

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Эйджин»



Д.А. Стуканов

15 апреля 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов

для выявления наследственных мутаций в генах человека BRCA1 и BRCA2

методом ПЦР в режиме реального времени

(ОнкоБрист)

ТУ 21.20.23-002-01963278-2023

Москва – 2024 г.

Введение

Настоящая Инструкция распространяется на «Набор реагентов для выявления наследственных мутаций в генах человека BRCA1 и BRCA2 методом ПЦР в режиме реального времени (ОнкоБрист) по ТУ 21.20.23-002-01963278-2023», далее по тексту набор реагентов, ОнкоБрист

Рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) занимают лидирующие позиции среди онкологических заболеваний. В Российской Федерации ежегодно диагностируется 65 000 новых случаев РМЖ и более 14 000 – РЯ. РМЖ лидирует как в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями (21%), так и в структуре смертности женщин от них (17%), РЯ занимает восьмое место среди всех злокачественных новообразований у женщин Российской Федерации (5%), в структуре смертности от них РЯ занимает седьмое место (6%).

Генетическая предрасположенность является существенным фактором риска развития РМЖ и РЯ, ассоциированных с мутациями в генах BRCA1 и BRCA2. Мутациями в генах BRCA1 и BRCA2 обусловлены 30–50% наследственных форм РМЖ и 90-95% - РЯ у женщин, а также 4–40% РМЖ у мужчин. Наследственные формы РМЖ и РЯ составляют 5–7% всех случаев РМЖ и 10–15% случаев РЯ.

Мутации в генах BRCA1 и BRCA2 значительно увеличивают индивидуальный риск развития в течении жизни РМЖ порядка 87%, РЯ порядка 44%.

Известно, что мутации в генах BRCA могут быть также ассоциированы с развитием рака предстательной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, желчного пузыря и желчных протоков, желудка.

По результатам ряда исследования описан спектр из 8 наиболее характерных мутаций для российской популяции в генах BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300 T>G (Cys61Gly), 2080delA) и BRCA2 (6174delT) с целью диагностики и прогнозирования наследственных форм РМЖ и РЯ в Российской Федерации.

Своевременная диагностика BRCA-ассоциированных наследственных форм онкозаболеваний обеспечивает возможность профилактики, ранней диагностики злокачественных новообразований и индивидуализации лечения пациентов с целью снижения частоты возникновения рецидивов.

1. ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов:** «Набор реагентов для выявления наследственных мутаций в генах человека BRCA1 и BRCA2 методом ПЦР в режиме реального времени (ОнкоБрист) по ТУ 21.20.23-002-01963278-2023».

1.2 **Назначение:** Набор реагентов предназначен для определения мутаций в генах человека BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300 T>G (Cys61Gly), 2080delA) и BRCA2 (6174delT), ассоциированных с риском развития онкопатологии (в том числе наследственных форм рака молочной железы и рака яичников) методом ПЦР в режиме реального времени. Материалом для проведения ПЦР служат образцы ДНК, полученные из периферической крови человека.

Полученные результаты могут быть использованы для диагностики наследственных форм рака молочной железы или рака яичника, прогнозирования соответствующих наследственных форм рака.

1.3 **Функциональное назначение:** изделие предназначено для диагностика *in vitro* (для определения мутаций в генах человека BRCA1 (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300 T>G (Cys61Gly), 2080delA) и BRCA2 (6174delT).

1.4 **Показания к проведению исследования:** онкопатология (рак молочной железы, рак яичников), диагностика в группах риска.

1.5 **Противопоказания к применению:** противопоказаний к применению нет.

1.5 **Популяционные и демографические аспекты:** применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в медицинских учреждениях для клинической лабораторной диагностики.

1.7 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал (врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант), обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 **Применять** набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

1.9 **Побочные действия:** не применимо для данного медицинского изделия

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1. Состав набора реагентов

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Набор реагентов	1 шт.		
Смеси для амплификации BRCA1: 185delAG BRCA1: 4153delA BRCA1: 5382insC BRCA1: 3819delGTAAA, BRCA1: 3875delGTCT, BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly), BRCA1: 2080delA BRCA2: 6174delT	Прозрачная, бесцветная жидкость.	1 пробирка 1 пробирка 1 пробирка 1 пробирка 1 пробирка 1 пробирка 1 пробирка 1 пробирка	960 мкл 960 мкл 960 мкл 960 мкл 960 мкл 960 мкл 960 мкл 960 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная, бесцветная жидкость	4 пробирки	1,0 мл
Полимераза Taq	Прозрачная, бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная, бесцветная жидкость	1 пробирка	8,0 мл
Положительный контрольный образец гомозиготный по нормальному аллелю (K+1)	Прозрачная, бесцветная жидкость	1 пробирка	270 мкл
Положительный контрольный образец гетерозиготный (K+2)	Прозрачная, бесцветная жидкость	1 пробирка	270 мкл
Инструкция по применению	1 шт.		
Паспорт	1 шт.		

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.2. Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан на 48 определений.

2.3. Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; анализ кривых плавления, качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В смесь для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки FAM и HEX, на каждый вариант определяемого генетического полиморфизма. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления сигнальных зондов, в результате

чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен ДНК-мишени, температура его плавления будет отличаться от температуры плавления полностью комплементарного зонда. На основании температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Набор реагентов ОнкоБрист включает смеси для амплификации, специфичные для каждого генетического полиморфизма, и положительные контрольные образцы: гомозиготный по нормальному аллелю (K+1) и гетерозиготный (K+), которые представляют собой смеси клонированных участков генов BRCA1, BRCA2, выявляемых с применением набора. Контрольные образцы предназначены для контроля качества исследования пользователем набора.

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку (Cy5) и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации.

Исследование с использованием набора реагентов состоит из двух этапов - выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация в режиме реального времени.

2.4. Время проведения анализа (исключая пробоподготовку): от 2 часов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

Специфичен по отношению к мутациям 185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 300 T>G (Cys61Gly), 2080delA, в гене человека BRCA1, и 6174delT в гене человека BRCA2.

Интерферирующие вещества в концентрациях: билирубин - 684 мкмоль/л, гемоглобин 2 г/л, холестерин 13 ммоль/л, триглицериды - 37 ммоль/л не влияют на специфичность набора реагентов.

3.2. Предел обнаружения:

Нижний предел обнаружения - не менее 1,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку, что соответствует концентрации 200 копий/мл ($C_p \leq 32,0$ на канале детекции ВК (Cy5)). При использовании меньшего количества ДНК ($C_p > 32,0$ на канале детекции ВК) производитель не гарантирует корректную работу набора.

В образцах с недостаточным количеством ДНК (менее 1,0 нг на амплификационную пробирку) после завершения реакции амплификации регистрируется недостоверный результат.

3.3. Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость – 100% (86,28-100%)

Межсерийная воспроизводимость – 100% (86,28-100%)

3.4. Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ): 100% (94,87-100%)

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ): 100% (94,72-100%)

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-2021 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-2021 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

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

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных правилами и нормами СанПиН 3.3686-2021.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- амплификатор детектирующий ДТлайт, ДТпрайм
- программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТлайт, ДТпрайм (версия ПО не ниже 7.7.5.23; ini файл с параметрами анализа)*
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки (стрипы) объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 0,5 до 10,0 мкл, от 2 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл, от 200 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от ДНКаз и РНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов

*- Производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для амплификаторов детектирующих. Актуальную версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <https://dna-technology.ru/poequip/po-dlya-jbjrudovaniya>

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

6.2. Общие требования

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования. Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-2021.

6.3. Взятие материала на исследование

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2 – 3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.3. Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. 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.

6.4. Подготовка биологического материала человека для исследования

Подготовка биологического материала в соответствии с инструкцией к комплектам для выделения ДНК из биологического материала:

- Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА (ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2010/08696),
- Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА) по ТУ 9398-033-46482062-2009 в составе: лизирующий раствор 1 флакон; реактив «Проба-Рapid» 1 флакон (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2010/08695).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из биологического материала

Рекомендуется использовать следующие комплекты для выделения ДНК из биологического материала:

- Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА (ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2010/08696),

– Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА) по ТУ 9398-033-46482062-2009 в составе: лизирующий раствор 1 флакон; реактив «Проба-Рapid» 1 флакон (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2010/08695).

Выделение ДНК из исследуемого материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору/комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор в объеме, указанном в инструкции к соответствующему набору/комплекту реагентов.

7.2. Подготовка и проведение ПЦР

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.2.1 Промаркируйте для каждого определяемого полиморфизма необходимое количество пробирок для амплификации объемом 0,2 мл: по одной пробирке - для каждого исследуемого образца, для отрицательного контрольного образца (К-), для положительных контрольных образцов К+1 (гомозиготный по нормальному аллелю) и К+2 (гетерозиготный). **Пример:** необходимо проанализировать 5 образцов. Для каждого полиморфизма нужно промаркировать 8 пробирок - 5 для исследуемых образцов, одну для К-, одну для К+1, одну для К+2. Общее количество пробирок для всех восьми полиморфизмов - 64.

7.2.2. Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3. Добавьте во все промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждого полиморфизма отдельным наконечником).

7.2.4. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой Таq в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу Таq необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.5. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой Таq. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5 x (N+1) мкл полимеразы Таq.

где N – количество промаркированных пробирок с учётом К-, К+1, К+2.

Пример: для анализа 5 образцов (64 промаркированных пробирок) необходимо приготовить 650 мкл ПЦР-буфера и 32,5 мкл полимеразы Таq.

7.2.6. Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера с полимеразой Таq в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе..

ВНИМАНИЕ! Смесью ПЦР-буфера и полимеразы Таq необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.2.7. Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой Таq.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы Таq в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 7.2.8 – 7.2.13.

7.2.8. Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.9. Внесите в пробирки для исследуемых образцов по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК (кроме пробирок К-, К+1, К+2).

7.2.10. Внесите в пробирки, промаркированные К-, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.11. Внесите в пробирки, промаркированные К+1 и К+2 по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца.

7.2.12. Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.13. Установите все пробирки в блок амплификатора. Запустите программное обеспечение к детектирующему амплификатору, выберите оператора, выберите режим «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл «BRCA..ini». При последующих постановках добавьте в протокол соответствующие тесты или используйте многотестовый режим, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

П р и м е ч а н и е: Тип пробирки для отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов к набору следует указывать как «Образец».

ВНИМАНИЕ! Расположение пробирок на матрице термоблока должно строго соответствовать порядку установки пробирок в блоке. Для многотестового режима порядок установки пробирок должен строго соответствовать последовательности тестов в группе.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

8.2. Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически. Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий "ДТпрайм" по ТУ 9443-004-96301278-2010 (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2011/10229),
- Амплификатор детектирующий "ДТлайт" по ТУ 9443-003-96301278-2010 (ООО «НПО ДНК-Технология», РУ №2011/10228).

Использование трёх флуоресцентных красителей позволяет одновременно определять два аллеля и оценивать количественную достаточность геномной ДНК в одной пробирке. Оценка достаточности ДНК представляющая собой систему внутреннего контроля (ВК) проводится по отдельному флуоресцентному каналу Cy5 путём регистрации стандартной «ПЦР в реальном времени» с разрушаемым ДНК-зондом. Программное обеспечение автоматически определяет прохождение реакции по каналу Cy5 и переходит к анализу мутаций. В случае отсутствия положительного результата по Cy5 программное обеспечение указывает «недостовверный результат», что требует перестановки исследования.

В таблице 1 представлены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица № 1. Каналы детекции продуктов амплификации

Полиморфизм (наименование смеси для амплификации)	Каналы детекции аллельных вариантов и внутреннего контроля (ВК)		
	Fam	Hex	Cy5
BRCA1: 185delAG	N*	m**	ВК
BRCA1: 4153delA	N	m	ВК
BRCA1: 5382insC	N	m	ВК
BRCA1: 3819delGTAAA	N	m	ВК
BRCA1: 3875delGTCT	N	m	ВК
BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly)	N	m	ВК
BRCA1: 2080delA	N	m	ВК
BRCA2: 6174delT	N	m	ВК

N* – нормальный аллель, m** –мутантный аллель

8.3. После окончания программы амплификации на графике будет отображена зависимость флуоресценции от температуры плавления для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название выявляемого полиморфизма и результат генотипирования каждого образца. По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учёт результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2. Интерпретация результатов. Для всех образцов программа фиксирует результат амплификации геномной ДНК человека (ВК). В образцах, прошедших ПЦР, и содержащих достаточное для корректного анализа количество ДНК, программа определяет генотип исследуемого образца (наличие или отсутствие мутации в 8 позициях в каждом образце), который отображён в таблице в графе «Полиморфизм».

Таблица №2. Интерпретация результатов

Идентификатор	Тип	Полиморфизм	
Образец 1	BRCA1: 185delAG	N*	N
Образец 1	BRCA1: 4153delA	N	N
Образец 1	BRCA1: 5382insC	N	N
Образец 1	BRCA1: 3819delGTAAA	N	N
Образец 1	BRCA1: 3875delGTCT	N	N
Образец 1	BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly)	N	N
Образец 1	BRCA1: 2080delA	N	N
Образец 1	BRCA2: 6174delT	N	N
Образец 2	BRCA1: 185delAG	N	N
Образец 2	BRCA1: 4153delA	N	m**
Образец 2	BRCA1: 5382insC	N	N
Образец 2	BRCA1: 3819delGTAAA	N	N
Образец 2	BRCA1: 3875delGTCT	N	N
Образец 2	BRCA1: 300 T>G (Cys61Gly)	N	N
Образец 2	BRCA1: 2080delA	N	N
Образец 2	BRCA2: 6174delT	N	N
K+1	Положительный контрольный образец гомозиготный по нормальному аллелю	N	N
K+2	Положительный контрольный образец гетерозиготный	N	m
K-	Отрицательный контрольный образец	нд***	нд

N* – нормальный аллель, m** – мутантный аллель, нд*** - недостоверный результат

ВНИМАНИЕ! В связи с высокой медицинской и социальной значимостью носительства полиморфизма (мутации) в гене BRCA1 или BRCA2 рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных образцов, начиная с этапа выделения ДНК.

9.3. Недостоверный результат может быть связан с недостаточным для анализа количеством ДНК, присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.4. Для отрицательного и положительных контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в Таблице № 2.

При получении для положительных контрольных образцов результатов, отличающихся от указанных в таблице, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

10. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1. Транспортирование

10.1.1. Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2. Допускается транспортирование всего набора при температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток.

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

10.2. Хранение

10.2.1. Компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы Taq, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора без возможности замораживания.

10.2.2. Полимеразу Taq следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

10.2.3. Смеси для амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.4. Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, а также с истекшим сроком годности, применению не подлежат.

10.3. Указания по эксплуатации

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

10.3.2. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

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

- компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы Taq, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- смеси для амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу Taq следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

11. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1. При использовании набора реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы класса Б, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09..

11.2. Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры		Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения n тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускать воздействия солнечного света
	Код партии		Нестерильно
	Дата изготовления		Запрет на повторное применение

АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

По вопросам качества набора реагентов обращаться по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «Эйджин», ООО «Эйджин», Россия.

117198, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 1, пом. 665

E-mail: 89161611445@mail.ru

Прошито, пронумеровано

количество листов

16

Подпись

Ф.И.О.

