**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ**

**«БИОЧИП-ИМБ»**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | **«УТВЕРЖДАЮ**»  Генеральный директор ООО «БИОЧИП-ИМБ»  к.б.н.  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Д.О. Фесенко |
|  |  | «09» апреля 2021 г. |

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

**Набора реагентов** **для** **выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по** **ТУ 21.20.23-009-64417140-2020.**

Москва, 2020

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

|  |  |
| --- | --- |
| *ATM* | - (англ. аtaxia telangiectasia mutated «мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок») — ген, кодирующий серин/треониновую протеинкиназу, которая рекрутируется и активируется двунитевыми разрывами ДНК; |
| *BRCA1* | - (англ. breast cancer type 1 susceptibility protein «белок восприимчивости к раку молочной железы типа 1») - ген, кодирующий белок BRCA1, участвующий в репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и поддержании генетической стабильности; |
| *BRCA2* | - (англ. breast cancer type 2 susceptibility protein «белок восприимчивости к раку молочной железы типа 2») - ген, кодирующий белок BRCA2, участвующий в репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и поддержании генетической стабильности; |
| *del* | - делеция; |
| *dup* | - дупликация; |
| *HBsAg* | - поверхностный антиген вируса гепатита B; |
| *ins* | - инсерция; |
| *PALB2* | - (partner and localizer of BRCA2 «партнер и локализатор BRCA2») – ген, кодирующий белок, взаимодействующий с BRCA2 и участвующий в процессе репарации ДНК; |
| *ВИЧ* | - вирус иммунодефицита человека; |
| ДНК | - дезоксирибонуклеиновая кислота; |
| дНТФ | - дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты; |
| *МУ* | - методические указания; |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция; |
| *РМЖ* | - рак молочной железы; |
| *РПЖ* | - рак поджелудочной железы; |
| *РУ* | - регистрационное удостоверение; |
| *РФ* | - Российская Федерация; |
| *РЯ* | - рак яичников; |
| *СанПин* | - санитарные правила и нормы; |
| *СП* | - санитарные правила; |
| *ТУ* | - технические условия; |
| *УАПК* | - комплекс универсальный аппаратно-программный; |
| *УФ* | - ультрафиолет (ультрафиолетовое излучение); |
| ЭДТА | - этилендиаминтетрауксусная кислота; |
|  | Набор реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1, BRCA2, PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020- далее по тексту- набор реагентов; набор реагентов «ГЕРДА- БИОЧИП»; изделие. |

**ВВЕДЕНИЕ**

Рак поджелудочной железы (РПЖ), рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) являются социально-значимыми заболеваниями. В 2018 году в России было зарегистрировано 15 028 новых случаев РПЖ, 64 544 новых случаев РМЖ и 12 555 новых случаев РЯ 1. РМЖ (21,0%) является ведущей онкологической патологией у женского населения, РЯ занимает девятое место (4,3%). Доля случаев РПЖ среди всех злокачественных новообразований составляет 2,9% у женщин и 3,3% у мужчин 2.

Генетическая предрасположенность является существенным фактором риска развития онкологических заболеваний. От 5 до 10% случаев РМЖ, от 10 до 17% случаев РЯ 3 и около 10% случаев РПЖ являются наследственными 4.

Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, участвующих в репарации двухцепочечных разрывов, значительно увеличивают индивидуальный риск развития РМЖ и РЯ. Мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* обусловлены 20–50% наследственных форм РМЖ и 90-95% - РЯ у женщин, а также 4– 40% РМЖ у мужчин 3. При семейных формах РПЖ мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* выявляются в 5% и 17% случаев, соответственно 5,6. Средние кумулятивные риски для носителей мутаций в гене *BRCA1* в возрасте 70 лет составляют 57‑65% в отношении развития РМЖ и 39‑40% — РЯ. Риск развития РМЖ для носителей мутаций в гене *BRCA2* составляет 45‑49%, тогда как риск РЯ не превышает 11‑18%. При отягощенном семейном анамнезе риски возрастают: 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% в отношении развития РМЖ и РЯ, соответственно 7. Носители мутаций в гене *BRCA2* имеют риск развития РПЖ в 3,5 раза выше общепопуляционного, в то время как влияние наличия мутации *BRCA1* на увеличение риска развития РПЖ еще не до конца ясно: в одних исследованиях показано, что он возрастает в 2,2 раза, в других такие закономерности не обнаружены 8.

Герминальные мутации в гене *PALB2* встречаются примерно в 1–2% случаев семейного рака молочной железы и в 3–4% случаев семейного РПЖ 9. Риск развития РМЖ у женщин-носителей мутаций *PALB2* по сравнению с общей популяцией в восемь-девять раз выше среди тех, кто моложе 40 лет, в шесть-восемь раз выше среди женщин 40-60 лет, и в пять раз выше среди людей старше 60 лет. Расчетный кумулятивный риск рака молочной железы у женщин среди носителей мутаций составлял 14% к 50 годам и 35% к 70 годам. Абсолютный риск РМЖ у женщин-носителей мутаций *PALB2* к 70 годам варьируется от 33% для тех, у кого в семье не было РМЖ, до 58% для тех, кто имеет двух или более родственников первой степени с раком молочной железы в возрасте 50 лет 10. Для носителей мутации в гене *PALB2* риск развития РЯ и РПЖ к 80 годам составляет 5% и 2-3%, соответственно 11.

*ATM*, еще один ген, играющий непосредственную роль в репарации повреждений ДНК. Мутациями в данном гене может быть объяснено около 2,4% семейных случаев РПЖ 4. Среди носителей гетерозиготных патогенных мутаций в гене *ATM* кумулятивный риск возникновения РМЖ к 80 годам составляет примерно 33%, т.е. риск возникновения РМЖ примерно в три раза выше общепопуляционного 12. Риск возникновения РЯ у носителей мутации *ATM* примерно в два раза выше общепопуляционного 13.

Во многих популяциях наблюдается так называемый эффект основателя — преобладание в генах нескольких мутаций, специфичных для этнической группы. В странах Восточной Европы и в России широко распространены определенные мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM*, что позволяет внедрять соответствующие молекулярные скрининговые программы и оптимизировать генетическое тестирование. На основании собственных данных и данных других исследователей о распространенности мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* в Российской Федерации предложена диагностическая панель, включающая 23 мутации в генах *BRCA1* (NM\_007294.3: c.66\_67AG[1], c.181T>G, c.1961delA, c.3695\_3699GTAAA[1], c.3752\_3755GTCT[1], c.4035delA, c.5161C>T, c.5251C>T, c.5266dupC), *BRCA2* (NM\_000059.3: c.752\_753insAG, c.1010\_1011insTG, c.2808\_2811delACAA, c.5286T>G, c.5586delG, c.5718\_5719CT[2], c.5946delT, c.6070C>T, c.6298С>T, c.6998dupT, c.7879A>T), *PALB2* (NM\_024675.3: c.172\_175delTTGT, c.509\_510delGA) и *ATM* (NM\_000051.3: c.5932G>T) c целью их диагностики у больных РПЖ, РМЖ и РЯ в Российской Федерации. Своевременное выявление мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* у больных РПЖ, РМЖ и РЯ позволяет индивидуально и наиболее оптимально спланировать протокол противоопухолевой терапии с наибольшей выгодой для больного. Также информация о носительстве патогенных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* обеспечивает возможность профилактики и ранней диагностики злокачественных новообразований.

**Список используемой литературы:**

1. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. (Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой). *Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России*; 2019.

2. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). (Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского Г.В. Петровой). *Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена  филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России*; 2018.

3. Любченко ЛН, Батенева ЕИ. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. *Пособие для врачей. Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»*; 2014.

4. Bakker JL, de Winter JP. A role for *ATM* in hereditary pancreatic cancer. *Cancer Discov*. 2012;2(1):14-15. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0318.

5. Schwartz M, Korenbaum C, Benfoda M, et al. Familial pancreatic adenocarcinoma: A retrospective analysis of germline genetic testing in a French multicentre cohort. *Clin Genet*. 2019;96(6):579-584. doi:10.1111/cge.13629

6. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and *BRCA2* in familial pancreatic cancer: Deleterious *BRCA2* mutations in 17%. *Cancer Res*. 2002;62(13):3789-3793.

7. Любченко ЛН, Батенева ЕИ, Абрамов ИС и др. Наследственный рак молочной железы и яичников. *Злокачественные опухоли*. 2:53-61.

8. Nepomuceno TC, De Gregoriis G, Bastos De Oliveira FM, et al. The role of *PALB2* in the DNA damage response and cancer predisposition. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1886. doi:10.3390/ijms18091886

9. Hofstatter EW, Domchek SM, Miron A, et al. *PALB2* mutations in familial breast and pancreatic cancer. *Fam Cancer*. 2011;10(2):225-231. doi:10.1007/s10689-011-9426-1

10. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in *PALB2*. *N Engl J Med*. 2014;371(6):497-506. doi:10.1056/NEJMoa1400382

11. *PALB2* mutation and cancer risks-*PALB2* Interest Group. *http://www.PALB2.org/PALB2-interest-group-2/PALB2-mutation-and-cancer-risks/.* Accessed June 10, 2020.

12. Jerzak KJ, Mancuso T, Eisen A. Ataxia–telangiectasia gene (*ATM*) mutation heterozygosity in breast cancer: A narrative review. *Curr Oncol*. 2018;25(2):e176-e180. doi:10.3747/co.25.3707

13. Arvai KJ, Roberts ME, Torene RI, et al. Age-adjusted association of homologous recombination genes with ovarian cancer using clinical exomes as controls. *Hered Cancer Clin Pract.* 2019;17(1):19. doi:10.1186/s13053-019-0119-3

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

[1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ 7](#_Toc70010367)

[2. НАИМЕНОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ 7](#_Toc70010368)

[3. СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ 7](#_Toc70010369)

[4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 7](#_Toc70010370)

[5. НАЗНАЧЕНИЕ 7](#_Toc70010371)

[6. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ 8](#_Toc70010372)

[7. КРАТНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 9](#_Toc70010373)

[8. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОТРЕБИТЕЛЬ 9](#_Toc70010374)

[9. ОПИСАНИЕ ИЗДЕЛИЯ. КОМПЛЕКТНОСТЬ. 9](#_Toc70010375)

[10. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ 10](#_Toc70010376)

[11. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ ЗНАЧЕНИЙ, ЗАДАННЫХ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ. 12](#_Toc70010377)

[12. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 12](#_Toc70010378)

[13. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ. 14](#_Toc70010379)

[14. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ 17](#_Toc70010380)

[15. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 17](#_Toc70010381)

[16. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ 25](#_Toc70010382)

[17. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ 26](#_Toc70010383)

[18. УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ 26](#_Toc70010384)

[19. СРОК ГОДНОСТИ 27](#_Toc70010385)

[20. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ 27](#_Toc70010386)

[21. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 27](#_Toc70010387)

[22. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ 27](#_Toc70010388)

[23. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ 28](#_Toc70010389)

[24. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ 28](#_Toc70010390)

[25. ИНФОРМАЦИЯ О ПЕРВОНАЧАЛЬНОМ ВЫПУСКЕ ИЛИ ПЕРЕСМОТРЕ ЭКСПЛУАТАЦИОННОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ 29](#_Toc70010391)

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ
   1. Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020 (далее – набор реагентов, набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП»).
   2. Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.
   3. Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике, безопасность работы лабораторий должна быть обеспечена в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.
2. НАИМЕНОВАНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов для выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе («ГЕРДА-БИОЧИП») по ТУ 21.20.23-009-64417140-2020.

1. СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) 115478 г. Москва, Каширское ш., д.24.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «БИОЧИП-ИМБ» (ООО «БИОЧИП-ИМБ»).

Адрес компании: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, строение 1, этаж 1, пом. I, ком. 12.

Адрес места производства: ООО «БИОЧИП-ИМБ»

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д.32, стр. 1: помещение № I 6-го этажа, комн. 41, 41а, 42, 42а, 43, 43а, 43б; помещение № I 6-го этажа, комн. 38, 39; помещение № I 1-го этажа, комн. 12.

тел. +7(499)135-98-26, факс +7(499)135-97-61

E-mail: deferos@yandex.ru

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для клинической лабораторной диагностики.

1. НАЗНАЧЕНИЕ
   1. Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для выявления 23 герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе.
   2. Наименования детектируемых мутаций приведены в Таблице:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ген** | **Нуклеотидная замена** | **АК замена** | **RS** | **Геномные координаты** | **Альтернативное название** |
| *BRCA1* | NM\_007294.3:c.66\_67AG[1] | p.Glu23Valfs | rs80357914 | 17: 43124028-43124029 (GRCh38)  17: 41276045-41276046 (GRCh37) | 185delAG  185\_186delAG  187delAG  NM\_007294.3:c.68\_69delAG  NM\_007294.3:c.66\_67delAG |
| NM\_007294.3:c.181T>G | p.Cys61Gly | rs28897672 | 17: 43106487 (GRCh38)  17: 41258504 (GRCh37) | 300T>G |
| NM\_007294.3:c.1961delA | p.Lys654Serfs | rs80357522 | 17: 43093570 (GRCh38)  17: 41245587 (GRCh37) | 2080delA  NM\_007294.3:c.1961\_1961delA |
| NM\_007294.3:c.3695\_3699GTAAA[1] | p.Val1234Glnfs | rs80357609 | 17: 43091827-43091831 (GRCh38)  17: 41243844-41243848 (GRCh37) | 3819delGTAAA  3819del5  3819\_3823delGTAAA  NM\_007294.3:c.3700\_3704delGTAAA |
| NM\_007294.3:c.3752\_3755GTCT[1] | p.Ser1253Argfs | rs80357868 | 17: 43091772-43091775 (GRCh38)  17: 41243789-41243792 (GRCh37) | 3874del4  3875delGTCT  3875\_3878delGTCT  NM\_007294.3:c.3756\_3759delGTCT |
| NM\_007294.3:c.4035delA | p.Glu1346Lysfs | rs80357711 | 17: 43091496 (GRCh38)  17: 41243513 (GRCh37) | 4153delA  4154delA |
| NM\_007294.3:c.5161C>T | p.Gln1721Ter | rs878854957 | 17: 43063365 (GRCh38)  17: 41215382 (GRCh37) | 5280C>T |
| NM\_007294.3:c.5251C>T | p.Arg1751Ter | rs80357123 | 17: 43057078 (GRCh38)  17: 41209095 (GRCh37) | 5370C>T |
| NM\_007294.3:c.5266dupC | p.Gln1756Profs | rs80357906 | 17: 43057062-43057063 (GRCh38)  17: 41209079-41209080 (GRCh37) | 5382insC  c.5266insC  5382\_5383insC  5384insC  5385insC  5383insC |
| *BRCA2* | NM\_000059.3:c.752\_753insAG | p.Asp252Glufs | отсутствует | 13: 32330989-32330989 (GRCh38)  13:32905126-32905127 (GRCh37) |  |
| NM\_000059.3:c.1010\_1011insTG | p.Asp339Leufs | отсутствует | 13: 32332488-32332489 (GRCh38)  13: 32906625-32906626 (GRCh37) |  |
| NM\_000059.3:c.2808\_2811delACAA | p.Ala938Profs | rs80359351 | 13: 32337161-32337164 (GRCh38)  13: 32911298-32911301 (GRCh37) | 3036delACAA 3034del4 3036\_3039delACAA NM\_000059.3:c.2806\_2809delAAAC |
| NM\_000059.3:c.5286T>G | p.Tyr1762Ter | отсутствует | 13: 32339641(GRCh38)  13: 32913778(GRCh37) |  |
| NM\_000059.3:c.5586delG | p.Lys1863Asnfs | отсутствует | 13: 32339941 (GRCh38)  13: 32914078 (GRCh37) |  |
| NM\_000059.3:c.5718\_5719CT[2] | p.Leu1908Argfs | rs80359530 | 13: 32340073-32340074 (GRCh38)  13: 32914210-32914211 (GRCh37) | 5946delCT  5950\_5951delCT  5950delCT  NM\_000059.3:c.5722\_5723delCT |
| NM\_000059.3:c.5946delT | p.Ser1982Argfs | rs80359550 | 13: 32340301 (GRCh38)  13: 32914438 (GRCh37) | 6174delT |
| NM\_000059.3:c.6070C>T | p.Gln2024Ter | rs80358844 | 13: 32340425 (GRCh38)  13: 32914562 (GRCh37) |  |
| NM\_000059.3:c.6298С>T | p.Gln2100Ter | rs746661607 | 13: 32340653 (GRCh38)  13: 32914790 (GRCh37) |  |
| NM\_000059.3:c.6998dupT | p.Pro2334Thrfs | rs754611265 | 13: 32346886-32346887 (GRCh38)  13: 32921023-32921024 (GRCh37) | NM\_000059.3:c.6997\_6998insT |
| NM\_000059.3:c.7879A>T | p.Ile2627Phe | rs80359014 | 13: 32362596 (GRCh38)  13: 32936733 (GRCh37) | 8107A>T |
| *PALB2* | NM\_024675.3:c.172\_175delTTGT | p.Gln60Argfs | rs180177143 | 16: 23637886-23637889 (GRCh38)  16: 23649207-23649210 (GRCh37) | NM\_024675.3:c.168\_171TTGT[1]  172\_175delTTGT |
| NM\_024675.3:c.509\_510delGA | p. Arg170Ilefs | rs515726123 | 16: 23636036-23636037 (GRCh38)  16: 23647357-23647358 (GRCh37) | 509\_510delGA  508\_509delAG |
| *ATM* | NM\_000051.3:c.5932G>T | p.Glu1978Ter | rs587779852 | 11: 108312424 (GRCh38)  11: 108183151 (GRCh37) |  |

* 1. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из периферической крови человека.
  2. Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для качественного анализа.
  3. Для диагностики *in vitro*. Только для профессионального применения.

1. ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ
   1. Показания к проведению исследования: лица с онкологическим заболеванием (рак поджелудочной железы, рак молочной железы или рак яичников) с целью выявления герминальных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM*.
   2. Противопоказаний к применению нет (пересадка костного мозга теоретически может влиять на результат анализа, в этом случае будут необходимы дополнительные исследования).
   3. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.
   4. Возможные побочные эффекты: при использовании специально обученным персоналом, с учетом применения набора реагентов строго по назначению, при соблюдении требований безопасности при работе с Набором реагентов, описанных в разделе 2 настоящих ТУ, побочные эффекты отсутствуют.
2. КРАТНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» предназначен для однократного дробного применения по назначению и рассчитан на 100 определений, включая положительные и отрицательные контроли. Один биологический микрочип предназначен для одного определения.

1. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОТРЕБИТЕЛЬ

Потенциальным потребителем является квалифицированный медицинский персонал (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), врач-клиницист), обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

Как и в случае любых других диагностических тестов, все результаты анализа необходимо рассматривать совместно с остальной клинической информацией, доступной врачу.

1. ОПИСАНИЕ ИЗДЕЛИЯ. КОМПЛЕКТНОСТЬ.
   1. **Состав набора реагентов**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Наименование компонентов** | **Внешний вид** | **Количество пробирок** | **Номинальный объем компонента** |
| **Комплект № 1** - **для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и флуоресцентного маркирования** | | | |
| Вода | Прозрачная бесцветная жидкость | 2 пробирки | по 1500 мкл |
| ПЦР-буфер | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка | 720 мкл |
| дНТФ | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка | 60 мкл |
| Полимераза | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка | 100 мкл |
| Смесь праймеров | Прозрачная голубая жидкость | 1 пробирка | 120 мкл |
| Положительный контроль «K+»\* | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка | 70 мкл |
| Отрицательный контроль «K-» | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка | 70 мкл |
| **Комплект № 2**- **для проведения гибридизации**  Состоит из трех подкомплектов | | | |
| ***Подкомплект 2А*** | | | |
| Гибридизационный компонент №1 | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка | 1200 мкл |
| Промывочный буфер (х20) | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 флакон | 20 мл |
| ***Подкомплект 2Б*** | | | |
| Гибридизационный компонент №2 | Прозрачная бесцветная жидкость | 1 пробирка | 1200 мкл |
| ***Подкомплект 2В*** | | | |
| Биологические микрочипы | Черная пластиковая подложка размером с предметное стекло с пластиковой гибридизационной камерой | 10 коробок | 10 шт |

**\* Примечание:** Компонент «Положительный контроль «К+»», входящий в Комплект №1 набора реагентов, содержит ДНК человеческого происхождения. В образце периферической крови донора Антитела к ВИЧ 1, 2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют. При выделении ДНК образец крови донора подвергается инактивации.

В комплект поставки входит Инструкция по применению – 1 шт. и Аналитический паспорт – 1 шт.

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

* 1. **Число анализируемых проб**

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан на 100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных и отрицательных контролей.

* 1. **Принцип метода**

**Метод:** мультиплексная ПЦР с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе.

Принцип метода набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» основан на применении мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией и детекцией флуоресцентно-меченных продуктов амплификации на биологическом микрочипе.

В ходе ПЦР происходит амплификация целевых фрагментов ДНК с использованием специфичных праймеров, после чего с данных фрагментов синтезируются преимущественно одноцепочечные ПЦР-продукты, содержащие флуоресцентную метку для последующей регистрации результатов гибридизации на биологическом микрочипе.

Биологический микрочип представляет собой пластиковую подложку с иммобилизованными зондами (олигонуклеотидами), специфичными к определенным генетическим вариантам изучаемой ДНК. Регистрация результатов гибридизации проводится с помощью анализа флуоресценции меченного ПЦР-продукта, комплементарно связанного с зондами, иммобилизованными на биологическом микрочипе. Регистрация и интерпретация результатов осуществляется с использованием «Комплекс универсальный аппаратно-программный (УАПК) для анализа биологических микрочипов по ТУ 9443-004-02699501-2006» (РУ РОСЗДРАВНАДЗОРА № ФСР 2010/08002 от 13 января 2020г.).

Исследование с использованием набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), мультиплексная полимеразная цепная реакция с одновременным введением флуоресцентной метки в ПЦР-продукт, гибридизация ПЦР-продукта с биологическим микрочипом, регистрация результатов гибридизации.

Реагенты для выделения ДНК не включены в состав набора реагентов. Выделение ДНК проводят с использованием наборов реагентов, зарегистрированных в установленном порядке в Российской Федерации.

* 1. **Время проведения анализа** (без учета пробоподготовки) – от 22 до 24 часов.

1. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
   1. **Предел обнаружения**

Нижний предел обнаружения – 5 нг/ мкл (10,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку).

При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу набора реагентов. В образцах с недостаточным количеством ДНК (менее 10,0 нг на амплификационную пробирку) после завершения реакции амплификации и гибридизации может регистрироваться недостоверный результат.

* 1. **Аналитическая специфичность**

Смесь праймеров, входящая в состав набора реагентов, специфично амплифицирует только целевые локусы генов *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* и *ATM* человеческого генома*.* Зонды, иммобилизованные на биологическом микрочипе, специфичны только к мутациям, указанным в назначении набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП».

* 1. **Интерферирующие вещества**

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» была проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале. Для проведения испытаний использовались образцы периферической крови, содержащие потенциально интерферирующие вещества (гемоглобин, билирубин общий, общие триглицериды) в пределах физиологических концентраций. Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале, каждое из перечисленных веществ 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 «ГЕРДА-БИОЧИП».

Результаты приведены в Таблице:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Интерферирующие вещества | Концентрация, соответствующая верхней границе нормы физиологических концентраций потенциально интерферирующих веществ в биоматериале | Установленные концентрации потенциально интерферирующих веществ, влияющие на результат работы набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» |
| Гемоглобин | 165 г/л | 400 г/л |
| Билирубин общий | 20,5 мкмоль/л | 500 мкмоль/л |
| Триглицериды | 2,25 ммоль/л | 50 ммоль/л |

Каждое вещество добавлялось к образцам периферической крови до достижения заданных концентраций. Такой образец подвергался выделению ДНК (набор «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696) и генотипированию с помощью набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП». По результатам сравнения генотипов, полученных при использовании набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» и генотипов, полученных секвенированием по Сэнгеру, делался вывод о влиянии потенциально интерферирующих веществ на набор реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП». Потенциально интерферирующие вещества в концентрациях, которые соответствуют физиологическим концентрациям в биоматериале, не влияют на способность набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» определять генотип исследуемого образца ДНК. Влияние потенциально интерферирующих веществ на результат работы набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» установлено только при увеличении концентрации веществ до концентраций, превышающих их известную максимальную концентрацию в биоматериале.

* 1. **Диагностические характеристики**

Количество образцов (n) – 530;

Диагностическая чувствительность составляет – не менее 95%; (данные отчета клиниспытаний производителя)

Диагностическая специфичность составляет – не менее 95%.(данные отчета клиниспытаний производителя)

Метод сравнения, используемый для определения диагностических характеристик: секвенирование по Сенгеру.

1. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ ЗНАЧЕНИЙ, ЗАДАННЫХ ДЛЯ КОНТРОЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ.

Генотип положительного контроля «K+» и образцов ДНК стандартной панели предприятия, которые используются для определения аналитической чувствительности, воспроизводимости, прецизионности анализа с использованием набора реагентов «ГЕРДА- БИОЧИП», был определен секвенированием по Сенгеру.

1. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», и санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

К работе с набором реагентов допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

Ни один из известных методов тестирования не может дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов. По этой причине, с человеческой кровью и всеми ее производными, реагентами и образцами человеческого происхождения, в том числе с Положительным контролем «К+» следует обращаться как с потенциально инфицированным материалом, в соответствии с универсальными мерами предосторожности для переносимых с кровью патогенов, что определено местными, региональными и национальными нормативами.

При работе следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

С целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб, помещений и оборудования необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ.

Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Учитывая специфику проведения анализа с использованием набора реагентов, согласно МУ 1.3.2569—09лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий перечень последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон (помещений) или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений:

* приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала (рабочая зона 1);
* выделения нуклеиновых кислот (рабочая зона 2);
* проведения реакции амплификации (рабочая зона 3):
* приготовление реакционных смесей (подзона 3а);
* амплификация нуклеиновых кислот (подзона 3б);
* учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот на ДНК-чипах (рабочая зона 4).

Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II-III класса с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах. Рекомендуется разнесение зон 3а и 3б по разным помещениям.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы, используемые при работе с набором реагентов, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Каждая манипуляция после её завершения обязательно должна сопровождаться сменой наконечников для дозаторов. Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

Открывание пробирок, содержащих продукты ПЦР, допустимо только в рабочей зоне 4.

При возникновении контаминации в помещениях лаборатории немедленно останавливают работы и проводят мероприятия по ликвидации контаминации, после чего проводят внутрилабораторный контроль качества дезинфекции и проведенной деконтаминации ампликонов путём исследования смывов с рабочих поверхностей оборудования и поверхностей помещений.

Отходы биоматериала (инфицированные или потенциально инфицированные), образцы после пробоподготовки, ПЦР и гибридизации, образующиеся в клинико-диагностических лабораториях, относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы), которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Опасные компоненты в наборе реагентов:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Наименование компонента** | **Опасный компонент** | **Указание на риски** |
| Гибридизационный компонент №2 | Формамид | Токсичен. По токсическому эффекту формамид напоминает диметилформамид: способен проникать через неповреждённую кожу, раздражает кожу и слизистые оболочки, имеет общетоксическое и эмбриотоксическое действие, вызывает поражение печени, нервной и сердечно-сосудистой системы, может накапливаться в организме. При хроническом действии метаболиты формамида имеют гепатотоксический эффект, усиливающийся в присутствии ацетона и этанола. |

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. С гибридизационным компонентом №2 следует работать в вытяжном шкафу.

При аварийных ситуациях возможно следующее:

- компоненты набора реагентов, не содержащие опасных веществ: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

- Гибридизационный компонент №2, содержащий формамид:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Воздействие** | **Симптомы** | **Профилактические меры** | **Первая помощь** |
| **Вдыхание** | Сонливость, головная боль, тошнота, Диарея | Применять вентиляцию, местную вытяжку или средства защиты органов дыхания | Свежий воздух, покой. Обратиться за медицинской помощью |
| **Кожа** | Покраснение | Защитная одежда, защитные перчатки | Снять загрязненную одежду. Промыть кожу большим количеством воды или принять душ |
| **Глаза** | Покраснение | Использовать маску для лица | Промыть большим количеством воды в течение нескольких минут (снять контактные линзы, если это возможно сделать без затруднений) |
| **Проглатывание** | См. вдыхание | Не принимать пищу, напитки и не курить во время работы | Прополоскать рот. Обратиться за медицинской помощью |

Избегать попадания Гибридизационного компонента №2 в окружающую среду. Утилизировать содержимое/контейнер в соответствии с местными, региональными, государственными и международными правилами.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Не допускается использовать набор реагентов:

− при нарушении условий транспортирования и хранения;

− при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;

− при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;

− по истечению срока годности.

Применять набор реагентов строго по назначению, согласно данной инструкции.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

* 1. **Ограничения**
* Набор применяется только для диагностики in vitro.
* Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом: ДНК, выделенной из периферической крови человека. Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.
* Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала.
* Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ РЕАГЕНТОВ.

Организация работы ПЦР- лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Перечень рекомендуемого оборудования и материалов для каждой зоны:

* 1. **Рабочая зона 1: приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала**
     1. Бокс биологической безопасности III класса защиты или бокс биологической безопасности II класса защиты.
     2. Центрифуга для пробирок объемом 5—100 мл до 3 тыс. об./мин.
     3. Микроцентрифуга/вортекс.
     4. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5—2 мл до 10 000 g.
     5. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.
     6. Термостатируемый шейкер для пробирок.
     7. Установка для фильтрования воды с набором фильтров.
     8. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл.
     9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 или 2,0 мл.
     10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1 000 мкл.
     11. Штативы для наконечников, микропробирок объемом 1,5 мл.
         1. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от –18 до –25 °С. Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от –18 до –25 °С.
     12. Морозильная камера на –70 °С (при необходимости, в случае длительного хранения материала).
     13. Емкость с регламентируемым дезинфицирующим раствором.
     14. Емкость с 70 %-м этиловым спиртом.
  2. **Рабочая зона 2: выделение нуклеиновых кислот**
     1. Бокс биологической безопасности II или III класса биологической защиты.
     2. Микроцентрифуга/вортекс.
     3. Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5—2 мл до 10 000 g.
     4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.
     5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.
     6. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл.
     7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.
     8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1 000 мкл.
     9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл.
     10. Штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 мл.
         1. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от –18 до –25 °С. Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от –18 до –25 °С.
     11. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот;
     12. Флуориметр;
     13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
     14. При исследовании материала, подозрительного на зараженность возбудителями III—IV групп патогенности, не образующими спор, допускается использование автоматизированного оборудования для выделения нуклеиновых кислот.
     15. Маркеры водостойкие.
     16. Пинцет медицинский.
     17. Отдельный халат, шапочки, обувь, защитные очки и одноразовые перчатки.
     18. Набор для выделения геномной ДНК, зарегистрированный в установленном порядке в Российской Федерации (например, Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в комплектации ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696 от 25 октября 2016 года).
  3. **Рабочая зона 3: проведение реакции амплификации**
     1. **Подзона 3а:** приготовление реакционных смесей.
        1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс).
        2. Микроцентрифуга/вортекс.
        3. Микроцентрифуга для пробирок типа Eppendorf объемом1,5-2,0 мл. Cкорость вращения ротора до 16000 об/мин. (18000g).
        4. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл.
        5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации объемом 0,2 мл
        6. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 и 2 мл.
        7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл, свободные от РНКаз.
        8. Штативы для наконечников.
        9. Штативы для микропробирок на 0,2, 1,5 и 2 мл.
        10. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С и от –18 до –25 °С. Возможно отдельное использование холодильника с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С, и морозильника с камерой, поддерживающей температуру от –18 до –25 °С.
        11. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.
     2. **Подзона 3б:** амплификация нуклеиновых кислот.
        1. Программируемый термоциклер для пробирок объемом 0,2 мкл с функцией горячей крышки (например, Амплификатор T100 (РУ ФЗС 2012/12788 от 28 октября 2015 г.), Bio-Rad Laboratories («Био-Рад Лабораториес», США).
  4. **Рабочая зона 4: учет результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот на ДНК-чипах**
     1. Мерный цилиндр объемом 100 мл.
     2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 и 2 мл.
     3. Штативы для микропробирок объемом 0,2, 1,5 или 2,0 мл.
     4. Набор одноканальных автоматических пипеток переменного объема до 20, 100, 200 и 1000 мкл.
     5. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема в штативах с фильтром до 20, 100, 200 и до 1 000 мкл.
     6. Микроцентрифуга от 10 000 до 12 000 g для микроцентрифужных пробирок объемом 1,5 или 2,0 мл.
     7. Микроцентрифуга/вортекс для пробирок объемом 0,2, 1,5 и 2 мл.
     8. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой (не обязательно).
     9. Вытяжной шкаф, оснащенный УФ-лампами.
     10. Холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 до 8 °С.
     11. Емкость с дезинфицирующим раствором для сброса отработанных расходных материалов.
     12. Пинцет медицинский.
     13. Отдельный халат, шапочки, защитные очки, обувь и одноразовые перчатки.
     14. Емкость Хеллендаля.
     15. Промывалка лабораторная.
     16. Груша медицинская.
     17. Комплекс универсальный программно-аппаратный УАПК с программным обеспечением по ТУ 9443-004-02699501-2006» (РУ РОСЗДРАВНАДЗОРА № ФСР 2010/08002 от 13 января 2020г.) (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

1. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ
   1. **Материал для исследования**

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

* 1. **Взятие цельной периферической крови**

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette (Вакуэтт, США) объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания периферической крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2 – 3 раза.

**ВНИМАНИЕ!** Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

* 1. **Транспортирование и хранение исследуемого материала**

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение 6 месяцев.

* 1. **Степень фрагментации и деградации** ДНК матрицы важна при амплификации. Оптимальной является матрица, хранившаяся не более 1 месяца при +4 °C без заморозки. Не рекомендуется многократно замораживать и размораживать матрицу во избежание ее деградации и фрагментации.

1. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА
   1. **Выделение ДНК из периферической крови пациента (Рабочая зона 2)**
      1. Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов для выделения ДНК.
      2. После выделения измерить концентрацию ДНК с помощью флуориметра согласно инструкции по применению прибора.
   2. **Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР (Рабочая зона 3а)**
      1. Для работы потребуется следующие реагенты Комплекта №1: Вода, ПЦР-буфер, дНТФ, Полимераза, Смесь праймеров, Отрицательный контроль «К-», Положительный контроль «К+».
      2. Разморозить реагенты на льду:

- Вода;

- ПЦР-буфер;

- дНТФ;

- Смесь праймеров;

- Отрицательный контроль «К-»;

- Положительный контроль «К+»

- Анализируемые образцы ДНК

* + 1. Тщательно перемешать их на вортексе и удалить со стенок пробирок капли смеси краткосрочным центрифугированием.
    2. Поместить реагенты и анализируемые образцы ДНК в лед, доставая непосредственно перед их добавлением в реакционную смесь. Не рекомендуется многократное размораживание и замораживание реагентов. Полимеразу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
    3. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР, внеся в промаркированную пробирку объемом 1,5 мл, следующие реагенты:

|  |  |
| --- | --- |
| **Реагент** | **Объем, мкл** |
| Вода | 14,7 мкл х (N+3)\* |
| ПЦР-буфер | 6 х (N+3) |
| дНТФ | 0,5 х (N+3) |
| Полимераза | 0,8 х (N+3) |
| Смесь праймеров | 1 х (N+3) |

\* (N+3) –, где N- число анализируемых проб, не считая Положительного контроля «К+» и Отрицательного контроля «К-». Рекомендуется постановка положительного и отрицательного контролей на каждую постановку серии образцов.

* + 1. Полученную реакционную смесь тщательно перемешать на вортексе, сбросить капли краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).
    2. Внести по 23 мкл полученной смеси в пробирки (объемом 0,2 мл), промаркированные К-, К+, 1, 2 …., N.
    3. В пробирку, промаркированную К-, внести 2 мкл Отрицательного контроля «К‑», пробирку плотно закрыть.
    4. В пробирку с реакционной смесью, промаркированную К+, внести 2 мкл Положительного контроля «К+», пробирку плотно закрыть.
    5. В пробирки, промаркированные 1, 2,…., N, внести по 2 мкл ДНК соответствующего анализируемого образца. Закрывать пробирки стоит непосредственно после внесения образца ДНК.

**Внимание!** Концентрация ДНК в анализируемых образцах должна находиться в диапазоне от 5 до 100 нг/мкл.

* + 1. Сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).
  1. **Амплификация нуклеиновых кислот (Рабочая зона 3б)**
     1. Поместить пробирки (п.15.2.11) в амплификатор и провести амплификацию, используя приведенный ниже температурно-временной режим.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Температура, 0С** | **Время, сек.** | **Количество циклов** |
| 95 | 120 | 1 |
| 95 | 30 | 50 |
| 65 | 60 |
| 72 | 20 |
| 95 | 20 | 50 |
| 52 | 30 |
| 72 | 30 |
| 72 | 300 | 1 |
| 4 | ∞ | - |

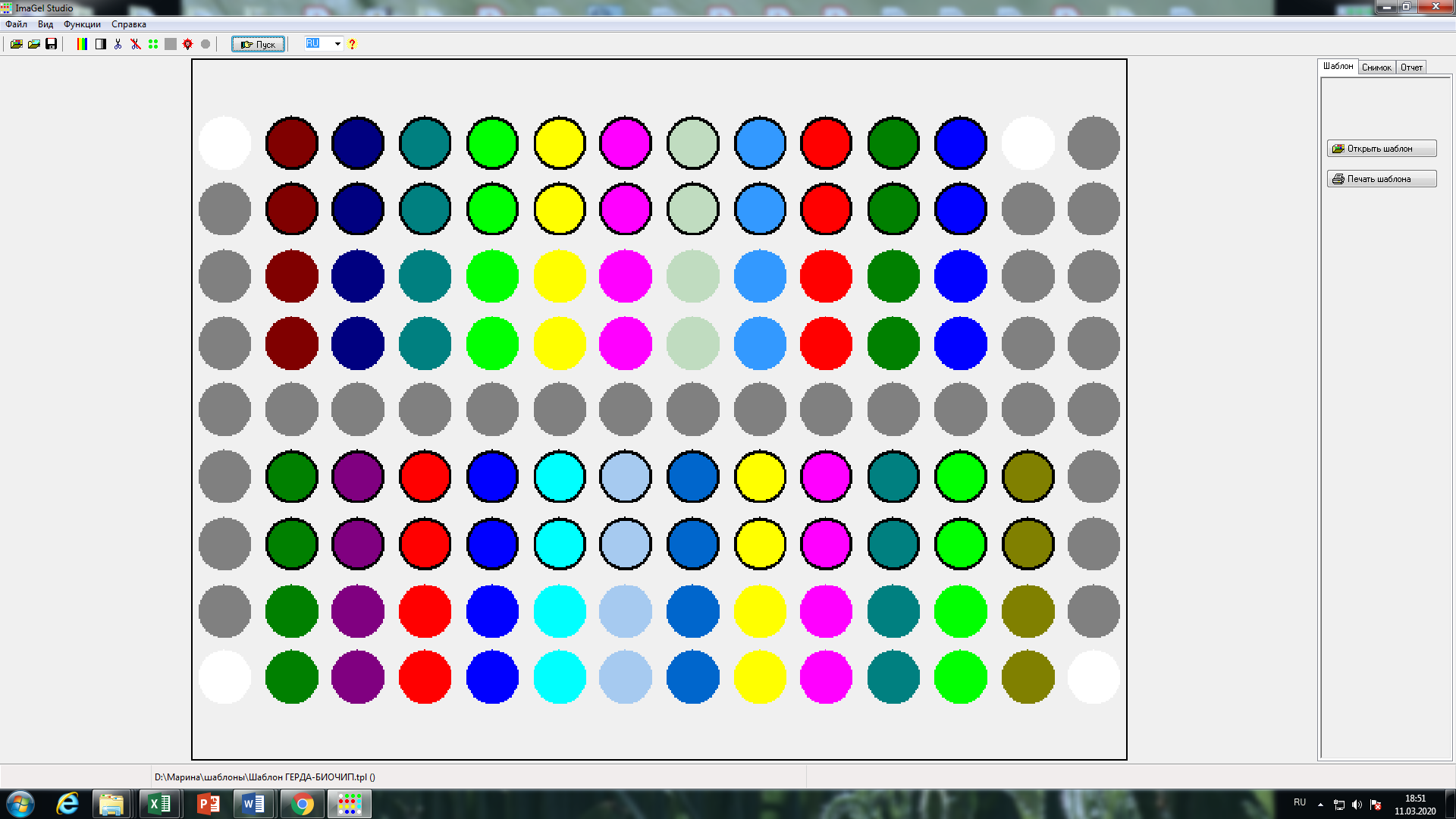
* + 1. В процессе ПЦР у амплификатора должна быть включена функция «горячая крышка».
  1. **Проведение гибридизации (Рабочая зона 4)**
     1. Для работы потребуется Комплект №2.
     2. По окончании программы амплификации сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).
     3. Подготовить пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл.
     4. Приготовить смесь для гибридизации: в пробирку объемом 1,5 мл внести Гибридизационный компонент №1 в объеме 10 х (N+3) мкл и Гибридизационный компонент №2 в объеме 10 х (N+3) мкл, где N- количество анализируемых проб.
     5. Тщательно перемешать и сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).
     6. Для каждого анализируемого образца подготовить пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Промаркировать пробирки «К-», «К+», 1, 2,…N, где N – количество анализируемых образцов.
     7. Внести по 20 мкл смеси для гибридизации (п.15.4.5) в промаркированные пробирки (п.15.4.6).
     8. Внести по 20 мкл ПЦР-продукта (п.15.4.2) в соответствующие пробирки, промаркированные в п.15.4.6.
     9. Тщательно перемешать и сбросить капли со стенок пробирок краткосрочным центрифугированием (10с при 4000об/мин).
     10. Подготовить биологические микрочипы (в количестве N+2) и промаркировать «К-», «К+», 1, 2,…N.
     11. Взять биологический микрочип, промаркированный «К-». Открыть камеру, наклонить чип под углом от 30 до 90 градусов и внести 35 мкл смеси из пробирки «К-» (п.15.4.9) внутрь гибридизационной камеры через нижнее отверстие, после чего плотно закрыть крышку. При заполнении следует избегать образования воздушных пузырей внутри камеры. Аналогичным образом внести смесь из остальных пробирок п.15.4.9 в гибридизационные камеры соответствующих биологических микрочипов.
     12. Заполненные биологические микрочипы инкубировать при 37оС в течение 12-18 часов в суховоздушном термостате.
     13. По окончании гибридизации проводится отмывка биологических микрочипов.

|  |
| --- |
| ***Предупреждение.*** *Отмывку биологических микрочипов рекомендуется проводить в вытяжном шкафу, оснащенном УФ-лампой с целью предотвращения контаминации ПЦР-продуктами. Для сброса наконечников дозаторов, использующихся при отмывке, рекомендуется использовать отдельную емкость с крышкой (спецрезервуар), содержащую раствор, вызывающий деградацию ДНК (0,1Н раствор соляной кислоты, 3% раствор хлорамина или аналоги). Все наконечники, используемые на данной стадии, должны быть сброшены в данный резервуар.* |

* + 1. Приготовить х1 Промывочный буфер для отмывки биологических микрочипов после гибридизации: 2 мл Промывочного буфера (х20) добавить к 38 мл дистиллированной воды, перемешать и налить в емкость Хеллендаля.
    2. Удалить реакционную смесь через любое из двух отверстий гибридизационной камеры.

**Внимание!** Наконечник содержит раствор с непрогибридизованными ПЦР-продуктами. Незамедлительно сбросить данный наконечник в спецрезервуар, содержащий раствор, вызывающий деградацию ДНК. Для удаления раствора из камеры биологического микрочипа можно использовать вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой.

* + 1. Аккуратно отсоединить гибридизационную камеру от подложки биологического микрочипа. Незамедлительно сбросить гибридизационную камеру в спецрезервуар, содержащий раствор, вызывающий деградацию ДНК.
    2. Биологический микрочип поместить в емкость Хеллендаля с раствором х1 Промывочного буфера (п.15.4.14) так, чтобы область биологического микрочипа, содержащая иммобилизованные ячейки, была погружена в буфер. Инкубировать при комнатной температуре (плюс 18-250C) в течение 10 мин.
    3. Промыть поверхность биологического микрочипа дистиллированной водой над емкостью для отходов. Для промывки биологического микрочипа можно использовать промывалку лабораторную.
    4. Высушить биологический микрочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки, особенно в зоне гелевых ячеек, для просушки можно использовать пустую промывалку (пластиковый диспенсер) или грушу медицинскую. Высушенные биологические микрочипы хранить в сухом темном месте при комнатной температуре.
    5. По окончании отмывки провести облучение ультрафиолетом внутри ПЦР-бокса. Время облучения должно составлять не менее 15 минут.
  1. **Интерпретация результатов анализа (Рабочая зона 4)**
     1. Учет результатов проводят с использованием Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов, по ТУ 9443-004-02699501-2006 (РУ РОСЗДРАВНАДЗОРА № ФСР 2010/08002 от 13 января 2020г.). Регистрацию результатов гибридизации осуществляют в соответствии с Руководством по эксплуатации УАПК.
     2. Произвести запуск программы «ImaGel Studio», версия 1.0 и выше.
     3. Программа содержит три вкладки в правой части окна: «Шаблон», «Снимок» и «Отчет» (Рис.1).
     4. При первом запуске программы выбрать шаблон биологического микрочипа путем нажатия кнопки «Открыть шаблон» и выбора файла с нужным названием, соответствующему сокращенному названию набора реагентов, с расширением «.tpl». При повторных запусках программа автоматически загружает последний загруженный шаблон и отображает его как показано на Рис.1.



**Рисунок 1.** Диалоговое окно режима «Шаблон». Загружен шаблон ГЕРДА-БИОЧИП.tpl. При наведении курсора на ячейку выводится информация с обозначением находящегося в ней зонда. Белым цветом обозначены маркерные элементы, содержащие флуоресцентный краситель, которые светятся перманентно.

* + 1. Анализ результатов гибридизации начинают с отрицательного контроля амплификации. Биологический микрочип «К-» (п.15.4.19) поместить в приемник Комплекса УАПК стороной, содержащей гелевые ячейки, кверху.
    2. Анализ флуоресцентной картины гибридизации осуществляется в автоматическом режиме. Для этого следует нажать пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части диалогового окна (Рис. 1). При этом происходит возбуждение флуоресценции ячеек биологического микрочипа, получение флуоресцентного изображения, автоматическое наложение шаблона на ячейки биологического микрочипа, обсчет сигналов и выдача текстового сообщения. Программа выдает заключение по каждому из 23 анализируемых маркеров, указывая при этом следующую информацию: название гена, транскрипт, нуклеотидную замену, аминокислотную замену и результат анализа (обнаружена или не обнаружена мутация). В случае обнаружения мутации в гетерозиготном состоянии в соответствующей строке будет выдано сообщение «обнаружена мутация».
    3. При анализе биологического микрочипа «К-» флуоресцентные сигналы должны присутствовать только в ячейках, соответствующих маркерным элементам.

При анализе биологического микрочипа «К-» программой «ImaGel Studio» должно быть выдано следующее сообщение (Рис. 2):

*BRCA1* NM\_007294.3:c.66\_67AG[1] (p.Glu23Valfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.181T>G (p.Cys61Gly) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.1961delA (p.Lys654Serfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.3695\_3699GTAAA[1] (p.Val1234Glnfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.3752\_3755GTCT[1] (p.Ser1253Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.4035delA (p.Glu1346Lysfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.5161C>T (p.Gln1721Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.5251C>T (p.Arg1751Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA1* NM\_007294.3:c.5266dupC (p.Gln1756Profs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.752\_753insAG (p.Asp252Glufs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.1010\_1011insTG (p.Asp339Leufs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.2808\_2811delACAA (p.Ala938Profs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5286T>G (p.Tyr1762Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5586delG (p.Lys1863Asnfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5718\_5719CT[2] (p.Leu1908Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5946delT (p.Ser1982Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.6070C>T (p.Gln2024Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.6298С>T (p.Gln2100Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.6998dupT (p.Pro2334Thrfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*BRCA2* NM\_000059.3:c.7879A>T (p.Ile2627Phe) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*PALB2* NM\_024675.3:c.172\_175delTTGT (p.Gln60Argfs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*PALB2* NM\_024675.3:c.509\_510delGA (p. Arg170Ilefs) низкий уровень флуоресцентного сигнала

*ATM* NM\_000051.3:c.5932G>T (p.Glu1978Ter) низкий уровень флуоресцентного сигнала.

***Примечание:*** *В случае вывода сообщения «Позиции ячеек не найдены. Сделайте это вручную»:*

*- наведите курсор на левую нижнюю маркерную ячейку;*

*- кликните правой кнопкой мыши и выберите «Установить ячейку 1,1»;*

*- кликните* *правой кнопкой мыши на правую нижнюю маркерную ячейку и выберете «Установить ячейку Nx,1»;*

*- нажмите последовательно на значки «Коррекция сетки», «Вычислить сигналы», расположенные в правой части окна программы;*

*- нажмите на вкладку «Отчет» в правом верхнем углу окна программы.*



**Рисунок 2**. Диалоговое окно режима «Отчет» при анализе Отрицательного контроля «К‑».

* + 1. В случае наличия флуоресцентных сигналов в ячейках биологического микрочипа, содержащих зонды, и вывода иного сообщения, например, по одной или нескольким строчкам сообщения вместо «низкий уровень флуоресцентного сигнала» будет выдана надпись: «генотип не определен», «мутация не обнаружена» или «обнаружена мутация», анализ результатов остальных образцов признается недействительным. Данное обстоятельство может свидетельствовать о контаминации реакционной смеси продуктами ПЦР в результате несоблюдения мер предосторожности при работе в лаборатории (см. п.12). Следует провести антиконтаминационные мероприятия и повторить всю процедуру анализа заново. Если после проведения повторного анализа в тех же содержащих зонды ячейках биологического микрочипа «К-», снова наблюдается флуоресцентный сигнал, то это может свидетельствовать о загрязнении продуктами ПЦР реактивов из комплекта №1. Следует сменить реактивы.
    2. При анализе биологического микрочипа, соответствующего Положительному контролю «К+», программой «ImaGel Studio» должно быть выдано следующее сообщение (Рис. 3):

*BRCA1* NM\_007294.3:c.66\_67AG[1] (p.Glu23Valfs) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.181T>G (p.Cys61Gly) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.1961delA (p.Lys654Serfs) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.3695\_3699GTAAA[1] (p.Val1234Glnfs) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.3752\_3755GTCT[1] (p.Ser1253Argfs) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.4035delA (p.Glu1346Lysfs) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.5161C>T (p.Gln1721Ter) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.5251C>T (p.Arg1751Ter) мутация не обнаружена

*BRCA1* NM\_007294.3:c.5266dupC (p.Gln1756Profs) **обнаружена мутация**

*BRCA2* NM\_000059.3:c.752\_753insAG (p.Asp252Glufs) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.1010\_1011insTG (p.Asp339Leufs) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.2808\_2811delACAA (p.Ala938Profs) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5286T>G (p.Tyr1762Ter) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5586delG (p.Lys1863Asnfs) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5718\_5719CT[2] (p.Leu1908Argfs) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.5946delT (p.Ser1982Argfs) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.6070C>T (p.Gln2024Ter) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.6298С>T (p.Gln2100Ter) мутация не обнаружена

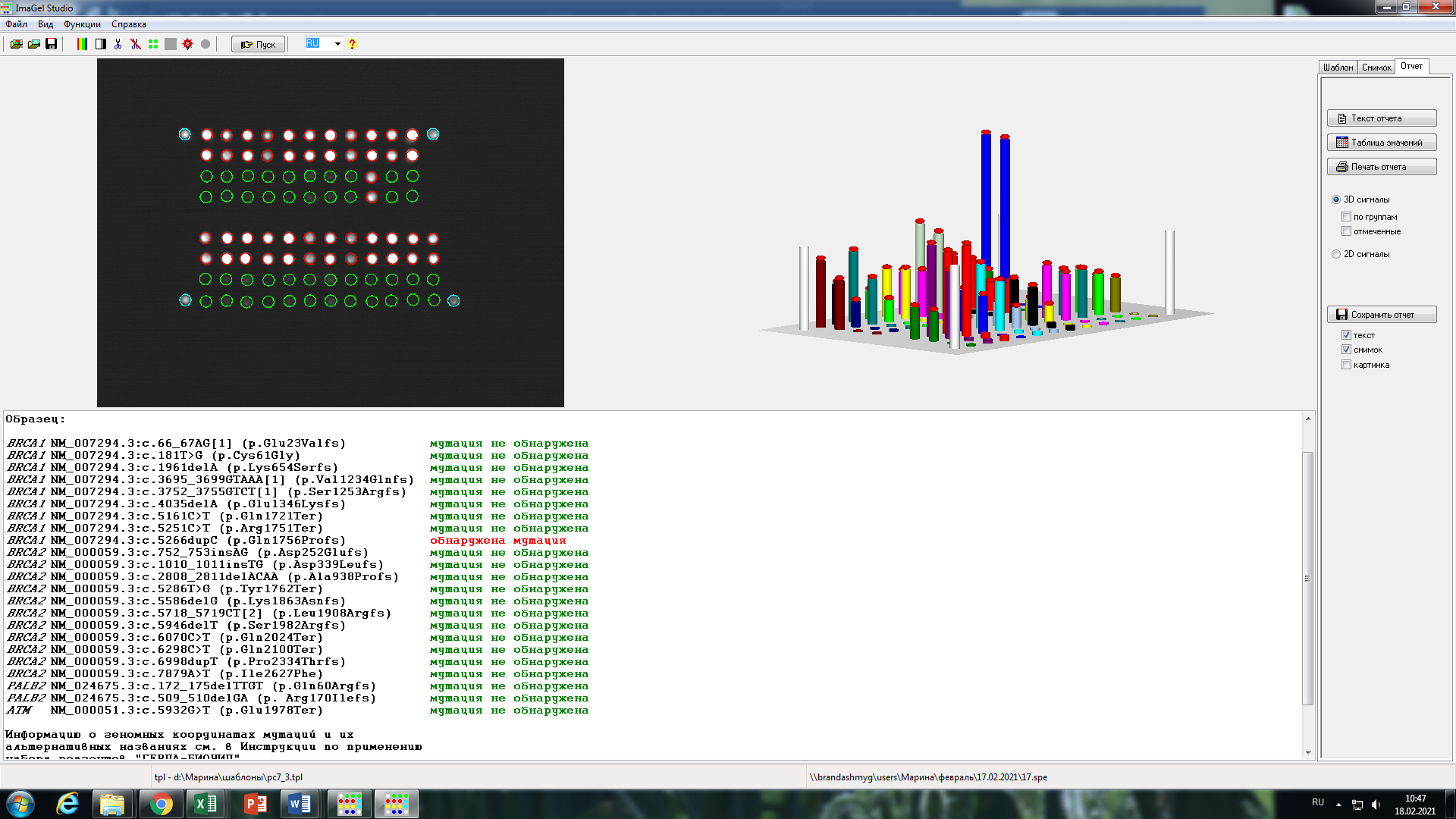
*BRCA2* NM\_000059.3:c.6998dupT (p.Pro2334Thrfs) мутация не обнаружена

*BRCA2* NM\_000059.3:c.7879A>T (p.Ile2627Phe) мутация не обнаружена

*PALB2* NM\_024675.3:c.172\_175delTTGT (p.Gln60Argfs) мутация не обнаружена

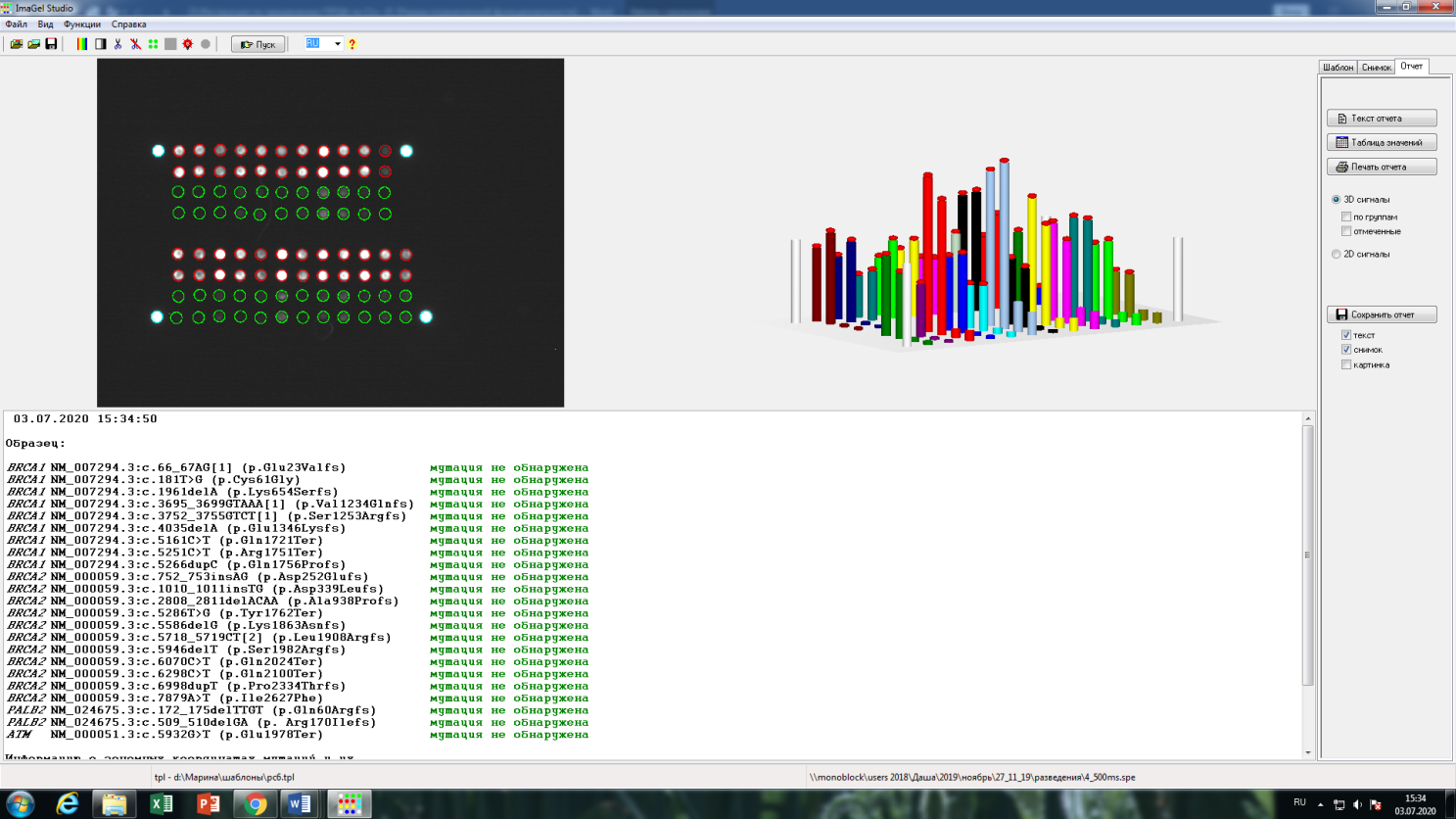
*PALB2* NM\_024675.3:c.509\_510delGA (p. Arg170Ilefs) мутация не обнаружена

*ATM* NM\_000051.3:c.5932G>T (p.Glu1978Ter) мутация не обнаружена.



**Рисунок 3**. Диалоговое окно режима «Отчет» при анализе Положительного контроля «К+».

* + 1. В случае получения иного сообщения, например, по одной или нескольким строчкам выведенного сообщения будет выдана надпись: «низкий уровень флуоресцентного сигнала», «генотип не определен», анализ результатов остальных образцов признается недействительным. Данное обстоятельство может свидетельствовать о деградации ДНК в Положительном контроле «К+» в результате ненадлежащего хранения, ошибке в процессе подготовки и проведения анализа. Следует повторить процедуру анализа заново. Если снова анализ не проходит должным образом, следует заменить реактивы.
    2. В случае получения правильных результатов при анализе Отрицательного контроля «К-» и Положительного контроля «К+» переходят к анализу результатов гибридизации остальных биологических микрочипов. Пример результатов анализа образца ДНК «дикого типа» (не содержащего мутаций), на биологическом микрочипе с использованием набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» приведен на Рис. 4.



**Рисунок 4**. В образце ДНК «дикого типа» мутации не обнаружены.

**ВНИМАНИЕ!** В связи с высокой медицинской и социальной значимостью носительства мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* или *PALB2* рекомендуется проводить повторное генотипирование образцов с выявленной мутацией, начиная с этапа выделения ДНК.

* + 1. В случае получения при анализе клинического образца отчета, в котором по одной или нескольким строчкам выведенного сообщения будет выдана надпись: «низкий уровень флуоресцентного сигнала» или «генотип не определен», требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала с последующим выделением ДНК и анализом (выполняется последовательно).
    2. Сохранение результатов осуществляется путем нажатия кнопки «Сохранить отчет» в диалоговом окне «Отчет» (Рис. 4). При этом пользователю предлагается выбор форматов сохранения результатов:
       1. текст (файл имеет расширение .txt, в котором прописывается отчет, а также таблица нормированных значений интенсивности сигналов ячеек биологического микрочипа);
       2. снимок (файл имеет расширение .spe, при этом сохраняется необработанная флуоресцентная картина гибридизации на биологическом микрочипе. Такой формат необходим для дальнейшей обработки гибридизационной картины, вычисления интенсивностей сигналов, получения отчета);
       3. картинка (файл имеет расширение .jpg, при этом сохраняется флуоресцентное изображение биологического микрочипа с наложенной сеткой в формате .jpeg. Этот формат удобен для быстрого создания презентаций с использованием полученных данных, однако, он не позволяет проводить обработку флуоресцентного изображения). Рекомендуемые форматы сохранения при рутинном анализе – «текстовый» и «снимок».

1. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ
   1. Хранение набора реагентов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при следующих условиях:
      1. Комплект № 1 – при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
      2. Комплект № 2:

* Подкомплект 2A, Подкомплект 2В – при температуре от плюс 18 до плюс 25°С в течение всего срока годности набора реагентов;
* Подкомплект 2Б - при температуре от плюс 2°С до плюс 6°С в течение всего срока годности набора реагентов.
  1. Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

1. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ
   1. Транспортировка изделия может осуществляться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Транспортировка возможна только с соблюдением указанного температурного режима:
      1. Транспортирование комплекта № 1 проводят при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С. Комплект № 1 должен быть помещен в термоконтейнер, в котором с помощью сухого льда, хладоэлементов или аккумуляторов холода поддерживается необходимый температурный режим.
      2. Транспортирование составляющих частей комплекта № 2:
         1. Подкомплект 2A, Подкомплект 2В – при температуре от плюс 18 до плюс 25°С;
         2. Подкомплект 2Б – при температуре от плюс 2°С до плюс 6°С. Подкомплект 2Б должен быть помещен в термоконтейнер, в котором с помощью хладоэлементов или аккумуляторов холода поддерживается необходимый температурный режим.
   2. Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
2. УКАЗАНИЯ ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ
   1. Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
   2. Набор реагентов предназначен для эксплуатации в условиях клинико- диагностических лабораторий, выполняющих молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на базе лечебно-профилактических медицинских учреждений.
   3. Набор реагентов предназначен для эксплуатации в помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией:

* рабочая температура окружающего воздуха от +18°С до +25ºС;
* относительная влажность окружающего воздуха от 45 до 85%;
* атмосферное давление от 730 до 790 мм рт.ст. (97,3 – 105,3 кПа).
  1. После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

Комплект № 1 – при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов;

Комплект № 2:

Гибридизационный компонент №1, Биологические микрочипы и Промывочный буфер (х20) – при температуре не выше плюс 25°С в течение всего срока годности набора реагентов;

Гибридизационный компонент №2 - при температуре от плюс 2°С до плюс 6°С в течение всего срока годности набора реагентов.

* 1. Следует избегать многократного замораживания/оттаивания компонентов Комплекта №1: Смесь праймеров, дНТФ и Положительный контроль «К+». Не замораживать/оттаивать реактивы более 5 раз.
  2. Наборы реагентов, эксплуатирующиеся с нарушением регламентированного режима и истекшим сроком годностиприменению не подлежат.

1. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» – 6 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

1. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ
   1. При использовании набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП» в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.
   2. Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б (эпидемиологически опасные отходы) и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.
   3. Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.
   4. В случае вскрытия упаковки набора реагентов в боксе она относится к отходам класса Б и подлежит утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.
2. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ
   1. Предприятие-производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.
3. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Медицинское изделие для диагностики in vitro |  | Дата изготовления |
|  | Температурный диапазон |  | Обратитесь к инструкции по применению |
|  | Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов |  | Номер по каталогу |
|  | Использовать до |  | Изготовитель |
|  | Код партии |  | Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению |
|  | Запрет на повторное применение |  | Не допускать воздействия солнечного света |
|  | Опасно для здоровья |  |  |

1. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ
   1. ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний».
   2. ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации».
   3. ГОСТ Р 52905-2007. Лаборатории медицинские. Требования безопасности
   4. ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro».
   5. ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования».
   6. 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».
   7. ГОСТ ISO 14971-2011 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям».
   8. ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3 Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.
   9. ГОСТ Р ЕН 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.
   10. ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 «Медицинские изделия. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».
   11. ГОСТ Р 56894-2016 «Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro».
   12. ГОСТ 14192-96. Маркировка грузов.

**Примечание:** Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения проекта инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

1. АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ
   1. Рекламации по вопросам качества набора реагентов «ГЕРДА-БИОЧИП», следует направлять по адресу: ООО «БИОЧИП- ИМБ», 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д.32 стр.1 этаж 1., пом.I, ком. 12, +7(499) 135-97-61, +7(926) 679-75-65, e-mail: deferos@yandex.ru
   2. При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов «ГЕРДА- БИОЧИП», нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

*Инструкция по применению доступна для скачивания на сайте www.biochip-imb.ru*

.