«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 185delAG/3875del4)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 185delAG/3875del4)» предназначен для определения мутаций 185delAG и 3875del4 в гене *BRCA1* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) и «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2,* при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак гортани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) BRCA1 185delAG/3875del4, лиофилизированная – 48 пробирок;

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1 лист.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения мутаций 185delAG и 3875del4 в гене *BRCA1* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2- 648).

Специфичность составляет 100 % при условии, что генотип по мутациям 185delAG и 3875del4 в гене *BRCA1* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (55 ± 3) °С и по каналу «ROX» (65 ± 3) °С.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (44 ± 3) °С и по каналу «ROX» (48 ± 3) °С.

3.4. Диагностическая специфичность определения мутаций 185delAG и 3875del4 в гене *BRCA1:* клинические испытания, проведенные на 213 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении раз-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);

– контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);

– нож канцелярский;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– оборудование, необходимое для выделения ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100», - см. инструкцию по применению соответствующего набора.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (соскобы буккального эпителия, образцы цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию по применению набора «РеалБест экстракция 100»).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции по применению набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в пакет из комбинированного материала с вложением осушителя, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 ме-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутации 185delAG;

«ROX» – регистрация мутации 3875del4.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения мутаций 185delAG и 3875del4 в гене *BRCA1*.

Ген	**Мутация**	**Канал**	**ГЕНОТИП**		
			«Нормальная гомозигота»	**«Мутантная гомозигота»**	**«Гетерозигота»**
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
BRCA1	**185delAG**	«FAM»	N/N	delAG/delAG	N/delAG
BRCA1	**3875del4**	«ROX»	N/N	del4/del4	N/del4

N – норма (отсутствие мутации).

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание! *В связи с высокой клинической значимостью мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов, начиная с этапа выделения ДНК.*

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения мутаций 4153delA, 5382insC, 185delAG, 3875del4, 3819del5, T300G, 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* описана в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием BRCA¬ мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюляндин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюляндина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 185delAG/3875del4)», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211, тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 3819del5/T300G)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 3819del5/T300G)» предназначен для определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) и «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2,* при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак гортани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) BRCA1 3819del5/T300G, лиофилизированная – 48 пробирок;

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1 лист.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2- 648).

Специфичность составляет 100 % при условии, что генотип по мутациям 3819del5 и T300G в гене *BRCA1* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (57 ± 3) °С и по каналу «ROX» (50 ± 3) °С.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (45 ± 3) °С и по каналу «ROX» (60 ± 3) °С.

3.4. Диагностическая специфичность определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1:* клинические испытания, проведенные на 213 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении раз-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);

– контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);

– нож канцелярский;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– оборудование, необходимое для выделения ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100», - см. инструкцию по применению соответствующего набора.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (соскобы буккального эпителия, образцы цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию по применению набора «РеалБест экстракция 100»).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции по применению набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в пакет из комбинированного материала с вложением осушителя, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 меся-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутации 3819del5;

«ROX» – регистрация мутации T300G.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения мутаций 3819del5 и T300G в гене *BRCA1*.

Ген	**Мутация**	**Канал**	**ГЕНОТИП**		
			«Нормальная гомозигота»	**«Мутантная гомозигота»**	**«Гетерозигота»**
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
BRCA1	**3819del5**	«FAM»	N/N	del5/del5	N/del5
BRCA1	**T300G**	«ROX»	N/N	T300G/T300G	N/T300G

N – норма (отсутствие мутации).

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание! *В связи с высокой клинической значимостью мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов, начиная с этапа выделения ДНК.*

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения мутаций 4153delA, 5382insC, 185delAG, 3875del4, 3819del5, T300G, 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* описана в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием BRCA¬ мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюляндин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюляндина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 3819del5/T300G)», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211, тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«28» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 2080delA(insA)/BRCA2 6174delT)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 2080delA(insA)/BRCA2 6174delT)» предназначен для определения мутаций 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) и «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2,* при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак гортани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) BRCA1 2080delA(insA)/BRCA2 6174delT, лиофилизированная – 48 пробирок;

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1 лист.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения мутаций 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2-648).

Специфичность составляет 100 % при условии, что генотип по мутациям 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (49 ± 3) °С и по каналу «HEX» (55 ± 3) °С.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (42 ± 3) °С и по каналу «HEX» (45 ± 3) °С.

3.4. Диагностическая специфичность определения мутаций 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2:* клинические испытания, проведенные на 213 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении раз-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);

– контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);

– нож канцелярский;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– оборудование, необходимое для выделения ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100», - см. инструкцию по применению соответствующего набора.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (соскобы буккального эпителия, образцы цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию по применению набора «РеалБест экстракция 100»).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции по применению набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в пакет из комбинированного материала с вложением осушителя, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 ме-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

сяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*:

«FAM» – регистрация мутации 2080delA(insA) в гене *BRCA1*;

«HEX» – регистрация мутации 6174delT в гене *BRCA2*.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «HEX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «HEX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения мутаций 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2*.

Ген	Мутация	Канал	ГЕНОТИП		
			«Нормальная гомозигота»	«Мутантная гомозигота»	«Гетерозигота»
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
BRCA1	**2080delA (insA)**	«FAM»	N/N	delA(insA)/ delA(insA)	N/delA(insA)
BRCA2	**6174delT**	«HEX»	N/N	delT/delT	N/delT

N – норма (отсутствие мутации).

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «HEX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание! *В связи с высокой клинической значимостью мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов, начиная с этапа выделения ДНК.*

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения мутаций 4153delA, 5382insC, 185delAG, 3875del4, 3819del5, T300G, 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* описана в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием BRCA¬ мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюляндин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюляндина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 2080delA(insA)/BRCA2 6174delT)», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211, тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«28» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников,
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 4153delA/5382insC)»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения мутаций, ассоциированных с раком молочной железы и раком яичников, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 4153delA/5382insC)» предназначен для определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой с последующим анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала (буккального эпителия, цельной крови) осуществляется с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) и «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип (нормальная гомозигота, гетерозигота, мутантная гомозигота).

Многочисленные исследования показали, что вероятность развития рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ) у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* крайне высока. По данным мета-анализа риск развития РМЖ к 70 годам составляет 55% для носителей мутаций в гене *BRCA1* и 47% для носителей мутаций в гене *BRCA2*, риск развития РЯ 39% для *BRCA1* и 17% для *BRCA2,* при этом зачастую наблюдается ранний возраст возникновения рака. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* повышают риск развития и других злокачественных новообразований (рак простаты, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак гортани), а также накладывают особенности на клиническое течение онкозаболевания.

Учитывая высокую вероятность развития онкопатологии, определение мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* целесообразно в группах высокого риска со случаями рака у кровных родственников, а также актуально для применения в скрининговых программах по оценке риска РМЖ и РЯ. Ранняя диагностика мутаций позволяет принять эффективные меры, предотвращающие развитие заболевания. Применение данного диагностического подхода может способствовать снижению заболеваемости РМЖ и РЯ.

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

– контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;

– контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) BRCA1 4153delA/5382insC, лиофилизированная – 48 пробирок;

– элюирующий раствор «Генетика» – 2 фл. по 12 мл.

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1 лист.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* определяется по стандартному образцу предприятия, СОП (рег. № 05-2- 648).

Специфичность составляет 100 % при условии, что генотип по мутациям 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1* в образцах №1 и №2 определяется в соответствии с инструкцией к СОП.

3.2. Для КО1 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (46 ± 3) °С и по каналу «ROX» (52 ± 3) °С.

3.3. Для КО2 должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления: по каналу «FAM» (39 ± 3) °С и по каналу «ROX» (60 ± 3) °С.

3.4. Диагностическая специфичность определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1:* клинические испытания, проведенные на 211 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении раз-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) или «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);

– контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);

– нож канцелярский;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– оборудование, необходимое для выделения ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100», - см. инструкцию по применению соответствующего набора.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа подготовить клинические образцы (соскобы буккального эпителия, образцы цельной крови) с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» или «РеалБест экстракция 100».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора.

6.1.1. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО). КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (ПКО) (см. инструкцию по применению набора «РеалБест экстракция 100»).

Элюцию образцов проводить в 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», входящего в состав данного набора. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту. Установить пробирки в магнитный штатив.

6.1.2. Выделение ДНК с помощью набора реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс».

Выделение ДНК из образцов проводить согласно инструкции по применению набора. Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

6.1.3. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в пакет из комбинированного материала с вложением осушителя, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2-8) °С составляет 3 месяца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору и пп. 7.6.-7.9.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации и детекции кривых плавления:

— 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

— 2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

— 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);

— 4 стадия: «кривая плавления» от 27 °С до 75 °С с шагом 1 °С

в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

— 5 стадия: 10 °С – 1 минута.

7.7. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного ДНК-зонда и продукта амплификации для регистрации мутаций в гене *BRCA1*:

«FAM» – регистрация мутации 4153delA;

«ROX» – регистрация мутации 5382insC.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

Для КО1 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

Для КО2 в каналах детекции «FAM» и «ROX» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления.

8.2. Анализ результатов определения мутаций 4153delA и 5382insC в гене *BRCA1*.

Ген	**Мутация**	**Канал**	**ГЕНОТИП**		
			«Нормальная гомозигота»	**«Мутантная гомозигота»**	**«Гетерозигота»**
			Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО1	Один пик плавления, отличается не более чем на 2 °С от КО2	Два пика плавления, отличаются не более чем на 2 °С от КО1 и КО2
BRCA1	**4153delA**	«FAM»	N/N	delA/delA	N/delA
BRCA1	**5382insC**	«ROX»	N/N	insC/insC	N/insC

N – норма (отсутствие мутации).

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «FAM» и «ROX» должен фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться значение температуры плавления.

8.2.2. Генотип анализируемого образца учитывается как «Нормальная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1.

8.2.3. Генотип анализируемого образца учитывается как «Мутантная гомозигота», если для этого образца фиксируется наличие одного пика плавления, при этом значение отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

8.2.4. Генотип анализируемого образца учитывается как «Гетерозигота», если для этого образца фиксируется наличие двух пиков плавления, при этом значение одного отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО1, а температура второго отличается не более чем на 2 °С от температуры плавления для КО2.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание! *В связи с высокой клинической значимостью мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 рекомендуется проводить повторное генотипирование гетерозиготных и мутантных гомозиготных образцов, начиная с этапа выделения ДНК.*

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и/или КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения мутаций 4153delA, 5382insC, 185delAG, 3875del4, 3819del5, T300G, 2080delA(insA) в гене *BRCA1* и 6174delT в гене *BRCA2* описана в литературе:

1. Соколенко А., Розанов М., Митюшкина Н., Шерина Н. и др. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России. // Сибирский онкологический журнал. 2008. Т.27 (№3). С. 43–49.

2. J. Balmaña et al., Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению у больных раком молочной железы с наличием BRCA¬ мутации // Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Медицинской Онкологии (ESMO) Редакторы русского перевода: проф. С. А. Тюляндин, к.м.н. Д. А. Носов; проф. Н. И. Переводчикова, — М.: Издательская группа РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010.— 436 с.

3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С., Емельянова М.А., Будик Ю.А., Тюляндина А.С., Крохина О.В., Воротников И.К., Соболевский В.А., Наседкина Т.В., Портной С.М. Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. с.53-61.

4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т.11. № 4. с. 258-266.

5. Часовникова О.Б., Митрофанов Д.В., Демченко Д.О., Сидоров С.В., Францкевич О.З., Коваленко С.П. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в Сибирском регионе. // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41 (№5). С. 32–35.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика BRCA (BRCA1 4153delA/5382insC)», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211, тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru