



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«06» декабря 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для качественного выявления мутаций в генах *BRCA1,2* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «*BRCA1,2*-ткань»

ТУ 21.20.23-029-97638376-2020

Содержание

Список сокращений	3
Введение.....	4
1. Назначение	8
2. Принцип метода.....	9
3. Состав набора реагентов	11
4. Характеристики набора реагентов	15
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «BRCA1,2 – ткань»	19
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	20
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором....	22
8. Анализируемые образцы.....	23
9. Проведение анализа	28
10. Регистрация и интерпретация результатов.....	32
11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора.	43
12. Утилизация.....	43
13. Гарантийные обязательства, контакты	46
Приложение А.....	48

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО-N	положительный контрольный образец (нормальная гомозигота) - N
ПКО-M	положительный контрольный образец (мутантная гомозигота) - M

Введение

Гены *BRCA1,2* являются классическими опухолевыми супрессорами, возникновение мутаций в этих генах приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, процессов дифференцировки и апоптоза, а также к нарастанию хромосомной нестабильности, приводящей к повышению риска развития наследственных опухолевых заболеваний, таких как, рак молочной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак желудка^{1 2 3}.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «*BRCA1,2* - ткань», являются мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G, *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T, *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA, *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A, *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del, *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del, *BRCA2* с.8754+1G, *BRCA1* с.4689C>G, *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT.

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности в отношении мутаций, локализованных в генах *BRCA1* и *BRCA2* человека.

Гены *BRCA1,2* относятся к группе генов-супрессоров, которые кодируют белки, вовлеченные в процесс репарации двухнитевых разрывов ДНК. При возникновении мутаций в этих генах теряется функция белков, вследствие чего нарушается основной механизм репарации двухнитевых разрывов ДНК.

Исследование для выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* помогает определить наиболее эффективную стратегию лечения как таргетными препаратами (PARP-ингибиторами) так и различными режимами химиотерапии, а также возможность спрогнозировать

¹ Клиническими рекомендациями «Рак молочной железы», Возрастная группа – пациенты старше 18 лет, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.

² Клиническими рекомендациями «Рак яичников/рак маточной трубы/первичный рак брюшины», Возрастная группа – пациенты старше 18 лет, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.

³ Клиническими рекомендациями «Рак поджелудочной железы», Возрастная группа – пациенты старше 18 лет, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.

течение заболевания рака молочной железы, яичников, рака поджелудочной железы, желудка⁴.

Было показано, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ в отличие от спорадического характеризуется лучшей отвечаемостью на терапию вплоть до полной ремиссии. Установлено, что выживаемость больных наследственным раком органов женской репродуктивной системы значительно выше, чем в общей группе больных, независимо от стадии и проводимого лечения: 5-летняя выживаемость больных наследственным РМЖ составляет $58,9 \pm 6,3\%$, в то время как при спорадическом раке — $39,7 \pm 4,6\%$. Значение генетического тестирования определяется также тем, что *BRCA*-статус потенциально может быть использован в качестве предиктивного маркера при проведении химиотерапевтического лечения. Наличие дефектов системы репарации предполагает высокую эффективность ДНК-повреждающих агентов, таких как ионизирующая радиация и лекарственные препараты. Показана высокая эффективность неоадьювантной терапии антрациклинами и таксанами у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Клетки с нарушенными механизмами гомологичной рекомбинации отличаются высокой чувствительностью к производным платины. В ряде исследований показано, что у больных *BRCA1*-ассоциированным РМЖ эффективна неоадьювантная терапия. «Цисплатином», выраженная реакция на препарат независимо связана с трижды негативным фенотипом и с наличием мутации в гене *BRCA1*⁵.

Показано, что *BRCA1/2*-дефицитные опухолевые клетки селективно гибнут при использовании PARP-ингибиторов (PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) — ферменты, катализирующие поли-АДФ-рибозилирование; участвуют в репарации ДНК). Показано, что *BRCA1/2*-дефицитные опухолевые клетки селективно гибнут при использовании PARP-ингибиторов, в частности «Олапариба»⁶.

⁴ Имянитов Е.Н. Общие представления о наследственных опухолевых синдромах // Практическая онкология. – 2014. – Т. 15. – № 3. – С. 101-106.

⁵ Gelmon K. et al. Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes // Ann Oncol. — 2012. — Vol. 23. — № 9. — P. 2223–2234.

⁶ Oza A. M. et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial // Lancet Oncol. — 2015. — Vol. 16. — № 1. — P. 87–89

В соответствии с результатами исследования OVATAR, проводимого совместно Российским обществом клинической онкологии (RUSSCO) и фармацевтической компанией AstraZeneca Russia, патогенные мутации в генах *BRCA1/2* выявляются у 35% (140/400) пациенток, по результатам параллельного секвенирования крови и опухолевой ткани у 400 больных первичным раком яичников в российской популяции. При этом частые 8 мутаций, которые официально зарегистрированы в России для панели ПЦР, выявляются только в 49% случаев (69/140). Во всех оставшихся 51% (71/140) случаях были выявлены редкие патогенные мутации (встречаемость менее 2%) в генах *BRCA1/2* методами полного секвенирования генов (NGS и MLPA). Из них в 30,7% (43/140) в российской популяции выявляются редкие герминальные мутации, в 15% (21/140) определялись соматические мутации, а крупные перестройки – в 5% (7/140).⁷

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «*BRCA1,2* – ткань» рекомендуется применять при проведении диагностики пациентов с наследственными формами опухолевых заболеваний (рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желудка) с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Применяемый способ исследования ДНК относится к неинвазивным процедурам, не несёт угрозы здоровью человека и не вызывает осложнений.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия:

- В соответствии с клиническими рекомендациями «Рак молочной железы», Возрастная группа – пациенты старше 18 лет,

⁷ Савец В.В. [и др.] Финальный анализ неинтервенционного исследования OVATAR: диагностические и лечебные подходы к лечению рака яичников в России. Анализ группы с мутациями *BRCA* // Журнал «Злокачественные опухоли». – 2019. – Т. 9. – №3S1. – С. 90-91.

утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.:

«Рекомендуется определение методом ПЦР в лимфоцитах крови наиболее частых герминальных мутаций в генах *BRCA1/2* и консультация врача-генетика для определения тактики лечения в следующих случаях:

- у женщин с подтвержденным РМЖ при отягощенном семейном анамнезе (наличие РМЖ у близких родственников в возрасте ≤ 50 лет, рака яичников или маточных труб, рака поджелудочной железы, РМЖ у мужчины, метастатического рака предстательной железы);

- у женщин с подтвержденным РМЖ в возрасте < 45 лет;

- у женщин < 60 лет с тройным негативным фенотипом РМЖ;

- при первично-множественном РМЖ (включая, но не ограничиваясь установленным - диагнозом рака контрлатеральной молочной железы, рака яичников или маточных труб, рака поджелудочной железы);

- при РМЖ у мужчин.

Комментарии: пациенток, имеющих личный/наследственный анамнез, у которых не выявлены частые наследственные мутации, следует направлять на расширенное исследование герминальных и/или соматических мутаций с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS).»

- В соответствии с клиническими рекомендациями «Рак яичников/рак маточной трубы/первичный рак брюшины», Возрастная группа – пациенты старше 18 лет, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.:

«Всем пациенткам с серозными и эндометриоидными карциномами высокой степени злокачественности рекомендовано молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в крови или взятием соскоба слизистой ротовой полости и/или в биопсийном (операционном) материале, как предикторов исхода заболевания и выбора алгоритма лечения пациента.

Комментарий: частота мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* при указанных гистологических типах опухоли составляет около 15 %. Информация о наличии мутации *BRCA* полезна с целью определения более высокой чувствительности опухоли к терапии алкилирующими препаратами, производными платины и PARP-ингибиторами.»

- В соответствии с клиническими рекомендациями «Рак поджелудочной железы», Возрастная группа – пациенты старше 18 лет, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.:

«Всем пациентам с раком поджелудочной железы рекомендуется молекулярно-генетическое исследование мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2* в крови или опухолевой ткани.

Комментарий: учитывая частоту выявления мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* и *PALB2* более 5%, а также существенное влияние данных мутаций на выбор схемы химиотерапии, определение данных мутаций целесообразно всем пациентам.»

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

1.1. Назначение: набор реагентов «*BRCA1,2* – ткань» предназначен для качественного выявления мутаций в генах *BRCA1* (с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.4035delA, с.5161C>T, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.1961delA, с.4689C>G, с.3756_3759del), *BRCA2* (с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G>A, 6174delT), методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме кривых плавления в пробе геномной ДНК человека, выделенной из ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), при проведении диагностики пациентов с наследственными формами опухолевых заболеваний (рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы) с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Функциональное назначение. Полученные результаты могут использоваться при проведении диагностики пациентов с наследственными формами опухолевых заболеваний (рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы) с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Потенциальные потребители медицинского изделия.

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического профиля. Профессиональный

уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени с детекцией кривых плавления.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека, выделенные из ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок).

Минимальное содержание опухоли в образце для проведения теста - 20% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

Принцип определения

Выявление мутаций в генах *BRCA1,2* - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G, *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T, *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA, *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A, *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del, *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del, *BRCA2* с.8754+1G, *BRCA1* с.4689C>G, *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT методом мультиплексной ПЦР с детекцией кривых плавления в пробе геномной ДНК человека, выделенной из биологического материала, включает в себя 3 этапа:

1. Подготовку ПЦР;
2. ПЦР-амплификацию ДНК и гибридационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени с детекцией кривых плавления;
3. Интерпретацию результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, смесь dNTP, ионы магния и оптимизированный буфер.

В составе праймер-микса присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени. По

окончании ПЦР проводится этап температурного плавления дуплексов, вследствие чего происходит изменение уровня флуоресценции, который фиксируется программным обеспечением прибора и представляется в виде графиков.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков геномной ДНК генов *BRCA1,2* - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G, *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T, *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA, *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A, *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del, *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del, *BRCA2* с.8754+1G, *BRCA1* с.4689C>G, *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT (табл. 1).

Таблица 1 – Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Мутации, соответствующие каналу детекции	
	FAM	HEX/ VIC
5266/181	<i>BRCA1</i> с.5266dupC	<i>BRCA1</i> с.181T>G
5251/5161	<i>BRCA1</i> с.5251C>T	<i>BRCA1</i> с.5161C>T
4035/1961	<i>BRCA1</i> с.4035delA	<i>BRCA1</i> с.1961delA
3749/4675	<i>BRCA2</i> с.3749dupA	<i>BRCA1</i> с.4675G>A
961/2897	<i>BRCA2</i> с.961_962insAA	<i>BRCA2</i> с.2897_2898del
68/3700	<i>BRCA1</i> с.68_69del	<i>BRCA1</i> с.3700_3704del
8754/4689	<i>BRCA2</i> с.8754+1G>A	<i>BRCA1</i> с.4689C>G
3756/6174	<i>BRCA1</i> с.3756_3759del	<i>BRCA2</i> 6174delT

Ограничения метода

Минимальное содержание опухоли в образце для проведения теста - 20% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

Возможная причина получения ложноположительного результата - контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции мультиплексной ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истёкшим сроком годности или нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Время выполнения протокола ПЦР составляет 2 часа.

3. Состав набора реагентов

Варианты исполнения

Набор реагентов выпускается **в одном варианте исполнения** - «*BRCA1,2* - ткань».

Количество анализируемых проб

Каждый набор «*BRCA1,2* - ткань» содержит реагенты, рассчитанные для проведения 48 реакций каждого мультиплекса (5266/181 - *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G; 5251/5161 - *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T; 4035/1961 - *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA; 3749/4675 - *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A; 961/2897 - *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del; 68/3700 - *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del; 8754/4689 - *BRCA2* с.8754+1G>A, *BRCA1* с.4689C>G; 3756/6174 - *BRCA1* с.3756_3759del, *BRCA2* 6174delT), что соответствует определению 36 исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами или 12 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора

Таблица 2 – Состав формы комплектации «*BRCA1,2* – ткань»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	3 пробирки по 1280 мкл
2	Праймер-микс 5266/181	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
3	Праймер-микс 5251/5161	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
4	Праймер-микс 4035/1961	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
5	Праймер-микс 3749/4675	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
6	Праймер-микс 961/2897	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
7	Праймер-микс 68/3700	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
8	Праймер-микс 8754/4689	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
9	Праймер-микс 3756/6174	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 192 мкл
10	ПКО-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл
11	ПКО-М	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл
12	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 576 мкл

ПЦР-буфер готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, смесь дНТФ и оптимизированный для ПЦР буфер

Праймер-микс 5266/181 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к участку с мутацией в гене *BRCA1* с.5266dupC. Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к участку с мутацией в гене *BRCA1* с.181T>G. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Праймер-микс 5251/5161 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA1* с.5251C>T. Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA1* с.5161C>T. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Праймер-микс 4035/1961 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.4035delA. Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA1* с.1961delA. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Праймер-микс 3749/4675 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA2* с.3749dupA. Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA1* с.4675G>A. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Праймер-микс 961/2897 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA2* с.961_962insAA. Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA2* с.2897_2898del. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Праймер-микс 68/3700 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA1* с.68_69del. Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.3700_3704del. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Праймер-микс 8754/4689 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA2* с.8754+1G>A. Детекция осуществляется по каналу FAM.
2. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA1* с.4689C>G. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Праймер-микс 3756/6174 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

3. Праймеры и зонд к мутации *BRCA1* с.3756_3759del. Детекция осуществляется по каналу FAM.

4. Праймеры и зонд к участку с мутацией *BRCA2* 6174delT. Детекция осуществляется по каналу HEX/VIC.

Положительный контрольный образец - N (ПКО-N) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – нормальные варианты генов *BRCA1,2*, заключённых в плазмидные векторы pUC57-BsaI-Free и pAl-TA с концентрацией 1 000 коп в 1 мкл TE буфера.

Положительный контрольный образец - M (ПКО-M) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – специфический фрагменты с мутациями в генах *BRCA1* (с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.5161C>T, с.4035delA, с.1961delA, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.4689C>G, с.3756_3759del) и *BRCA2* (с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G, 6174delT), заключённых в плазмидный вектор pAl-TA с концентрацией 1 000 коп в 1 мкл TE буфера.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «BRCA1,2 – ткань».

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1. Технические характеристики		1
1) Внешний вид		
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 5266/181	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 5251/5161	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 4035/1961	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 3749/4675	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 961/2897	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 68/3700	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 8754/4689	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 3756/6174	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-N	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-M	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-029-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-029-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-029-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
Положительный результат с ПКО-N	Регистрация наличия одного пика плавления и определение температуры плавления по каналам FAM и HEX/VIC	Раздел 7, пункт 7.8.3

Положительный результат с ПКО-М	Регистрация наличия одного пика плавления и определение температуры плавления по каналам FAM и HEX/VIC	Раздел 7, пункт 7.8.3
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM и HEX/VIC отсутствуют пики плавления и температура плавления.	Раздел 7, пункт 7.8.3

4.2. Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к мутациям в генах *BRCA1* (с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.4035delA, с.5161C>T, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.1961delA, с.4689C>G, с.3756_3759del), *BRCA2* (с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G>A, 6174delT).

4.2.2 Аналитическая чувствительность

10 копий гена *BRCA1*, *BRCA2* в 1 мкл раствора ДНК

4.2.3 Минимальное содержание опухоли в образце для проведения теста - 20% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

4.2.4 Предел обнаружения (LoD) - наименьшая частота заявленных аллелей в образце в генах *BRCA1*, *BRCA2*, которое способно выявить изделие составляет 5%.

4.2.5 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительные контрольные образцы ПКО-N и ПКО-М были исследованы по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 2%.

4.2.6 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости, однако для

тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 3%.

4.3 Характеристики клинической эффективности

В ходе проведения клинических испытаний было отобрано 53 образца ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), от пациентов с наследственными формами опухолевых заболеваний (рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы) с подтвержденным положительным статусом исследуемых мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «*BRCA1,2*-ткань», производства ООО «ТестГен», для оценки межсерийной сходимости.

Для проведения ПЦР-исследования были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

Воспроизводимость результатов 100%.

Таблица 4 – Характеристики клинической эффективности

Мутация	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
<i>BRCA1</i> с.5266dupC	40	66	100% (95% ДИ:91,19%-100%)	(100% (95% ДИ:94,56%-100%))
<i>BRCA1</i> с.5251C>T	4	102	(100% (95% ДИ:39,76%-100%))	(100% (95% ДИ:96,45%-100%))
<i>BRCA1</i> с.4035delA	8	98	100% (95% ДИ:63,06%-100%)	(100% (95% ДИ:96,31%-100%))
<i>BRCA2</i> с.3749dupA	4	102	(100% (95% ДИ:39,76%-100%))	(100% (95% ДИ:96,45%-100%))
<i>BRCA2</i> с.961_962insAA	4	102	(100% (95% ДИ:39,76%-100%))	(100% (95% ДИ:96,45%-100%))
<i>BRCA1</i> с.68_69del	2	104	(100% (95% ДИ:15,81%-100%))	(100% (95% ДИ:96,52%-100%))
<i>BRCA2</i> с.8754+1G>A	2	104	(100% (95% ДИ:15,81%-100%))	(100% (95% ДИ:96,52%-100%))
<i>BRCA1</i> с.3756_3759del	2	104	(100% (95% ДИ:15,81%-100%))	(100% (95% ДИ:96,52%-100%))
<i>BRCA1</i> с.181T>G	10	96	(100% (95% ДИ:69,15%-100%))	(100% (95% ДИ:96,23%-100%))
<i>BRCA1</i> с.5161C>T	8	98	100% (95% ДИ:63,06%-100%)	(100% (95% ДИ:96,31%-100%))
<i>BRCA1</i> с.1961delA	6	100	(100% (95% ДИ:54,07%-100%))	(100% (95% ДИ:96,38%-100%))
<i>BRCA1</i> с.4675G>A	4	102	(100% (95% ДИ:39,76%-100%))	(100% (95% ДИ:96,45%-100%))
<i>BRCA2</i> с.2897_2898del	4	102	(100% (95% ДИ:39,76%-100%))	(100% (95% ДИ:96,45%-100%))
<i>BRCA1</i> с.3700_3704del	4	102	(100% (95% ДИ:39,76%-100%))	(100% (95% ДИ:96,45%-100%))
<i>BRCA1</i> с.4689C>G	2	104	(100%)	(100%)

			(95% ДИ:15,81%-100%)	(95% ДИ:96,52%-100%)
<i>BRCA2</i> 6174delT	2	104	(100% (95% ДИ:15,81%-100%)	(100% (95% ДИ:96,52%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «*BRCA1,2* – ткань»

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих внабор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые
3. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержащим из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;
4. проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
5. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
6. использование непригодного для применения набора (использование по истечению срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набор реагентов для качественного выявления мутаций в генах *BRCA1,2* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «*BRCA1,2* – ткань» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 3 – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «*BRCA1,2* – ткань», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «*BRCA1,2* – ткань», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «*BRCA1,2* – ткань», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 2.1 3684 21 от 28.01 2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий". Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб, помещений и оборудования.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому

водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий";

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.

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

2. допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедшего обучение на лицензированных курсах специализации по ПЦР-диагностике, а также со средним специальным медицинским образованием);

3. не использовать набор по истечении срока годности;

4. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с набором реагентов для мультиплексной ПЦР «BRCA1,2–ткань» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. ПЦР-бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма (например, «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник от 2°C до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16°C.

5. Амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM, HEX/VIC, например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм», «ДТлайт» («ДНК-Технология», Россия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Ахуген», США).

2. Одноразовые пробирки Эппендорф на 1,5 мл;

3. Планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, «Ахуген», США) или тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой для ПЦР:

- пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл,

- пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл в стрипах.

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька.

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

7. Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани (см. п. 8.2).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Биологическим материалом для исследования является ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок.

8.1 Процедура получения биологического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор материала на исследование

Биопсийный и (или) операционный материал.

Материал забирают из патологически изменённого очага: из его центральной зоны и зоны, граничащей с неизменёнными тканями. Взятый материал помещают в ёмкость с 10% раствором нейтрального формалина. После фиксации проводят процедуру лабораторной обработки биологического материала, которая включает в себя следующие процедуры – проводка (обезвоживание и пропитывание парафином); заливка в парафин с изготовлением парафиновых блоков – FFPE-блоков); микротомия (изготовление парафиновых срезов).

Критерии пригодности гистологических препаратов для выделения ДНК для последующего молекулярно-генетического анализа опухолевых клеток:

1. По результатам морфологического исследования опухолевые зоны должны занимать не менее 20% площади ткани в срезе с FFPE-блока;
2. По результатам морфологического исследования зоны некроза и кровоизлияния в совокупности должны занимать не более 15% площади ткани в срезе с FFPE-блока;

В случае, если образец не соответствует хотя бы одному из перечисленных критериев, рекомендуется использовать другой образец.

При подготовке срезов с парафиновых блоков необходимо минимизировать риск кросс-контаминации образцов, для чего необходимо:

- работать в одноразовых неопудренных перчатках;
- проводить процедуру в ПЦР-боксе или ламинарном шкафу;

- использовать одноразовые лезвия для микротомы и стерильные пинцеты;
- первые два среза с каждого блока утилизировать, а для молекулярного исследования использовать срезы, начиная с третьего;
- не помещать срезы на водяную баню.

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного биологического материала:

- при комнатной температуре - в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С - в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С - в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С - длительно.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Условия транспортирования, хранения FFPE-блоков:

- при температуре от 15 до 25 °С – не более 3-х лет.

Утилизация биологического материала (класс Б) осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

8.2 Процедура получения пробы геномной ДНК человека, выделенной из биологического материала

Для выделения пробы геномной ДНК человека из биологического материала рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-М) по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14273 от 06.05.2021 г);

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016, производства ООО «ТестГен», Россия. Регистрационное удостоверение № РЗН2018/7772 от 30.10.2018.

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Условия возможного хранения анализируемых образцов

ДНК

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов,
- при температуре от минус 18 до минус 22 °С – в течение 1 месяца,
- при температуре минус 80 °С – длительно.

8.3 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «*BRCA1,2 – ткань*» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

- 1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);
- 2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение образца ткани гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;
- 3) вещества, добавляемые во время подготовки образца - в данном случае парафин, который используется для приготовления FFPE-блока.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «*BRCA1,2 – ткань*», приведены в таблице 5.

Таблица 5

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Вещества, добавляемые во время подготовки образца	
Парафин	1*10 ⁻⁴ мкл/мкл
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Ропивакаин (обезболивающее средство)	0,02 мг/мл
Бевацизумаб (применяется для терапии рака яичника, рака молочной железы)	0,02 мг/мл
Паклитаксел (профилактика и лечение рака молочной железы, рака яичников)	0,006 мг/мл

Капецитабин (препарат для лечения рака молочной железы)	0,03 мг/мл
Гемцитабин (показан при раке поджелудочной железы)	0,04 мг/мл
Цисплатин (противоопухолевое средство)	0,002 мг/мл

На основании результатов исследования потенциально интерферирующие вещества, встречающиеся при процедуре выделения ДНК из клинического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «*BRCA1,2* – ткань», не оказывают влияние на результат анализа.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- минимальное содержание опухоли в образце для проведения теста - 20% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

9. Проведение анализа

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

9.1 Подготовка компонентов набора для ПЦР

Перед приготовлением реакций необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём, с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20-30 мин.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером, Праймер-миксами, ОКО, ПКО-N и ПКО-M переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек., затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,1-0,2 мл для ПЦР из расчёта для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов⁹ + 1 ПКО-N + 1 ПКО-M + 1 ОКО.

В зависимости от необходимости выявления конкретных мутаций и используемого варианта комплектации набора, каждый образец ставится с одним или несколькими мультиплексами (праймер-миксами). В таблице 6 приведена схема расположения ПЦР-пробирок при использовании восьми мультиплексов.

⁹ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторах.

Таблица 6 – Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	Образец 1	Образец n	ПКО-N	ПКО-M	ОКО
5266/181	○	○	○	○	○
5251/5161	○	○	○	○	○
4035/1961	○	○	○	○	○
3749/4675	○	○	○	○	○
961/2897	○	○	○	○	○
68/3700	○	○	○	○	○
8754/4689	○	○	○	○	○
3756/6174	○	○	○	○	○

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 10 мкл,
2. Соответствующий праймер-микс (5266/181, 5251/5161, 4035/1961, 3749/4675, 961/2897, 68/3700, 8754/4689, 3756/6174) – 4 мкл,
3. Образец (исследуемый образец ДНК⁹, ПКО-N, ПКО-M, ОКО) – 6 мкл.

Общий объём реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!

9.2 Протокол проведения ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 6 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,2 мл для ПЦР. Для каждого мультиплекса берётся необходимое количество пробирок для исследуемых образцов + 1 ПКО-N + 1 ПКО-M + 1 ОКО (таблица 6).

2. Внести в каждую пробирку по 10 мкл ПЦР-буфера¹⁰.

3. Внести по 4 мкл Праймер-миксов (5266/181, 5251/5161, 4035/1961, 3749/4675, 961/2897, 68/3700, 8754/4689, 3756/6174) в пробирки для соответствующих мультиплексов.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК¹¹. В пробирки для ПКО-N, ПКО-M и ОКО ДНК не вносится.

5. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ПКО-N и ПКО-M.

¹⁰ Рекомендуется сначала приготовить смесь праймер-микса и ПЦР-буфера для каждого мультиплекса в отдельной пробирке на 1,5-2,0 мл из расчёта: $(n+4) \times 10$ мкл ПЦР-буфера + $(n+4) \times 4$ мкл соответствующего праймер-микса, где n – количество образцов. Перемешать на вортексе, осадить капли коротким центрифугированием и внести по 14 мкл в ПЦР-пробирки для соответствующего мультиплекса.

¹¹ Для предотвращения ингибирования ПЦР объём образца может быть снижен до 1-5 мкл, при этом объём реакции доводится до 20 мкл деионизированной водой из ОКО.

6. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ОКО.

7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1-3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

8. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

9. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 7.

10. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

Таблица 7 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	94	00:15	-	5
	67	00:30	-	
3	94	00:10	-	45
	67	00:30	-	
4	95	00:05	-	1
5	25	00:30	-	1
6	25	00:15	FAM, HEX/VIC, Δt	100 (0,5)

11. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM, HEX/VIC.

12. Запустить ПЦР-РВ с детекцией кривых плавления.

13. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Интерпретация результатов выполняется по значениям температуры плавления по каналам FAM, HEX/VIC (табл. 8).

Таблица 8 – Интерпретация результатов по каналам

Мультиплекс (праймер-микс)	Мутации, соответствующие каналу детекции	
	FAM	HEX/ VIC
5266/181	<i>BRCA1</i> c.5266dupC	<i>BRCA1</i> c.181T>G
5251/5161	<i>BRCA1</i> c.5251C>T	<i>BRCA1</i> c.5161C>T
4035/1961	<i>BRCA1</i> c.4035delA	<i>BRCA1</i> c.1961delA
3749/4675	<i>BRCA2</i> c.3749dupA	<i>BRCA1</i> c.4675G>A
961/2897	<i>BRCA2</i> c.961_962insAA	<i>BRCA2</i> c.2897_2898del
68/3700	<i>BRCA1</i> c.68_69del	<i>BRCA1</i> c.3700_3704del
8754/4689	<i>BRCA2</i> c.8754+1G>A	<i>BRCA1</i> c.4689C>G
3756/6174	<i>BRCA1</i> c.3756_3759del	<i>BRCA2</i> 6174delT

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Сначала оценивают прохождение реакции и значения температуры плавления в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 9).

Таблица 9 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Выбранный флуорофор	
	FAM (<i>BRCA1</i> c.5266dupC, <i>BRCA1</i> c.5251C>T, <i>BRCA1</i> c.4035delA, <i>BRCA2</i> c.3749dupA, <i>BRCA2</i> c.961_962insAA, <i>BRCA1</i> c.68_69del, <i>BRCA2</i> c.8754+1G>A, <i>BRCA1</i> c.3756_3759del)	HEX/VIC (<i>BRCA1</i> c.181T>G, <i>BRCA1</i> c.5161C>T, <i>BRCA1</i> c.1961delA, <i>BRCA1</i> c.4675G>A, <i>BRCA2</i> c.2897_2898del, <i>BRCA1</i> c.3700_3704del, <i>BRCA1</i> c.4689C>G, <i>BRCA2</i> 6174delT)
ОКО	Отсутствует	Отсутствует
ПКО-N	Должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться температура плавления	
ПКО-M	Должно фиксироваться наличие одного пика плавления и определяться температура плавления	

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 10-17.

ВНИМАНИЕ! В таблицах по интерпретации под «трапециевидным графиком» подразумевается кривая плавления, имеющая следующие характеристики:

- основание (начало левой восходящей и окончание правой нисходящей линий) по ширине практически равно суммарной ширине двух оснований ПКО-N и ПКО-M анализируемого мультиплекса;

- вместо пика наблюдается пологая линия.

Трапециевидный график (рисунок 1) указывается в интерпретации как альтернативный вид графика у образца с мутацией из-за особенностей обработки данных некоторыми приборами.

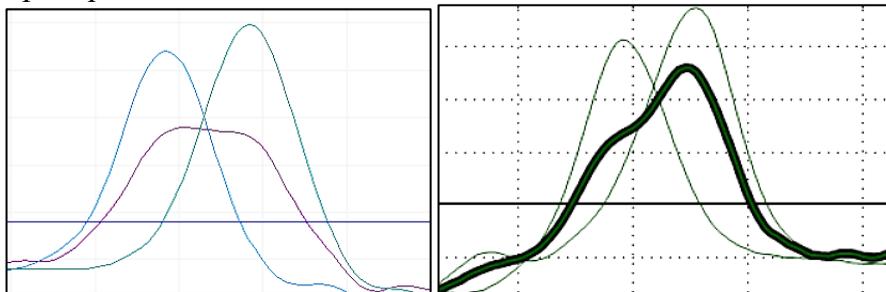


Рисунок 1 – Примеры трапециевидных графиков

Таблица 10 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 5266/181 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.5266dupC, *BRCA1* с.181T>G)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.5266dupC, <i>BRCA1</i> с.181T>G не обнаружены)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.181T>G
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.5266dupC
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C, либо трапециевидный		

график		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 11 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 5251/5161 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.5251C>T, *BRCA1* с.5161C>T)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.5251C>T, <i>BRCA1</i> с.5161C>T не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.5161C>T
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C, либо трапециевидный график	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.5251C>T
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 4035/1961 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.4035delA, *BRCA1* с.1961delA)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.4035delA, <i>BRCA1</i> с.1961delA не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.1961delA
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C, либо трапециевидный график	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.4035delA
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 3749/4675 (определение наличия мутаций *BRCA2* с.3749dupA, *BRCA1* с.4675G>A)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA2</i> с.3749dupA, <i>BRCA1</i> с.4675G>A не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.4675G>A
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с.3749dupA
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C, либо трапециевидный график		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 14 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 961/2897 (определение наличия мутаций *BRCA2* с.961_962insAA, *BRCA2* с.2897_2898del)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутаций <i>BRCA2</i> с.961_962insAA, <i>BRCA2</i> с.2897_2898del не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с.2897_2898del
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с.961_962insAA
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 15 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 68/3700 (определение наличия мутаций *BRCA1* с.68_69del, *BRCA1* с.3700_3704del)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1</i> с.68_69del, <i>BRCA1</i> с.3700_3704del не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.3700_3704del)
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.68_69del
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 16 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 8754/4689 (определение наличия мутаций *BRCA2* с.8754+1G>A, *BRCA1* с.4689C>G)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA2</i> с.8754+1G>A, <i>BRCA1</i> с.4689C>G не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1</i> с.4689C>G
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA2</i> с.8754+1G>A
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Таблица 17 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 3756/6174 (определение наличия мутаций *BRCA1 c.3756_3759del*, *BRCA2 6174delT*)

Каналы флуоресценции		Определяемый генотип
FAM	HEX	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	N/N – нормальная гомозигота (мутации <i>BRCA1 c.3756_3759del</i> , <i>BRCA2 6174delT</i> не обнаружено)
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA2 6174delT</i>
	Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C	
Один пик плавления, отличающийся от ПКО-M не более чем на 2°C	Один пик плавления, отличающийся от ПКО-N не более чем на 2°C	Обнаружена мутация <i>BRCA1 c.3756_3759del</i>
Два пика плавления, отличающиеся от ПКО-M и ПКО-N не более чем на 2°C		
Температура плавления отличается от ПКО-N и ПКО-M более чем на 2°C		Результат сомнительный

Примечание: «N» - нормальный генотип, «M» - мутантный генотип.

Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ПЦР выделенного препарата ДНК.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор «*BRCA1,2* – ткань» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 16 до минус 24 °С в течение всего срока годности набора.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

ПЦР-буфер перед использованием разморозить при комнатной температуре и хорошо перемешать переворачиванием пробирки без образования пены.

Допускается заморозка/оттаивание набора «*BRCA1,2* – ткань» не более 5 раз.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «*BRCA1,2* – ткань» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор «*BRCA1,2* – ткань» транспортировать при температуре от минус 16 до минус 24 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 30 суток, или при температуре от 15 до 25 °С не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности

и условий транспортирования.

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «*BRCA1,2* – ткань» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 16 до минус 24 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

12. Утилизация

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 «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».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 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» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «BRCA1,2 –ткань» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

13. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «BRCA1,2 – ткань» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Набор реагентов для качественного выявления мутаций в генах *BRCA1,2* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «*BRCA1,2*-ткань» по ТУ 21.20.23-029-97638376-2020 соответствует следующим межгосударственным стандартам на продукцию:

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ Р 15.309-98	Система разработки и постановки

	продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия
ГОСТ 2.104-2006	Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Основные надписи
ГОСТ Р 1.3-2018	Стандартизация в Российской Федерации. Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

Символы маркировки

Символ	Наименование символа
	Использовать до
	Дата изготовления
	Код партии
	Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для 48 реакций
	Медицинское изделие для диагностики in vitro