

«Утверждаю»

Генеральный директор

ООО «НОМОТЕК»

\_\_\_\_ Пономарев Р.В.

«07» декабря 2020 г.



## ГенТест-М BRCA1, BRCA2

Набор реагентов для выделения ДНК из периферической крови и выявления наследственных мутаций *185delAG*, *2080delA*, *4153delA*, *5382insC*, *c.3700\_3704delGTAAA*, *c.3756\_3759delGTCT*, *T300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2* методом ПЦР в режиме реального времени для диагностики *in vitro* (ГенТест-М BRCA1, BRCA2) по ТУ 21.20.23-024-11248074-2018

РУ № РЗН 2021/13565 от 02.03.2021 г.

Инструкция по применению

## Сокращения и обозначения

<i>Cq(Ct)</i>	Пороговый цикл
FAM	Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
N	Нормальный аллель, генотип N
m	Мутантный аллель, генотип m
Номенклатура HGVS	Nomenclature - Human Genome Variation Society
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИО	Истинно отрицательный образец
ИП	Истинно положительный образец
ЛО	Ложно отрицательный образец
ЛП	Ложно положительный образец
ОКВ	Отрицательный контроль выделения
Олиго-смесь М	Обобщенное название компонентов набора «Олиго-смесь М BRCA1 185delAG», «Олиго-смесь М BRCA1 2080delA», «Олиго-смесь М BRCA1 4153delA», «Олиго-смесь М BRCA1 5382insC», «Олиго-смесь М BRCA1 с.3700_3704delGTAAA», «Олиго-смесь М BRCA1 с.3756_3759delGTCT», «Олиго-смесь М BRCA1 T300G», «Олиго-смесь М BRCA2 6174delT»
ПКО	Положительный контрольный образец, обобщенное название компонентов: ПКО 185delAG, ПКО 2080delA, ПКО 4153delA, ПКО 5382insC, ПКО с.3700_3704delGTAAA, ПКО с.3756_3759delGTCT, ПКО T300G, ПКО 6174delT
ОКО	Отрицательный контрольный образец, обобщенное название компонентов: ОКО 185delAG, ОКО 2080delA, ОКО 4153delA, ОКО 5382insC, ОКО с.3700_3704delGTAAA, ОКО с.3756_3759delGTCT, ОКО T300G, ОКО 6174delT
Пр.	Пробирка
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией накопления продукта амплификации ДНК в режиме реального времени
ТУ	Технические условия
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота

## Оглавление

Сокращения и обозначения.....	2
1. Название, варианты исполнения.....	4
2. Сведения, необходимые для эксплуатации .....	4
3. Назначение, область применения.....	4
4. Состав, форма выпуска.....	6
5. Количество анализируемых образцов, кратность применения.....	9
6. Принцип действия.....	9
7. Научная обоснованность анализа .....	10
8. Аналитические характеристики .....	11
9. Диагностические характеристики .....	12
10. Ограничения метода. Расчет неопределенности определения в условиях повторяемости и воспроизводимости.....	17
11. Меры предосторожности. Риски применения медицинского изделия.....	20
12. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки.....	22
13. Биологический материал.....	26
14. Протокол анализа образца .....	26
15. Анализ данных.....	33
16. Условия транспортирования, хранения и использования .....	38
17. Срок годности .....	40
18. Критерии непригодности набора реагентов для применения .....	42
19. Гарантии изготовителя .....	42
20. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость .....	42
21. Порядок подачи рекламаций .....	43
22. Утилизация.....	43
23. Национальные стандарты РФ, применимые к изделию медицинского назначения.....	44
Приложение №1.....	45
Литература.....	48
Графические символы.....	49

## 1. Название, варианты исполнения

Набор реагентов для выделения ДНК из периферической крови и выявления наследственных мутаций *185delAG*, *2080delA*, *4153delA*, *5382insC*, *c.3700\_3704delGTAAA*, *c.3756\_3759delGTCT*, *T300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2* методом ПЦР в режиме реального времени для диагностики *in vitro* (ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*) по ТУ 21.20.23-024-11248074-2018.

Набор реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*» выпускается в одном варианте исполнения.

## 2. Сведения, необходимые для эксплуатации

Внимательно изучите инструкцию перед применением набора реагентов. Все сведения, необходимые для применения (эксплуатации) набора реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*», приведены в настоящей инструкции. Другие документы по эксплуатации кроме инструкции не предусмотрены.

## 3. Назначение, область применения

Набор реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*» предназначен для качественного определения наследственных мутаций *185delAG*, *2080delA*, *4153delA*, *5382insC*, *c.3700\_3704delGTAAA*, *c.3756\_3759delGTCT*, *T300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2*, ассоциированных с риском развития онкопатологии (в том числе наследственных форм рака молочной железы и рака яичников), в препаратах ДНК человека, полученных из периферической (венозной) крови, методом ПЦР в режиме реального времени.

Полученные результаты могут быть использованы для определения предрасположенности к развитию наследственных форм рака молочной железы или рака яичника, прогнозирования соответствующих наследственных форм рака у родственников первой линии.

Область применения набора реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*» – профессиональное применение в клинической лабораторной диагностике. Для профессионального применения в медицинских учреждениях для диагностики *in vitro*.

Предназначенный пользователь набора – сотрудники клинично-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку и имеющие достаточную квалификацию для проведения исследований в области диагностики *in vitro* методом ПЦР в режиме реального времени.

Набор реагентов «ГенТест-М *BRCA1*, *BRCA2*» совместим с приборами:

1. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнение: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (Производитель Био-Рад Лабораториз, Инк, США, РУ: № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016);

2. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями, исполнение: StepOnePlus (Производитель: Лайф Текнолоджис Корпорейшн, США, РУ: ФСЗ 2010/06259 от 25.01.2017);

3. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500 (Производитель: Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд, Сингапур, РУ: РЗН 2016/3932 от 06.04.2016).

Набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» позволяет определить следующие мутации:

**Таблица 1 – определяемые мутации**

Ген	Мутация	Номенклатура HGVS	Идент-р dbSNP	Фланкирующая последовательность	Генотип	
					N	m
BRCA1	185delAG	NG_005905.2:g.93953_93954insAG NM_007294.3:c.66_67delAG NP_009225.1:p.Glu23AArgfs	rs80357713	AATGCTATGCAGAAA ATCTT[AG/-]AGTGTG CCATCTGGTAAAGTC	AG	--
	2080delA	NG_005905.2:g.124414delA NM_007294.3:c.1961delA NP_009225.1:p.Lys654Serfs	rs80357522	TGAAGAGATAAAA GAAAAAAA[A/-] GTACAACCAAAAT GCCAGTCA	AA	A-
	4153delA	NG_005905.2:g.126488delA NM_007294.3:c.4035delA NP_009225.1:p.Glu1346Lysfs	rs80357711	GAATTGGTTTCA GATGATGACA[-] GAAAGAGGAAC GGGCTTGGGA	AA	A-
	5382insC	NG_005905.2:g.160921dup NM_007294.3:c.5266dup NP_009225.1:p.Gln1756Profs	rs397507247	AAAGCGAGCAA GAGAATCCC[-/C] AGGACAGAAAGG TAAAGCTC	--	-C
	c.3700_3704delGTAAA	NG_005905.2:g.126148_126152GTAAA NM_007294.3:c.3700_3704delGTAAA NP_009225.1:p.Val1234Glnfs	rs80357609	AACACTTGTATTT GGTAAAI[GTAAA/-] CAATATACCTTCTC AGTCTA	GTAAA GTAAA	GTAAA -
	c.3756_3759delGTCT	NG_005905.2:g.126205_126208GTCT NM_007300.3:c.3756_3759delGTCT NP_009231.2:p.Ser1253Argfs	rs80357868	TAGGCATAGCACC GTTGCTACCGAGT GTCT[GTCT/-] AAGAACACA GAGGAGAATTT	GTCT GTCT	GTCT -
	T300G	NG_005905.2:g.111497T>G NM_007294.3:c.181T>G NP_009225.1:p.Cys61Gly	rs28897672	GAAGAAAGGGCC TTCACAG[TT/G] GTCCTTATGTAA GAATGAT	TT	TG
	BRCA2	6174delT	NG_012772.3:g.29822delT NM_000059.3:c.5946delT NP_000050.2:p.Ser1982Argfs	rs80359550	GGGATTTTTAGCA CAGCAAG[TT/-] GGAAAATCTG TCCAGGTATC	TT

## 4. Состав, форма выпуска

Исключен непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента или пользователя (телом человека) при соблюдении требований инструкции по применению.

Модуль 1 для выделения ДНК				
Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
Раствор 1	27 мл	1 флакон	Жидкость прозрачная бесцветная невязкая. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит компоненты, необходимые для отмывки от эритроцитов.
Раствор 2	0.3 мл	2 пр. по 0.15 мл	Жидкость прозрачная бесцветная вязкая.	Содержит компоненты, необходимые для разрушения белков.
Раствор 3	15 мл	2 флакона по 7.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная невязкая. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит компоненты, необходимые для разрушения клеточных структур.
Раствор 4	1 мл	1 пр.	Жидкость прозрачная от бесцветной до розовой невязкая.	Содержит компоненты, необходимые для концентрирования ДНК.
Раствор 5	14.4 мл	8 пр. по 1.8 мл	Жидкость прозрачная бесцветная невязкая.	Содержит компоненты, необходимые для элюции ДНК в раствор.
ОКВ	3 мл	2 пр. по 1.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная невязкая.	Содержит компоненты, необходимые для контроля чистоты выделения ДНК.

Модуль 2 для генотипирования				
Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПЦР-смесь М	4.8 мл	8 пр. по 0.6 мл	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Taq-полимераза, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg <sup>2+</sup> и реакционный буфер.
Олиго-смесь М BRCA1 185delAG	0.55 мл	1 пр.	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357713 (185 delAG).
Олиго-смесь М BRCA1 2080delA	0.55 мл	1 пр.		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357522 (2080delA).
Олиго-смесь М BRCA1 4153delA	0.55 мл	1 пр.		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357711 (4153delA).
Олиго-смесь М BRCA1 5382insC	0.55 мл	1 пр.		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs397507247 (5382insC).
Олиго-смесь М BRCA1 с.3700 _ 3704 delGTAAA	0.55 мл	1 пр.		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гидролизующие зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357609 (с.3700 _ 3704 delGTAAA).

Модуль 2 для генотипирования				
Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
Олиго-смесь M BRCA1 с.3756 _ 3759 delGTCT	0.55 мл	1 пр.	Жидкость прозрачная бледно-розовая	Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гиролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80357868 (с.3756 _ 3759delGTCT).
Олиго-смесь M BRCA1 T300G	0.55 мл	1 пр.		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA1</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гиролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs28897672 (T300G).
Олиго-смесь M BRCA2 6174delT	0.55 мл	1 пр.		Содержит праймеры для специфической амплификации участка гена <i>BRCA2</i> . Содержит конкурентные аллель-специфичные гиролизуемые зонды, меченные флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце, детектирующие генотип rs80359550 (6174delT).
ОКО 185delAG	0.13 мл	1 пр.	Жидкость прозрачная зеленого цвета умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Каждый ОКО содержит индивидуальную смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов «N». Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипов «N».
ОКО 2080delA	0.13 мл	1 пр.		
ОКО 4153delA	0.13 мл	1 пр.		
ОКО 5382insC	0.13 мл	1 пр.		
ОКО с.3700 _ 3704 delGTAАА	0.13 мл	1 пр.		
ОКО с.3756 _ 3759 delGTCT	0.13 мл	1 пр.		
ОКО T300G	0.13 мл	1 пр.		
ОКО 6174delT	0.13 мл	1 пр.		



Модуль 2 для генотипирования				
Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПКО 185delAG	0.13 мл	1 пр.	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Каждый ПКО содержит индивидуальную смесь синтетических матриц ДНК, содержащих последовательности генотипов «т». Контроль прохождения ПЦР и верного определения генотипов «т».
ПКО 2080delA	0.13 мл	1 пр.		
ПКО 4153delA	0.13 мл	1 пр.		
ПКО 5382insC	0.13 мл	1 пр.		
ПКО с.3700 _ 3704 delGTAAA	0.13 мл	1 пр.		
ПКО с.3756 _ 3759delGTCT	0.13 мл	1 пр.		
ПКО T300G	0.13 мл	1 пр.		
ПКО 6174delT	0.13 мл	1 пр.		
Вода деионизированная	12 мл	8 пр. по 1.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная.	Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей

## 5. Количество анализируемых образцов, кратность применения

Набор рассчитан на 100 реакций. Набор реагентов позволяет проанализировать от 10 до 41 образцов, каждый в двух повторностях.

Количество образцов определяется форматом постановки и степенью загрузки 96-луночного амплификатора ПЦР-РВ. Максимальное количество анализируемых образцов достигается при анализе всех образцов одновременно по одному полиморфизму и при полной загрузке 96-луночного амплификатора.

Набор реагентов рассчитан на однократное, в том числе дробное, использование.

## 6. Принцип действия

Принцип метода (принцип действия) основан на 1) выделении ДНК и 2) полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени.

Выделение ДНК основано на ферментативной и термической обработке крови в присутствии детергентов, ведущей к лизису клеток и клеточных элементов.

Полимеразная цепная реакция включает в себя две стадии. На первой стадии анализа ДНК происходит амплификация целевого фрагмента ДНК с участием специфических праймеров, образуется ампликон («ПЦР-смесь М»; «Олиго-смесь М»). Амплификация проходит вне зависимости от аллельного варианта. На второй стадии анализа ДНК происходит определение генотипа путём температурного плавления дуплекса: детектирующий зонд – ампликон («ПЦР-смесь М»; «Олиго-смесь М»). Температура плавления дуплекса, образованного зондом и «аллелем N» отличается от температуры плавления дуплекса, образованного зондом и «аллелем m». ДНК, содержащая оба аллеля, имеет две температуры плавления.

Для контроля качества результатов используются реакции контрольного образца без ДНК и реакции с ОКО и ПКО.

## 7. Научная обоснованность анализа

Рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) занимают лидирующие позиции среди онкологических заболеваний. В России ежегодно диагностируется более 70000 новых случаев РМЖ (это наиболее частая онкопатология у женщин – 20,9%) и более 14000 новых случаев РЯ (4,2%), при этом количество заболеваний увеличивается год от года [1]. Одним из факторов риска развития РМЖ и РЯ является генетическая предрасположенность: от 5 до 10% случаев РМЖ, от 10 до 17% случаев РЯ [2,3].

Причиной аутосомно-доминантной предрасположенности к развитию РМЖ и РЯ часто являются герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*: ими обусловлены 20–50% наследственных форм РМЖ и 90–95% РЯ у женщин, а так же 4–40% РМЖ у мужчин [3]. Средние кумулятивные риски для носителей мутаций в гене *BRCA1* к возрасту 70 лет составляют 57–65% в отношении развития РМЖ и 39–40% – РЯ. Для носителей мутаций в гене *BRCA2* риск развития РМЖ составляет 45–49%, риск развития РЯ – 11–18% [4]. Риски возрастают приотягощенном семейном анамнезе: для носителей мутаций в гене *BRCA1* до 87% в отношении развития РМЖ и до 44% в отношении развития РЯ, для носителей мутаций в гене *BRCA2* – до 84 и 27% соответственно [3,5].

На настоящий момент выявлено более 1800 вариантов изменений в гене *BRCA1* и более 2000 в гене *BRCA2* [6]. При этом частота мутаций может различаться в зависимости от популяции и этнической принадлежности [7]. Для российской популяции описан спектр из 8 наиболее характерных мутаций [3,8] (Таблица 2).

Таблица 2 – мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*

Ген	Мутация	Частота встречаемости
<i>BRCA1</i>	185delAG	3,2%
	2080delA	11,1%
	4153delA	11,1%
	5382insC	55,6%
	T300G	12,7%
	c.3700_3704delGTAAA	1,6%
	c.3756_3759delGTCT	<1,6%
<i>BRCA2</i>	6174delT	4,8%

## 8. Аналитические характеристики

Наименование показателя	Характеристика и норма
Технические характеристики	
<b>Минимальное количество биоматериала</b> (периферическая (венозная) кровь)	100 мкл биоматериала
Аналитические характеристики	
<b>Предел обнаружения</b>	1.0 нг/мкл
<b>Аналитическая специфичность</b> (под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов «ГенТест-М <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> » специфически определять генотипы N и m мутаций 185delAG, 2080delA, 4153delA, 5382insC, c.3700_3704delGTAAA, c.3756_3759delGTCT, T300G в гене человека <i>BRCA1</i> , и 6174delT в гене человека <i>BRCA2</i> на фоне всего остального генома человека, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах*)	<p>Детекция генотипов «m» в реакциях с ПКО</p> <p>Детекция генотипов «N» в реакциях с ОКО</p> <p>Генотип не определяется в образцах ОКВ и контрольном образце без ДНК</p>

\* Для подтверждения специфичности используются: 1) образцы предприятия ПКО: ПКО 185delAG, ПКО 2080delA, ПКО 4153delA, ПКО 5382insC, ПКО c.3700\_3704delGTAAA, ПКО c.3756\_3759delGTCT, ПКО T300G, ПКО 6174delT, ОКО: ОКО 185delAG, ОКО 2080delA, ОКО 4153delA, ОКО 5382insC, ОКО c.3700\_3704delGTAAA, ОКО c.3756\_3759delGTCT, ОКО T300G, ОКО 6174delT, верифицированные по Сангеру; 2) ОКВ и контрольный образец без ДНК, которые представляют собой демонизированную воду свободную от ДНК.

\*\* Генотипы m: 185delAG, 2080delA, 4153delA, 5382insC, c.3700\_3704delGTAAA, c.3756\_3759delGTCT, 300TT,6174delT.

Генотипы N: 185AG, 2080A, 4153A, 5382-, c.3700\_3704GTAAA, c.3756\_3759GTCT, 300GG, 6174T.

## 9. Диагностические характеристики

Диагностические характеристики набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» были определены в ходе разработки и клинических испытаниях изделия. Диагностические характеристики рассчитывались по формулам:

**Диагностическая чувствительность (TPR)** определялась как доля, выраженная в %, истинно положительных результатов ко всем положительным, включая ложноотрицательные, по формуле:

$$TPR = 100\% \times \frac{\text{ИП}}{\text{ИП} + \text{ЛО}}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[ 100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times \text{ИП} + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times \text{ИП} \times \text{ЛО}}{\text{ИП} + \text{ЛО}}}$$

$$Q3 = 2(\text{ИП} + \text{ЛО} + 1,96^2)$$

**Диагностическая специфичность (TNR)** определялась как доля, выраженная в %, истинно отрицательных результатов ко всем отрицательным, включая ложноположительные, по формуле:

$$TNR = 100\% \times \frac{\text{ИО}}{\text{ЛП} + \text{ИО}}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[ 100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times \text{ИО} + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times \text{ЛП} \times \text{ИО}}{\text{ЛП} + \text{ИО}}}$$

$$Q3 = 2(\text{ЛП} + \text{ИО} + 1,96^2)$$

**Положительная предсказательная ценность (положительная предиктивная величина, PPV)** рассчитана по формуле:

$$PPV = 100\% \times \frac{ИП}{ИП+ЛП}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[ 100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times ИП + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times ИП \times ЛП}{ИП + ЛП}}$$

$$Q3 = 2(ИП + ЛП + 1,96^2)$$

**Отрицательная предсказательная ценность (отрицательная предиктивная величина, NPV)** рассчитана по формуле:

$$NPV = 100\% \times \frac{ИО}{ИО+ЛО}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[ 100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times ИО + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times ИО \times ЛО}{ИО + ЛО}}$$

$$Q3 = 2(ИО + ЛО + 1,96^2)$$

**Отношение правдоподобия положительного результата (PLR)** рассчитывается по формуле:

$$PLR = \frac{TPR}{1 - TNR}$$

**Отношение правдоподобия отрицательного результата (LNR)** рассчитывается по формуле:

$$LNR = \frac{1 - TPR}{TNR}$$

Доля истинно отрицательных результатов (FNR) рассчитывается по формуле:

$$FNR = \frac{ЛО}{ЛО+ИП}$$

Доля ложно положительных результатов (FPR) рассчитывается по формуле:

$$FPR = \frac{ЛП}{ЛП+ИО}$$

Доля ложных отклонений (FDR) рассчитывается по формуле:

$$FDR = \frac{ЛП}{ИП+ЛП}$$

Доля ложных пропусков (FOR) рассчитывается по формуле:

$$FOR = \frac{ЛО}{ЛО+ИО}$$

## 9.1 Диагностические характеристики, установленные в ходе разработки изделия

Характеристика	Значение [95% CI]
Диагностическая чувствительность (TPR)	100%, [94,31–100]
Диагностическая специфичность (TNR)	100%, [95,49–100]
Положительная предиктивная величина (PPV)	100%, [94,31–100]
Отрицательная предиктивная величина (NPV)	100%, [95,49–100]
Отношение правдоподобия положительного результата (PLR)*	не определено
Отношение правдоподобия отрицательного результата (LNR)	0

\*не определено – неопределенное значение (деление на ноль).

Оценка диагностических характеристик набора реагентов «Ген-Тест-М BRCA1, BRCA2» проводилась на выборке остаточных клинических образцов (143 образца). Правильность определения генотипов подтверждена референтной методикой – секвенированием по Сэнгеру.

Таблица 3 – результаты генотипирования клинических образцов набором «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» и секвенированием по Сэнгеру.

		Секвенирование по Сэнгеру																
		Генотип не определен	185delAG	185AG	2080delA	2080A	4153delA	4153A	5382insC	5382-C	c.3700_3704 delGTAAA	c.3700_3704 GTAAA	c.3756_3759 delGTCT	c.3756_3759 GTCT	300TT	300GG	6174delT	6174T
ГенТест-М BRCA1, BRCA2	Генотип не определен	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	185delAG	-	5															
	185AG	-		10														
	2080delA	-			6													
	2080A	-				10												
	4153delA	-					5											
	4153A	-						10										
	5382insC	-							21									
	5382-C	-								10								
	c.3700_3704 delGTAAA	-									9							
	c.3700_3704 GTAAA	-										10						
	c.3756_3759 delGTCT	-											8					
	c.3756_3759 GTCT	-												10				
	300TT	-													8			
	300GG	-														10		
	6174delT	-															1	
	6174T	-																10
Всего	0																	143

## 9.2 Диагностические характеристики, установленные в ходе оценки эффективности и безопасности изделия при проведении клинических испытаний

Характеристика	Значение [95% CI]
Диагностическая чувствительность (TPR)	100%, [91,24–100]
Диагностическая специфичность (TNR)	100%, [91,24–100]
Положительная предиктивная величина (PPV)	100%, [91,24–100]
Отрицательная предиктивная величина (NPV)	100%, [91,24–100]
Доля истинно отрицательных результатов (FNR)	0
Доля ложноположительных результатов (FPR)	0
Доля ложных отклонений (FDR)	0
Доля ложных пропусков (FOR)	0
Отношение правдоподобия положительного результата (PLR)*	не определено
Отношение правдоподобия отрицательного результата (LNR)	0

\*не определено – неопределенное значение (деление на ноль).

Для проведения клинических испытаний в качестве референтной методики были выбраны зарегистрированные в РФ в установленном порядке медицинские изделия для диагностики *in vitro*, являющиеся аналогом набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2». Испытания были проведены на выборке 80 клинических образцов: 40 образцов от пациентов, у которых нет показаний для проведения анализа по мутациям *185delAG, 2080delA, 4153delA, 5382insC, c.3700\_3704delGTAAA, c.3756\_3759delGCT, T300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2* и 40 образцов от пациентов с показаниями к анализу.

Воспроизводимость результатов исследования с использованием референтного набора составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на разных сериях набора (внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость).



## 10. Ограничения метода. Расчет неопределенности определения в условиях повторяемости и воспроизводимости

### 10.1 Показания и противопоказания к применению

Показания к применению набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2»: определение наследственных мутаций *185delAG, 2080delA, 4153delA, 5382insC, с.3700\_3704delGTAАА, с.3756\_3759delGTCT, Т300G* в гене человека *BRCA1* и *6174delT* в гене человека *BRCA2* для выявления предрасположенности развития наследственных форм рака молочной железы или рака яичника и прогнозирования соответствующих наследственных форм рака у родственников первой линии.

Медицинских противопоказаний к применению набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» нет. Ограничения по применению связаны с interfering веществами, содержащимися в биоматериале.

### 10.2 Информация об interfering веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования

Для оценки влияния потенциально interfering веществ на работу набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» была проведена оценка влияния потенциально interfering веществ, содержащихся в биоматериале.

Для проведения испытаний использовались контрольные образцы предприятия (далее КОП), не содержащие потенциально interfering вещества из Таблицы 4.

Для оценки влияния потенциально interfering веществ, содержащихся в биоматериале, каждое вещество из Таблицы 4 испытывалось в максимальной концентрации, которая, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов, а так же в концентрации, превышающей нормальное содержание этих веществ в биоматериале, с целью установления концентрации, влияющей на результат работы набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2».

Результаты приведены в Таблице 4. Каждое вещество в заданной концентрации добавлялось к КОП. Такой образец подвергался выделению ДНК (Модуль 1) и генотипированию (Модуль 2) набором реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2». По результатам сравнения генотипов, полученных при использовании набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» и генотипов, полученных секвенированием по Сэнгеру, делался вывод о влиянии потенциально interfering веществ на набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2».

Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияют на способность набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» выделять геномную ДНК человека и определять в ней исследуемый генотип. Влияние потенциально интерферирующих веществ на результат работы набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» установлено только при увеличении концентрации веществ до концентраций, превышающих их известную максимальную концентрацию в биоматериале.

**Таблица 4 – концентрации потенциально интерферирующих веществ**

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация потенциально интерферирующих веществ, встречающаяся в биоматериале при нормальном использовании набора реагентов	Установленные концентрации потенциально интерферирующих веществ, влияющие на результат работы набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2»
Гемоглобин	220 г/л	400 г/л
Лактоферрин	200 мкг/мл	300 мкг/мл
IgG	17 г/л	60 г/л
Билирубин общий	160 мкмоль/л	500 мкмоль/л
Холестерин общий	12 ммоль/л	40 ммоль/л
Общие триглицериды	11,3 ммоль/л	50 ммоль/л

### 10.3 Оценка неопределенности в условиях повторяемости и воспроизводимости

Для оценки неопределенности в условиях повторяемости были подобраны условия, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Для оценки неопределенности в условиях воспроизводимости были подобраны условия, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

По результатам испытаний рассчитаны значения диагностических характеристик и коэффициент вариации порогового цикла в условиях повторяемости и воспроизводимости.

Характеристика		Значение характеристики в условиях повторяемости	Значение характеристики в условиях воспроизводимости
Диагностическая чувствительность		100% (ДИ 92,60%-100,00%, ДВ 95%)	100% (ДИ 97,47%-100,00%, ДВ 95%)
Диагностическая специфичность		100% (ДИ 92,60%-100,00%, ДВ 95%)	100% (ДИ 97,47%-100,00%, ДВ 95%)
Положительная предсказательная ценность		100% (ДИ 92,60%-100,00%, ДВ 95%)	100% (ДИ 97,47%-100,00%, ДВ 95%)
Отрицательная предсказательная ценность		100% (ДИ 92,60%-100,00%, ДВ 95%)	100% (ДИ 97,47%-100,00%, ДВ 95%)
Отношение правдоподобия положительного результата		Расчёт произвести нельзя, т. к. на данной выборке не было установлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов.	
Отношение правдоподобия отрицательного результата			
Коэффициент вариации порогового цикла (рассчитан для каждого детектирующего амплификатора)	CFX96*	10%	18%
	StepOnePlus*	10%	18%
	7500*	12%	19%

\* Коэффициент вариации порогового цикла рассчитан по данным, полученным на приборах:

- CFX96 – Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: C1000 Touch, в комплекте 5. Модуль реакционный оптический CFX96 (Optical Reaction Module CFX96);
- StepOnePlus – Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями: I. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, исполнения: StepOnePlus;
- 7500 – Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с принадлежностями: I. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500.

## 11. Меры предосторожности.

### Риски применения медицинского изделия

#### 11.1 Общие

- Потенциальный риск применения Набора – класс 2б (Приказ Минздрава Российской Федерации от № 4н).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению, только для диагностики *in vitro*.
- Набор реагентов не содержит факторы инфекционной и микробной опасности.
- Набор содержит факторы токсикологической опасности требующие обеспечение специальных мер безопасности. Компоненты с такими веществами имеют предупредительную маркировку:



#### 11.2 Для оператора

- При проведении исследования необходимо строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с биологическим материалом человека, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей в соответствии с ГОСТ Р 52905-2007.
- При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом, рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- При работе с Набором реагентов необходимо соблюдать МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к используемым электрическим приборам; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними,

использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими необходимыми принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

*Примечание: Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории описаны в Приложении №1 данной инструкции по применению*

- При работе с Набором соблюдать следующие правила: использовать одноразовые нитриловые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.
- Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Набор реагентов готов к применению согласно инструкции по применению. Применять набор реагентов строго по назначению.
- Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

- Не использовать Набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать Набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать Набор реагентов по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

## 12. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки

Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» представлен в таблице 5.

Замена амплификатора и пробирок для амплификации на оборудование и материалы с аналогичными характеристиками не допускается!

Каждая зона ПЦР-лаборатории должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами (см. Приложение №1).

**Таблица 5 – перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования**

Перечень необходимых материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования необходимых для проведения исследования	Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2»
ПЦР-бокс для выделения ДНК	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004. Производитель: ЗАО «Ламинарные системы», Россия. ФСР 2010/07114 от 18.03.2010. Модель: БАВ-ПЦР-"Ламинар-С". Кат.№: 1R-F.001-10.1/0.06.1
ПЦР-бокс для приготовления реакционной смеси	
ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР	

Перечень необходимых материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования необходимых для проведения исследования	Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2»
Комплект дозаторов переменного объема и наконечников с фильтром, позволяющих отбирать объемы жидкостей от 2 до 1000 мкл	<p><i>Дозаторы</i>  Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема серии Pipetman: 3. Pipetman P20; 4. Pipetman P100; 5. Pipetman P200; 6. Pipetman P1000.</p> <p>Производитель: Gilson Pipetman, Франция.</p> <p>Модель:  Дозатор 2-20 мкл: точность <math>\pm 0.2</math> мкл,  Кат. № P20 F123600.</p> <p>Дозатор 20-100 мкл: точность <math>\pm 0.8</math> мкл,  Кат. № P100 F123615.</p> <p>Дозатор 50-200 мкл: точность <math>\pm 1.6</math> мкл,  Кат. № P200 F123601.</p> <p>Дозатор 200-1000 мкл: точность <math>\pm 8.0</math> мкл,  Кат. № P1000 F123602.</p> <p><i>Наконечники</i>  Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований <i>in vitro</i>.</p> <p>2. Наконечники универсальные с фильтром, для лабораторных дозаторов, объемом от 0,1 мкл до 10 мл, стерильные и нестерильные, упакованные в пакеты и штативы.</p> <p>Производитель: SSI, США.  РУ ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017.  Кат.№ SSI-4237NAFS.</p>
Микроцентрифуга	<p>Лабораторная микроцентрифуга MiniSpin с принадлежностями: 1. Лабораторные центрифуги MiniSpin, вариант исполнения: 2. MiniSpin Plus.  Производитель: «Eppendorf Manufacturing Corporation», США.  ФСЗ 2012/13316 от 05.12.2012.  Модель: MiniSpin plus.</p>
Мини-центрифуга/вортекс	<p>Мини-центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400.  Производитель: ООО «БИОСАН», Латвия.</p>

Перечень необходимых материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования необходимых для проведения исследования	Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2»
Амплификатор детектирующий	<p>1. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: C1000 Touch, в комплекте 5. Модуль реакционный оптический CFX96 (Optical Reaction Module CFX96). Производитель: «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США. РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016;</p> <p>2. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями: I. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, исполнения: StepOnePlus. Производитель: «Applied Biosystems, LLC», США. РУ: ФСЗ 2010/06259 от 25.01.2017;</p> <p>3. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с принадлежностями: I. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500. Производитель: Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд, Сингапур. РУ: РЗН 2016/3932 от 06.04.2016.</p>
Секундомер	<p>Производитель: ОАО "ИНТЕГРАЛ", Республика Беларусь Модель: Секундомер «Интеграл» С-01</p>
Термостат (2 шт)	<p>Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит" по ТУ 9452-004-46482062-2002 Производитель: ООО «НПО ДНК-Технология», Россия. ФСР 2012/14090 от 23.11.2012. Модель: ТТ-2 "Термит".</p>
Штатив «рабочее место»	<p>Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований <i>in vitro</i> 15. Штативы для хранения и транспортировки пробирок, криопробирок объемом от 0,2 мл до 50 мл. Производитель: SSI, США. РУ ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017. Кат.№ RA-9602, Кат.№ SSI-5210-29.</p>



Перечень необходимых материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования необходимых для проведения исследования	Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2»
Пробирки для амплификации объемом 0.1 мл или 0.2 мл	<p>1. Пробирки для амплификаторов C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 и 7500: Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований <i>in vitro</i> 4. Пробирки объемом от 0,2 мл до 2,0 мл для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), индивидуальные и в стрипах по 8 и 12 штук, с крышками и без крышек, стерильные и нестерильные, упакованные в пакеты. Производитель: SSI, США. РУ ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017. Кат. № SSI-3247-00.</p> <p>2. Пробирки для амплификатора StepOnePlus: Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями: 11. Принадлежности: 24. Пробирки стрипованные реакционные оптические 8-луночные MicroAmp для скоростной ПЦР. Кат.№ 4358293. 28. Крышки оптические для реакционных пробирок MicroAmp для ПЦР. Кат.№ 4323032. Производитель: «Лайф Текнолоджис Корпорейшн», США. РУ ФСЗ 2010/06259 от 25.01.2017.</p>
Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 и 2.0 мл	Издлия медицинские полимерные лабораторные одноразовые для взятия и исследования биоматериалов 10. Пробирки (виды: 108710, 108740, 108750, 264440, 264460, 169800, 169870). Производитель: «Sarstedt АГ& Ко. КГ», Германия. РУ ФСЗ 2009/04699 от 18.10.2017. Кат.№ 72.690.001, Кат.№ 72.695.500
Холодильная и морозильная камера, поддерживающие температуры от +2 до +15 °С и от – 28 до – 10 °С	Производитель: Индезит, Италия. Модель: ES 20. Кат.№ SB 185.027
Спирт этиловый 96%	–
Перчатки медицинские	Перчатки медицинские диагностические (смотровые) стерильные и нестерильные по ТУ 9398-001-53733748-2008. Производитель: ООО «Ардейл-Импэкс», Россия. РУ ФСР 2008/03090 от 30.07.2008.

## 13. Биологический материал

Биологический материал – периферическая (венозная) кровь. При заборе крови в качестве антикоагулянта использовать К2ЭДТА.

Сбор, обработка и подготовка образцов крови происходят согласно штатным протоколам медицинского учреждения.

Для выделения ДНК необходимо 100 мкл периферической (венозной) крови (разделение на фракции не требуется).

*Не использовать гепаринизированную кровь!*

*Не использовать кровь, в которой произошел гемолиз!*

*Не использовать тромбозную кровь!*

### Условия хранения биоматериала.

Хранить и транспортировать кровь при температуре от +2 до +8 °С в течение 5 дней, с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

### Условия хранения выделенной ДНК.

Хранить и транспортировать препарат ДНК при температуре от -28 до -10 °С в течение 1 месяца, с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

Для анализа одного образца по одной мутации необходимо 10 мкл препарата ДНК. Не проводить определение генотипа по смеси ДНК от различных пациентов.

## 14. Протокол анализа образца

### 14.1 Выделение ДНК. Подготовка к применению:

- Дозатором перенести все содержимое одной пробирки Раствора 2 в один фалькон с Раствором 3. Плотно закрыть крышку и перемешать растворы до полного растворения. Отметить на крышке Раствора 3 дату смешивания!
- Заранее включить 2 термостата и установить температуры +40 и +98 °С.
- В каждое выделение обязательно включать 1 дополнительный образец – Отрицательный контроль выделения – вместо исследуемого образца вносить 100 мкл ОКВ.

### ВНИМАНИЕ!

СЛЕДУЕТ ВЕСТИ СТРОГИЙ УЧЕТ ОКВ И ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОДНОВРЕМЕННО, А ТАКЖЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ОКВ НА ЭТАПЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КОНТАМИНАЦИИ. НЕ ДОПУСКАТЬ ПЕРЕПУТЫВАНИЕ ОКВ И ОБРАЗЦОВ МЕЖДУ РАЗНЫМИ ВЫДЕЛЕНИЯМИ ДНК.

1. Подготовить микроцентрифужные пробирки по количеству выделяемых образцов: промаркировать.
2. Исследуемые образцы крови аккуратно перемешать 30-кратным переворачиванием.
3. Перенести в подписанные микроцентрифужные пробирки по 100 мкл крови. Плотно закрыть крышки.

*Менять наконечники между разными образцами!*

4. Перемешать на вортексе кровь в течение 15 секунд. Сбросить капли центрифугированием.
5. Внести 600 мкл Раствора 1 в пробирку с кровью. Плотно закрыть крышки и перемешать содержимое на вортексе в течение 10 секунд.

*Менять наконечники между разными образцами!*

6. Центрифугировать в течение 5 мин. на скорости 9000 г.
7. Не дотрагиваясь до дна и стенок нижней части пробирки отобрать и удалить 690 мкл надосадочной жидкости.

*Менять наконечники между разными образцами!*

8. В пробирки внести 300 мкл Раствора 3. Плотно закрыть крышки и перемешать содержимое на вортексе в течение 15 секунд. Сбросить капли центрифугированием.

*Менять наконечники между разными образцами!*

9. Инкубировать в термостате при температуре +98°C в течение 10 минут. Проверять плотность закрытия крышек.
10. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 15 секунд.
11. Центрифугировать в течение 5 мин. на скорости 9000 г.
12. Подготовить новые микроцентрифужные пробирки: промаркировать.
13. Не дотрагиваясь до дна и стенок нижней части пробирки отобрать и перенести в новую микроцентрифужную пробирку 290 мкл надосадочной жидкости. Пробирку с осадком утилизировать.

*Менять наконечники между разными образцами!*

14. В пробирки внести по 900 мкл 96% этанола и по 20 мкл Раствора 4. Плотно закрыть крышки и перемешать содержимое на вортексе в течение 10 секунд.

*Менять наконечники между разными образцами!*

15. Центрифугировать в течение 10 мин. на максимальной скорости.

16. Не дотрагиваясь до дна и стенок нижней части пробирки отобрать и удалить 1210 мкл надосадочной жидкости (два раза по 605 мкл). Если в пробирке осталась надосадочная жидкость, отобрать ее дозатором малого объема (до 20 мкл), не касаясь дна и стенок пробирок.

*Менять наконечники между разными образцами!*

17. Не закрывая крышки пробирок, инкубировать в термостате при температуре +40 °С в течение 5 минут.

18. Внести в пробирки по 300 мкл Раствора 5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе до растворения осадка. Сбросить капли центрифугированием.

*Менять наконечники между разными образцами!*

Полученный раствор ДНК готов к использованию.

## 14.2 Генотипирование

### Подготовка компонентов. Приготовление реакционных смесей

1. В ПЦР-боксе для приготовления реакционных смесей разморозить при температуре от +15 до +30 °С компоненты: «ПЦР-смесь М», «Вода деионизированная» и «Олиго-смесь М» (одновременно все восемь или только некоторые из них в зависимости от анализируемых мутаций).

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортексе в течение 10 с, не допуская образования пены; сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

3. Рассчитать необходимый объем компонентов для реакционной смеси, исходя из числа исследуемых образцов и согласно Таблице 6.

Дополнительно необходимо провести реакции с:

- ОКВ (при постановке ПЦР должны быть включены все ОКВ, полученные на этапе выделения ДНК одновременно с исследуемыми образцами);
- ОКО, ПКО;
- Контрольным образцом без ДНК.

*Каждую реакцию с контрольными и исследуемыми образцами необходимо выполнить в двух повторностях.*

**Таблица 6 – расчет количества компонентов (контрольные образцы и выполнение всех образцов в двух повторностях учтены в формуле)**

*Для каждой мутации готовится реакционная смесь, в состав которой входит только одна из восьми олиго-смесей М.*

	Количество компонента, мкл (где N – анализируемые образцы, X – ОКВ, З -ОКО, ПК0 и КО без ДНК)
<b>Реакционная смесь:</b>	
Вода деионизированная	$10.5 \times 2(N+X+3)$
ПЦР-смесь М	$5.25 \times 2(N+X+3)$
Олиго-смесь М	$5.25 \times 2(N+X+3)$

4. Приготовить реакционную смесь.

*Менять наконечники между компонентами!*

5. Тщательно перемешать реакционную смесь встряхиванием на вортексе в течение 10 с; сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 5 с.

6. Подготовить пробирки для ПЦР (стрипы; 1 стрип – 8 пробирок): установить в штатив, промаркировать.

*Не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Маркировку наносить на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.*

Перед внесением образцов в пробирки для ПЦР (п. 7-13) ознакомиться со схемой расположения исследуемых образцов, ОКО, ПК0, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга.

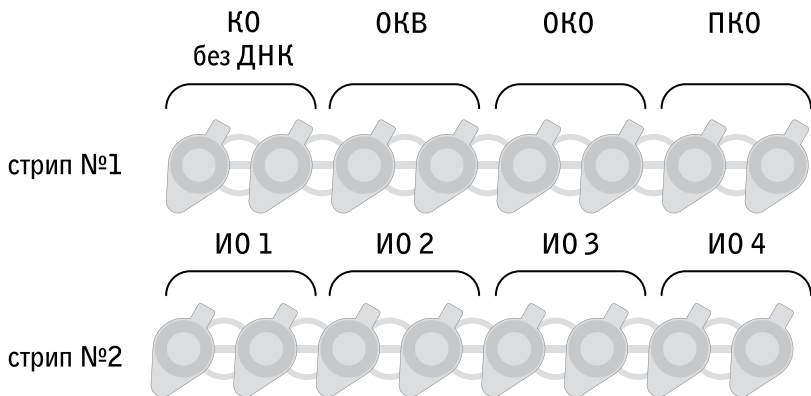


Рисунок 1 – схема расположения пробирок для ПЦР при исследовании 4 образцов. При изменении количества исследуемых образцов сохранять расположение пробирок для ПЦР и порядок внесения (п. 7-13) исследуемых образцов, ПКО, ОКО, ОКВ и Контрольного образца без ДНК относительно друг друга. ИО – исследуемый образец, ОКВ – отрицательный контроль выделения, КО без ДНК – контрольный образец без ДНК.

7. Внести по 20 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.

**Менять наконечники между разными реакционными смесями!**

8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в пробирки для ПЦР, соответствующие «Контрольному образцу без ДНК». Плотно закрыть крышки пробирок.

**Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!**

9. Закрывать крышки других пробирок для ПЦР. Перенести все пробирки для ПЦР в ПЦР-бокс для внесения ДНК.

**Подготовка контрольных образцов и ДНК. Внесение образцов в пробирки для ПЦР**

10. В ПЦР-боксе для внесения ДНК разморозить при температуре от +15 до +30 °С контрольные образцы ОКО и ПКО.

Для каждой анализируемой мутации подготовить соответствующие ПКО и ОКО:

Анализируемая мутация	ОКО	ПКО
BRCA1 185delAG	ОКО 185delAG	ПКО 185delAG
BRCA1 2080delA	ОКО 2080delA	ПКО 2080delA
BRCA1 4153delA	ОКО 4153delA	ПКО 4153delA
BRCA1 5382insC	ОКО 5382insC	ПКО 5382insC
BRCA1 c.3700 _ 3704 delGTAAA	ОКО c.3700 _ 3704 delGTAAA	ПКО c.3700 _ 3704 delGTAAA
BRCA1 c.3756 _ 3759delGTCT	ОКО c.3756 _ 3759delGTCT	ПКО c.3756 _ 3759delGTCT
BRCA1 T300G	ОКО T300G	ПКО T300G
BRCA2 6174delT	ОКО 6174delT	ПКО 6174delT

Разморозить/прогреть при температуре +50 °С исследуемые образцы ДНК и ОКВ.

Все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

11. Добавить по 5 мкл ОКВ в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

**Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!**

12. Добавить по 5 мкл ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

**Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!**

13. Добавить по 5 мкл контрольных образцов ОКО и ПКО в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения контрольного образца, выполнить последовательно для всех образцов.

**Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!**

14. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

15. Перемешать встряхиванием содержимое пробирок для ПЦР, не допуская образования пены.

16. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

## Проведение ПЦР

17. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

18. Запустить программное обеспечение амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон или ввести параметры:

- программа амплификации (одинакова для каждого прибора)

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация	95	3 мин	–
Амплификация 10 циклов	95	10 с	–
	62	30 с	–
Амплификация 40 циклов	95	10 с	–
	62	30 с	√
Формирование дуплекса	95	3 мин	–
	20	2 мин	—
Плавнение дуплекса	От 20 до 70 °С с увеличением температуры на 0.5 °С каждые 10 с		√

- создать разметку плашки в соответствии с установленными пробирками в блок амплификатора:

- Для всех образцов, включая контрольные, выбрать канал детекции FAM;

### ВНИМАНИЕ!

НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ГАСИТЕЛЬ И ПАСИВНЫЙ РЕФЕРЕНСНЫЙ КРАСИТЕЛЬ!

- В поле "Target" ввести название исследуемой мутации,
- В поле "Sample Name" ввести названия исследуемых и контрольных образцов. Не вводить одинаковые названия для разных образцов;
- запустить программу амплификации.



## 15. Анализ данных

1. Настройки: Задать параметр «Пороговый уровень» (Threshold): для прибора CFX96 ввести значение 50, для прибора StepOne Plus ввести значение 2500, для прибора 7500 ввести значение 5000.\*

### 2. Контроль качества ПЦР:

2.1 Анализ Контрольного образца без ДНК и ОКВ

$Cq \geq 38$  или  $Cq$  не определяется  
и График сигнала флуоресценции  
не имеет S-образной формы

→ НЕТ

Результаты эксперимента признаются  
недействительными

↓ ДА

2.2 Анализ контрольных образцов ОКО и ПКО

Для образцов ОКО и ПКО  $Cq \leq 26$

→ НЕТ

Результаты эксперимента признаются  
недействительными

↓ ДА

Для образцов ОКО и ПКО форма пиков и  
их температуры плавления соответствуют  
значениям, заявленным в таблице 7.

→ НЕТ

Результаты эксперимента признаются  
недействительными

### 3. Анализ исследуемых образцов:

Определение генотипов исследуемых образцов

Значение  $Cq \leq 30^{**}$

→ НЕТ

Образец анализировать нельзя

↓ ДА

Форма пиков и их температуры  
плавления совпадают с ОКО

→ ДА

Генотип «N».  
Для интерпретации генотипа см. Таблицу 8.

↓ НЕТ

Форма пиков и их температуры  
плавления совпадают с ПКО

→ ДА

Генотип «m».  
Для интерпретации генотипа см. Таблицу 8.

↓ НЕТ

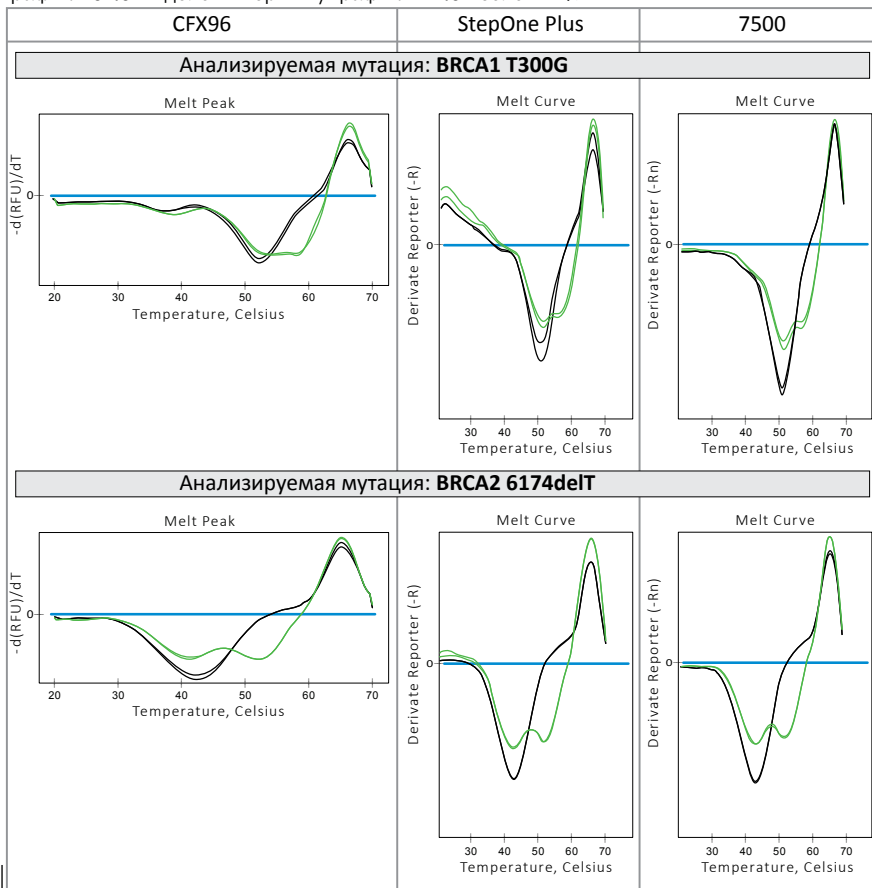
→ НЕТ

Образец анализировать нельзя

\* при необходимости изменить значения Baseline так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат.

\*\* если не выполняется условие  $Cq \leq 30$ , значит в исследуемом образце концентрация ДНК меньше, чем предел обнаружения (1 нг/мкл) набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» и образец анализировать нельзя.

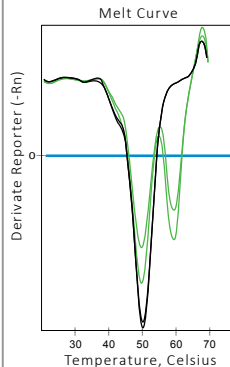
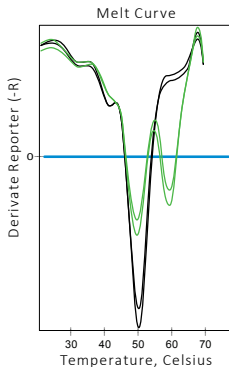
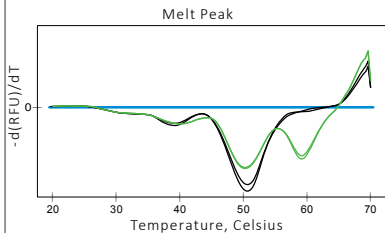
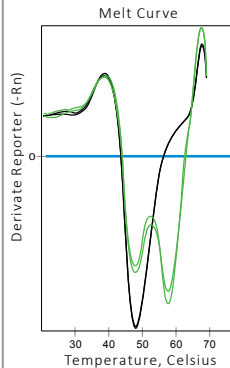
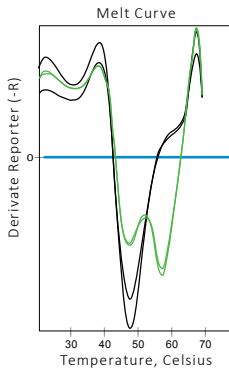
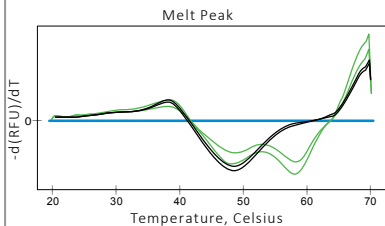
Таблица 7 – форма пиков ОКО и ПКО и их температуры плавления  
 (Целевые пики ОКО и ПКО находятся в диапазоне от +40 до +65 °С ниже оси абсцисс; графики ОКО выделены черным, графики ПКО - зеленым).



CFX96

StepOne Plus

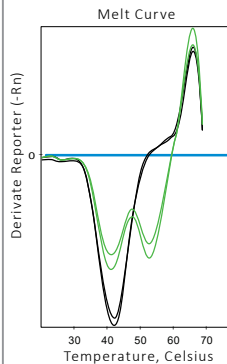
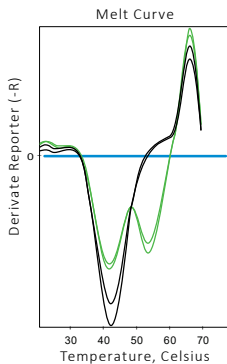
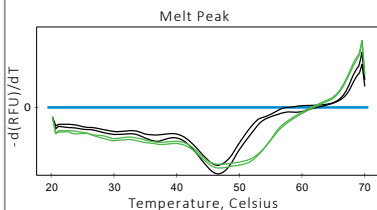
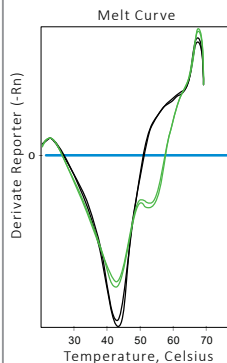
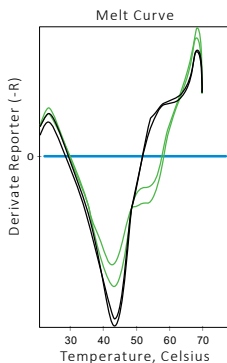
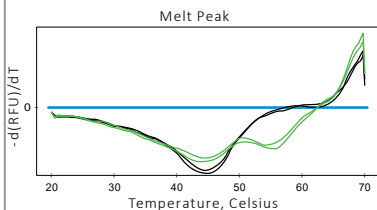
7500

Анализируемая мутация: **BRCA1 с.3700\_3704delGTAAА**Анализируемая мутация: **BRCA1 с.3756\_3759delGTCT**

CFX96

StepOne Plus

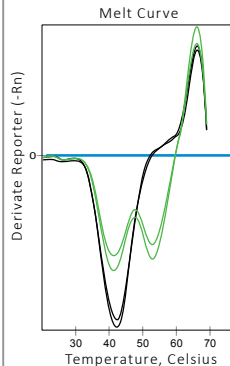
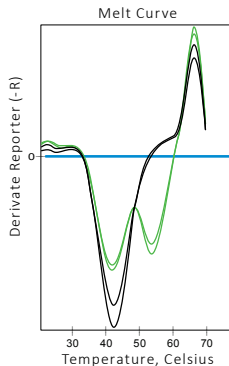
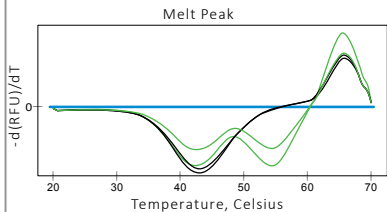
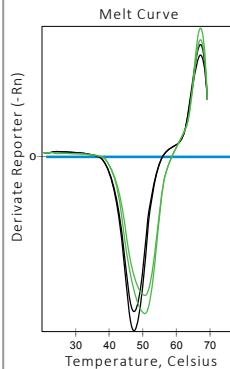
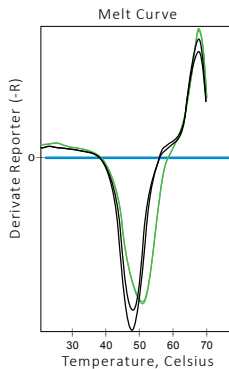
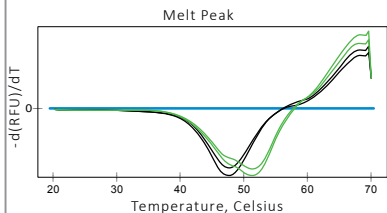
7500

Анализируемая мутация: **BRCA1 4153delA**Анализируемая мутация: **BRCA1 5382insC**

CFX96

StepOne Plus

7500

Анализируемая мутация: **BRCA1 185delAG**Анализируемая мутация: **BRCA1 2080delA**

**Таблица 8 – интерпретация генотипов «N» и «m».**

Анализируемая мутация	Генотип «N»	Генотип «m»
BRCA1 185delAG	AG	--
BRCA1 2080delA	AA	A-
BRCA1 4153delA	AA	A-
BRCA1 5382insC	--	- C
BRCA1 c.3700_3704delGTAAA	GTAAA GTAAA	GTAAA -
BRCA1 c.3756_3759delGTCT	GTCTGTCT	GTCT -
BRCA1 T300G	TT	TG
BRCA2 6174delT	TT	T-

## 16. Условия транспортирования, хранения и использования

16.1 Набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» разрешается транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

16.2 Транспортирование компонентов набора реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2», требующих хранения при температуре от -28 до -10 °С, осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами в течение 5 суток при температуре от -28 до +8 °С.

16.3 Транспортирование компонентов набора реагентов «Ген-Тест-М BRCA1, BRCA2», требующих хранения при температуре от +2 до +15 °С, осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами. Не допускается замораживание компонентов набора реагентов.

16.4 Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.

Таблица 9 – условия транспортирования, хранения и использования

Модуль 1 для выделения ДНК	Транспортирование	Хранение ВНИМАНИЕ! Разукомплектовать при хранении	Хранение после первого вскрытия
Раствор 1	от +2 до +15 °С	от +2 до +15 °С	от +2 до +15 °С
Раствор 2	от -28 до +8 °С в течение 5 суток	от -28 до -10 °С	
Раствор 3	от +2 до +15 °С	от +2 до +15 °С	
Раствор 4			
Раствор 5			
ОКВ			
Модуль 2 для генотипирования	Транспортирование	Хранение ВНИМАНИЕ! Разукомплектовать при хранении	Хранение после первого вскрытия
ПЦР-смесь М	от -28 до +8 °С в течение 5 суток	от -28 до -10 °С	от -28 до -10 °С
Олиго-смесь М BRCA1 185delAG			
Олиго-смесь М BRCA1 2080delA			
Олиго-смесь М BRCA1 4153delA			
Олиго-смесь М BRCA1 5382insC			
Олиго-смесь М BRCA1 с.3700 _ 3704 delGTAAA			
Олиго-смесь М BRCA1 с.3756 _ 3759delGTCT			
Олиго-смесь М BRCA1 T300G			
Олиго-смесь М BRCA2 6174delT			
ОКО 185delAG			
ОКО 2080delA			
ОКО 4153delA			
ОКО 5382insC			
ОКО с.3700 _ 3704 delGTAAA			
ОКО с.3756 _ 3759delGTCT			
ОКО T300G			
ОКО 6174delT			
ПКО 185delAG			
ПКО 2080delA			

Модуль 2 для генотипирования	Транспортирование	Хранение ВНИМАНИЕ! Разукомплектовать при хранении	Хранение после первого вскрытия
ПКО 4153delA	от -28 до +8 °С в течение 5 суток	от -28 до -10 °С	от -28 до -10 °С
ПКО 5382insC			
ПКО с.3700_3704 delGTAAA			
ПКО с.3756_3759delGTCT			
ПКО T300G			
ПКО 6174delT			
Вода деионизированная			

## 17. Срок годности

Срок годности указан с даты производства при соблюдении условий транспортирования и хранения. Набор реагентов или полученные в ходе использования смеси растворов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Модуль 1 для выделения ДНК	Срок годности НЕвскрытых реагентов	Срок годности вскрытых реагентов
Раствор 1	12 месяцев	12 месяцев
Раствор 2		После смешивания Растворов 2 и 3 срок годности полученного реагента – 1 месяц
Раствор 3		
Раствор 4		12 месяцев
Раствор 5		
ОКВ		



Модуль 2 для генотипирования	Срок годности НЕвскрытых реагентов	Срок годности вскрытых реагентов
ПЦР-смесь М	12 месяцев	12 месяцев
Олиго-смесь М BRCA1 185delAG		
Олиго-смесь М BRCA1 2080delA		
Олиго-смесь М BRCA1 4153delA		
Олиго-смесь М BRCA1 5382insC		
Олиго-смесь М BRCA1 с.3700_3704 delGTAAA		
Олиго-смесь М BRCA1 с.3756_3759delGTCT		
Олиго-смесь М BRCA1 T300G		
Олиго-смесь М BRCA2 6174delT		
ОКО 185delAG		
ОКО 2080delA		
ОКО 4153delA		
ОКО 5382insC		
ОКО с.3700_3704 delGTAAA		
ОКО с.3756_3759delGTCT		
ОКО T300G		
ОКО 6174delT		
ПКО 185delAG		
ПКО 2080delA		
ПКО 4153delA		
ПКО 5382insC		
ПКО с.3700_3704 delGTAAA		
ПКО с.3756_3759delGTCT		
ПКО T300G		
ПКО 6174delT		
Вода деионизированная		

## 18. Критерии непригодности набора реагентов для применения

Не использовать «ГенТест-М BRCA1, BRCA2», если верно хотя бы одно утверждение:

- при первом вскрытии обнаружено повреждение фасовочной тары компонентов;
- нет возможности плотно закрыть фасовочную тару компонентов или обнаружены протечки;
- неполная комплектность, в том числе в результате применения;
- внешний вид компонентов не соответствует описанию;
- нарушены условия хранения;
- истек срок годности;
- компоненты контаминированы ДНК человека;
- изготовитель сообщил об отзыве производственной серии, к которой относится данный набор реагентов (посредством объявления на сайте [www.nomotech.ru](http://www.nomotech.ru) или иным способом).

## 19. Гарантии изготовителя

Предприятие-изготовитель ООО «НОМОТЕК» при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 21.20.23-024-11248074-2018;
- гарантийный срок хранения в упаковке – 12 месяцев со дня изготовления.

По истечению срока годности набор реагентов и все его компоненты применению не подлежат.

## 20. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость

20.1 Контроль качества набора реагентов осуществляется ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 21.20.23-024-11248074-2018.

Предприятие-изготовитель проводит приемо-сдаточные испытания для каждой производственной серии, осуществляя контроль основных аналитических характеристик, внешний вид, комплектность, упаковку, маркировку, а также проводит контроль качества сырья и компонентов.

20.2 Метрологическая прослеживаемость компонентов набора ПКО 185delAG, ПКО 2080delA, ПКО 4153delA, ПКО 5382insC, ПКО с.3700\_3704delGTAAA, ПКО с.3756\_3759delGTCT, ПКО T300G, ПКО 6174delT, ОКО 185delAG, ОКО 2080delA, ОКО 4153delA, ОКО 5382insC, ОКО с.3700\_3704delGTAAA, ОКО с.3756\_3759delGTCT, ОКО T300G, ОКО 6174delT обеспечена до контрольных образцов предприятия, верифицируемых секвенированием по методу Сэнгера.

## 21. Порядок подачи рекламаций

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться:

- 000 «НОМОТЕК» 119421 г. Москва, Ленинский проспект, д.111, корп.1, помещ.34, эт.3;
- md-support@nomotech.ru — техническая поддержка.

При подаче рекламации необходимо исключить низкое качество биоматериала, ошибку измерения, ошибку выполнения протокола, нарушение условий транспортирования и хранения. Если все указанные факторы исключены, необходимо обратиться в службу технической поддержки.

## 22. Утилизация

22.1 Наборы реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2», пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

22.2 Уничтожение наборов реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральным законам, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

22.3 После проведения тестирования все отходы необходимо утилизировать как отходы класса «Б» согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

22.4 Непригодные к использованию наборы «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» и его компоненты необходимо утилизировать как отходы класса «Б» согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

## 23. Национальные стандарты РФ, применимые к изделию медицинского назначения

Набор реагентов «ГенТест-М BRCA1, BRCA2» соответствует требованиям следующих стандартов и нормативных документов:

- ТУ 21.20.23-024-11248074-2018.
- ГОСТ Р ЕН 13612-2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*».
- ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний».
- ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования».
- ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения».
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*».
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования».
- ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации».
- ГОСТ ISO 14971-2011 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям».
- ГОСТ Р ИСО 15193-2015 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в пробах биологического происхождения. Требования к описанию референтных методик выполнения измерений».

## Приложение №1

### Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории и правила ее организации:

- Зонирование.
- Направление потока материалов и персонала.
- Размещение оборудования и уборочного инвентаря.

### *Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории*

- Однонаправленность потока персонала и материалов.
- Технологическая одежда должна быть строго индивидуальна.
- Всегда использовать перчатки. Не прикасаться к поверхностям, оборудованию, ручкам дверей, холодильников и т.д. без перчаток.
- Не перемещать при работе, уборке помещений оборудование даже в пределах одной зоны.
- Не выходить за пределы зоны в технологической одежде.
- Маркировать используемые реактивы.
- Хранить используемые реактивы (вскрытые наборы реагентов) отдельно от не использовавшихся.
- Хранить материалы, содержащие ДНК отдельно от реактивов, использующихся для приготовления реакционной смеси.
- Выделение ДНК, приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
- При работе с дозаторами использовать наконечники с фильтром. Для каждой операции менять наконечник.
- Для хранения дозаторов использовать специальную стойку.
- После перемещения пробирок всегда осаждают капли со стенок на мини-центрифуге. Избегать касания внутренней поверхности пробирок и крышек наконечником.
- Перед и после работы проверить исправность оборудования, убрать рабочее место. Для уборки ПЦР-бокса в т.ч. использовать ультрафиолет.
- После работы утилизировать использованные материалы – наконечники, пробирки и т.д. согласно регламенту лаборатории.
- Пробирки с ПЦР-продуктам не открывать в Зоне №4. Для утилизации пробирок с ПЦР-продуктом в Зоне №4 поместить пробирки в пакет, пакет закрыть, утилизировать.

## ***Зонирование***

ПЦР-лаборатория для ПЦР-РВ должна включать минимальный набор рабочих зон:

- Зона №1 – для работы с геномной ДНК (выделение ДНК, подготовка образцов)
- Зона №2 – для приготовления реакционных смесей (изолирована от источника ДНК)
- Зона №3 – для внесения ДНК в реакционную смесь
- Зона №4 – для проведения ПЦР (место нахождения амплификаторов)

При необходимости возможно размещение зон №2 и №3 в одном помещении при соблюдении разделения процессов приготовления реакционных смесей и внесения ДНК в разных ПЦР-боксах.

Для работы с большим потоком биологического материала следует создать дополнительную зону №1а для его приемки, регистрации, разбора, первичной обработки.

Для работы с ПЦР-продуктом необходимо создать дополнительную Зону №5 – для манипуляций с ПЦР-продуктом (электрофорез, подготовка образцов перед секвенированием).

Перед каждой зоной должен быть оборудован санпропускник – для смены одежды на технологическую, хранения уборочного инвентаря.

## ***Направление потока материалов и персонала***

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока материалов. В зону №2 не должны попадать материалы из других зон. Для других зон действует принцип: материалы, побывавшие в зонах с бóльшим номером, не должны перемещаться в обратном направлении. Под материалами следует понимать: пробирки, штативы, пакеты, документы и т.п.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока персонала, в т.ч. обслуживающего персонала. Люди, побывавшие в зонах с бóльшим номером, могут перемещаться в обратном направлении только при соблюдении порядка подготовки персонала к работе (мытьё рук, смена комплекта одежды и т.д.). При работе в зоне №5 следует планировать рабочий процесс так, чтобы в этот день не возвращаться в другие зоны. Все находящиеся в лаборатории должны в каждой зоне менять одежду на технологическую: обувь, халат, шапочка, маска, перчатки, нарукавники. Технологическая одежда строго не должна перемещаться между зонами.

## *Размещение оборудования и уборочного инвентаря*

Каждая зона должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами. Минимальный список стационарного оборудования в зонах ПЦР-лаборатории:

- Зона № 1а – центрифуга, штативы, вортекс, комплект дозаторов, комплект инструментов для работы с материалом, место для хранения материала;
- Зона № 1 – ПЦР-бокс для выделения ДНК, комплект дозаторов, вортекс, мини-центрифуга, центрифуга, термостат, штативы, морозильная камера, холодильная камера;
- Зона № 2 – ПЦР-бокс для подготовки реакционной смеси, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона № 3 – ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, термостат, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона № 4 – амплификатор, центрифуга с ротором для стрипов и плашек;
- Зона № 5 – ПЦР-бокс для работы с ПЦР-продуктом, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, штативы, прибор для проведения электрофореза, лабораторные весы, микроволновая печь, морозильная камера, холодильная камера.












Каждая зона должна быть снабжена индивидуальным уборочным инвентарем – ведро для мытья пола, швабра, тряпка для мытья пола, емкость и тряпки для мытья рабочих поверхностей, дезинфицирующие хлор- или перекись- содержащие средства. Уборочный инвентарь не должен перемещаться из одной зоны в другую.

## Литература

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 250 с. ISBN 978-5-85502-251-3
2. Lalwani N., Prasad S.R., Vikram R. et al. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment // Radiographics. – 2011. – V. 31. – P. 625-646.
3. Любченко Л.Н., Батенева Е.И. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Пособие для врачей. М.: ИГ РОНЦ, 2014. 64 р.
4. Chen S., Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance // J. Clin. Oncol. – 2007. – V. 25. – P. 1329-1333.
5. King M.-C. et al. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2 // Science (80-. ). 2003. Vol. 302, № 5645. P. 643–646.
6. Couch F.J., Nathanson K.L., Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. // Science. 2014. Vol. 343, № 6178. P. 1466–1470.
7. Karami F., Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. // Biomed Res. Int. 2013. Vol. 2013. P. 928562.
8. Батенева Е.И, Кадочникова В.В., Трофимов Д.Ю., Филиппова М.Г., Мещеряков А.А., Любченко Л.Н. Обоснование состава диагностической панели для генетического тестирования больных раком молочной железы и/или раком яичников: спектр частых мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 в российской популяции // Медицинская генетика. 2013. Vol. 12, № 7. P. 26–31.



## Графические символы

	Номер по каталогу
	Код серии
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать для приготовления реакционной смеси
	Только для диагностики <i>in vitro</i>
	Знак Общего количества тестов <i>in vitro</i> , которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе
	Осторожно. Вредные для здоровья аллергические (раздражающие) вещества

Эта страница намеренно оставлена пустой

Эта страница намеренно оставлена пустой

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель:  
Общество с ограниченной ответственностью  
«Новые Молекулярные Технологии»  
(ООО «НОМОТЕК»)  
Фирменное наименование:

 **НОМОТЕК**

Москва 119421  
Ленинский проспект, д.111, корп.1, помещ.34, эт.3  
Тел.: +7 (968) 333 43 85  
[www.nomotech.ru](http://www.nomotech.ru)

I0014