



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«02» августа 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для определения статуса мутаций
генов BRCA1 и BRCA2 методом массового
параллельного секвенирования в пробе геномной ДНК
человека «Quasar-BRCA1/2»
по ТУ 21.20.23-038-97638376-2020**

Содержание

Введение	3
1. Назначение	8
2. Принцип метода.....	9
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	17
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Quasar-BRCA1/2».....	26
6. Меры предосторожности при работе с набором	27
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором.....	29
8. Анализируемые образцы.....	31
9. Подготовка компонентов набора для исследования	36
10. Проведение анализа.....	38
11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора.....	51
12. Утилизация.....	53
13. Гарантийные обязательства, контакты.....	54
Приложение 1.....	55
Приложение 2.....	56
Приложение 3.....	58
Приложение 4.....	59

Введение

Наследственные формы рака молочной железы (PMЖ) и рака яичника (PЯ) относятся к заболеваниям с аутосомно-доминантным типом наследования и обуславливаются мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Ранняя диагностика PMЖ и PЯ представляет собой важную проблему современной онкогенетики в связи со значительной частотой выявления опухолей на поздних стадиях. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* чрезвычайно разнообразны, поэтому для проведения целевого скрининга целесообразным подходом является проведение полного секвенирования кодирующих участков генов *BRCA1* и *BRCA2*.^{1 2}

Целевыми анализатами, определяемыми с применением набора реагентов «Quasar-*BRCA1/2*», являются последовательности ДНК кодирующих участков генов *BRCA1* и *BRCA2* человека.

Материалом для проведения исследования служат пробы геномной ДНК, выделенные из клинического материала (цельная кровь, ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок)).

Научная обоснованность целевого анализа заключается в наличии в нем разнообразных мутаций, ассоциированных с наследственными формами рака молочной железы и рака яичника.

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

Исследование для выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* помогает определить предрасположенность к наследственным

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

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

опухолевым синдромам³. Патогенетический механизм развития заболевания опосредован нарушением в данных генах репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) различной степени пенетрантности. Большинство клинических случаев наследственного рака ассоциировано с мутациями именно в этих генах, которые обеспечивают также защиту организма от трансформированных клеток, провоцирующих появление опухолевых новообразований⁴.

В неповреждённом состоянии оба гена (*BRCA1* и *BRCA2*) являются классическими опухолевыми супрессорами, и кодируемые ими белки играют ведущую роль в репарации разрывов двухцепочечных ДНК путём гомологичной рекомбинации⁵. Потеря функциональной активности вследствие врождённых или приобретённых мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, процессов дифференцировки и апоптоза, а также к нарастанию хромосомной нестабильности, приводящей к повышению риска развития РМЖ, рака предстательной железы, яичников, а также рака грудных желёз у мужчин¹.

Исследование для выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* помогает определить наиболее эффективную стратегию лечения как таргетными препаратами (PARP-ингибиторами), так и различными режимами химиотерапии, а также дает возможность спрогнозировать течение заболевания рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желудка⁶.

Было показано, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ в отличие от спорадического характеризуется лучшей отвечаемостью на терапию вплоть до полной ремиссии. Установлено, что выживаемость больных наследственным раком органов женской

³ Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р. Нарушение системы репарации ДНК — роль в онкогенезе и терапии злокачественных новообразований // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95. - № 3. – С. 307-314.

⁴ Имянитов Е.Н. Биология опухолевого процесса. // Практическая онкология. – 2017. – Т. 18. - №4. – С. 307-315.

⁵ Имянитов Е.Н. Биология рака молочной железы // Практическая онкология. – 2017. Т. 18. - №3. – С. 221-231.

⁶ Имянитов Е.Н. Общие представления р наследственных опухолевых синдромах // Практическая онкология. – 2014. – Т. 15. - № 3. – С. 101-106.

репродуктивной системы значительно выше, чем в общей группе больных, независимо от стадии и проводимого лечения: 5-летняя выживаемость больных наследственным РМЖ составляет $58,9 \pm 6,3\%$, в то время как при sporadicческом раке — $39,7 \pm 4,6\%$. Значение генетического тестирования определяется также тем, что BRCA-статус потенциально может быть использован в качестве предиктивного маркера при проведении химиотерапевтического лечения. Наличие дефектов системы репарации предполагает высокую эффективность ДНК-повреждающих агентов, таких как ионизирующая радиация и лекарственные препараты. Показана высокая эффективность неoadъювантной терапии антрациклинами и таксанами у носителей мутаций в генах BRCA1 и BRCA2. Клетки с нарушенными механизмами гомологичной рекомбинации отличаются высокой чувствительностью к производным платины. В ряде исследований показано, что у больных BRCA1-ассоциированным РМЖ эффективна неoadъювантная терапия «Цисплатином», выраженная реакция на препарат независимо связана с трижды негативным фенотипом и с наличием мутации в гене BRCA1⁷.

Показано, что BRCA1/2-дефицитные опухолевые клетки селективно гибнут при использовании PARP-ингибиторов (PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) — ферменты, катализирующие поли-АДФ-рибозилирование; участвуют в репарации ДНК)⁸.

В соответствии с результатами исследования OVATAR, проводимого совместно Российским обществом клинической онкологии (RUSSCO) и фармацевтической компанией AstraZeneca Russia, патогенные мутации в генах BRCA1/2 выявляются у 35% (140/400) пациенток, по результатам параллельного секвенирования крови и опухолевой ткани среди 400 больных первичным раком яичников в российской популяции. При этом частые 8 мутаций, которые официально зарегистрированы в России для панели ПЦР,

⁷ Gelmon K. et al. Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes // *Ann Oncol.* — 2012. — Vol. 23. — № 9. — P. 2223–2234.

⁸ Oza A. M. et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial // *Lancet Oncol.* — 2015. — Vol. 16. — № 1. — P. 87–89

выявляются только в 49% случаев (69/140). Во всех оставшихся 51% (71/140) случаев были выявлены редкие патогенные мутации (встречаемость менее 2%) в генах BRCA1/2 методами полного секвенирования генов (NGS и MLPA). Из них в 30,7% (43/140) в российской популяции выявляются редкие герминальные мутации, в 15% (21/140) определялись соматические мутации, а крупные перестройки – в 5% (7/140).⁹

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Определение последовательности кодирующих участков генов BRCA1 и BRCA2 методом высокопроизводительного секвенирования рекомендуется для скрининга наследственных форм рака молочной железы, рака яичников у потенциально здоровых женщин и при обследовании пациентов с диагнозом рак молочной железы и рак яичников для с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

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

Демографические и популяционные аспекты применения:

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

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

- у женщин с подтвержденным РМЖ при отягощенном семейном анамнезе (наличие РМЖ у близких родственников в возрасте ≤ 50 лет, рака яичников или маточных труб, рака

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

поджелудочной железы, РМЖ у мужчины, метастатического рака предстательной железы);

- у женщин с подтвержденным РМЖ в возрасте <45 лет;
- у женщин < 60 лет с тройным негативным фенотипом РМЖ;
- при первично-множественном РМЖ (включая, но не ограничиваясь установленным - диагнозом рака контрлатеральной молочной железы, рака яичников или маточных труб, рака поджелудочной железы);
- при РМЖ у мужчин.

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

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

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

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

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Quasar-BRCA1/2» предназначен для качественного определения статуса мутаций генов BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с риском развития рака молочной железы и раком яичников, методом массового параллельного секвенирования в пробе геномной ДНК человека, выделенной из клинического материала (цельная кровь, ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок)) с применением платформ Illumina для скрининга наследственных форм рака молочной железы, рака яичников у потенциально здоровых женщин и при обследовании пациентов с диагнозом рак молочной железы и рак яичников с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Функциональное назначение. Данные, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, подготовленных с применением набора реагентов «Quasar-BRCA1/2», после последующего биоинформатического анализа могут использоваться для скрининга наследственных форм рака молочной железы, рака яичников у потенциально здоровых женщин и при обследовании пациентов с диагнозом рак молочной железы и рак яичников с целью определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная полимеразная цепная реакция в реальном времени с последующей индексацией ампликонов и получением ДНК-библиотек, для высокопроизводительного параллельного секвенирования с применением Illumina MiSeq.

Инструментальное время проведения протокола пробоподготовки ДНК-библиотек до этапа секвенирования составляет около 3 часов без учета времени работы оператора. Инструментальное время проведения этапа секвенирования на Illumina MiSeq с применением набора реагентов для секвенирования Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles) MS-102-3003 в формате прочтения 2x150 п.о. составляет около 30 часов.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения анализа служат пробы геномной ДНК человека, выделенные из клинического материала (цельная кровь, ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок)).

Принцип метода

Исследование состоит из следующих этапов:

1. Целевая мультиплексная ПЦР-амплификация ДНК с возможной флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
2. Очистка целевых ампликонов;
3. Индексирование ампликонов с применением ПЦР-амплификации с ограниченными циклами;
4. Смешивание и очистка целевых ДНК-библиотек;
5. Массовое параллельное секвенирование с применением Illumina MiSeq.
6. Интерпретация результатов.

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

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», dNTP, интеркалирующий краситель и оптимизированный буфер.

В составе праймер-микса присутствуют специфические праймеры для проведения мультиплексной ПЦР.

Продукты специфической амплификации после очистки с применением магнитных частиц проходят этап индексирования с добавлением адаптеров, специфических для секвенирования на платформе Illumina.

Индексированные ДНК-библиотеки после очистки с применением магнитных частиц являются готовыми библиотеками для секвенирования на платформе Illumina.

Ограничения метода

Возможная причина получения неспецифического результата – контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции мультиплексной и индексной ПЦР. Неспецифический результат может быть выявлен с помощью положительного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

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

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

3. Состав набора реагентов

Варианты исполнения

Набор реагентов «Quasar-BRCA1/2» выпускается в трех вариантах исполнения:

- «Quasar-BRCA1/2-96А»,
- «Quasar-BRCA1/2-96Б»,
- «Quasar-BRCA1/2-48В».

Количество анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для одноразового использования.

Варианты исполнения «Quasar-BRCA1/2-96А», «Quasar-BRCA1/2-96Б» предназначены для проведения 96 реакций каждого мультиплекса BRCA1/2, что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательного и положительного контрольных образцов при одновременной постановке в амплификаторе и однократном запуске секвенатора Illumina MiSeq.

Вариант исполнения «Quasar-BRCA1/2-48B» предназначен для проведения 48 реакций каждого мультиплекса BRCA1/2, что соответствует определению 46 исследуемых образцов, отрицательного и положительного контрольных образцов при одновременной постановке реакций амплификации и однократном запуске секвенатора Illumina MiSeq.

Возможность мультиплексирования проб для секвенса

Варианты исполнения «Quasar-BRCA1/2-96A», «Quasar-BRCA1/2-96B», «Quasar-BRCA1/2-48B» отличаются Планшетами индексов А, Б, В для двойной индексации образцов:

- «Планшет индексов А» на 96 образцов
- «Планшет индексов Б» на 96 образцов
- «Планшет индексов В» на 48 образцов

Индексы в планшетах А и Б не повторяются, что позволяет проводить одновременную пробоподготовку и секвенирование до 192 образцов в рамках однократного запуска секвенатора Illumina MiSeq (включая отрицательный и положительный контрольные образцы). Планшет индексов В представляет собой половину Планшета индексов А. Схема расположения уникальных пар индексов в планшетах индексов представлена в Приложении 2.

Состав набора

Таблица 1 – Состав варианта исполнения «Quasar-BRCA1/2-96A»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Упаковка №1			
1	ПЦР-буфер-1	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с сиреневой крышкой	1 пробирка, 384 мкл
2	ПЦР-буфер-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с оранжевой крышкой	1 пробирка, 960 мкл
3	Праймер-микс-QB	Прозрачная жидкость с оттенком желтого цвета в пробирке с бесцветной крышкой	1 пробирка, 384 мкл

4	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с красной крышкой	1 пробирка, 24 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с синей крышкой	1 пробирка, 24 мкл
6	Планшет индексов А на 96 образцов	Полимерный 96-луночный планшет с прозрачной бесцветной жидкостью в каждой лунке	1 планшет, 30 мкл в каждой лунке
Упаковка №2			
1	Частицы-1	Суспензия коричневого цвета в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 3840 мкл
2	Частицы-2	Суспензия коричневого цвета в пробирке с коричневой крышкой	1 пробирка, 52 мкл
3	Растворитель-1	Прозрачная бесцветная жидкость в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 1920 мкл
4	Растворитель-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с желтой крышкой	1 пробирка, 40 мкл

Таблица 2 – Состав варианта исполнения «Quasar-BRCA1/2-96Б»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Упаковка №1			
1	ПЦР-буфер-1	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с сиреневой крышкой	1 пробирка, 384 мкл
2	ПЦР-буфер-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с оранжевой крышкой	1 пробирка, 960 мкл
3	Праймер-микс-QB	Прозрачная жидкость с оттенком желтого цвета в	1 пробирка, 384 мкл

		пробирке с бесцветной крышкой	
4	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с красной крышкой	1 пробирка, 24 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с синей крышкой	1 пробирка, 24 мкл
6	Планшет индексов Б на 96 образцов	Полимерный 96-луночный планшет с прозрачной бесцветной жидкостью в каждой лунке	1 планшет, 30 мкл в каждой лунке
Упаковка №2			
1	Частицы-1	Суспензия коричневого цвета в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 3840 мкл
2	Частицы-2	Суспензия коричневого цвета в пробирке с коричневой крышкой	1 пробирка, 52 мкл
3	Растворитель-1	Прозрачная бесцветная жидкость в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 1920 мкл
4	Растворитель-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с желтой крышкой	1 пробирка, 40 мкл

Таблица 3 – Состав варианта исполнения «Quasar-BRCA1/2-48B»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
Упаковка №1			
1	ПЦР-буфер-1	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с сиреневой крышкой	1 пробирка, 192 мкл
2	ПЦР-буфер-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с оранжевой крышкой	1 пробирка, 480 мкл
3	Праймер-микс-QB	Прозрачная жидкость с оттенком желтого цвета в пробирке с бесцветной крышкой	1 пробирка, 192 мкл
4	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с красной крышкой	1 пробирка, 24 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с синей крышкой	1 пробирка, 24 мкл
6	Планшет индексов В на 48 образцов	Полимерный 96- луночный планшет, в котором 48 лунок содержат прозрачную бесцветную жидкость, а другие 48 лунок пусты	1 планшет, 30 мкл в каждой лунке
Упаковка №2			
1	Частицы-1	Суспензия коричневого цвета в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 1920 мкл

2	Частицы-2	Суспензия коричневого цвета в пробирке с коричневой крышкой	1 пробирка, 52 мкл
3	Растворитель-1	Прозрачная бесцветная жидкость в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 960 мкл
4	Растворитель-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с желтой крышкой	1 пробирка, 40 мкл

ПЦР-буфер-1 и ПЦР-буфер-2 готовы к использованию, в их состав входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер, позволяющий проводить ПЦР амплификацию. **ПЦР-буфер-1** используется в зоне приготовления ПЦР смесей, **ПЦР-буфер-2** используется в зоне работы с ампликонами.

Праймер-микс-QB готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров для амплификации участков генов BRCA1 и BRCA2.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой очищенную геномную ДНК клеточной линии Jurkat.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой воду деионизованную.

Планшеты индексов А, Б, В готовы к использованию и представляет собой олигонуклеотиды содержащие короткие последовательности по 8 п.о. (i7/i5), используемые для уникальной маркировки каждого фрагмента ДНК в NGS-библиотеке. В планшетах индексов А, Б, В применяется комбинаторная двойная индексация – индексы повторяются по рядам и столбцам (см. рисунок 1, 2). Комбинация индексов i7 и i5 уникальна для каждого исходного образца ДНК. Введение таких индексов позволяет проводить одновременное секвенирование множества образцов за один запуск прибора.

Комбинаторная двойная индексация
индексы повторяются по рядам и столбцам

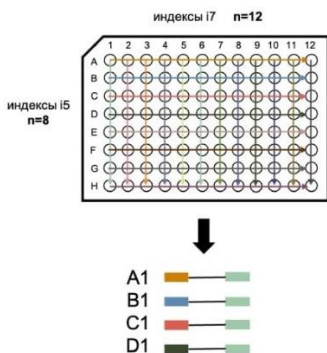


Рисунок 1 – комбинаторная двойная индексация, применяемая в Планшетах индексов А и Б на 96 образцов

Комбинаторная двойная индексация
индексы повторяются по рядам и столбцам

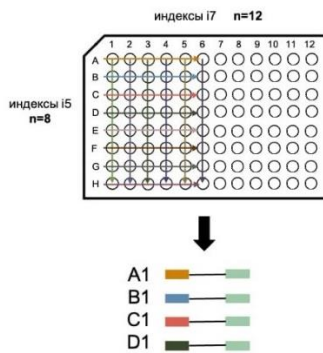


Рисунок 2 – комбинаторная двойная индексация, применяемая в Планшете индексов В на 48 образцов

Последовательности индексов i7 и i5 приведены в Приложении 1. Схема расположения уникальных пар индексов в планшетах индексов А, Б и В представлена в Приложении 2.

Частицы-1 и Частицы-2 являются двухкомпонентной суспензией магнитных частиц в буфере и предназначены для очистки ДНК из реакционных смесей. **Внимание:** магнитные частицы хранятся в холодильном отделении при +4 °С, **замораживание не допустимо!**

Растворитель-1 и Растворитель-2 являются растворителем для применения **Частиц-1 и Частиц-2** соответственно, и представляют собой воду деионизованную качества milliQ.

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

Для проведения секвенирования требуется применение набора Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles) MS-102-3003 (Illumina, США).

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 4

Наименование показателя	Характеристики и нормы	
1.1. Технические характеристик		
Наименование реагента	Внешний вид	Количество, объем, мкл ($\pm 5\%$)
Вариант исполнения «Quasar-BRCA1/2-96A»		
Упаковка №1		
ПЦР-буфер-1	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с сиреневой крышкой	1 пробирка, 384 мкл
ПЦР-буфер-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с оранжевой крышкой	1 пробирка, 960 мкл
Праймер-микс-QB	Прозрачная жидкость с оттенком желтого цвета в пробирке с бесцветной крышкой	1 пробирка, 384 мкл
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с красной крышкой	1 пробирка, 24 мкл
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с синей крышкой	1 пробирка, 24 мкл
Планшет индексов А на 96 образцов	96-луночный планшет с прозрачной бесцветной жидкостью в каждой лунке	1 планшет, 30 мкл в каждой лунке
Упаковка №2		
Частицы-1	Суспензия коричневого цвета в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 3840 мкл
Частицы-2	Суспензия коричневого цвета в пробирке с коричневой крышкой	1 пробирка, 52 мкл
Растворитель-1	Прозрачная бесцветная жидкость в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 1920 мкл

Наименование показателя	Характеристики и нормы	
Растворитель-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с желтой крышкой	1 пробирка, 40 мкл
Вариант исполнения «Quasar-BRCA1/2-96Б»		
Упаковка №1		
ПЦР-буфер-1	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с сиреневой крышкой	1 пробирка, 384 мкл
ПЦР-буфер-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с оранжевой крышкой	1 пробирка, 960 мкл
Праимер-микс-QB	Прозрачная жидкость с оттенком желтого цвета в пробирке с бесцветной крышкой	1 пробирка, 384 мкл
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с красной крышкой	1 пробирка, 24 мкл
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с синей крышкой	1 пробирка, 24 мкл
Планшет индексов Б на 96 образцов	Полимерный 96-луночный планшет с прозрачной бесцветной жидкостью в каждой лунке	1 планшет, 30 мкл в каждой лунке
Упаковка №2		
Частицы-1	Суспензия коричневого цвета в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 3840 мкл
Частицы-2	Суспензия коричневого цвета в пробирке с коричневой крышкой	1 пробирка, 52 мкл
Растворитель-1	Прозрачная бесцветная жидкость в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 1920 мкл
Растворитель-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с желтой крышкой	1 пробирка, 40 мкл
Вариант исполнения «Quasar-BRCA1/2-48B»		
Упаковка №1		

Наименование показателя	Характеристики и нормы	
ПЦР-буфер-1	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с сиреневой крышкой	1 пробирка, 192 мкл
ПЦР-буфер-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с оранжевой крышкой	1 пробирка, 480 мкл
Праймер-микс-QB	Прозрачная жидкость с оттенком желтого цвета в пробирке с бесцветной крышкой	1 пробирка, 192 мкл
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с красной крышкой	1 пробирка, 24 мкл
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с синей крышкой	1 пробирка, 24 мкл
Планшет индексов В на 48 образцов	Полимерный 96-уночный планшет, в котором 48 лунок содержат прозрачную бесцветную жидкость, а другие 48 лунок пусты	1 планшет, 30 мкл в каждой лунке
Упаковка №2		
Частицы-1	Суспензия коричневого цвета в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 1920 мкл
Частицы-2	Суспензия коричневого цвета в пробирке с коричневой крышкой	1 пробирка, 52 мкл
Растворитель-1	Прозрачная бесцветная жидкость в бесцветном матовом флаконе с крышкой	1 флакон, 960 мкл
Растворитель-2	Прозрачная бесцветная жидкость в пробирке с желтой крышкой	1 пробирка, 40 мкл
1.2. Комплектность	Пункт 1.4 ТУ	
1.3. Маркировка	Пункт 4 ТУ	
1.4. Упаковка	Пункт 5 ТУ	
2. Функциональные характеристики		
Контроль этапа амплификации	В пробирках 1-24 с ПКО: нарастание флуоресценции, амплификация не выходит за экспоненциальную фазу. В пробирках 25-28 с	

Наименование показателя	Характеристики и нормы
	реакционной смесью «П-»: отсутствует сигнал флуоресценции. В пробирке 29 с ОКО: нарастание флуоресценции, амплификация не выходит за экспоненциальную фазу.
Контроль этапа очистки и индексирования	В пробирках 1-192 с ПКО: нарастание флуоресценции. Характерная выпуклая дугообразная кривая флуоресценции с накоплением. В пробирке 193 с ОКО: нарастание флуоресценции. Характерная выпуклая дугообразная кривая флуоресценции с накоплением.
Контроль этапа очистки ДНК -библиотек	Концентрация очищенных ДНК-библиотек не менее 0,92 нг/мкл и нарастание флуоресценции во всех 4 образцах амплификации.
Контроль этапа секвенирования ДНК-библиотек	файл VCF не содержит генотипов ALT

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 13 Инструкции).

Метрологическая прослеживаемость контрольного образца – ПКО

Метрологическая прослеживаемость контрольного образца ПКО подтверждена спектрофотометрическим методом, путем проведения проверки концентрации стокового раствора Jurkat (производства «Thermo Fisher Scientific», США), входящего в состав ПКО в концентрации 1 нг/мкл.

Последующее проведение целевой мультиплексной ПЦР и секвенирования ДНК-библиотек с применением Illumina MiSeq подтвердило, что положительный контрольный образец (ПКО) обеспечивает стабильную работу Набора реагентов «Quasar-VRCA1/2» и представляет собой геномную ДНК человека клеточной линии Jurkat с концентрацией 1 нг/мкл в ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичность по отношению к мутациям в генах *BRCA1* (с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.4035delA, с.5161C>T, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.1961delA, с.4689C>G, с.3756_3759del), *BRCA2* (с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G>A, с.6174delT) была доказана на клинических образцах, положительных по содержанию мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* (ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок), цельная кровь), неспецифических реакций выявлено не было.

4.2.2 Аналитическая чувствительность

300 копий генов *BRCA1*, *BRCA2* в 1 мкл раствора ДНК

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

4.2.4 Средняя глубина прочтения для анализируемых образцов и ПКО считается достаточной, если она превышает значение 150x для герминальных мутаций и 500x для соматических мутаций.

4.2.4 Прецизионность в условиях повторяемости

Оценка прецизионности в условиях повторяемости проведена на клинических образцах (ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), и цельной крови) положительных и отрицательных по содержанию мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, набором реагентов «Quasar-*BRCA1/2*» в трех вариантах исполнения.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости клинические образцы были исследованы в 10 повторах.

Данные по повторяемости получили на наборах одной и той же производственной партии в одних и тех же экспериментальных условиях. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Прецизионность в условиях повторяемости составляет 100%.

4.2.5 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценка прецизионности в условиях воспроизводимости проведена на клинических образцах (ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), и цельной крови) положительных и отрицательных по содержанию мутаций в генах BRCA1, BRCA2 набором реагентов «Quasar-BRCA1/2» в трех вариантах исполнения.

Оценку воспроизводимости тест-системы проводили аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости, однако для тестирования использовали различные партии набора реагентов, реакции ставили в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, с использованием разных ПЦР-амплификаторов (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Прецизионность в условиях воспроизводимости составляет 100%.

4.2.6 Влияние интерферирующих веществ

Результаты исследования по оценке влияния интерферирующих веществ представлены в разделе 8.3 Инструкции.

4.3 Характеристики клинической эффективности

В ходе проведения клинических испытаний был отобрано 241 образец, из которых 140 образцов цельной крови и 101 образец ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок) от потенциально здоровых женщин, имеющих личный/наследственный анамнез и пациентов с диагнозом рак молочной железы и рак яичников.

Для проведения целевой мультиплексной ПЦР-амплификации ДНК были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011 г.);

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США, Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 г.);

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 г.);

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США, Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 г.).

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100%.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «Quasar-BRCA1/2» каждым вариантом исполнения, производства ООО «ТестГен», для оценки межсерийной сходимости.

Таким образом, проверка качества, безопасности и эффективности испытуемого медицинского изделия на образцах ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), была проверена в 202 опытах, на образцах цельной крови – 280 опытах.

В условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость

Таблица 5. Диагностические характеристики набора реагентов «Quasar-BRCA1/2» по отношению к каждому исследованному клиническому материалу

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Цельная кровь	206	74	100% (95% ДИ:98,23%-100%)	100% (95% ДИ:95,14%-100%)
Ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок)	142	60	100% (95% ДИ:97,44%-100%)	100% (95% ДИ:94,04%-100%)

Таблица 6. Диагностические характеристики набора реагентов

«Quasar-BRCA1/2» по отношению к каждому анализируемому анализу

Вид исследуемого материала	Исследуемый анализ	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок)	<i>BRCA1</i> с.5266dupC	30	172	100% (95% ДИ: 88,43%-100%)	100% (95% ДИ: 97,88%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.5251C>T	4	198	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 98,15%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.4035delA	16	186	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)	100% (95% ДИ: 98,04%-100%)
	<i>BRCA2</i> с.3749dupA	4	198	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 98,15%-100%)
	<i>BRCA2</i> с.961_962ins AA	2	200	100% (95% ДИ: 15,81%-100%)	100% (95% ДИ: 98,17%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.68_69del	10	192	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 98,10%-100%)
	<i>BRCA2</i> с.8754+1G>A	2	200	100% (95% ДИ: 15,81%-100%)	100% (95% ДИ: 98,17%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.3756_3759del	10	192	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ: 98,10%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.181T>G	7	188	100% (95% ДИ: 59,04%-100%)	100% (95% ДИ: 98,06%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.5161C>T	4	198	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 98,15%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.1961delA	14	188	100% (95% ДИ: 76,84%-100%)	100% (95% ДИ: 98,06%-100%)
	<i>BRCA1</i> с.4675G>A	4	198	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 98,15%-100%)

				100%)	ДИ:98,15%-100%)
	<i>BRCA2</i> c.2897_2898 del	2	200	100% (95% ДИ: 15,81%-100%)	100% (95% ДИ:98,17%-100%)
	<i>BRCA1</i> c.3700_3704 del	12	190	100% (95% ДИ: 73,54%-100%)	100% (95% ДИ:98,08%-100%)
	<i>BRCA1</i> c.4689C>G	2	200	100% (95% ДИ: 15,81%-100%)	100% (95% ДИ:98,17%-100%)
	<i>BRCA2</i> c.6174delT	12	190	100% (95% ДИ: 73,54%-100%)	100% (95% ДИ:98,08%-100%)
Цельная кровь	<i>BRCA1</i> c.5266dupC	46	234	100% (95% ДИ: 92,29%-100%)	100% (95% ДИ:98,44%-100%)
	<i>BRCA1</i> c.5251C>T	6	274	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)	100% (95% ДИ:98,66%-100%)
	<i>BRCA1</i> c.4035delA	30	250	100% (95% ДИ:88,43%-100%)	100% (95% ДИ:98,54%-100%)
	<i>BRCA2</i> c.3749dupA	4	276	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ:98,67%-100%)
	<i>BRCA2</i> c.961_962ins AA	4	276	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ:98,67%-100%)
	<i>BRCA1</i> c.68_69del	18	262	100% (95% ДИ:81,47%-100%)	100% (95% ДИ:98,60%-100%)
	<i>BRCA2</i> c.8754+1G> A	4	276	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ:98,67%-100%)
	<i>BRCA1</i> c.3756_3759 del	10	270	100% (95% ДИ: 69,15%-100%)	100% (95% ДИ:98,64%-100%)
	<i>BRCA1</i> c.181T>G	24	256	100% (95% ДИ:85,75%-100%)	100% (95% ДИ:98,57%-100%)
	<i>BRCA1</i>	6	274	100%	100%

c.5161C>T			(95% ДИ: 54,07%-100%)	(95% ДИ:98,66%-100%)
<i>BRCA1</i> c.1961delA	14	266	100% (95% ДИ: 76,84%-100%)	100% (95% ДИ:98,62%-100%)
<i>BRCA1</i> c.4675G>A	4	276	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ:98,67%-100%)
<i>BRCA2</i> c.2897_2898 del	6	274	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)	100% (95% ДИ:98,66%-100%)
<i>BRCA1</i> c.3700_3704 del	14	266	100% (95% ДИ: 76,84%-100%)	100% (95% ДИ:98,62%-100%)
<i>BRCA1</i> c.4689C>G	4	276	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ:98,67%-100%)
<i>BRCA2</i> c.6174delT	12	268	100% (95% ДИ: 73,54%-100%)	100% (95% ДИ:98,63%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Quasar-BRCA1/2»

В пограничную зону риска вошли опасности:

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

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций генов BRCA1 и BRCA2 методом массового параллельного секвенирования в пробе геномной ДНК человека «Quasar-BRCA1/2» по ТУ 21.20.23-038-97638376-2020» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2Б – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

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

Реагенты, входящие в набор «Quasar-BRCA1/2», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Quasar-BRCA1/2», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

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

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического

материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

1. удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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

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

2. набор реагентов по истечении срока годности или при нарушении упаковки применению не подлежит;

3. допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по ПЦР-диагностике, а также имеющий навыки работы с секвенатором Illumina MiSeq (Illumina, США) с установленным программным модулем GenerateFastq (регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014));

4. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

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

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с набором реагентов «Quasar-BRCA1/2» осуществляется в двух рабочих зонах.

Этап «Проведение специфической ПЦР» осуществляется в рабочей зоне 3а. Последующие этапы до этапа «Смешивание библиотек» проводятся в рабочей зоне 3б.

Возможно проведение работ в единой зоне 3 с применением не менее двух отдельных боксов биологической безопасности II или III классов: первого бокса для этапа проведения специфической ПЦР, второго бокса для последующих этапов пробоподготовки, включая этап «Смешивания библиотек».

Секвенирование библиотек осуществляется в рабочей зоне 4-2 (для учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения анализа:

1. ПЦР-бокс биологической безопасности II и III класса защиты;
2. Центрифуга–вортекс, 6000 об/мин;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема;
4. Холодильник от 2 °С до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

5. Амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофору FAM/Green: CFX96 («Bio-Rad», США, Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 г.), «ДТпрайм», («ДНК-Технология», Россия, Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011 г.), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 г.), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 г.).
6. Секвенатор Illumina MiSeq (Illumina, США) с установленным программным модулем GenerateFastq (Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014).
7. Для измерения концентрации исследуемых образцов ДНК непосредственно перед началом исследования - Спектрофотометр (производства Thermo Fisher Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Внесён в Государственный реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл;
2. Одноразовые пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл, или пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой, совместимые с используемым амплификатором;
4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл или ПЦР-планшетов объёмом лунок 0,2 мл;
7. Магнитный штатив для пробирок 0,2 мл или магнитный штатив на 96 мест для работы с планшетами для ПЦР,
8. Этиловый спирт 96%.
9. Набор для секвенирования Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles) MS-102-3003 (Illumina, США), регистрационное удостоверение № РЗН 2020/13097 от 30.12.2020.
10. Раствор 2М NaOH
11. Деионизованная вода mQ
12. Набор реагентов для выделения ДНК человека из клинического материала (см. п. 8.2).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения анализа служат пробы геномной ДНК человека, выделенные из клинического материала (цельная кровь, ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок)).

8.1 Процедура получения биологического материала

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

8.1.1 Забор материала на исследование

Цельная кровь.

Забор крови осуществляется натошак или через три часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему (сиреневые крышки – 6% раствор EDTA-K2) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 1:9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и выделение ДНК станет невозможным).

Гепарин в качестве коагулянта использовать нельзя!

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного клинического материала:

Образцы цельной крови

- при +2 ... +8°C – не более 24 ч.
- при -18 ... -22°C – не более 6 месяцев.

Допускается однократное замораживание материала, при условии невозможности его доставки в лабораторию.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

8.1.2 Биопсийный и (или) операционный материал.

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

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

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

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

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

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

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

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного биологического материала:

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

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Условия транспортирования, хранения FFPE-блоков:

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

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

8.2 Процедура получения пробы геномной ДНК человека, выделенной из клинического материала (цельная кровь, ткань, фиксированная в 10% растворе формалина и заключённая в парафиновый блок (FFPE-блок))

Для выделения пробы геномной ДНК человека из ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой, в парафиновый блок (FFPE-блок), рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

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

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016, производства

ООО «ТестГен», Россия. Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018.

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

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15428 от 24.09.2021 г.).

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

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- при +2 ...+8°C – не более суток (24 ч),
- при -18 ...-22°C – не более месяца,
- при минус 80°C – длительно.

8.3 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

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

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение клинического образца гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;

3) вещества, добавляемые во время подготовки образца - например, антикоагулянты, или парафин, который используется для приготовления FFPE-блока.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Quasar-BRCA1/2», приведены в таблице 7.

Таблица 7

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Вещества, добавляемые во время подготовки образца	
Гепарин (антикоагулянт)	0,15 МЕ/мл
Цитрат натрия (антикоагулянт)	0,1 мМ/мл
EDTA-K2 (антикоагулянт)	0,5 мМ/мл
Парафин	$1 \cdot 10^{-4}$ мкл/мкл
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Ропивакаин (обезболивающее средство)	0,02 мг/мл
Бевацизумаб (применяется для терапии рака яичника, рака молочной железы)	0,02 мг/мл
Паклитаксел (профилактика и лечение рака молочной железы, рака яичников)	0,006 мг/мл
Капецитабин (препарат для лечения рака молочной железы)	0,03 мг/мл

На основании результатов исследования к ингибиторам ПЦР при проведении анализа отнесен гепарин (антикоагулянт) в концентрации 0,15 МЕ/мл. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта при взятии периферической крови.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

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

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

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом

- не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта при взятии крови.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

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

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

2. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером-1, ПЦР-буфером-2, Праймер-миксом-QB и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек., затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

3. Перед началом работы достать из холодильника Частицы-1, Частицы-2, Растворитель-1 и Растворитель-2. Частицы-1 и Частицы-2 перемешать до гомогенного состояния. Инкубировать флаконы около 30 мин. при комнатной температуре. Перед каждым использованием тщательно перемешать частицы.

4. Измерить концентрацию исследуемых образцов ДНК спектрофотометрическим методом непосредственно перед началом исследования. Проверку концентрации ДНК рекомендуется проводить с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Fisher Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Спектрофотометр Nanodrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) внесён в Государственный реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590.

Сделать разведение ДНК чистой деионизованной водой mQ до концентрации 1 нг/мкл в объеме 12 мкл (итого 12 нг). Точно

измерение концентрации и разведение образца важны для эффективности проведения исследования. Рекомендуется проводить анализ образцов ДНК, выделенных одним методом.

5. Приготовить 35 мл свежего разведения 70% этилового спирта. Для этого смешать 25,6 мл 96% этилового спирта и 9,5 мл деионизированной воды mQ.

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

Подготовка реактивов для секвенирования

Для проведения секвенирования требуется применение набора Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles) MS-102-3003 (Illumina, США) в режиме чтения 2x150 п.о.

1. Извлеките упаковку с картриджем с реактивами и буфером NT1 из морозильной камеры.

2. Поместите картридж с реактивами в водяную баню, содержащую воду комнатной температуры в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами до линии, указанной на его упаковке.

3. Разморозьте пробирку буфером NT1 при комнатной температуре.

4. Оставьте картридж с реактивами размораживаться в водяной бане комнатной температуры до полного оттаивания (около 60 минут).

5. Извлеките картридж из водяной бани и осторожно постучите им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытрите основание картриджа насухо.

6. Переверните картридж с реактивами десять раз для перемешивания растаявших реактивов, а затем внимательно осмотрите и проверьте, что все позиции оттаяли.

7. Проверьте реактивы в положениях 1, 2 и 4 и удостоверьтесь в том, что они равномерно перемешаны и не содержат осадка.

8. Поместите размороженный картридж с реактивами и пробирку с размороженным буфером NT1 в холодильник с температурой +4 °С до тех пор, пока вы не подготовитесь к загрузке образца.

9. Сделайте свежее разведение 0,2М NaOH из стокового раствора 2М NaOH. Для этого в чистой пробирке объемом 0.5-1.5 мл смешайте 5 мкл 2М NaOH и 45 мкл деионизованной воды mQ. Для сброса капель со стенок отцентрифугируйте пробирку в течение 1–3 секунд на центрифуге-вортексе.

10. Проведение анализа

Исследование состоит из следующих этапов:

1. Целевая мультиплексная ПЦР-амплификация ДНК с возможной флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
2. Очистка целевых ампликонов;
3. Индексирование ампликонов с получением ДНК-библиотек с применением реПЦР с ограниченными циклами;
4. Смешивание и очистка целевых ДНК-библиотек;
5. Массовое параллельное секвенирование с применением Illumina MiSeq.
6. Интерпретация результатов

10.1 Целевая мультиплексная ПЦР-амплификация ДНК с возможной флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

Общий объем реакции – 20 мкл.

В этом разделе проводится работа с образцами ДНК, разведенными до концентрации 1 нг/мкл (Раздел 9)

1. Промаркировать пробирки или планшет на 0,2 мл для ПЦР из расчета: количество исследуемых образцов + 1 образец ПКО + 1 образец ОКО.

2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа «Эпэндорф» объемом 1,5 или 2,0 мл приготовить реакционную смесь: $(n+3) \times 4$ мкл ПЦР-буфера-1 и $(n+3) \times 4$ мкл Праймер-микса-QB, где n – количество исследуемых образцов, включая ПКО и ОКО. Тщательно перемешать реакционную смесь в течение 3–5 с на центрифуге-вортексе.

3. Внести в каждую пробирку или лунку планшета по 8 мкл реакционной смеси.

4. Внести в соответствующие пробирки или лунки планшета для исследуемых образцов по 12 мкл разведенной ДНК. В пробирки для ПКО и ОКО ДНК не вносится.

5. Внести в соответствующую пробирку или лунку планшета 12 мкл ПКО.

6. Внести в соответствующую пробирку или лунку планшета 12 мкл ОКО.

7. Закрыть крышки пробирок или заклеить планшет плёнкой.

8. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки или планшеты в течение 1–3 секунд на центрифуге-вортексе.

9. Установить пробирки или планшеты в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой. Возможно использование прибора ПЦР без детекции сигнала в режиме реального времени.

10. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 8

11. Указать количество и идентификаторы образцов. В случае использования для проведения ПЦР пробирок, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

12. В случае использования амплификатора с детекцией сигнала в режиме реального времени, удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействован канал детекции FAM/Green и **отключен** режим автоматической базовой линии.

13. Запустить амплификацию.

14. Удостовериться в проведении реакции по нарастанию уровня флуоресценции в канале анализируемых образцов, ПКО и ОКО в соответствии с Таблицей 9. Типичный вид графика нарастания флуоресценции для тестируемых образцов, ПКО и ОКО приведен на Рисунке 1.

Таблица 8– Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	05:00	-	1
2	95	01:00	-	5
	61	04:00		
	63	02:00		
	66	01:00		
3	95	00:30	-	25
	72	03:00	FAM/Green	
4	8	постоянно	-	1

Таблица 9 – Результаты исследования для положительного и отрицательного контрольного образца

Внесенный материал	Флуорофор: FAM/Green
ПКО	Наращение флуоресценции. Амплификация не выходит за экспоненциальную фазу.
ОКО	Наращение флуоресценции. Амплификация не выходит за экспоненциальную фазу.

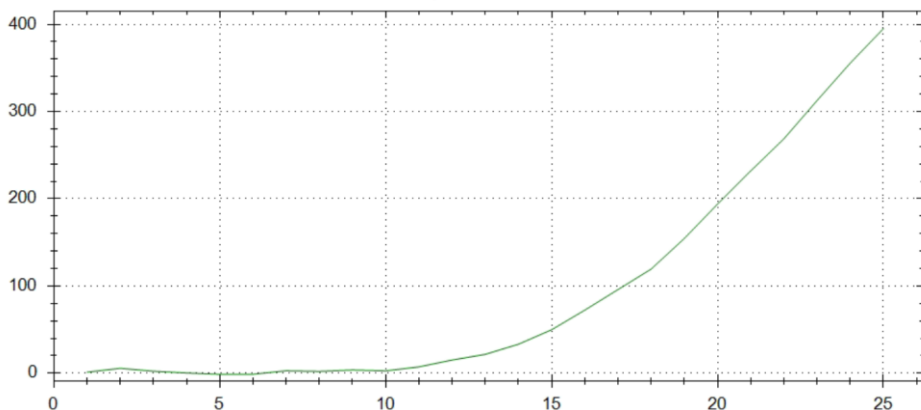


Рисунок 2 – Типичный вид графика нарастания флуоресценции. Общий вид кривой не отличается для тестируемых образцов, ПКО и ОКО. Вогнутая дугообразная кривая флуоресценции без накопления. Амплификация не выходит за экспоненциальную фазу.

15. По окончании выполнения программы приступить к следующему этапу.

Внимание! При необходимости, полученные ампликоны могут храниться в течение 12 часов при температуре -20°C .

10.2 Очистка целевых ампликонов

В этом разделе проводится работа с ампликонами (продукты ПЦР из Раздела 10.1) с получением очищенных ампликонов.

1. Приготовить суспензию магнитных частиц в одноразовых пробирках объемом 15 мл из расчета: $(n+1) \times 20$ мкл Растворителя-1 и $(n+1) \times 40$ мкл ресуспендированных Частиц-1 комнатной температуры, где n – количество исследуемых образцов, включая ПКО и ОКО. Растворенные магнитные частицы достаточно быстро осаждаются, в случае необходимости дополнительно ресуспендируйте их непосредственно перед применением. Готовая суспензия магнитных частиц **не хранится** и должна быть использована сразу после приготовления!

2. В каждую пробирку или лунку планшета с ампликонами из Раздела 10.1 внести по 60 мкл приготовленной суспензии из п.1, перемешать пипетированием.

3. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
4. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшет на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной.
5. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить п. 4-5
6. Добавить в пробирки или лунки планшета по 180 мкл 70% этанола.
7. Поместить пробирки или планшет с реакционной смесью на магнитный штатив и инкубировать 1 мин. при комнатной температуре. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить этот шаг.
8. Повторить пп. 6-7 еще 1 раз. Таким образом, проводится 2 промывки целевых ампликонов 70% этанолом.
9. Удалить остатки этанола тонким наконечником.
10. Просушить магнитные частицы при комнатной температуре 2 мин, не вынимая пробирку или планшет из магнитного штатива, для удаления остаточного спирта.
11. Добавить к осадку магнитных частиц 100 мкл деионизованной воды mQ для элюции, хорошо перемешать на вортексе до гомогенизации суспензии. Скинуть капли коротким центрифугированием.
12. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».
13. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшет на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной. В супернатанте содержатся очищенные ампликоны. Сразу перейти к следующему этапу!

10.3 Индексирование ампликонов с получением ДНК-библиотек с применением реПЦР с ограниченными циклами

Общий объем реакции – 50 мкл.

В этом разделе проводится работа с очищенными ампликонами из Раздела 10.2 с получением индексированных ДНК-библиотек.

1. Промаркировать пробирки или планшеты на 0,2 мл для ПЦР из расчета: количество исследуемых образцов + 1 образец ПКО + 1 образец ОКО.
2. Внести в каждую пробирку или лунку планшета по 10 мкл ПЦР-буфера-2.
3. Уникальная комбинация индексов QR7 и QR5 заранее внесена в планшеты индексов А, Б и В. Внести 30 мкл выбранной смеси индексов из лунок планшета в каждую пробирку или лунку планшета для ПЦР. В один образец вносится одна смесь индексов.

Внимание! Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждой выбранной смеси индексов из лунок планшета.

Схема расположения уникальных пар индексов в планшетах А, Б и В представлена в Приложении 2.

4. Внести в соответствующие пробирки или лунки планшета 10 мкл очищенных ампликонов из раздела 10.2. Остаток раствора ампликонов вместе с магнитными частицами может храниться при температуре -20 °С в течение 30 дней. **После замораживания магнитные частицы теряют свои свойства и не могут использоваться для пересадки ДНК.**

5. Закрыть крышки пробирок или заклеить планшеты плёнкой.

6. Для сброса капель со стенок центрифугировать пробирки или планшеты в течение 1-3 секунд на центрифуге-вортексе.

7. Установить пробирки или планшеты в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой. Возможно использование прибора ПЦР без детекции сигнала в режиме реального времени.

8. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции

флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 10.

9. Указать количество и идентификаторы образцов. В случае использования для проведения ПЦР пробирок, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

Таблица 10 – Протокол индексной ПЦР QB-IND

Стадия	Температура, °С	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	03:00	-	1
2	95	00:30	-	3
	66	00:30		
	72	02:00		
3	95	00:30	-	6
	72	02:00	FAM/Green	
4	72	05:00	-	1
5	8	постоянно	-	1

10. В случае использования амплификатора с детекцией сигнала в режиме реального времени, удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействован канал детекции FAM/Green и **отключен** режим автоматической базовой линии.

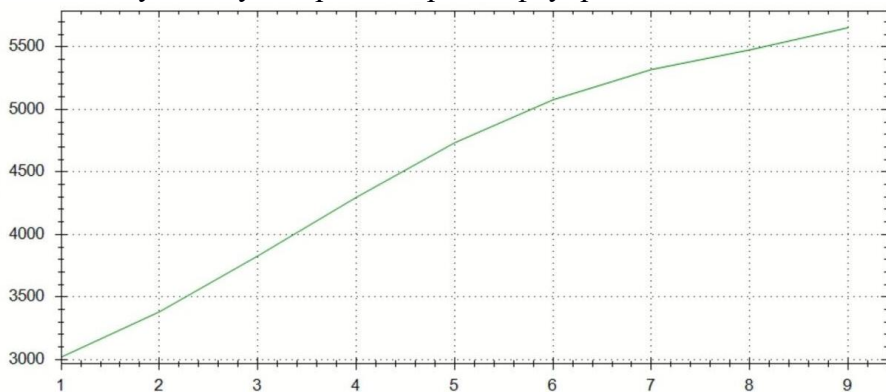
11. Запустить амплификацию.

12. Удостовериться в проведении реакции по нарастанию уровня флуоресценции в канале анализируемых образцов ПКО и ОКО в соответствии с Таблицей 11. Типичный вид графика нарастания флуоресценции для тестируемых образцов и ПКО приведен на Рисунке 2. После проведения амплификации в пробирках или лунках планшета содержатся ДНК-библиотеки.

Таблица 11 – Результаты исследования для положительного и отрицательного контрольного образца

Внесенный материал	Флуорофор: FAM/Green
ПКО	Нарастание флуоресценции. Характерная выпуклая дугообразная кривая флуоресценции с накоплением
ОКО	Нарастание флуоресценции. Характерная выпуклая дугообразная кривая флуоресценции с накоплением

Рисунок 3– Типичный вид графика нарастания флуоресценции. Общий вид кривой не отличается для тестируемых образцов, ПКО и ОКО. Выпуклая дугообразная кривая флуоресценции с накоплением.



10.4 Смешивание и очистка целевых ДНК-библиотек

В этом разделе проводится работа с индексированными ДНК-библиотеками из Раздела 10.3

1. В новой пробирке смешать по 10 мкл каждой индексированной ДНК-библиотеки из Раздела 10.3 (включая ПКО и ОКО). Хорошо перемешать и кратко центрифугировать.

2. Отобрать аликвоту 20 мкл смеси ДНК-библиотек в новую пробирку 0,2 мл.

3. Добавить к аликвоте 20 мкл Растворителя-2 и 26 мкл ресуспендированных Частиц-2 комнатной температуры, перемешать пипетированием.

4. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».

5. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшет на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной.

6. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить п. 5-6

7. Добавить в пробирки или лунки планшета по 180 мкл 70% этанола.

8. Поместить пробирки или планшет с реакционной смесью на магнитный штатив и инкубировать 1 мин. при комнатной температуре. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить этот шаг.

9. Повторить пп. 7-8 еще 1 раз. Таким образом, проводится 2 промывки целевых ампликонов 70% этанолом.

10. Удалить остатки этанола тонким наконечником.

11. Просушить магнитные частицы при комнатной температуре 2 мин, не вынимая пробирку или планшет из магнитного штатива, для удаления остаточного спирта.

12. Добавить к осадку магнитных частиц 22 мкл деионизованной воды mQ для элюции, хорошо перемешать на вортексе до гомогенизации суспензии. Скинуть капли коротким центрифугированием.

13. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».

14. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирку на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирке не станет прозрачной.

15. Отобрать 20 мкл супернатанта в новую пробирку 0,2 мл.

16. Добавить 16 мкл ресуспендированных Частиц-2 комнатной температуры, перемешать пипетированием.

17. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».

18. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирки или планшет на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках или лунках планшета не станет прозрачной.

19. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить п. 18-19

20. Добавить в пробирки или лунки планшета по 180 мкл 70% этанола.

21. Поместить пробирки или планшет с реакционной смесью на магнитный штатив и инкубировать 1 мин. при комнатной температуре. Аккуратно удалить супернатант, не задевая магнитных частиц, одноразовым наконечником и вылить его в ёмкость с дезинфицирующим раствором. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку или лунку планшета и повторить этот шаг.

22. Повторить пп. 20-21 еще 1 раз. Таким образом, проводится 2 промывки целевых ампликонов 70% этанолом.

23. Удалить остатки этанола тонким наконечником.

24. Просушить магнитные частицы при комнатной температуре 2 мин, не вынимая пробирку или планшет из магнитного штатива, для удаления остаточного спирта.

25. Добавить к осадку магнитных частиц 20 мкл деионизованной воды mQ для элюции, хорошо перемешать на вортексе до гомогенизации суспензии. Скинуть капли коротким центрифугированием.

26. Инкубировать пробирки или планшет 2 мин. при комнатной температуре в штативе «рабочее место».

27. Для осаждения магнитных частиц переставить пробирку на магнитный штатив и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирке не станет прозрачной.

28. Отобрать 18 мкл супернатанта в новую пробирку 0,2 мл. В супернатанте содержится единая очищенная ДНК-библиотека для секвенирования (содержит все ранее смешанные ДНК-библиотеки анализируемых образцов).

29. Измерить концентрацию ДНК-библиотеки в пробирках спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Fisher Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. в соответствии с инструкцией производителя. **Примечание:** рекомендуется использовать 2 мкл образца на измерение.

30. Отобрать аликвоту 5 мкл ДНК-библиотеки из п. 16 и добавить воды mQ до конечной концентрации 4 нМ. Для расчёта количества добавляемой воды mQ воспользуйтесь формулой ниже.

$$V_{mQ} = 5.4 \cdot C_{\text{библ}} - 5$$

V_{mQ} – объем добавляемой деионизованной воды mQ

$C_{\text{библ}}$ – измеренная концентрация библиотеки (в нг/мкл)

Концентрация 0,92 нг/мкл соответствует молярности 4 нМ.

10.5 Массовое параллельное секвенирование с применением Illumina MiSeq.

В этом разделе проводится работа с очищенной ДНК-библиотекой с концентрацией 4 нМ из Раздела 10.4.

Внимание! Убедитесь, что на секвенаторе Illumina MiSeq установлен программный модуль GenerateFastq. В случае необходимости, скачайте и установите его с сайта компании Illumina.

1. В пробирке объемом 1,5 мл смешайте 5 мкл ДНК-библиотеки с концентрацией 4 нМ и 5 мкл 0,2М NaOH.

2. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирку в течение 1–3 секунд на центрифуге-вортексе.

3. Инкубировать смесь 5 минут при комнатной температуре.

4. Добавить в пробирку 1100 мкл охлажденного до +4 °С буфера HT1, входящего в состав Набора для секвенирования Illumina MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycles) MS-102-3003, производства Illumina, США (регистрационное удостоверение № РЗН 2020/13097 от 30.12.2020). Итоговый раствор ДНК-библиотеки для секвенирования имеет концентрацию 18 пМ.

5. Далее следовать инструкции производителя для секвенатора Illumina MiSeq (Illumina, США) с установленным программным модулем GenerateFastq (Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014) по загрузке картриджа и запуску секвенирования.

6. Для анализа требуется проведения секвенирования в формате 2x150 п.о. с прочтением двух индексов по 8 п.о. (i7/i5)

7. Последовательности индексов QR7 и QR5 для включения в Sample Sheet приведены в Приложении 1.

8. Пример заполнения Sample Sheet приведен в Приложении 3.

10.6 Интерпретация результатов

Проверьте глубину прочтения с помощью программного обеспечения Local Run Manager, применяемого совместно с секвенатором Illumina MiSeq (Illumina, США). Средняя глубина прочтения для анализируемых образцов и ПКО считается достаточной, если она превышает значение 150x для герминальных мутаций и 500x для соматических мутаций. Средняя глубина прочтения для ОКО не должна превышать значение 10x.

Мутации в генах BRCA1 и BRCA2 (BRCA1 с.5266dupC, с.181T>G, с.5251C>T, с.4035delA, с.5161C>T, с.4675G>A, с.68_69del, с.3700_3704del, с.1961delA, с.4689C>G, с.3756_3759del, BRCA2 с.3749dupA, с.961_962insAA, с.2897_2898del, с.8754+1G>A, с.6174delT) считаются обнаруженными, если в файле VCF (см. инструкцию производителя секвенатора Illumina MiSeq) содержится хотя бы одна строка следующего вида:

Таблица 12 – записи в файле VCF.

CHROM	POS	ID	REF	ALT	Интерпретация
chr17	41209079	.	T	TG	BRCA1 c.5266dupC
chr17	41243512	.	CT	C	BRCA1 c.4035delA
chr17	41258504	.	A	C	BRCA1 c.181T>G
chr17	41245586	.	CT	C	BRCA1 c.1961delA
chr17	41215382	.	G	A	BRCA1 c.5161C>T
chr17	41209095	.	C	T	BRCA1 c.5251C>T
chr17	41226348	.	C	T	BRCA1 c.4675G>A
chr17	41276044	.	ACT	A	BRCA1 c.68_69del
chr17	41243843	.	GTTTAC	G	BRCA1 c.3700_3704del
chr17	41223242	.	G	C	BRCA1 c.4689C>G
chr17	41243788	.	TAGAC	T	BRCA1 c.3756_3759del
chr13	32914437	.	GT	G	BRCA2 c.6174delT
chr13	32912240	.	G	GA	BRCA2 c.3749dupA
chr13	32906576	.	C	CAA	BRCA2 c.961_962insAA
chr13	32911388	.	ACT	A	BRCA2 c.2897_2898del
chr13	32950929	.	G	A	BRCA2 c.8754+1G>A

Значение столбца ID может отличаться от табличного.

Если ни одной строки из таблицы 12 нет, то в образце отсутствуют мутации в генах BRCA1 и BRCA2 (BRCA1 c.5266dupC, c.181T>G, c.5251C>T, c.4035delA, c.5161C>T, c.4675G>A, c.68_69del, c.3700_3704del, c.1961delA, c.4689C>G, c.3756_3759del, BRCA2 c.3749dupA, c.961_962insAA, c.2897_2898del, c.8754+1G>A, c.6174delT).

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Данные, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, подготовленных с применением набора реактивов «Quasar-BRCA1/2», после последующего биоинформатического анализа могут быть использованы квалифицированным специалистом (врачом-онкологом), с учётом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, для определения эффективной стратегии лечения и прогнозирования эффективности лечения, а также для скрининга наследственных форм рака молочной железы, рака яичников у потенциально здоровых женщин в соответствии с клиническими рекомендациями «Рак молочной железы» (Возрастная группа – пациенты старше 18 лет, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.) и клиническими рекомендациями «Рак яичников/рак маточной трубы/первичный рак брюшины» (Возрастная группа – пациенты старше 18 лет, утвержденными Министерством здравоохранения Российской Федерации, 2018 г.).

11. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор «Quasar-BRCA1/2» в упаковке предприятия-изготовителя состоит из двух упаковок.

Содержимое упаковки №1 хранить при температуре от -15 °С до -25 °С в течение всего срока годности набора. Допускается заморозка/оттаивание упаковки №1 набора не более 5 раз.

Содержимое упаковки №2 хранить при температуре от +2 °С до +8 °С в течение всего срока годности набора. Не допускается хранение и транспортировка Упаковки №2 при температуре ниже +2 °С.

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

Транспортирование

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

Содержимое упаковки №1 Набора «Quasar-BRCA1/2» транспортировать при температуре от -15 °С до -25 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от +2 °С до +8 °С до 5 суток.

Содержимое упаковки №2 Набора «Quasar-BRCA1/2» транспортировать при температуре от +2 °С до +8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре окружающей среды, но не ниже +2 °С и не выше +30 °С не более 5 суток.

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

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

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

Срок годности

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

Срок годности вскрытых компонентов набора

Набор реагентов предназначен для однократного применения. В связи с этим оценка стабильности в процессе использования набора реагентов не проводилась.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

12. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

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

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

Потребительская упаковка набора реагентов «Quasar-VRCA1/2» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

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

13. Гарантийные обязательства, контакты

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

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

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

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

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

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

Приложение 1

Последовательности индексов i7 и i5 для включения в Sample Sheet для MiSeq (а также, NovaSeq, HiSeq 2000/2500, NextSeq 2000 Sample Sheet v2).

Название i7	Последовательность i7	Название i5	Последовательность i5
QR701	AACTGAGC	QR501	GTGGAGCG
QR702	GGTCAGAT	QR502	ACAAGATA
QR703	GTCTCATA	QR503	TAGTAGCT
QR704	TTCCATAA	QR504	CCTGGTGG
QR705	ACGAGATT	QR505	ATTATCCT
QR706	ACATCGCG	QR506	CCACTTGT
QR707	TAGTGCTC	QR507	GAACAGTA
QR708	ATCAAGGC	QR508	TTGTTAAT
QR709	ACTGAGTA	QR509	TGATAGTG
QR710	GTCAGACG	QR510	CAGCGACA
QR711	CGTATGTT	QR511	TACACTGT
QR712	AGTCATAG	QR512	GTGGCGCT
		QR513	CACGAAGG
		QR514	GCTCTACT
		QR515	ATGCACGA
		QR516	GACTATAG

Приложение 2

Схема расположения уникальных пар индексов в планшетах индексов А, Б и В.

Таблица 1 - схема расположения уникальных пар индексов в планшете А

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501
В	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502
С	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503
Д	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504
Е	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505
Ф	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506
Г	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507
Н	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508

Таблица 2 - схема расположения уникальных пар индексов в планшете Б

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509	QR509
В	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510	QR510
С	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511	QR511
Д	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512	QR512
Е	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513	QR513
Ф	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514	QR514
Г	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515	QR515
Н	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706	QR707	QR708	QR709	QR710	QR711	QR712
	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516	QR516

Таблица 3 - схема расположения уникальных пар индексов в планшете В

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501	QR501						
B	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502	QR502						
C	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503	QR503						
D	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504	QR504						
E	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505	QR505						
F	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506	QR506						
G	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507	QR507						
H	QR701	QR702	QR703	QR704	QR705	QR706						
	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508	QR508						

Пример заполнения Sample Sheet.

[Header]

IEMFileVersion,4

Experiment Name,QB1

Date,10/21/2021

Workflow,GenerateFASTQ

Application,FASTQ Only

Assay,TruSeq HT

Description,

Chemistry,Amplicon

[Reads]

151

151

[Settings]

ReverseComplement,0

[Data]

sample_id,Sample_Name,Sample_Plate,Sample_Well,I7_Index_ID,Index,I5_Index_ID,Index2

T1,,,QR703,GTCTCATA,QR513,CACGAAGG

T2,,,QR704,TTCCATAA,QR516,GACTATAG

Приложение 4

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ Р 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>