gln2024Ter) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.6298C>T (p.Gln2100Ter) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.6998dupT (p.Pro2334Thrfs) мутация не обнаружена
 BRCA2 NM_000059.3:c.7879A>T (p.Ile2627Phe) мутация не обнаружена
 PALB2 NM_024675.3:c.172_175delTTGT (p.Gln60Argfs) мутация не обнаружена
 PALB2 NM_024675.3:c.509_510delGA (p.Arg170Ilefs) мутация не обнаружена
 ATM NM_000051.3:c.5932G>T (p.Glu1978Ter) мутация не обнаружена.

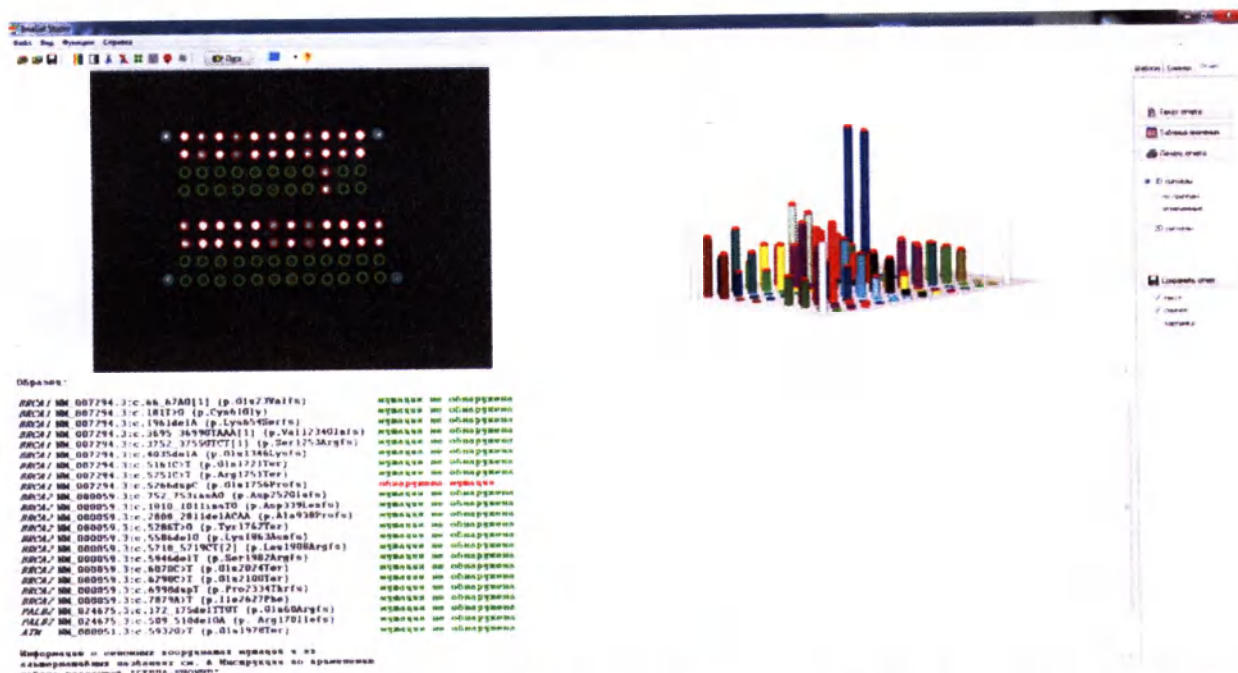


Рисунок 3. Диалоговое окно режима «Отчет» при анализе Положительного контроля «К+».

15.5.10. В случае получения иного сообщения, например, по одной или нескольким строчкам выведенного сообщения будет выдана надпись: «низкий уровень флуоресцентного сигнала», «генотип не определен», анализ результатов остальных образцов признается недействительным. Данное обстоятельство может свидетельствовать о деградации ДНК в Положительном контроле «К+» в результате ненадлежащего хранения, ошибке в процессе подготовки и проведения анализа. Следует повторить процедуру анализа заново. Если снова анализ не проходит должным образом, следует заменить реактивы.

15.5.11. В случае получения правильных результатов при анализе Отрицательного контроля «К-» и Положительного контроля «К+» переходят к анализу результатов гибридизации остальных биологических микрочипов. Пример результатов анализа образца ДНК «дикого типа» (не содержащего мутаций), на биологическом микрочипе с использованием набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» приведен на Рис. 4.

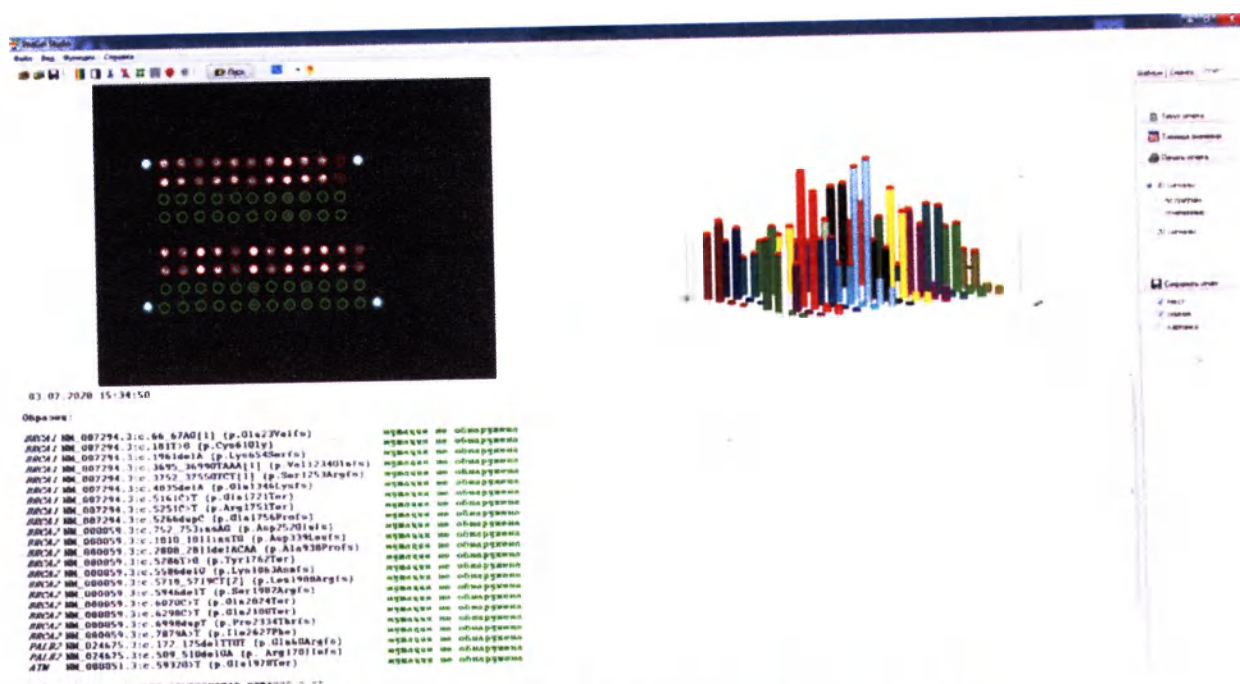


Рисунок 4. В образце ДНК «дикого типа» мутации не обнаружены.

ВНИМАНИЕ! В связи с высокой медицинской и социальной значимостью носительства мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* или *PALB2* рекомендуется проводить повторное генотипирование образцов с выявленной мутацией, начиная с этапа выделения ДНК.

15.5.12. В случае получения при анализе клинического образца отчета, в котором по одной или нескольким строчкам выведенного сообщения будет выдана надпись: «низкий уровень флуоресцентного сигнала» или «генотип не определен», требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала с последующим выделением ДНК и анализом (выполняется последовательно).

15.5.13. Сохранение результатов осуществляется путем нажатия кнопки «Сохранить отчет» в диалоговом окне «Отчет» (Рис. 4). При этом пользователю предлагается выбор форматов сохранения результатов:

15.5.13.1. текст (файл имеет расширение .txt, в котором прописывается отчет, а также таблица нормированных значений интенсивности сигналов ячеек биологического микрочипа);

15.5.13.2. снимок (файл имеет расширение .spe, при этом сохраняется необработанная флуоресцентная картина гибридизации на биологическом микрочипе. Такой формат необходим для дальнейшей обработки гибридизационной картины, вычисления интенсивностей сигналов, получения отчета);

15.5.13.3. картинка (файл имеет расширение .jpg, при этом сохраняется флуоресцентное изображение биологического микрочипа с наложенной сеткой в формате .jpeg. Этот формат удобен для быстрого создания презентаций с использованием полученных данных, однако, он не позволяет проводить обработку флуоресцентного изображения). Рекомендуемые форматы сохранения при рутинном анализе – «текстовый» и «снимок».

16. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

16.1. Хранение набора реагентов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при следующих условиях:

16.1.1. Комплект № 1 – при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов;

16.1.2. Комплект № 2:

- Подкомплект 2А, Подкомплект 2В – при температуре от плюс 18 до плюс 25°C в течение всего срока годности набора реагентов;
- Подкомплект 2Б - при температуре от плюс 2°C до плюс 6°C в течение всего срока годности набора реагентов.

16.2. Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

17. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

17.1. Транспортирование изделия может осуществляться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Транспортировка возможна только с соблюдением указанного температурного режима:

17.1.1. Транспортирование комплекта № 1 проводят при температуре от при температуре от плюс 2°C до плюс 6°C не более 3-х суток. Комплект № 1 должен быть помещен в термоконтейнер, в котором с помощью хладоэлементов или аккумуляторов холода поддерживается необходимый температурный режим.

17.1.2. Транспортирование составляющих частей комплекта № 2:

17.1.3. Гибридизационный компонент №1, Биологические микрочипы и Промывочный буфер (x20) – при температуре от плюс 18 до плюс 25°C ;

17.1.4. Гибридизационный компонент №2, – при температуре от плюс 2°C до плюс 6°C. Гибридизационный компонент №2 должен быть помещен в термоконтейнер, в котором с помощью хладоэлементов или аккумуляторов холода поддерживается необходимый температурный режим.

17.2. Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

18. УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ

18.1. Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

18.2. Набор реагентов предназначен для эксплуатации в условиях клинико-диагностических лабораторий, выполняющих молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала.

18.3. Набор реагентов предназначен для эксплуатации в помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией:

- рабочая температура окружающего воздуха от +18°C до +25°C;
- относительная влажность окружающего воздуха от 45 до 85%;
- атмосферное давление от 730 до 790 мм рт.ст. (97,3 – 105,3 кПа).

18.4. После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

Комплект № 1 – при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C в течение всего срока годности набора реагентов;

Комплект № 2:

Гибридизационный компонент №1, Биологические микрочипы и Промывочный буфер (x20) – при температуре не выше плюс 25°C в течение всего срока годности набора реагентов;

Гибридизационный компонент №2 - при температуре от плюс 2°C до плюс 6°C в течение всего срока годности набора реагентов.

18.5. Следует избегать многократного замораживания/оттаивания компонентов Комплекта №1: Смесь праймеров, дНТФ и Положительный контроль «К+». Не замораживать/оттаивать реактивы более 5 раз.

18.6. Наборы реагентов, эксплуатирующиеся с нарушением регламентированного режима и истекшим сроком годности применению не подлежат.

18.7. К набору реагентов неприменимы требования к техническому обслуживанию и ремонту.

18.8. Рекомендуется постановка исследуемых образцов в дубликатах.

18.9. Изделие не требует монтажа.

18.10. Не используйте изделие, если упаковка набора реагентов повреждена; компоненты изделия поломаны.

19. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» – 6 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. После вскрытия, при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, изделие стабильно до окончания срока годности, дата окончания срока годности отпечатана на флаконе изделия.

20. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

20.1. При использовании набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

20.2. Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Г и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

20.3. Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

20.4. В случае вскрытия упаковки набора реагентов в боксе она относится к отходам класса Г и подлежит утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

21. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

21.1. Предприятие-производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

22. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Дата изготовления
	Предел температуры		Обратитесь к инструкции по применению
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Номер по каталогу
	Использовать до		Изготовитель
	Код партии		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

	Запрет на повторное применение		Не допускать воздействия солнечного света
	Опасность для здоровья человека		

23. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

23.1. ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний».

23.2. ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации».

23.3. ГОСТ Р 52905-2007. Лаборатории медицинские. Требования безопасности

23.4. ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro».

23.5. ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования».

23.6. ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения».

23.7. ГОСТ ISO 14971-2011 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям».

23.8. ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3 Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

23.9. ГОСТ Р EN 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.

23.10. ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 «Медицинские изделия. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».

23.11. ГОСТ Р 56894-2016/GHTF/SG1/N063:2011 «Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro».

23.12. ГОСТ 14192-96 Маркировка грузов.

23.13. СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

23.14. ГОСТ 31508-2012 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования».

23.15. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

23.16. СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания»

23.17. Инструкция по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 года;

Примечание: Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения проекта инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

24. ИНФОРМАЦИЯ О НАЛИЧИИ В МЕДИЦИНСКОМ ИЗДЕЛИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, МАТЕРИАЛОВ ЖИВОТНОГО И (ИЛИ) ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Изделие не содержит лекарственных веществ. Компонент «Положительный контроль «К+»», входящий в Комплект №1 набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП», содержит ДНК человеческого происхождения. ДНК человеческого происхождения выделена из образца донорской крови с подтвержденным отсутствием маркеров сифилиса (IgG, IgM к *T. pallidum*), гепатита В (HBsAg), ВИЧ (антиген р24, суммарные антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2), гепатита С (IgG, IgM к ВГС) в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 22 июня 2019 г. N 797. При выделении ДНК образец крови донора подвергается инаktivации¹¹ нагреванием при 60°C, 12 часов и дополнительной инаktivации - лизису клеток крови с последующим протеолизом и получением доступа к геномной ДНК, проводимой с использованием «Комплекта реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года. Комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА предназначена для получения ДНК с целью последующего проведения генетических исследований выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), в качестве лизирующего агента используется гуанидин тиоцианат, который разрушает (инаktivирует) вирусные частицы^{12, 13, 14}.

25. СВЕДЕНИЯ О СТЕРИЛЬНОСТИ

Изделие поставляется нестерильным. Не подлежит повторному использованию и/или стерилизации пользователем.

26. ИНФОРМАЦИЯ О ПОРЯДКЕ ОБРАБОТКИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ЕГО ПОВТОРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Изделие не подлежит повторному использованию. Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для однократного дробного применения по назначению. Один биологический микротип предназначен для одного определения.

27. СВЕДЕНИЯ ОБ ОХРАНЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Изделие при использовании, транспортировке и хранении не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду при соблюдении условий применения и мер предосторожности, указанных в инструкции.

28. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

28.1. Рекламации по вопросам качества набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП», следует направлять по адресу: ООО «БИОЧИП-ИМБ», 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д.32 стр.1 этаж 1., пом. I, ком. 12, тел.: +7(499) 135-97-61, +7(499)135-98-26
e-mail: deferos@yandex.ru.

28.2. При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП», нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских

работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Инструкция по применению доступна для скачивания на сайте www.biochip-imb.ru.

29. Список используемой литературы:

1. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. (Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой). Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019.
2. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). (Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского Г.В. Петровой). Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018.
3. Любченко ЛН, Батенева ЕИ. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Пособие для врачей. Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»; 2014.
4. Schwartz M, Korenbaum C, Benfoda M, et al. Familial pancreatic adenocarcinoma: A retrospective analysis of germline genetic testing in a French multicentre cohort. *Clin Genet*. 2019;96(6):579-584. doi:10.1111/cge.13629.
5. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, et al. Evaluation of candidate genes *MAP2K4*, *MADH4*, *ACVR1B*, and *BRCA2* in familial pancreatic cancer: Deleterious *BRCA2* mutations in 17%. *Cancer Res*. 2002;62(13):3789-3793.
6. Hofstatter EW, Domchek SM, Miron A, et al. PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer. *Fam Cancer*. 2011;10(2):225-231. doi:10.1007/s10689-011-9426-1.
7. Bakker JL, de Winter JP. A role for ATM in hereditary pancreatic cancer. *Cancer Discov*. 2012;2(1):14-15. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0318.
8. Клинические рекомендации Минздрава по раку поджелудочной железы, эл. ресурс https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/04/kr_rak-podzheludochnoj-zhelezy_aor.pdf, дата обращения 15.09.2021.
9. Клинические рекомендации Минздрава по раку яичников, маточной трубы и первичному раку брюшины, эл. ресурс https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_jaichnikov_matochnoj_truby.pdf, дата обращения 15.09.2021.
10. Клинические рекомендации Минздрава по раку молочной железы, эл. ресурс <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/02/rak-molochnoj-zhelezy-2021.pdf>, дата обращения 15.09.2021.
11. WHO Technical Report, Series No. 924. - Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. http://www.who.int/bloodproducts/publications/WHO_TRS_924_A4.pdf.
12. Jamie A. Blow, David J. Dohm, Diane L. Negley, Christopher N. Mores. Virus inactivation by nucleic acid extraction reagents. *Journal of Virological Methods* 119 (2004) 195–198.
13. PAHO. WHO General Procedures for Inactivation of Potentially Infectious Samples with Ebola Virus and Other Highly Pathogenic Viral Agents.; <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-procedures-inactivation-ebola.pdf>.

14. Simon Elveborg, Vanessa M. Monteil, Ali Mirazimi. Methods of Inactivation of Highly Pathogenic Viruses for Molecular, Serology or Vaccine Development Purposes. Pathogens. 2022 Feb; 11(2): 271. doi: 10.3390/pathogens1102027.

Лист регистрации изменений	
-----------------------------------	--

[illegible]

Всего прошито, пронумеровано
и скреплено печатью

35 (тридцать пять) ЛИСТОВ
цифрами прописью
Должность ТЕН. ДИРЕКТОР
000 "НОЧИП-ИМБ"
Подпись ФЕСЕНКО Д.В.
« 18 » апреля 20 22

