

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

«LightCycler 96» (Roche)

1. По окончании амплификации откройте файл завершеного анализируемого эксперимента в рабочей программе **LightCycler 96**.
2. Откройте вкладку **Analysis**. На панели инструментов кликните по значку **Add Analysis**, чтобы добавить новый анализ. Откроется диалоговое окно **Create New Analysis**.
3. Выберите **Endpoint Genotyping**. Нажмите ОК.
4. Во вкладке **Analysis** в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента.
5. Указать специфичные настройки в диалоговом окне **Endpoint Genotyping Settings** во вкладке **Parameters**:
 - **Pos/Neg Threshold**: 0,3
 - **Angle FAM**: 30 - 35
 - **Angle HEX**: 60 - 65
6. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«CFX96» (BioRad)

1. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
Cycles to Analyze 5-40
2. На вкладке **Allelic discrimination** в поле **Selected Fluorophores** назначить для аллели 1 канал **HEX**, для аллели 2 – канал **FAM**.
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«ДТ96» (ДНК-технология)

1. Критерии положительного результата ПЦР 60%
2. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
Канал **HEX Threshold** 20; Канал **FAM Threshold** 200
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

Проверить соответствие генотипов контрольных образцов заявленным:

Положительный контрольный образец 11 – Allele 1
Положительный контрольный образец 22 – Allele 2

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»:
телефон (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru



ПАМЯТКА ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА МУТАЦИЙ В
ГЕНАХ BRCA1, BRCA2, АССОЦИИРОВАННЫХ С РИСКОМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДОМ ПЦР

КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA

SNP-SHOT TwoStep-PB-96

ПРИНЦИП МЕТОДА

Система «SNP-SHOT» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека.

В реакционной смеси содержатся праймеры, необходимые для амплификации участка, содержащего искомую последовательность, и два аллель-специфичных гидролизных зонда, содержащих полиморфный сайт. Зонд, содержащий сайт Аллель 1, мечен флуорофором **HEX**, аллель 2 – флуорофором **FAM**. Дискриминация аллелей осуществляется за счёт различной эффективности разрушения Taq-полимеразой полностью и неполностью комплементарного зонда.

Результаты анализа позволяют дать **три типа заключений**:

гомозигота по аллелю 1; гетерозигота; гомозигота по аллелю 2;

СОСТАВ НАБОРА

Набор состоит из 96 пробирок с реакционной смесью под слоем парафина, по 12 пробирок на реакционную смесь одного генетического маркера. Один вертикальный ряд пробирок предназначен для исследования одного клинического образца на 8 маркеров. Пробирки с реакционной смесью на определенный маркер расположены согласно приведенной ниже схеме:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- A. BRCA1 185delAG
- B. BRCA1 4153delA
- C. BRCA1 5382insC
- D. BRCA1 3819delGTAA
- E. BRCA1 3875delGTCT
- F. BRCA1 Cys61Gly
- G. BRCA1 2080delA
- H. BRCA2 6174delT



Отдельно вложены пробирка с раствором Taq-полимеразы, пробирка с разбавителем, который используется в качестве единого **отрицательного контроля**, и пробирки с **положительными контрольными образцами** для всех реакционных смесей в отдельном пакете.

ВНИМАНИЕ! При работе с прибором «**LightCycler 96**» (Roche) следует проверить, что амплификационная смесь расфасована в **низкопрофильный пластик**.

ОБОЗНАЧЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ

Кат №	Ген	Аминокислотная замена	Нуклеотидная замена	SNP ID	Аллель		Каналы
t01137	BRCA1		185 delAG	rs80357713	AG	Аллель 1	HEX
					del AG	Аллель 2	FAM
t01168	BRCA1		4153 delA	rs80357711	A	Аллель 1	HEX
					del A	Аллель 2	FAM
t01138	BRCA1		5382 insC	rs80357906	delC	Аллель 1	HEX
					insC	Аллель 2	FAM
t01385	BRCA1	p.Val1234 Glufs	3819 del GTAAA	rs80357609	GTAAA	Аллель 1	HEX
					del GTAAA	Аллель 2	FAM
t01386	BRCA1		3875 delGTCT	rs80357868	GTCT	Аллель 1	HEX
					del GTCT	Аллель 2	FAM
t01146	BRCA1	Cys61Gly	T181G	rs28897672	Cys(T)	Аллель 1	HEX
					Gly(G)	Аллель 2	FAM
t01387	BRCA1		2080 delA	rs80357522	A	Аллель 1	HEX
					del A	Аллель 2	FAM
t01139	BRCA2		-6174 del T	rs80359550	T	Аллель 1	HEX
					del T	Аллель 2	FAM

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

- Достать из коробки необходимое число пробирок (стрипов) и расставить в соответствии с заранее подготовленным протоколом. Маркировка пробирок не допустима.
- Тщательно перемешать раствор Taq-полимеразы.
- Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по **5 мкл** раствора Taq-полимеразы.
- Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по **5 мкл**:
 - в пробирки **исследуемых образцов** – исследуемые образцы ДНК;
 - в пробирку **отрицательного контрольного образца** – разбавитель из комплекта набора;
 - в пробирки **положительных контрольных образцов** – положительные контрольные образцы ДНК из комплекта используемого набора.
- Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500–3000 об/мин на плашечной центрифуге или на микроцентрифуге-вортексе.
- Создать протокол расположения образцов.

1) При работе на приборе «**CFX96**» (BioRad) положительные контрольные образцы и исследуемые образцы обозначить как **Unknown**, отрицательный контроль обозначить как **NTC**.

2) При работе с прибором «**ДТ96**» (ДНК-технология) создать следующий тест:

Тип: анализ полиморфизмов, 2 краски.

При необходимости назначить каналам FAM и HEX соответствующие аллели

Указать параметры анализа полиморфизмов:

- гетерозигота dCp < 3,0

-гомозигота dCp > 6,0

Для работы с наборами «**SNP-SHOT**» используются следующие каналы:

канал **HEX**– АЛЛЕЛЬ 1

канал **FAM**– АЛЛЕЛЬ 2

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу.

7. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

«**CFX96**» (BioRad)

+80 °C	2 мин	
+94 °C	3 мин	
+94 °C	15 сек	40 циклов
+64 °C	40 сек (считывание)	

«**ДТ96**» (ДНК-технология)

+80 °C	2 мин	
+94 °C	3 мин	
+94 °C	15 сек	5 циклов
+64 °C	40 сек	
+94 °C	15 сек	35 циклов
+64 °C	40 сек (считывание)	

«**LightCycler 96**» (Roche)

+80 °C	120 сек	
+94 °C	180 сек	
+94 °C	10 сек	40 циклов
+62 °C	40 сек (считывание) (ramp rate 2,2 °C/сек)	

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

«LightCycler 96» (Roche)

1. По окончании амплификации откройте файл завершеного анализируемого эксперимента в рабочей программе **LightCycler 96**.
2. Откройте вкладку **Analysis**. На панели инструментов кликните по значку **Add Analysis**, чтобы добавить новый анализ. Откроется диалоговое окно **Create New Analysis**.
3. Выберите **Endpoint Genotyping**. Нажмите ОК.
4. Во вкладке **Analysis** в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента.
5. Указать специфические настройки в диалоговом окне **Endpoint Genotyping Settings** во вкладке **Parameters**:
 - **Pos/Neg Threshold**: 0,3
 - **Angle FAM**: 30 - 35
 - **Angle HEX**: 60 - 65
6. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«CFX96» (BioRad)

1. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
Cycles to Analyze 5-40
2. На вкладке **Allelic discrimination** в поле **Selected Fluorophores** назначить для аллели 1 канал **HEX**, для аллели 2 – канал **FAM**.
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

«ДТ96» (ДНК-технология)

1. Критерии положительного результата ПЦР 60%
2. Для каналов FAM и HEX выставить следующие настройки:
Канал HEX **Threshold** 20; Канал FAM **Threshold** 200
3. Программа автоматически интерпретирует результаты.

Проверить соответствие генотипов контрольных образцов заявленным:

Положительный контрольный образец 11 – Allele 1
Положительный контрольный образец 22 – Allele 2



ПАМЯТКА ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА МУТАЦИЙ В
ГЕНАХ BRCA1, BRCA2, АССОЦИИРОВАННЫХ С РИСКОМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДОМ ПЦР

КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA

SNP-SHOT OneStep-PB-96

ВСЕ КОМПОНЕНТЫ УЖЕ ВНЕСЕНЫ. ДОБАВЬТЕ ТОЛЬКО ОБРАЗЦЫ И КОНТРОЛИ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Система «SNP-SHOT» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека.

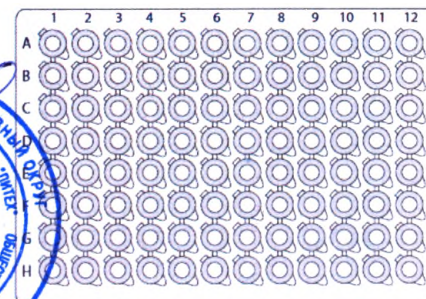
В реакционной смеси содержатся праймеры, необходимые для амплификации участка, содержащего искомую последовательность, и два аллель-специфичных гидролизных зонда, содержащих полиморфный сайт. Зонд, содержащий сайт Аллель 1, мечен флуорофором HEX, аллель 2 – флуорофором FAM. Дискриминация аллелей осуществляется за счёт различной эффективности разрушения Taq-полимеразой полностью и неполностью комплементарного зонда.

Результаты анализа позволяют дать **три типа заключений**:

гомозигота по аллелю 1; гетерозигота; гомозигота по аллелю 2;

СОСТАВ НАБОРА

Набор состоит из 96 пробирок с амплификационной смесью под слоем масла, по 12 пробирок на амплификационную смесь одного генетического маркера. Один вертикальный ряд пробирок предназначен для исследования одного клинического образца на 8 маркеров. Пробирки с амплификационной смесью на определенный маркер расположены согласно приведенной ниже схеме:



- A. BRCA1 185delAG
- B. BRCA1 4153delA
- C. BRCA1 5382insC
- D. BRCA1 3819delGTAA
- E. BRCA1 3875delGTCT
- F. BRCA1 Cys61Gly
- G. BRCA1 2080delA
- H. BRCA2 6174delT

«Утверждаю»
Подпись



Отдельно вложены пробирка с разбавителем, который используется в качестве единого отрицательного контроля, и пробирки с положительными контрольными образцами для всех амплификационных смесей в отдельном пакете.

ВНИМАНИЕ! При работе с прибором «LightCycler 96» (Roche) следует проверить, что амплификационная смесь расфасована в **низкопрофильный пластик**.

ОБОЗНАЧЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ

Кат №	Ген	Аминокислотная замена	Нуклеотидная замена	SNP ID	Аллель		Каналы
t01137	BRCA1		185 delAG	rs80357713	AG	Аллель 1	HEX
					del AG	Аллель 2	FAM
t01168	BRCA1		4153 delA	rs80357711	A	Аллель 1	HEX
					del A	Аллель 2	FAM
t01138	BRCA1		5382 insC	rs80357906	delC	Аллель 1	HEX
					insC	Аллель 2	FAM
t01385	BRCA1	p.Val1234 Glufs	3819 del GTAAA	rs80357609	GTAAA	Аллель 1	HEX
					del GTAAA	Аллель 2	FAM
t01386	BRCA1		3875 delGTCT	rs80357868	GTCT	Аллель 1	HEX
					del GTCT	Аллель 2	FAM
t01146	BRCA1	Cys61Gly	T181G	rs28897672	Cys(T)	Аллель 1	HEX
					Gly(G)	Аллель 2	FAM
t01387	BRCA1		2080 delA	rs80357522	A	Аллель 1	HEX
					del A	Аллель 2	FAM
t01139	BRCA2		-6174 del T	rs80359550	T	Аллель 1	HEX
					del T	Аллель 2	FAM

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

1. Достать из коробки необходимое число пробирок (стрипов) и расставить в соответствии с заранее подготовленным протоколом. Маркировка пробирок не допустима.

2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек на плашечной центрифуге или на микроцентрифуге-вортексе.

3. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 5 мкл:

- в пробирки **исследуемых образцов** – исследуемые образцы ДНК;
- в пробирку **отрицательного контрольного образца** – разбавитель из комплекта набора;
- в пробирки **положительных контрольных образцов** – положительные контрольные образцы ДНК из комплекта используемого набора.

4. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500–3000 об/мин на плашечной центрифуге или на микроцентрифуге-вортексе.

5. Создать протокол расположения образцов.

1) При работе на приборе «CFX96» (BioRad) положительные контрольные образцы и исследуемые образцы обозначить как **Unknown**, отрицательный контроль обозначить как **NTC**.

2) При работе с прибором «ДТ96» (ДНК-технология) создать следующий тест:

Тип: анализ полиморфизмов, 2 краски.

При необходимости назначить каналам FAM и HEX соответствующие аллели

Указать параметры анализа полиморфизмов:

- гетерозигота dCp < 3,0

-гомозигота dCp > 6,0

Для работы с наборами «SNP-SHOT» используются следующие каналы:

канал **HEX**– АЛЛЕЛЬ 1

канал **FAM**– АЛЛЕЛЬ 2

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу.

6. Перенести пробирки в прибор и провести амплификацию по следующей программе:

«CFX96» (BioRad)

+94 °C	3 мин	40 циклов
+94 °C	15 сек	
+64 °C	40 сек (считывание)	

«ДТ96» (ДНК-технология)

+94 °C	3 мин	5 циклов
+94 °C	15 сек	
+64 °C	40 сек	
+94 °C	15 сек	35 циклов
+64 °C	40 сек (считывание)	

«LightCycler 96» (Roche)

+94 °C	180 сек	40циклов
+94 °C	10 сек	
+62 °C	40 сек (считывание) (ramp rate 2,2 °C/сек)	

Набор реагентов для анализа мутаций в генах BRCA1, BRCA2,
ассоциированных с риском онкологических заболеваний, методом ПЦР
КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA
SNP-SHOT OneStep-PB-96

Предприятие-изготовитель ООО НПФ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 01/t-1004p/22 Дата изготовления 03.10.2022 Наборов в серии 170

Состав	Комплектация	Внешний вид
1.1. Амплификационная смесь BRCA1 185delAG	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.2. Амплификационная смесь BRCA1 4153delA	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.3. Амплификационная смесь BRCA1 5382insC	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.4. Амплификационная смесь BRCA1 3819delGTAA	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.5. Амплификационная смесь BRCA1 3875delGTCT	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.6. Амплификационная смесь BRCA1 Cys61Gly	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.7. Амплификационная смесь BRCA1 2080delA	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.8. Амплификационная смесь BRCA2 6174delT	12 пробирок по 20 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости
1.9. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.10. ПКО «Онкогенетика BRCA»11	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.11. ПКО «Онкогенетика BRCA»22	1 пробирка – 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость

Результаты контроля:

Наименование показателя	Характеристика и норма по ТУ	Результаты контроля
1. Комплектность	Согласно п.1.4. ТУ	Соответствует В комплект поставки входят: -набор реагентов; -памятка по применению набора.
2. Упаковка	Согласно п.1.6. ТУ	Соответствует
3. Маркировка	Согласно п.1.5. ТУ.	Соответствует На каждый блок компонентов, наклеена этикетка. На потребительскую упаковку каждого набора наклеена этикетка.
4. Технические характеристики		
4.1. Аналитическая чувствительность, геном-эквивалентов*/мл ДНК человека	10000	Соответствует
4.2. Аналитическая специфичность: 4.2.1. ПКО «Онкогенетика BRCA» 11	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться для всех смесей по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем.	Соответствует
4.2.2. ПКО «Онкогенетика BRCA» 22	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться для всех смесей по каналу FAM не позднее 25 цикла; по каналу HEX позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем.	Соответствует
4.3. ОКО	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала не должен регистрироваться по каналам FAM, HEX для всех смесей.	Соответствует

ПРИМЕЧАНИЕ.

* геном-эквивалент (гэ) – суммарное количество генетического материала в одной клетке.

Условия хранения:

Набор реагентов КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* должен храниться при температуре -18...-20°C в течение всего срока годности.

Условия транспортировки:

Набор реагентов КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* рекомендуется транспортировать при температуре его хранения. Допустима транспортировка при температуре +2...+8 °C в течение 1 суток (не более), либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

ГОДЕН ДО 03.04.2023

Набор реагентов КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA *SNP-SHOT OneStep-PB-96* серии 01/t-1004p/22 соответствует требованиям ТУ 21.20.23-1004-17253567-2022.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____

Чижикова А.И.

Дата выдачи паспорта: 03.10.2022



Набор реагентов для анализа мутаций в генах BRCA1, BRCA2,
ассоциированных с риском онкологических заболеваний, методом ПЦР
КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA
SNP-SHOT TwoStep-PB-96

Предприятие-изготовитель ООО НПФ «Литех», Москва 119435, ул. Малая Пироговская 1стр.3, тел. (495) 258-39-47

Номер серии 01/t-1004TS/22 Дата изготовления 03.10.2022 Наборов в серии 170

Состав	Комплектация	Внешний вид
1.1. Реакционная смесь BRCA1 185delAG	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.2. Реакционная смесь BRCA1 4153delA	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.3. Реакционная смесь BRCA1 5382insC	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.4. Реакционная смесь BRCA1 3819delGTAAA	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.5. Реакционная смесь BRCA1 3875delGTCT	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.6. Реакционная смесь BRCA1 Cys61Gly	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.7. Реакционная смесь BRCA1 2080delA	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.8. Реакционная смесь BRCA2 6174delT	12 пробирок по 15 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета
1.9. Раствор Taq-полимеразы	1 пробирка - 550 мкл	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость
1.10. Разбавитель	1 пробирка - 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.11. ПКО «Онкогенетика BRCA»11	1 пробирка - 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость
1.12. ПКО «Онкогенетика BRCA»22	1 пробирка - 200 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость

Результаты контроля:

Наименование показателя	Характеристика и норма по ТУ	Результаты контроля
1. Комплектность	Согласно п.1.4. ТУ	Соответствует В комплект поставки входят: -набор реагентов; -памятка по применению набора;
2. Упаковка	Согласно п.1.6. ТУ	Соответствует
3. Маркировка	Согласно п.1.5. ТУ.	Соответствует На каждый блок компонентов, наклеена этикетка. На потребительскую упаковку каждого набора наклеена этикетка.
4. Технические характеристики		
4.1. Аналитическая чувствительность, геном-эквивалентов*/мл ДНК человека	10000	Соответствует
4.2. Аналитическая специфичность: 4.2.1. ПКО «Онкогенетика BRCA» 11	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться для всех смесей по каналу HEX не позднее 25 цикла; по каналу FAM позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем.	Соответствует
4.2.2. ПКО «Онкогенетика BRCA» 22	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала должен регистрироваться для всех смесей по каналу FAM не позднее 25 цикла; по каналу HEX позднее 37 цикла или не регистрироваться совсем.	Соответствует
4.3. ОКО	Экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала не должен регистрироваться по каналам FAM, HEX для всех смесей.	Соответствует

ПРИМЕЧАНИЕ.

* геном-эквивалент (гэ)— суммарное количество генетического материала в одной клетке.

Условия хранения:

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* должен храниться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности.

Условия транспортировки:

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* рекомендуется транспортировать при температуре его хранения. Допустима транспортировка при температуре +18...+25 °C в течение 3 суток (не более).

Заключение отдела контроля производства медицинских изделий:

ГОДЕН ДО 03.07.2023

Набор реагентов КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* серии 01/t-1004TS/22 соответствует требованиям ТУ 21.20.23-1004-17253567-2022.

Начальник отдела контроля производства медицинских изделий _____



_____ Чижикова А.И.

Дата выдачи паспорта: 03.10.2022

Копия на 4 листах верн:



Директор ООО НПФ «Литех»

Наумов А.Ю.



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

12 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ МОСКВА

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для анализа мутаций в генах BRCA1, BRCA2, ассоциированных с риском
онкологических заболеваний, методом ПЦР

КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** предназначен для одновременного качественного выявления мутаций в генах BRCA1, BRCA2 генома человека, ассоциированных с риском возникновения наследственных онкологических заболеваний, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах ДНК человека, выделенных из клинических образцов (цельная кровь).

Функциональное назначение – Набор реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** предназначен для диагностики наследственной онкологии, обусловленной мутациями 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, Cys61Gly, 2080delA в гене BRCA1, 6174delT в гене BRCA2.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** может быть использован в клинической лабораторной диагностике генетической предрасположенности к онкологии.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** выпускается в 2 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (OneStep-PB-96, TwoStep-PB-96) (табл. 1).

Набор рассчитан на проведение анализа 12 образцов на 8 генетических маркеров, включая контрольные образцы, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	SNP-SHOT OneStep-PB-96	1. Амплификационные смеси:	
		BRCA1 185delAG	12 пробирок по 20 мкл
		BRCA1 4153delA	12 пробирок по 20 мкл
		BRCA1 5382insC	12 пробирок по 20 мкл
		BRCA1 3819delGTAAA	12 пробирок по 20 мкл



		BRCA1 3875delGTCT	12 пробирок по 20 мкл
		BRCA1 Cys61Gly	12 пробирок по 20 мкл
		BRCA1 2080delA	12 пробирок по 20 мкл
		BRCA2 6174delT	12 пробирок по 20 мкл
		2. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл
		3. ПКО «Онкогенетика BRCA» 11	1 пробирка – 200 мкл
		4. ПКО «Онкогенетика BRCA» 22	1 пробирка – 200 мкл
		1. Реакционные смеси:	
		BRCA1 185delAG	12 пробирок по 15 мкл
		BRCA1 4153delA	12 пробирок по 15 мкл
2	SNP-SHOT TwoStep-PB-96	BRCA1 5382insC	12 пробирок по 15 мкл
		BRCA1 3819delGTAAA	12 пробирок по 15 мкл
		BRCA1 3875delGTCT	12 пробирок по 15 мкл
		BRCA1 Cys61Gly	12 пробирок по 15 мкл
		BRCA1 2080delA	12 пробирок по 15 мкл
		BRCA2 6174delT	12 пробирок по 15 мкл
		2. Раствор Taq-полимеразы	1 пробирка – 550 мкл
		3. Разбавитель	1 пробирка – 200 мкл
		4. ПКО «Онкогенетика BRCA» 11	1 пробирка – 200 мкл
		5. ПКО «Онкогенетика BRCA» 22	1 пробирка – 200 мкл

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав каждой амплификационной (реакционной) смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров, необходимых для амплификации участка, содержащего искомую последовательность;
- ПЦР-буфер;
- аллель-специфичные гидролизные зонды, содержащие полиморфные сайты: зонд, содержащий сайт аллель 1, мечен флуорофором HEX; зонд, содержащий сайт аллель 2 мечен флуорофором FAM.

Амплификационная смесь комплектации *SNP-SHOT OneStep-PB-96* полностью готова к амплификации, содержит Taq-полимеразу;

Реакционная смесь комплектации *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* требует внесения Taq-полимеразы, входящей в состав набора.

ПКО «Онкогенетика BRCA» 11 представляет собой смесь ДНК-мишеней, соответствующих аллелям 1 маркеров в генах BRCA1, BRCA2.

ПКО «Онкогенетика BRCA» 22 представляет собой смесь ДНК-мишеней, соответствующих аллелям 2 маркеров в генах BRCA1, BRCA2.

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора.

Паспорт предоставляется по запросу пользователя.

Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru (ГОСТ 51088). На бумажном носителе инструкция предоставляется по запросу пользователя.

4.3. Принцип метода

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения маркеров в генах ДНК человека путем накопления (амплификации) фрагментов ДНК, ограниченных специфически подобранными праймерами.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе.

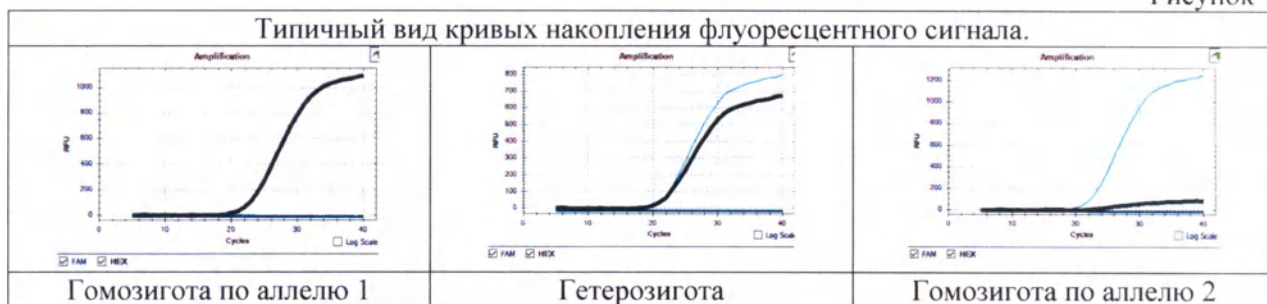


Амплификационная/реакционная смесь содержит два аллель-специфичных зонда, меченных различными флуорофорами. В процессе амплификации зонды конкурируют за связывание с матрицей в участке с определяемым генетическим маркером. Преимущество получает тот зонд, который соответствует представленному в образце аллелю. Если в исследуемом образце присутствует два одинаковых аллеля, то с ДНК-мишенью связывается только один из сигнальных зондов, и данный образец интерпретируется как гомозигота по определенному аллелю. В случае присутствия в образце двух разных аллелей, оба зонда будут гибридизоваться с одинаковой вероятностью, и образец будет интерпретироваться как гетерозигота.

В ходе последующей элонгации происходит разрушение полностью комплементарного матрице зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе. Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов, что даёт возможность визуализировать результат и осуществлять дискриминацию аллелей.

Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по аллелю 1, гетерозигота, гомозигота по аллелю 2 для каждого определяемого генетического маркера. В случае гомозиготы по аллелю 1 кривая накопления флуоресцентного сигнала будет представлена только по каналу Флуорофора 1; в случае гомозиготы по аллелю 2 - по каналу Флуорофора 2; в случае гетерозиготы будут представлены равнозначные кривые накопления по каналам обоих Флуорофоров (Рисунок 1).

Рисунок 1



Примечание: кривая накопления флуоресцентного сигнала по каналу Флуорофора 1 обозначена жирной линией; по каналу Флуорофора 2 - тонкой линией.

4.4. Коммутабельность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации и генотипирования ДНК референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации или аллель-специфичного анализа генетической последовательности, соответственно, при исследовании ДНК, выделенной из соответствующих клинических образцов.

4.5. Ограничения метода

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания исследуемой ДНК в клиническом образце.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая специфичность

Специфичность анализа 100%. Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами) и зондами, подобранными к определенным аллелям генов человека и условиями реакции амплификации.

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации должен определяться генотип исследуемого образца.

5.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность составляет 10^4 геном-эквивалентов/мл ДНК человека в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА¹

6.1. Диагностическая чувствительность выявления мутации 185delAG в гене BRCA1²: 100 % (интервал 74,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления мутации 4153delA в гене BRCA1: 100 % (интервал 91,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления мутации 5382insC в гене BRCA1: 100 % (интервал 91,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления мутации 3819delGTAAA в гене BRCA1²: 100 % (интервал 54,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления мутации 3875delGTCT в гене BRCA1²: 100 % (интервал 47,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления мутации Cys61Gly в гене BRCA1²: 100 % (интервал 65,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления мутации 2080delA в гене BRCA1²: 100 % (интервал 54,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления мутации 6174delT в гене BRCA2²: 100 % (интервал 54,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления мутации 185delAG в гене BRCA1: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления мутации 4153delA в гене BRCA1: 100 % (интервал 98,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления мутации 5382insC в гене BRCA1: 100 % (интервал 98,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления мутации 3819delGTAAA в гене BRCA1: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления мутации 3875delGTCT в гене BRCA1: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления мутации Cys61Gly в гене BRCA1: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления мутации 2080delA в гене BRCA1: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления мутации 6174delT в гене BRCA2: 100 % (интервал 98,5 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.3. Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутримышечная воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения Ct по соответствующим каналам флуоресценции для одного и того же образца не превышает 4%.

Таблица 2

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Мутация	Генотип	Результаты испытаний	
				Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Цельная кровь	207	185delAG в гене BRCA1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98,5-100%)	100% (95% ДИ: 74,1-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 74,1-100%)	100% (95% ДИ: 98,5-100%)
		4153delA в гене BRCA1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98,3-100%)	100% (95% ДИ: 91,3-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 91,3-100%)	100% (95% ДИ: 98,3-100%)

¹ диагностические характеристики представлены для гетерозиготных носителей мутации.
² представленная выборка образцов недостаточна для подтверждения высокой диагностической чувствительности исследуемого набора реагентов, однако, ввиду редкой встречаемости мутаций исследование более широкой выборки на данном этапе не представляется возможным.

		5382insC в гене BRCA1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98.3-100%)	100% (95% ДИ: 91.6-100%)
			Гетерозигота	100% (95% ДИ: 91.6-100%)	100% (95% ДИ: 98.3-100%)
		3819delGTAAA в гене BRCA1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98.5-100%)	100% (95% ДИ: 54.9-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 54.9-100%)	100% (95% ДИ: 98.5-100%)
		3875delGTCT в гене BRCA1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98.5-100%)	100% (95% ДИ: 47.3-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 47.3-100%)	100% (95% ДИ: 98.5-100%)
		Cys61Gly в гене BRCA1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98.5-100%)	100% (95% ДИ: 65.2-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 65.2-100%)	100% (95% ДИ: 98.5-100%)
		2080delA в гене BRCA1	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98.5-100%)	100% (95% ДИ: 54.9-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 54.9-100%)	100% (95% ДИ: 98.5-100%)
		6174delT в гене BRCA2	Гомозигота по Аллелю 1	100% (95% ДИ: 98.5-100%)	100% (95% ДИ: 54.9-100%)
			Гетерозигота*	100% (95% ДИ: 54.9-100%)	100% (95% ДИ: 98.5-100%)

* Представленная выборка образцов недостаточна для подтверждения высокой диагностической чувствительности исследуемого набора реагентов, однако, ввиду редкой встречаемости образцов цельной крови от пациентов с генотипами Гетерозигота по представленным мутациям исследование более широкой выборки на данном этапе не представляется возможным.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и 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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

ВНИМАНИЕ! При удалении пробирок, содержащих продукты ПЦР, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, 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.
- Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3 тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для работы с биопробами;
- одноразовые наконечники до 10, 50, 200 и 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- набор реагентов для проведения ПЦР.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** являются образцы ДНК человека, выделенные из клинических проб (цельная кровь).

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Особенности забора и хранения цельной крови.

2000 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 200 мкл раствора антикоагулянта (0,05M раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). Гепарин использовать не рекомендуется.

Внимание! При использовании для забора крови вакуумных пробирок с ЭДТА или цитратом натрия дополнительное внесение антикоагулянта не требуется. При этом объем крови, необходимый для исследования, заранее маркируется на пробирке в соответствии с количеством антикоагулянта, помещенного в пробирку.

Неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; не замораживать!

9.3. Предварительная обработка клинического материала

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического материала.

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ наборы реагентов для пробоподготовки с сорбентной очисткой, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот (ДНК) из клинического материала (**цельная кровь**) для ПЦР-диагностики и позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца. Производитель рекомендует использовать зарегистрированный в установленном порядке набор «НК-сорбент» (ООО НПФ «Литех», РЗН 2019/9331) совместно с набором **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** для полного цикла исследования образцов.

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Материалом для исследования набором реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** являются образцы ДНК человека, выделенные из клинических проб.

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** могут являться:

- использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала или наборов для пробоподготовки (выделение ДНК);

- эндогенные интерферирующие вещества, входящие в состав клинического материала (например, метаболиты, образующиеся при патологических состояниях, таких как сахарный диабет; множественная миелома; холестатический гепатит; гемолиз, т.е. разрушение эритроцитов с выходом в жидкую часть крови ряда внутриклеточных компонентов), приводящие к получению недостаточно очищенного препарата ДНК в результате неэффективной экстракции наборами для пробоподготовки; такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию;

- экзогенные интерферирующие вещества (например, лекарственные средства и их метаболиты, парентеральное питание, плазма расщирители, антикоагулянты; вещества, принимаемые пациентом, такие как алкоголь, наркотики, пищевые добавки и т.п.; вещества, добавленные во время приготовления образца, такие как антикоагулянты, консерванты, стабилизаторы).

Все это может приводить к ингибированию реакции амплификации, снижению чувствительности анализа и получению недостоверных результатов.

При использовании зарегистрированного в установленном порядке набора реагентов для выделения НК «НК-сорбент» (РУ № РЗН 2019/9331) интерференции не ожидается.

Производителем Набора реагентов НК-сорбент было показано сохранение эффективности выделения НК из цельной крови в случае присутствия в клинических образцах потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз (Таблица 3).

Таблица 3

Клинический образец	Интерферент	Допустимое содержание в образце
цельная кровь	жиры	50%
	K2-ЭДТА	1,8 мг/мл
	цитрат натрия	0,129 моль/л

Контроль качества тестируемой ДНК (недостаточное количество, присутствие возможных ингибиторов) осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения детектирующего амплификатора. Образец ненадлежащего качества будет интерпретироваться как невалидный.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Все компоненты необходимо добавлять отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами (фильтрами). Такие же наконечники необходимо использовать и для внесения в пробирки препарата ДНК.

После внесения образца, пробирки с реакционными смесями должны быть как можно скорее помещены в амплификатор.

10.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96*

10.1.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке необходимое количество стрипов с раскапанными амплификационными смесями, включая стрипы для положительных контрольных образцов (ПКО) и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

Для исследования одного образца ДНК требуется один стрип (по восемь пробирок А-Н). В каждой пробирке представлена амплификационная смесь для определения соответствующего маркера в гене.

Расположение амплификационных смесей представлено на Рис. 2.

Рисунок 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRCA1 185delAG											
B	BRCA1 4153delA											
C	BRCA1 5382insC											
D	BRCA1 3819delGTAAA											
E	BRCA1 3875delGTCT											
F	BRCA1 Cys61Gly											
G	BRCA1 2080delA											
H	BRCA2 6174delT											

10.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Растворы разбавителя и ПКО тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

10.1.3. В 8 пробирок стрипа с различными амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 5 мкл:

- а) в 8 пробирок стрипа для отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;
- б) в 8 пробирок стрипа для исследуемого образца – исследуемый образец ДНК;
- в) в 8 пробирок стрипов для положительных контрольных образцов – ПКО «Онкогенетика BRCA» 11 и ПКО «Онкогенетика BRCA» 22, соответственно.

10.1.4. Стрипованные пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при комнатной температуре на предназначенной для этого центрифуге.

Перейти к п.10.3.

10.2. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96*

10.2.1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке необходимое количество стрипов с раскапанными реакционными смесями, включая стрипы для положительных контрольных образцов (ПКО) и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается!

Для исследования одного образца ДНК требуется один стрип (по восемь пробирок А-Н). В каждой пробирке представлена реакционная смесь для определения соответствующего маркера в гене.

Расположение реакционных смесей представлено на Рис. 3.

Рисунок 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRCA1 185delAG											
B	BRCA1 4153delA											
C	BRCA1 5382insC											
D	BRCA1 3819delGTAAA											
E	BRCA1 3875delGTCT											
F	BRCA1 Cys61Gly											

G	BRCA1 2080delA
H	BRCA2 6174delT

10.2.2. Пробирку с раствором Таq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

10.2.3. Внести в раставленные пробирки по 5 мкл раствора Таq-полимеразы для приготовления амплификационных смесей.

10.2.4. Растворы разбавителя и ПКО тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

10.2.5. В 8 пробирок стрипа с различными амплификационными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 5 мкл:

- а) в 8 пробирок стрипа для отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;
- б) в 8 пробирок стрипа для исследуемого образца – исследуемый образец ДНК;
- в) в 8 пробирок стрипов для положительных контрольных образцов – ПКО «Онкогенетика BRCA» 11 и ПКО «Онкогенетика BRCA» 22, соответственно.

10.2.6. Стрипованные пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при комнатной температуре на предназначенной для этого центрифуге. Перейти к п.10.3.

10.3. Проведение амплификации, все варианты исполнения

10.3.1. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлена Таблица 4 с программами амплификации для комплектаций *SNP-SHOT OneStep-PB-96* и *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* для различных видов амплификаторов):

Таблица 4

«CFX96» (BioRad)	+80 °C	2 мин*	40 циклов
	+94 °C	3 мин	
	+94 °C	15 сек	
	+64 °C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX)	
«ДТ96» (ДНК-Технология)	+80 °C	2 мин*	5 циклов
	+94 °C	3 мин	
	+94 °C	15 сек	
	+64 °C	40 сек	35 циклов
	+94 °C	15 сек	
	+64 °C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX)	
«LightCycler 96» (Roche)	+80 °C	120 сек*	40 циклов
	+94 °C	180 сек	
	+94 °C	10 сек	
	+62 °C	40 сек (считывание по каналам FAM, HEX) (ramp rate 2,2 °C/сек)	

* - для комплектаций *OneStep* раздел программы +80 °C -2 мин необязателен.

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA**, представлены на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» «CFX96» (BioRad).

Во вкладке **Settings** выставить следующие настройки (Таблица 5):

Таблица 5

Канал	Cycles to Analyze...	Baseline Setting
HEX	5 - 40	Apply Fluorescence Drift Correction
FAM		

На вкладке Allelic discrimination в поле Selected Fluorophores назначить для Аллеля 1 канал HEX, для Аллеля 2 – канал FAM.

Программа автоматически интерпретирует результаты.

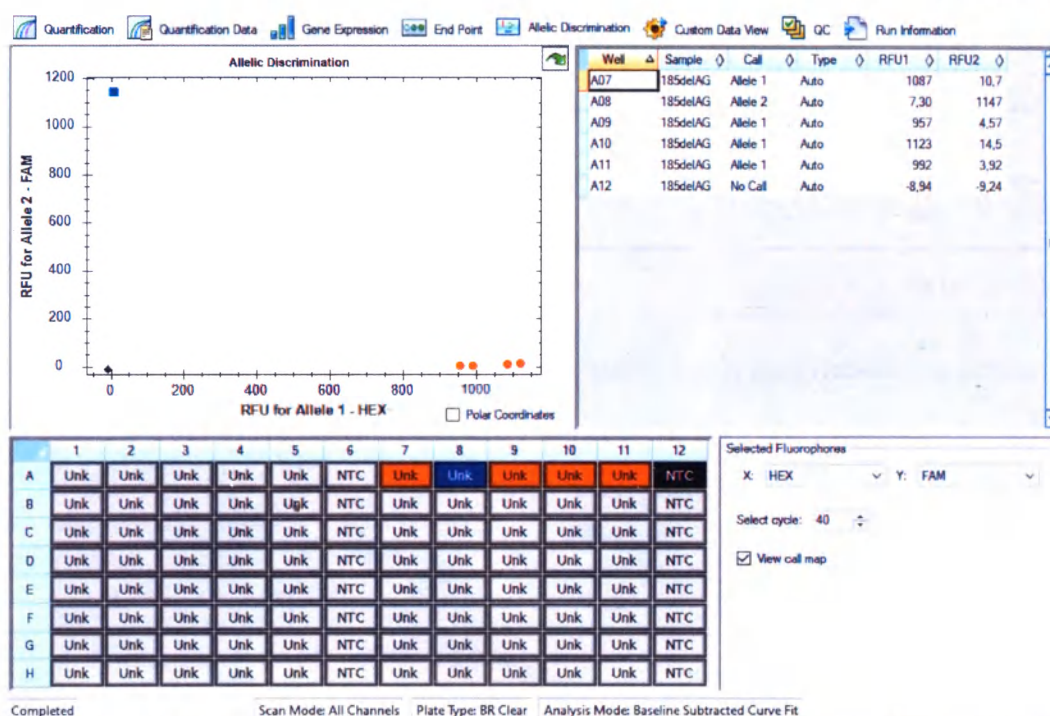
При наличии в постановке Контрольных образцов необходимо убедиться, что тип образца установлен правильно.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

Пример представления результата анализа генотипирования по мутации 185delAG гена BRCA1 программным обеспечением CFX96 представлен на рисунке 4.

В левом верхнем окне – График ОЕФ (отображение данных на графике относительных единиц флуоресценции – RFU), где генотипы разделяются на зоны. Нижнее окно отображает данные в виде цветовой карты, где каждый генотип обозначается соответствующим цветом. В верхнем правом окне – «Электронная таблица данных лунок», перечисляющая данные дискриминации аллелей, собранные в каждой лунке.

Рисунок 4



11.2. Интерпретация результатов

При использовании амплификатора CFX96 интерпретация результатов проводится во вкладке *Allelic Discrimination*.

Аллельный дискриминантный анализ требует следующего минимального содержания лунок:

- наличие двух флуорофоров в каждой лунке;
- наличие не менее одного образца без ДНК-мишени (ОКО) с обозначением *NTC* для оптимизации анализа данных.

Необходимо убедиться, что результаты генотипирования ПКО соответствуют заявленным генотипам: ПКО «Онкогенетика BRCA» 11 – Allele 1; ПКО «Онкогенетика BRCA» 22 – Allele 2.

Генотипирование образцов происходит автоматически с отображением заключения по каждому маркеру: гомозигота по аллелю 1, гетерозигота или гомозигота по аллелю 2.

Невалидные образцы (недостаточное количество анализируемой ДНК, наличие ингибиторов реакции в образце) будут интерпретироваться как *Undetermined*. В этом случае можно говорить о ненадлежащем качестве образца для исследования и необходимости повторной пробоподготовки.

Образцы, не прошедшие ПЦР с интерпретацией *No Call*, могут содержать мутации в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК.

Аллельные варианты, детектируемые по использованным каналам флуоресценции, представлены в таблице 6. Аллель 1 соответствует генотипу с популяционным риском заболевания, Аллель 2 – генотипу с высоким риском заболевания.

Таблица 6

Амплификационная/реакционная смесь	Канал флуоресценции и детектируемая мишень	
	HEX Аллель 1	FAM Аллель 2
BRCA1 185delAG	AG	delAG
BRCA1 4153delA	A	delA
BRCA1 5382insC	delC	insC
BRCA1 3819delGTAAA	GTAAA	delGTAAA
BRCA1 3875delGTCT	GTCT	delGTCT
BRCA1 Cys61Gly	(Cys)T	(Gly)G
BRCA1 2080delA	A	delA
BRCA2 6174delT	T	delT

Интерпретация результатов анализа с целью выявления и идентификации аллелей генов ДНК человека проводится в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7

	HEX	FAM	Заключение
ОКО	No Call	No Call	Отсутствие амплификации
ПКО 11	Allele 1	-	Гомозигота по аллелю 1
ПКО 22	-	Allele 2	Гомозигота по аллелю 2
Исследуемый образец	Allele 1	-	Гомозигота по аллелю 1
	Heterozygote	Heterozygote	Гетерозигота
	-	Allele 2	Гомозигота по аллелю 2
	Undetermined	Undetermined	Неопределённый. Образец ненадлежащего качества. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа с этапа пробоподготовки

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* должен храниться при температуре $-18...-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Срок годности набора – 6 месяцев.

Набор **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* должен храниться при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Срок годности набора – 9 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Условия транспортирования набора должны соответствовать условиям хранения!

Для наборов реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** варианта исполнения *SNP-SHOT OneStep-PB-96* допустима транспортировка при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 суток (не более), либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Для наборов реагентов **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA** варианта исполнения *SNP-SHOT TwoStep-PB-96* допустима транспортировка при температуре $+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 дней (не более).

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА

Предприятие-изготовитель проводит приемочные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик (технические характеристики), внешний вид, комплектность, упаковку, маркировку, а также контроль качества сырья и компонентов.

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 1.2.3684-21.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клиничко-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение ДНК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **КОМПЛЕКС ОНКОГЕНЕТИКА BRCA**, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 12³ ЛИСТОВ

«15» 12 2022 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошито, проверено,
креплено печатью.

Количество листов
шт.

Директор

Наумов А.Ю.

