

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека



В.Г. Акимкин

«16» октября 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для качественного определения
герминальных мутаций 5382insC, 4153delA, 300T>G (C61G) и
185delAG в гене *BRCA1* методом ПЦР

АмплиСенс® BRCA1-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	8
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	12
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	14
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	16
СОСТАВ.....	16
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка проб для амплификации	17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	18
В. Анализ и интерпретация результатов.....	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

АмплиСенс® BRCA1-FL	- Набор реагентов для качественного определения герминальных мутаций 5382insC, 4153delA, 300T>G (C61G) и 185delAG в гене <i>BRCA1</i> методом ПЦР АмплиСенс® BRCA1-FL
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FL	- ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
rs	- reference SNP (идентификационный номер полиморфного ДНК-локуса в международных базах данных SNP)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® BRCA1-FL предназначен для определения генетической склонности к развитию онкологических заболеваний путем качественного определения герминальных мутаций 5382insC (rs80357906), 4153delA (rs80357711), 300T>G (C61G) (rs28897672) и 185delAG (rs80357914) в гене *BRCA1* в биологическом материале (цельная венозная кровь) человека методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике и может быть применен в медицинской практике для определения генетической склонности к развитию онкологических заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене *BRCA1* (в том числе рака молочной железы или рака яичников), вне зависимости от наличия манифестации заболевания.

Ограничения по применению медицинского изделия в различных популяционных и демографических группах отсутствуют.

Отрицательный результат тестирования не позволяет исключить наличие других мутаций в гене *BRCA1* и других генах, а также общепопуляционный риск развития онкологических заболеваний.

Потенциальные пользователи медицинского изделия: к работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники (например, врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант), обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике и может быть применен в медицинской практике для определения генетической склонности к развитию онкологических заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене *BRCA1* (в том числе рака молочной железы или рака яичников), вне зависимости от наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на амплификации участков геномной ДНК человека, включающих сайты мутаций 5382insC (rs80357906), 4153delA (rs80357711), 300T>G (C61G) (rs28897672) и 185delAG (rs80357914) в гене *BRCA1*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

В качестве эндогенного внутреннего контроля используется участок гена *BRCA1*, не несущий мутации в положении 5382 (5382 WT). Функциональная копия гена *BRCA1* должна всегда присутствовать в исследуемом образце в достаточном количестве, пропорциональном количеству клеток человека в образце. Эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования, но и оценивать

адекватность взятия материала и его хранения.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация всех выявляемых ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	5382insC (rs80357906)	4153delA (rs80357711)	300T>G (rs28897672)	185delAG (rs80357914)	5382 WT (без мутации)
Область амплификации	BRCA1	BRCA1	BRCA1	BRCA1	BRCA1

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 используется для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Цельная венозная кровь	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1×10^4

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов определяет наличие мутаций 5382insC (rs80357906), 4153delA (rs80357711), 300T>G (rs28897672) и 185delAG (rs80357914) в гене *BRCA1*. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании 249 образцов геномной ДНК человека с известными генотипами по этим мутациям, определенными методом секвенирования с использованием пиросеквенатора PyroMark Q24.

При проведении тестирования неспецифических реакций и неправильного определения мутаций в исследуемых образцах выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Для тестирования были использованы стандартные образцы предприятия в концентрации 1×10^4 копий/мл, содержащие мутации в гене *BRCA1* в качестве положительного образца и не содержащие мутации в гене *BRCA1* (дикий тип) в качестве отрицательного образца, в 10 повторях каждый.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости –

тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Мутация	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
5382insC	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100
4153delA	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100
300T>G	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100
185delAG	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® BRCA1-FL в сравнении с референтным методом

Мутация	Результаты применения АмплиСенс® BRCA1-FL		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
5382insC (rs80357906)	Всего исследовано 300 образцов	положительных	35	0
		отрицательных	0	265
4153delA (rs80357711)	Всего исследовано 300 образцов	положительных	15	0
		отрицательных	0	285
300T>G (rs28897672)	Всего исследовано 300 образцов	положительных	20	0
		отрицательных	0	280
185delAG (rs80357914)	Всего исследовано 300 образцов	положительных	15	0
		отрицательных	0	285

Диагностические характеристики набора реагентов определяли на 300 образцах геномной ДНК человека.

В качестве референтного метода был использован набор реагентов для детекции генетических полиморфизмов методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark «АмплиСенс® Пироскрин» (форма 9) (ПУ № ФСР 2012/13246). При проведении тестирования расхождений между двумя методами выявлено не было. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов АмплиСенс® BRCA1-FL

Мутация	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
5382insC (rs80357906)	100 (90,11 - 100) %	100 (98,57 - 100) %
4153delA (rs80357711)	100 (79,61 - 100) %	100 (98,67 - 100) %
300T>G (rs28897672)	100 (83,89 - 100) %	100 (98,65 - 100) %
185delAG (rs80357914)	100 (79,61 - 100) %	100 (98,67 - 100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал,

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения набора риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных,

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Перечисленные ниже дополнительные материалы и оборудование, относящиеся к категории медицинских изделий и зарегистрированные на территории Российской Федерации или Евразийского экономического союза, не имеют ограничений по совместному использованию с данным набором реагентов, кроме позиций, для которых указаны конкретные примеры.

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумные пробирки или одноразовая система для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro*.
2. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro*.

Предварительная подготовка исследуемого материала

3. Реагент для предобработки цельной венозной крови (например, реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» (РУ № ФСР 2010/09505).
4. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки или завинчивающиеся объемом 1,5 мл.
5. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл.
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
8. Бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
9. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
10. Центрифуга-вортекс.
11. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой

для удаления надосадочной жидкости.

12. Автоматические дозаторы переменного объема.

13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

14. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

16. Комплект реагентов для экстракции ДНК (например, «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147)).

17. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

18. Реагент 1-кратный ТЕ-буфер (10мМ Трис/НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0).

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

19. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.

20. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, 200 мкл, 1000 мкл.

21. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл, 0,2 мл или 0,1 мл.

22. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс, УФ-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса защиты.

23. Центрифуга-вортекс.

24. Автоматические дозаторы переменного объема.

25. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research,

Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229))).

26. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

27. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

28. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит цельная венозная кровь.

Для получения образцов цельной венозной крови взятие крови провести одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором К₂ЭДТА / К₃ЭДТА в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция ДНК станет невозможной!) После перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов цельной венозной крови до проведения предобработки:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной венозной крови!

Допускается транспортирование цельной венозной крови при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы цельной венозной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» требуют предварительной подготовки с использованием реагента «ГЕМОЛИТИК»:

В пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл внести 1 мл

гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,1 мл крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 4 тыс. g (например, 8 тыс. об/мин для микроцентрифуги MiniSpin) в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» добавить 300 мкл раствора для лизиса и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя раствор для лизиса повторно) или заморожен.

Допускается хранение и транспортирование замороженного осадка:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 2 недель;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение года.

При использовании других комплектов реагентов для экстракции ДНК подготовка исследуемого материала к экстракции проводится при необходимости, в соответствии с инструкцией к применяемому набору.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной венозной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной венозной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут

присутствовать в биологическом материале (цельная венозная кровь), используемом для исследования (см. табл. 6).

Были протестированы образцы цельной венозной крови с известными генотипами без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6. Каждый образец тестировался в трех повторах. Генотип образцов цельной венозной крови был подтвержден методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа серии PyroMark.

Таблица 6

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Экзогенные вещества	K ₂ ЭДТА ⁴	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
	K ₃ ЭДТА ⁴		
	Литий гепарин ⁴	от 12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
Эндогенные вещества	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	Не обнаружено
	Общий холестерин	78 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	Не обнаружено
	Триглицериды	37 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	Не обнаружено
	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп». Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-

⁴ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калий ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, литий гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

преп» смотрите в инструкции к данному комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

ВНИМАНИЕ! Добавление внутреннего контрольного образца не требуется.

Исследуемый образец – осадок, полученный после предобработки гемолитиком **100 мкл** цельной венозной крови.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК человека, включающих сайты мутаций 5382insC (rs80357906), 4153delA (rs80357711), 300T>G (C61G) (rs28897672) и 185delAG (rs80357914) в гене *BRCA1*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество пробирок, шт
Часть 1 из 2			
К+ BRCA WT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
К+ BRCA Het	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL BRCA1	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета	0,6	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Перед проведением ПЦР рекомендуется определить концентрацию ДНК в полученных экстрагированных образцах и при необходимости развести выделенную ДНК ТЕ-буфером до оптимальной концентрации 10-30 нг в реакцию (соответствует концентрации выделенной ДНК $3 \times 10^5 - 9 \times 10^5$ копий/мл).

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-FL BRCA1, 5 мкл ПЦР-буфера-С и 0,5 мкл полимеразы (TaqF). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL BRCA1. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL BRCA1, ПЦР-буфером-С и полимеразой (TaqF), осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL BRCA1, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF), осадить капли на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 часов.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
5. Внести в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и разведенных до оптимальной концентрации.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) положительный контроль ПЦР (K+ WT) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K+ BRCA WT.

- б) **положительный контроль ПЦР (K+ Het)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ BRCA Het**.
- в) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.
- г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить выполнение соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7, 8)⁵.

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁶ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы для приборов роторного типа можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. Если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления

⁵ Программы амплификации (табл. 7, 8) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

⁶ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN).

ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов планшетного⁷ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	27 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по пяти каналам:

Таблица 9

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	5382insC (rs80357906)	4153delA (rs80357711)	300T>G (rs28897672)	185delAG (rs80357914)	5382 WT (без мутации)

Анализ полученных результатов амплификации проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t).

Принцип интерпретации результатов следующий:

⁷ Например, CFX 96 (Bio-Rad).

Таблица 10

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Мутация 5382insC (rs80357906) обнаружена
отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Мутация 4153delA (rs80357711) обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Мутация 300T>G (rs28897672) обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Мутация 185delAG (rs80357914) обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	Детектируемые мутации в гене <i>BRCA1</i> не обнаружены
определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	отсутствует или больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае невалидного результата при повторной постановке рекомендуется повторное взятие материала для анализа.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Для образцов с выявленными мутациями рекомендуется подтвердить результат дополнительным исследованием с использованием методов секвенирования. Отрицательный результат тестирования не позволяет исключить наличие других мутаций в гене *BRCA1* и других генах, а также общепопуляционный риск развития онкологических заболеваний.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей

этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 11 и вкладываем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 11

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР-исследо- вания	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
K–	ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного
K+ WT	ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	определено меньше граничного
K+ Het	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+ Het) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 11) отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для положительного контроля ПЦР (K+ WT) значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора Cy5.5 отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для исследуемых образцов. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
3. Для отрицательного контроля экстракции (OK) и отрицательного контроля ПЦР (K–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5, и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории

продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для таких образцов.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, не превышающее граничное, при этом на графике флуоресценции (в режиме просмотра необработанных («сырых») данных) отсутствует участок экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии, требуется повторно провести амплификацию для этого образца.
5. Для исследуемого образца определено значение C_t , не превышающее граничное значение, по двум или более каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование для всех образцов в постановке, начиная с этапа экстракции ДНК.
6. Для исследуемого образца определено значение C_t менее граничного по каналу для флуорофора Cy5.5 и определено значение C_t менее граничного по одному или нескольким другим каналам детекции (FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5). При этом конечный уровень флуоресценции по этому/этим каналам значительно ниже конечного уровня флуоресценции K+ Net. (см. вкладыш к набору реагентов). Возможно отсутствие мутации, детектируемой по данному каналу. Необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа амплификации, взяв его в оптимальной концентрации (см. раздел «Амплификация с детекцией в режиме «реального времени»).

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (K+ BRCA WT, K+ BRCA Het, K–, OKO) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL BRCA1, ПЦР-буфер-С, полимеразы (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL BRCA1 хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru⁸.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 25
(двадцать пять) лист 06

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



« 16 » 10 2024 г.  А.О.Лисицына

М.П.

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 25 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.





Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® BRCA1-FL

Форма 1: **REF** S-3901-1



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

– «РИБО-преп».

Контроли: для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контроля и элюции	
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:	
Исследуемый образец	осадок, полученный после предобработки гемолитиком 100 мкл цельной венозной крови (порядок подготовки исследуемого материала см. в инструкции)
ОКО	100 мкл в пробирку для ОК
Элюция	
Все образцы	50 мкл в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 2 положительных контроля ПЦР (K+ WT, K+ Het), 1 отрицательный контроль ПЦР (K-) и 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL BRCA1**.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL BRCA1	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-С	$5 \cdot (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь хранить не более 2 часов.

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов и разведенных до концентрации 10-30 нг в реакцию	в пробирки для исследуемых образцов
K+ BRCA WT	в пробирку для K+ WT
K+ BRCA Het	в пробирку для K+ Het
K-	в пробирку для K-
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе,
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить программу амплификации.

Цикл	Единая программа амплификации для приборов роторного типа				Цикл	Программа амплификации для приборов планшетного типа			
	Темпера-тура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов		Темпера-тура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	15 мин	–	1	1	95	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1	2	95	10 с	–	45
3	95	10 с	–	45		60	27 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5						

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы для приборов роторного типа можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. Если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

4. Наб)

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	5382insC (rs80357906)	4153delA (rs80357711)	300T>G (rs28897672)	185delAG (rs80357914)	5382 WT (без мутации)

ВНИМАНИЕ! К набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (C_t), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

ВНИМАНИЕ! Для образцов с выявленными мутациями рекомендуется подтвердить результат дополнительным исследованием с использованием методов секвенирования. Отрицательный результат тестирования не позволяет исключить наличие других мутаций в гене *BRCA1* и других генах, а также общепопуляционный риск развития онкологических заболеваний.

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
(968) лист 9

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



« 24 » 10 2024 г.
М.П.

А.О.Лисицына

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набор реагентов для качественного определения герминальных мутаций 5382insC, 4153delA, 300T>G (C61G) и 185delAG в гене BRCA1 методом ПЦР
АмплиСенс® BRCA1-FL

Форма 1	LOT 08.07.24	 2024-07-08
		 2025-10-08

ТУ 20.59.52-390-01897593-2024

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный результат для образца K+ WT (положительный контроль ПЦР)	Определено значение Ct меньше граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
	Значение Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5	
Положительный результат для K+ WT, разведенного в 50 раз	Определено значение Ct меньше граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
	Значение Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5	
Положительный результат для образца K+ Het (положительный контроль ПЦР)	Определено значение Ct меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	соответствует
Положительный результат для K+ Het, разведенного в 50 раз	Определено значение Ct меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	соответствует
Отрицательный результат для образца K- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
Часть 1 из 2			
K+ BRCA WT	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
K+ BRCA Het	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL BRCA1	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (K+ BRCA WT, K+ BRCA Het, K-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL BRCA1, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL BRCA1 хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

08.07.24

Руководитель ГЛК

ГРУППА
КОНТРОЛЯ
КАЧЕСТВА

(Коды О.И.)
(Ф.И.О.)

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набор реагентов для качественного определения герминальных мутаций 5382insC, 4153delA, 300T>G (C61G) и 185delAG в гене BRCA1 методом ПЦР
АмплиСенс® BRCA1-FL

Форма 1	LOT A08.07.24	 2024-07-08
		 2025-10-08

ТУ 20.59.52-390-01897593-2024

Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный результат для образца K+ WT (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5	
Положительный результат для K+ WT, разведенного в 50 раз	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналу для флуорофора Cy5.5	соответствует
	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5	
Положительный результат для образца K+ Het (положительный контроль ПЦР)	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	соответствует
Положительный результат для K+ Het, разведенного в 50 раз	Определено значение <i>Ct</i> меньше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	соответствует
Отрицательный результат для образца K- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
Часть 1 из 2			
K+ BRCA WT	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
K+ BRCA Het	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Часть 2 из 2			
ПЦР-смесь-FL BRCA1	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета	соответствует	1
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов форма 1 (часть 1 и часть 2) транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 26 °С не более 5 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (K+ BRCA WT, K+ BRCA Het, K-, ОКО) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-FL BRCA1, ПЦР-буфер-С, полимераза (TaqF)) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL BRCA1 хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

08.07.24

Руководитель ГК



(Коды О.И.)

(Ф.И.О.)

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью:

(869) лист 2

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



« 24 » 10 2024 г.
М.п.

А.О.Лисицына

ВКЛАДЫШ к набору реагентов АмплиСенс® BRCA1-FL

Форма 1: REF S-3901-1
LOT 08.07.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал для флуорофора	Calibrate/Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	More settings/Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5FI до 10FI	15%	включена	включена
JOE/Yellow	от 4FI до 8FI	30%	включена	включена
ROX/Orange	от 5FI до 9FI	15%	включена	включена
Cy5/Red	от 4FI до 8FI	20%	включена	включена
Cy5.5/Crimson	от 4FI до 8FI	20%	включена	включена

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options*, задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate 2,5 °C/sec*.

ДТ-96/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Ct(Cp)	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/R6G, Rox, Cy5, Cy5.5	80%	10 StD	25% F(Cp)	30% F(Cp)	Не использовать	Отключить

Установка пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа

Канал для флуорофора	Threshold/Порог
FAM, ROX, Cy5	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ Het
JOE	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем: – 25% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ Het для CFX96; – 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ Het для других приборов
Cy5.5	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ WT

Продолжение см. на обороте

Граничные значения порогового цикла C_t для приборов роторного типа

Образец	Канал для флуорофора				
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
K+ WT	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 34,5$	31
K+ Het	31	30	30	29	31
K-	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 34,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$
OK	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 34,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$
Исследуемые образцы	36,5	35,5	35,5	34,5	36,5

Граничные значения порогового цикла C_t для приборов планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора				
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
K+ WT	C_t отсутствует или $> 38,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$	33
K+ Het	33	32	32	31	33
K-	C_t отсутствует или $> 38,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 38,5$
OK	C_t отсутствует или $> 38,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 38,5$
Исследуемые образцы	38,5	37,5	37,5	36,5	38,5

ВНИМАНИЕ! Если для исследуемого образца определено значение C_t по каналу для флуорофора Cy5.5 менее граничного значения и определено значение C_t менее граничного по одному или нескольким другим каналам детекции (FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5), при этом конечный уровень флуоресценции по этому/этим каналам значительно ниже конечного уровня флуоресценции K+ Het необходимо оценить уровень флуоресценции исследуемого образца относительно K+ WT:

Примечание – Для приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q и ДТ-96, «ДТпрайм» график флуоресценции K+ WT появится после отключения **Устранение выбросов/Порог положительного результата** по тому каналу детекции (FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5), для которого конечный уровень флуоресценции исследуемого образца значительно ниже конечного уровня флуоресценции K+ Het.

Если конечный уровень флуоресценции исследуемого образца близок к уровню флуоресценции K+ WT, предполагается отсутствие в образце мутации, детектируемой по данному каналу. Необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа амплификации, взяв его в оптимальной концентрации (см. раздел инструкции «Амплификация с детекцией в режиме «реального времени»).

ВКЛАДЫШ

к набору реагентов АмплиСенс® BRCA1-FL

Форма 1: REF S-3901-1
LOT A08.07.24

Настройки для приборов роторного типа

Rotor-Gene 3000/6000/Q

Канал для флуорофора	Calibrate/Gain Optimisation... / Опт.уровня сигн	More settings/Outlier Removal/ Устранение выбросов	Slope Correct/ Коррект. уклона	Dynamic tube/ Динамич.фон
FAM/Green	от 5FI до 10FI	15%	включена	включена
JOE/Yellow	от 4FI до 8FI	30%	включена	включена
ROX/Orange	от 5FI до 9FI	15%	включена	включена
Cy5/Red	от 4FI до 8FI	20%	включена	включена
Cy5.5/Crimson	от 4FI до 8FI	20%	включена	включена

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку *Step Options*, задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate* 2,5 °C/sec.

ДТ-96/«ДТпрайм»

Тип анализа	Метод	Канал	Критерий положительного результата ПЦР	Величина Threshold	Нижняя граница/ порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Сt(Cp)	Пороговый (Ct)	Fam, Hex/R6G, Rox, Cy5, Cy5.5	80%	10 StD	25% F(Cp)	30% F(Cp)	Не использовать	Отключить

Установка пороговой линии для приборов планшетного и роторного типа

Канал для флуорофора	Threshold/Порог
FAM, ROX, Cy5	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ Het
JOE	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем: – 25% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ Het для CFX96; – 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ Het для других приборов
Cy5.5	Пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем 10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца K+ WT

Продолжение см. на обороте

Граничные значения порогового цикла C_t для приборов роторного типа

Образец	Канал для флуорофора				
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
K+ WT	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 34,5$	31
K+ Het	31	30	30	29	31
K–	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 34,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$
OK	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 35,5$	C_t отсутствует или $> 34,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$
Исследуемые образцы	36,5	35,5	35,5	34,5	36,5

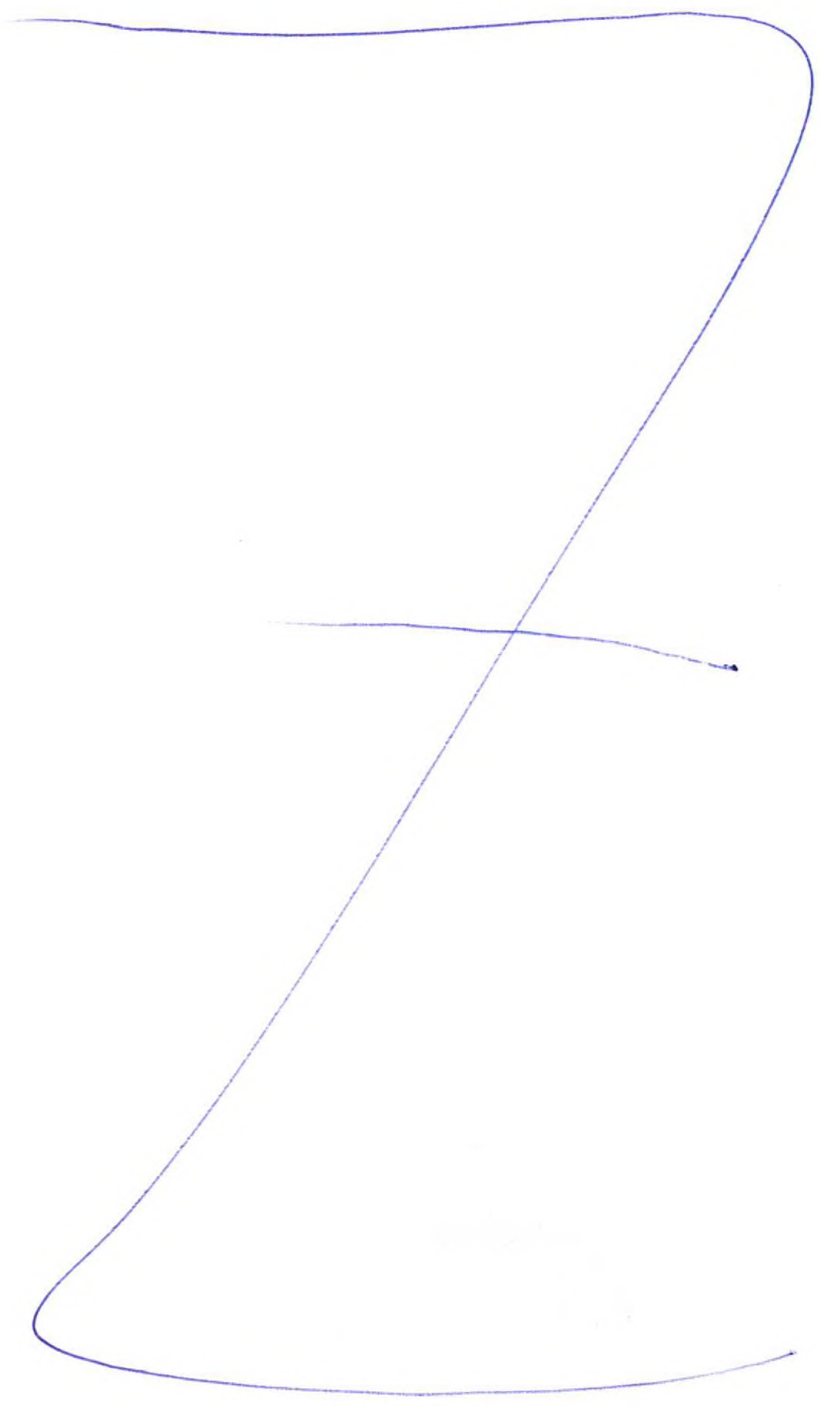
Граничные значения порогового цикла C_t для приборов планшетного типа

Образец	Канал для флуорофора				
	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
K+ WT	C_t отсутствует или $> 38,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$	33
K+ Het	33	32	32	31	33
K–	C_t отсутствует или $> 38,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 38,5$
OK	C_t отсутствует или $> 38,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 37,5$	C_t отсутствует или $> 36,5$	C_t отсутствует или $> 38,5$
Исследуемые образцы	38,5	37,5	37,5	36,5	38,5

ВНИМАНИЕ! Если для исследуемого образца определено значение C_t по каналу для флуорофора Cy5.5 менее граничного значения и определено значение C_t менее граничного по одному или нескольким другим каналам детекции (FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5), при этом конечный уровень флуоресценции по этому/этим каналам значительно ниже конечного уровня флуоресценции K+ Het необходимо оценить уровень флуоресценции исследуемого образца относительно K+ WT:

Примечание – Для приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q и ДТ-96, «ДТпрайм» график флуоресценции K+ WT появится после отключения *Устранение выбросов/Порог положительного результата* по тому каналу детекции (FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5), для которого конечный уровень флуоресценции исследуемого образца значительно ниже конечного уровня флуоресценции K+ Het.

Если конечный уровень флуоресценции исследуемого образца близок к уровню флуоресценции K+ WT, предполагается отсутствие в образце мутации, детектируемой по данному каналу. Необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа амплификации, взяв его в оптимальной концентрации (см. раздел инструкции «Амплификация с детекцией в режиме «реального времени»).



КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3

лист 8

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына

«14» 10 2024 г.
м.п.