

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ГОРДИЗ»

Леонов С.Н.

2020 г.



КРАТКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для ПЦР-диагностики
микросателлитной нестабильности генома человека с детекцией
результата методом капиллярного электрофореза

«COrDIS MSI»

COrDIS



ООО «ГОРДИЗ»,
Российская Федерация, 117246,
Город Москва, Научный проезд, дом 20, строение 3



ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. СОСТАВ НАБОРА.....	3
3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	3
4. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	4
4.1. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК.....	4
4.2. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК.....	5
4.3. Проведение капиллярного электрофореза	5
5. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	5
5.1. Детекция результатов.....	5
5.2. Интерпретация результатов	5
6. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	8
7. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	8
8. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	9

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «COrDIS MSI» предназначен для выявления состояния микросателлитной нестабильности (MSI) и нарушений функционирования системы репарации геномной ДНК человека, выделенной из биоматериала в парафиновых блоках (FFPE), методом полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза. Набор предназначен для вспомогательной диагностики злокачественных новообразований толстого кишечника с нарушениями в генах репарации ДНК. Набор предназначен для использования совместно с медицинским изделием «Анализатор Генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

2. СОСТАВ НАБОРА

Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контрольные образцы

В состав набора входят следующие комплекты:

- 1) «Комплект для амплификации», включающий:
 - Реакционная смесь – 1 пробирка (500 мкл)
 - Раствор активатора – 1 пробирка (500 мкл)
 - Деионизованная вода – 1 пробирка (1700 мкл)
- 2) «Комплект контрольных образцов», включающий:
 - Положительный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
 - Отрицательный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
- 3) «Комплект для электрофореза», включающий:
 - Размерный стандарт S550 – 1 пробирка (120 мкл)

3. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, ФСР 2010/07114).
2. Центрифуга "Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400" (Biosan, Латвия, ФС № 2005/518).
3. Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/11028).
4. Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/12077).
5. Одноразовые полипропиленовые тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой. Например, Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/11892).
6. Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/09244).
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Анализатор генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007):
 - Полимер POP-4 3,5 мл на 384 прогона (2 упаковки);
 - Hi-Di Formamide 5 мл (2 упаковки);

- Плашки реакционные оптические 96-луночные MicroAmp для ПЦР со штрих-кодом (1 упаковка);
 - Картридж с капиллярами 8х36см или 24х36см (1 упаковка)
 - Контейнер с анодным буфером (1 упаковка)
 - Контейнер с катодным буфером (1 упаковка)
9. Холодильник, поддерживающий температуру +4°C, например XM-4424-000-N «ATLANT» (ЗАО «АТЛАНТ», Россия).
 10. Холодильник, поддерживающий температуру -20°C, например Liebherr LGT 3725 (Liebherr, Австрия).

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование биоматериала с использованием набора реагентов «COrDIS MSI» включает следующие этапы:

- Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК.
- Проведение фрагментного анализа полученных ПЦР продуктов методом капиллярного электрофореза.
- Анализ и интерпретация результатов.

4.1. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 15 мкл.

- 1) Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке на 1,5 мл для необходимого количества исследований из расчета 5 мкл Реакционной смеси и 5 мкл Раствора активатора на одну пробу. Смесь необходимо приготовить с запасом на 1 образец. После приготовления реакционной смеси тщательно перемешать ее на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
- 2) Внести в каждую пробирку по 10 мкл готовой реакционной смеси.
- 3) В пробирки с реакционной смесью, используя наконечники с фильтром, внести до 15 мкл исследуемого препарата ДНК (в зависимости от концентрации исследуемого препарата) и довести Деионизованной водой до общего объема 25 мкл. При постановке реакции с контрольными образцами (Положительный контроль и Отрицательный контроль) внести в пробирки с реакционной смесью 5 мкл Деионизованной воды и 10 мкл раствора исследуемого Контрольного образца.
- 4) Осторожно перемешать пипетированием.

4.2. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 3).

Таблица 1

Программа амплификации «COrDIS MSI»			
Шаг программы	Температура, °C	Время инкубации, сек.	Количество циклов
1	95	120	1
2	96	10	28
3	58	30	
4	72	30	
5	68	10 мин	1
6	15	∞	1

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации.
4. По окончании выполнения программы приступить к этапу проведения капиллярного электрофореза полученных ПЦР продуктов.

4.3. Проведение капиллярного электрофореза

Фрагментный анализ полученных ПЦР продуктов проводится в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper для Анализатора Генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение, № ФСЗ 2010/07007).

5. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Детекция результатов

Детекция флуоресцентного сигнала продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из каналов детекции. Анализ полученных данных проводится в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper (на бумажном носителе или компакт-диске) для Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

5.2. Интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам детекции:

- по каналу детекции Blue регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов NR-24, NR-27, BAT-26 в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4
- по каналу детекции Green регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов NR-21, BAT-25 в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4
- по каналу детекции Yellow регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов D12S391, CSF1PO в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4
- по каналу детекции Red регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов vWA, D21S11 в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4

При этом, результаты электрофоретического исследования анализируемых образцов ДНК могут считаться достоверными только при условии обнаружения всех 26 фрагментов размерного стандарта S550 по каналу детекции Orange. В случае отсутствия на электрофореграмме по каналу детекции Orange хотя бы одного из фрагментов размерного стандарта S550, результаты исследования не могут считаться достоверными. В этом случае требуется провести повторное исследования образца.

Результаты анализа микросателлитных локусов BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27 интерпретируются на основании морфологии кривой сигнала флуоресценции.

Принцип интерпретации результатов анализа микросателлитной нестабильности:

- **Выявлена картина микросателлитной нестабильности**, если распределение интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации для данного локуса имеет более одного максимума (рис 1).
- **Микросателлитная нестабильность не выявлена**, если распределение интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации для данного локуса имеет один максимум (рис 2.).

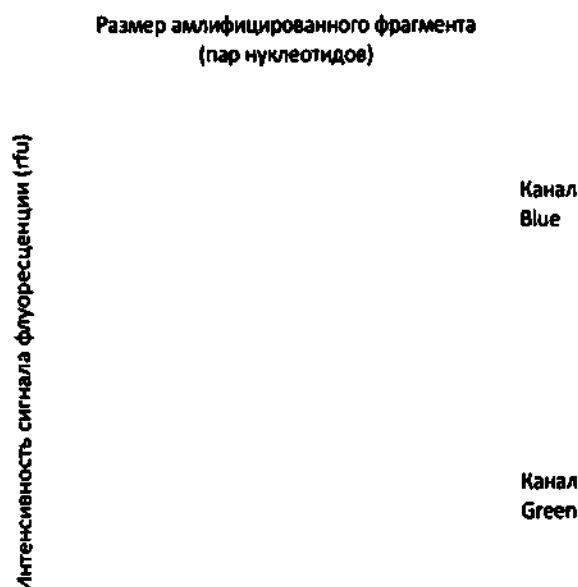


Рисунок 1. Примеры распределения интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации с более чем одним максимумом.

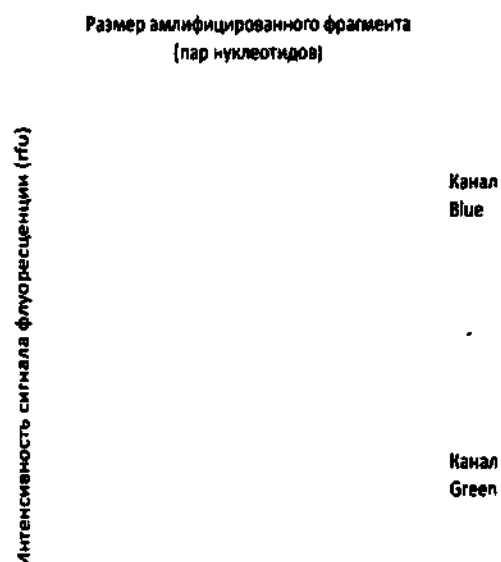


Рисунок 2. Примеры распределения интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации с одним максимумом

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены ожидаемые результаты для положительного и отрицательного контрольных образцов, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 2).

Результаты оценки контрольных реакций на наличие MSI-положительных вариантов исследуемых маркеров

Канал детекции	Анализируемая мишень	Положительный контроль (результат исследования)	Отрицательный контроль (результат исследования)
Blue	NR-27	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 77-100 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 87-90 п.н.
Blue	NR-24	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 121-144 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 131-134 п.н.
Blue	BAT-26	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 171-194 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 181-184 п.н.
Green	NR-21	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 110-133 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 120-123 п.н.
Green	BAT-25	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 147-171 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 158-161 п.н.

Принцип интерпретации результатов анализа происхождения биоматериала основан на сравнении результатов исследования нескольких образцов клинического материала, полученных от одного и того же пациента:

- Происхождение клинического биоматериала от данного пациента подтверждено, если аллельные варианты (молекулярный размер амплифицированных фрагментов) локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 выявленные в исследуемом образце биоматериала полностью совпадают с аллельными вариантами локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11, выявленными в ранее исследованных образцах биоматериала пациента.
- Происхождение клинического биоматериала от данного пациента не подтверждено, если аллельные варианты (молекулярный размер амплифицированных фрагментов) локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 выявленные в исследуемом образце биоматериала не совпадают (как минимум для одного из амплифицированных фрагментов) с аллельными вариантами локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11, выявленными в ранее исследованных образцах биоматериала пациента.

Результаты анализа амплифицированных фрагментов полиморфных локусов хромосомной ДНК для идентификации биоматериала человека D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 для контрольных образцов Должны соответствовать следующим значениям:

Результаты оценки индивидуализирующих маркеров контрольных реакций

Канал детекции	Анализируемая мишень	Положительный контроль (результат исследования)	Отрицательный контроль (результат исследования)
Yellow	D12S391	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 112 до 165 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 112 до 165 пар нуклеотидов
Yellow	CSF1PO	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 166 до 220 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 166 до 220 пар нуклеотидов
Red	vWA	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 80 до 158 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 80 до 158 пар нуклеотидов
Red	D21S11	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 159 до 237 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 159 до 237 пар нуклеотидов

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа хотя бы одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Положительный контроль не соответствуют ожидаемым, приведенным в Таблице 4 и Таблице 5. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести постановку реакции ПЦР еще раз.
2. Если результаты анализа хотя бы одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Таблице 4 и Таблице 5. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.
3. Если хотя бы для одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Положительный контроль отсутствует сигнал амплификации. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.
4. Если хотя бы для одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Отрицательный контроль отсутствует сигнал амплификации. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.

6. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 18 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать в течение 7 суток при температуре -25 до -20 °С.

7. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 121205 г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Большой Бульвар, д.42, стр. 1, эт.1 пом.337, тел./факс (499) 670-40-41, email: gordiz@gordiz.ru

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, 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 регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

8. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора «COrDIS MSI», следует обращаться в ООО «ГОРДИЗ» по адресу: Российская Федерация, 117246, Москва, Научный проезд, дом 20, строение 3, телефон/факс: 8 (499) 670-40-41, или e-mail: gordiz@gordiz.ru

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 9 ЛИСТОВ

«28» 04 2010 год



Ген. Директор
ООО «ГОРДИЗ»
Леонов С.Н.

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ГОРДИЗ»
Леонов С.Н.
2020 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для ПЦР-диагностики
микросателлитной нестабильности генома человека с детекцией
результата методом капиллярного электрофореза

«COrDIS MSI»

COrDIS



ООО «ГОРДИЗ»,
Российская Федерация, 117246,
Город Москва, Научный проезд, дом 20, строение 3



ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	4
3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА	5
4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	5
4.1. Состав набора	5
4.2. Принцип метода.....	5
5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	8
5.1. Аналитическая чувствительность	8
6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	8
7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	9
7.1. Требования безопасности при работе с набором	9
7.2. Требования охраны окружающей среды	10
8. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	11
9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА	11
9.1. Материал для исследования	11
9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов	11
9.3. Предварительная обработка клинического материала.....	12
9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой	12
10. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
10.1. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК	13
10.2. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК	13
10.3. Проведение капиллярного электрофореза	13
11. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	17
11.1. Детекция результатов	17
11.2. Интерпретация результатов	17
12. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20
13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ	20
14. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	20
15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ	20
16. ПЕРЕЧЕНЬ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ.....	21

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
FFPE	- образец биологического материала, заключенного в парафиновый блок
MSI	- микросателлитная нестабильность
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
мкл	- микролитр
мл	- миллилитр

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «COrDIS MSI» предназначен для выявления состояния микросателлитной нестабильности (MSI) и нарушений функционирования системы репарации геномной ДНК человека, выделенной из биоматериала в парафиновых блоках (FFPE), методом полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза. Набор предназначен для вспомогательной диагностики злокачественных новообразований толстого кишечника с нарушениями в генах репарации ДНК. Набор предназначен для использования совместно с медицинским изделием «Анализатор Генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

Научная обоснованность определяемых мутаций

Набор реагентов «COrDIS MSI» предназначен для выявления состояния микросателлитной нестабильности геномной ДНК человека, ассоциированной с определенными видами рака. Объектом исследования при анализе микросателлитной нестабильности набором «COrDIS MSI» являются пять микросателлитных маркеров (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 и NR-27). Исследуемые маркеры представляют собой области моноклеотидных повторов геномной ДНК, обычно встречающиеся в геноме человека в гомозиготном состоянии. Состояние микросателлитной нестабильности выявляется по смещению распределения длин амплифицированных моноклеотидных фрагментов исследуемых маркеров в опухолевых клетках в сравнении с продуктами амплификации ДНК из нормальных тканей (возникновению дополнительного максимума распределения длин фрагментов в отличие от одного максимума распределения в нормальных тканях). Наличие в исследуемом образце более одного максимума амплификации локусов BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, и NR-27 в редких случаях может быть связано с гетерозиготным состоянием данных маркеров в организме пациента (например, для некоторых африканских популяций описан полиморфизм длины моноклеотидных повторов маркеров BAT-26 (12,6%) и BAT-25 (18,4%)). Для исключения ложноположительного результата в таких случаях рекомендуется, по возможности, проводить дополнительное исследование образца нормальной ткани пациента (например, исследование образца крови).

Явление микросателлитной нестабильности может встречаться с разной частотой в опухолях различного типа и локализации (Cortes-Ciriano et al., A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers, 2016). При этом, анализ микросателлитной нестабильности имеет важное практическое значение для диагностики и выбора стратегии лечения злокачественных новообразований толстого кишечника, включая наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча) («Клинические рекомендации. Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2020 г. ID:KP396/2»; «Клинические рекомендации. Рак прямой кишки. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2020 г. ID:KP554/1»).

Встречаемость MSI в разных типах опухолей.

Тип опухоли	Аббревиатура	Тестировано образцов	Частота MSI
Карцинома эндометрия матки	UCEC	265	75 (28.3%)
Аденокарцинома желудка	STAD	292	64 (21.9%)
Аденоканцинома толстой кишки	COAD	271	45 (16.6%)
Аденоканцинома прямой кишки	READ	76	4 (9.2%)
Карцинома коры надпочечников	ACC	92	5 (5.4%)
Рак пищевода	ESCA	183	3 (3.3%)
Рак яичника	OV	436	14 (3.2%)
Рак печени	LIHC	375	11 (2.9%)
Плоскоклеточный рак шейки матки	CESC	305	7 (2.3%)
Рак молочной железы	BRCA	922	16 (1.7%)
Глиобластома	GBM	316	4 (1,3%)
Плоскоклеточный рак головы и шеи	HNSC	505	6 (1.2%)
Плоскоклеточный рак легких	LUSC	407	5 (1.2%)
Рак почки	KIRC	377	4 (1.1%)
Рак поджелудочной железы	PAC	171	2 (1.1%)
Рак мочевого пузыря	BLCA	368	2 (0.8%)
Карцинома почки	KIRP	286	2 (0.7%)
Глиома	LGG	514	3 (0.6%)
Аденокарцинома простаты	PRAD	497	3 (0.6%)
Аденокарцинома легкого	LUAD	482	1 (0.2%)
Меланома	SKCM	109	0 (0%)
Феохромоцитома и параганглиома	PHCA	176	0* (0%)
Рак щитовидной железы	THCA	493	0* (0%)
Всего		7,919	281

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹ и могут служить основанием для выбора стратегии лечения.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению: набор реагентов «COrDIS MSI» применяется в клинической лабораторной диагностике для выявления состояния микросателлитной нестабильности и вспомогательной диагностики злокачественных новообразований толстого кишечника с нарушениями в генах репарации ДНК.

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА

Сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контрольные образцы

В состав набора входят следующие комплекты:

- 1) «Комплект для амплификации», включающий:
 - Реакционная смесь – 1 пробирка (500 мкл)
 - Раствор активатора – 1 пробирка (500 мкл)
 - Деионизованная вода – 1 пробирка (1700 мкл)
- 2) «Комплект контрольных образцов», включающий:
 - Положительный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
 - Отрицательный контроль – 1 пробирка (20 мкл)
- 3) «Комплект для электрофореза», включающий:
 - Размерный стандарт S550 – 1 пробирка (120 мкл)

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

Реакционная смесь и Раствор активатора содержат все необходимые компоненты для проведения ПЦР:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных флуоресцентно меченых праймеров;
- ПЦР-буфер;
- Taq-полимеразу;

Контрольные образцы «Положительный контроль» и «Отрицательный контроль» представляют собой охарактеризованные препараты ДНК, содержащие соответственно MSI-позитивные и MSI-негативные варианты исследуемых локусов геномной ДНК человека в концентрации 1 нг/мкл раствора.

Размерный стандарт S550 представляет собой смесь охарактеризованных по молекулярной массе флуоресцентно меченых фрагментов ДНК, используемых в качестве стандарта для определения размера амплифицированных ПЦР-продуктов при проведении фрагментного анализа методом капиллярного электрофореза.

4.2. Принцип метода

Выявление состояния микросателлитной нестабильности генома человека в биологическом материале с помощью набора реагентов «CoDIS MSI» проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим фрагментным анализом амплифицированных фрагментов.

На первом этапе исследуемый биоматериал в парафиновых блоках (FFPE) подвергается процедуре экстракции ДНК. На следующем этапе исследования полученный препарат ДНК

используется для проведения полимеразной цепной реакции. Олигонуклеотидные праймеры, используемые в наборе «COrDIS MSI» содержат флуоресцентную метку, обеспечивающую возможность последующей оптической регистрации сигнала амплификации исследуемых молекулярных мишеней. Полученные флуоресцентно меченные ПЦР продукты анализируются методом капиллярного электрофореза и подвергаются сегрегации по длине фрагмента в акриламидном геле. Разделение продуктов ПЦР и детекция флуоресцентного сигнала производится в автоматическом режиме с использованием Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (РУ № ФСЗ 2010/07007). Анализ полученных данных проводится в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper (на бумажном носителе или компакт-диске) для Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007). Проводится идентификация исследуемых маркеров по распределению длин амплифицированных фрагментов и использованному флуоресцентному красителю, а также анализ гомогенности полученного сигнала амплификации.

Исследуемые маркеры представляют собой области моонуклеотидных повторов геномной ДНК, обычно встречающиеся в геноме человека в гомозиготном состоянии. Однако нарушение работы системы репарации ДНК в клетках опухоли приводит к изменению числа нуклеотидных повторов. В образцах биоматериала, содержащих клетки опухоли, присутствуют как стандартные варианты исследуемых локусов, так и варианты, содержащие отличающееся количество моонуклеотидных повторов. Количество повторов в каждом из маркеров а, следовательно, и размеры амплифицируемых фрагментов известны и могут быть определены методом капиллярного электрофореза (Таблица 1).

Анализ всех маркеров, амплифицируемых в единой мультиплексной реакции может проводиться одновременно благодаря регистрации длины амплифицированных фрагментов сразу в нескольких оптических каналах детекции.

Определение длины амплифицированного фрагмента происходит при сравнении относительной подвижности исследуемого фрагмента в полиакриламидном геле с подвижностью фрагментов размерного стандарта известной длины. Размерный стандарт S550, входящий в состав набора «COrDIS MSI», представляет собой набор охарактеризованных синтетических олигонуклеотидов заведомо известной длины.

Ниже приводится пример электрофореграммы с сигналами фрагментов стандарта S550 в канале детекции Orange. Обозначения 26 фрагментов ДНК приводятся в соответствии с их размером: 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 230, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 450, 500, 550.



Рисунок 1. Электрофореграмма размерного стандарта S550.

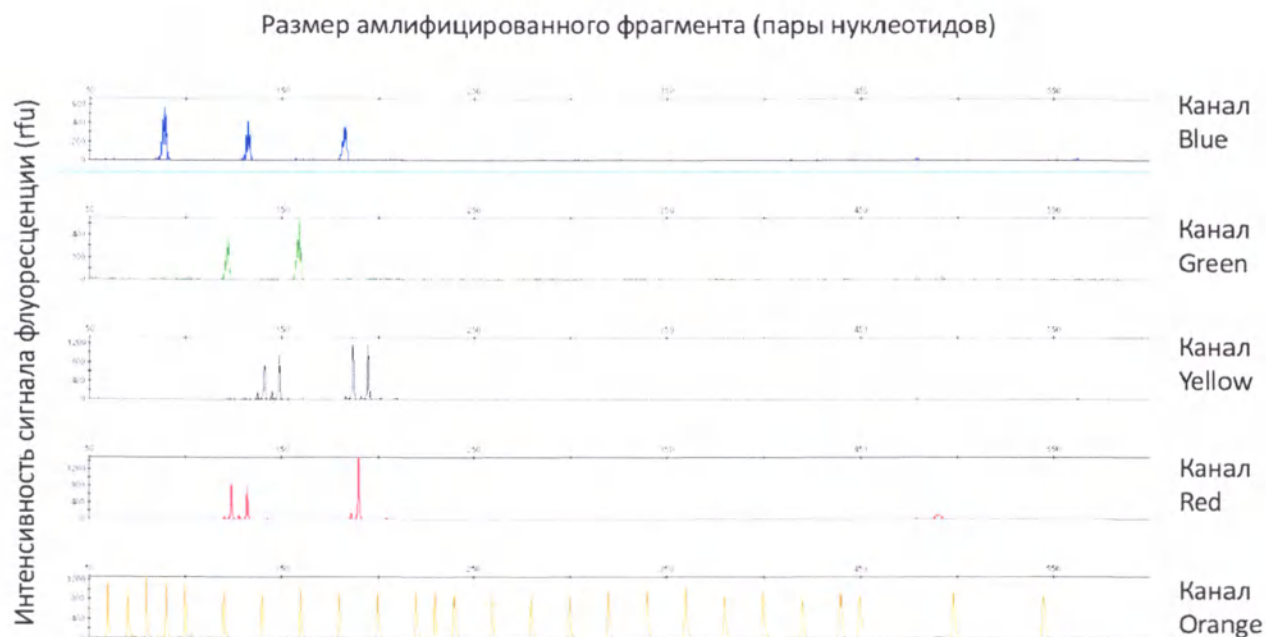


Рисунок 2. Электрофореграмма размерного стандарта S550 и ПЦР-продуктов, полученных при исследовании Отрицательного контрольного образца ДНК с использованием набора «COrDIS MSI».

Таблица 1.

Характеристики анализируемых маркеров микросателлитной нестабильности.

Маркер	Структура повтора	Диапазон длины амплифицируемого фрагмента (пар нуклеотидов)	Канал детекции
NR-27	(A) ₂₇	87-90	Blue
NR-24	(A) ₂₄	131-134	Blue
BAT-26	(A) ₂₆	181-184	Blue
NR-21	(A) ₂₁	120-123	Green
BAT-25	(A) ₂₅	158-161	Green
D12S391	[AGAT]5 GAT[AGAT]7 [AGAC]6 AGAT	112-165	Yellow
CSF1PO	[AGAT]12	166-220	Yellow
vWA	TCTA [TCTG]4 [TCTA]13	80-158	Red
D21S11	[TCTA]4[TCTG]6 [TCTA]3TA[TCTA]3 TCA [TCTA]2CCATA [TCTA]11	159-237	Red

Дополнительно, набор позволяет индивидуализировать исследуемые образцы и подтвердить происхождение биоматериала от конкретного пациента (с целью исключения возможности контаминации образцов посторонним биоматериалом человека) с использованием полиморфных локусов хромосомной ДНК человека D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим фрагментным анализом продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза.

При исследовании образцов биоматериала с использованием набора реагентов «COrDIS MSI» дополнительно проводится анализ 4 высокополиморфных локусов аутосомной ДНК, представляющих собой тетрануклеотидные повторы D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11. Результаты исследования высокополиморфных маркеров D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 позволяют проверить происхождение исследуемого образца биоматериала от конкретного пациента (в случае совпадения установленных аллельных вариантов в исследуемом материале и образце крови пациента) и исключить возможность контаминации образцов посторонним биологическим материалом.

Результаты исследования высокополиморфных маркеров D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 не имеют диагностического значения для выявления состояния микросателлитной нестабильности и служат только для генетической индивидуализации исследуемого биологического материала.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая чувствительность

С помощью набора «COrDIS MSI» может быть проведен анализ препарата ДНК, содержащего не менее 1 нг аутосомной ДНК человека в объеме 15 мкл. Концентрация целевой ДНК в исследуемом препарате должна быть не менее 0.07 нг/мкл.

5.2. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к целевым нуклеотидным последовательностям исследуемых локусов, что исключает перекрестные реакции с другими участками генома человека. Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена в ходе испытаний посредством добавления в реакцию препаратов геномной ДНК человека, содержащих как MSI-позитивные, так и MSI-негативные варианты исследуемых локусов.

Перекрестные результаты реакций при исследовании MSI-позитивных и MSI-негативных образцов зарегистрированы не были. Полученные в ходе испытаний результаты исследования специфичны и соответствуют ожидаемых в 100% проведенных исследований.

5.3. Предел обнаружения

Предел обнаружения геномной ДНК человека с использованием набора «COrDIS MSI» составляет не менее 1 нг аутосомной ДНК человека в объеме 15 мкл. Концентрация целевой ДНК в исследуемом препарате должна быть не менее 0.07 нг/мкл.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Валидация реагентов, входящих в состав набора, проведена в рамках клинических испытаний на 56 образцах биопсийного материала, фиксированных в парафиновых блоках (FFPE). В качестве метода сравнения для всех образцов проведено секвенирование исследуемых последовательностей ДНК методом Сэнгера.

Сравнительные результаты испытаний подтверждают, что результаты исследования, полученные при использовании набора реагентов «COrDIS MSI», эквивалентны результатам, полученным методом прямого секвенирования анализируемых последовательностей.

Показатели диагностических характеристик суммарно, для всех исследованных клинических образцов соответствуют значениям, приведенным в таблице 2.

Таблица 2.

Исследованные Локусы	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
BAT-25	91,6-100%	96,2-100%
BAT-26	90,5-100%	96,4-100%
NR-27	92,4-100%	96,0-100%
NR-24	92,4-100%	96,0-100%
NR-21	92,1-100%	96,1-100%

Повторяемость результатов исследования с использованием набора «COrDIS MSI» подтверждена производителем в ходе проведения клинических испытаний.

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

Правильность результатов исследования с использованием набора «COrDIS MSI» подтверждена прямым секвенированием ДНК методом Сэнгера.

Предсказательная ценность результата рассчитана в отношении злокачественных новообразований толстой кишки исходя из результатов проведенных клинических испытаний. Проведено исследование 56 образцов парафиновых блоков (FFPE), в том числе 35 образцов парафиновых блоков с подтвержденным диагнозом злокачественного новообразования отделов толстой кишки (Восходящая ободочная кишка (C18,2) -11, Печеночный изгиб (C18,4) – 6, Селезёночный изгиб (C18,6) -2 Ободочная кишка (C18) – 8, Прямая кишка (C20) - 6), Сигмовидная кишка (C18,7) - 2); 21 образцов – новообразования других органов.

Проведен расчет прогностической ценности для каждого из исследуемых маркеров положительных и отрицательных результатов исследования образцов парафиновых блоков (FFPE) с подтвержденным диагнозом злокачественного новообразования отделов толстой кишки:

Маркеры MSI	Число образцов с истинно положительными результатами анализа	Негативный результат	Позитивный результат	Предсказательная ценность положительного результата (по ГОСТ Р 53022.3-2008), с доверительной вероятностью 95%	Предсказательная ценность отрицательного результата (по ГОСТ Р 53022.3-2008), с доверительной вероятностью 95%
BAT-25	17	0	17	83,8-100%	84,7-100%
BAT-26	15	0	15	81,9-100%	86,1-100%
NR-27	18	0	18	84,7-100%	83,8-100%
NR-24	19	0	19	85,4-100%	82,9-100%
NR-21	19	0	19	85,4-100%	82,9-100%

Значение **диагностической эффективности теста** в отношении злокачественных новообразований толстой кишки составило 96,5-100%.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с

соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором 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.
- Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." по ТУ 9443-004-51495026-2004 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, ФСР 2010/07114).
2. Центрифуга "Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400" (Biosan, Латвия, ФС № 2005/518).
3. Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/11028).
4. Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/12077).
5. Одноразовые полипропиленовые тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой. Например, Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro ("Эксиджен, Инк.", США, ФСЗ 2012/11892).
6. Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/09244).
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Анализатор генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007):
 - Полимер POP-4 3,5 мл на 384 прогона (2 упаковки);
 - Hi-Di Formamide 5 мл (2 упаковки);
 - Плашки реакционные оптические 96-луночные MicroAmp для ПЦР со штрих-кодом (1 упаковка);
 - Картридж с капиллярами 8х36см или 24х36см (1 упаковка)
 - Контейнер с анодным буфером (1 упаковка)
 - Контейнер с катодным буфером (1 упаковка)
9. Холодильник, поддерживающий температуру +4°C, например ХМ-4424-000-N «ATLANT» (ЗАО «АТЛАНТ», Россия).
10. Холодильник, поддерживающий температуру -20°C, например Liebherr LGT 3725 (Liebherr, Австрия).

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования

Материалом для исследования набором реагентов «COrDIS MSI» являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб (биоматериал срезов с FFPE-блоков, содержащих фиксированные формалином и залитые парафином фрагменты ткани человека).

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Необходимо следовать следующим требованиям к предварительной подготовке биоматериала: при анализе биоматериала в парафиновых блоках (FFPE) необходимо предварительно провести их морфологический анализ. Образцы считаются пригодными для анализа если ткань опухоли занимает не менее 80% площади препарата. В случае невыполнения данного условия рекомендуется подготовить гистологический препарат биоматериала и по результатам гистологического исследования провести разметку препарата с обратной стороны предметного стекла, отметив границы зоны опухоли.

В дальнейшем для выделения ДНК необходимо использовать отмеченную область препарата, содержащую опухолевую ткань. Для проведения исследования рекомендуется использовать фрагмент парафинового блока, соответствующий следующим параметрам: толщина каждого

среза от 5 до 6 мкм; суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани и комплексов клеток человека от 2 см²; суммарная площадь срезов, используемая для выделения ДНК, включая фрагменты ткани, комплексы клеток и парафин, до 8 см². Рекомендуется избегать присутствия в исследуемом материале сгустков крови, так как высокая концентрация гематина в исследуемой пробе может приводить к ингибированию ПЦР и снижению общей чувствительности метода. Хранить и транспортировать материал в парафиновых блоках (FFPE) необходимо при температуре от +5 до +40 °С с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК. При соблюдении указанных условий срок хранения не более 1 года.

9.3. Предварительная обработка клинического материала

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического биоматериала в парафиновых блоках (FFPE).

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ реагенты, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот (ДНК) из клинического биоматериала в парафиновых блоках (FFPE) для ПЦР-диагностики. Предпочтение следует отдавать наборам реагентов для пробоподготовки, позволяющим максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца, например, Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016 (ФСЗ 2018/7772), “Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*” по ТУ 9398-001-11248074-2017 (ФСЗ 2019/9172).

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Влияние интерферирующих веществ на эффективность полимеразной цепной реакции исследовано производителем набора для экстракции ДНК из биоматериала в парафиновых блоках. Результаты исследования влияния парафина, ксилола и этилового спирта на эффективность полимеразной цепной реакции при использовании Набора реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016 (ФСЗ 2018/7772) приведены в Инструкции к Набору реагентов (ДНК-Ткань-Ф). Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ производителем набора (ДНК-Ткань-Ф) было выполнено исследование воздействия каждого вещества в двух концентрациях (максимальной и минимальной), диапазон которых, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф», на значения чистоты выделения ДНК (выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК, A260/280) и концентрации выделенной ДНК (выраженной в нг/мкл) с последующим проведением анализа методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Согласно результатам проведенного исследования «ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «ДНК-Ткань-Ф» выделять геномную ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (FFPE-блоков) соответствующего качества и количества, необходимого для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени».

10. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование биоматериала с использованием набора реагентов «COrDIS MSI» включает следующие этапы:

- Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК.
- Проведение фрагментного анализа полученных ПЦР продуктов методом капиллярного электрофореза.
- Анализ и интерпретация результатов.

10.1. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами. Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 15 мкл.

- 1) Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке на 1,5 мл для необходимого количества исследований из расчета 5 мкл Реакционной смеси и 5 мкл Раствора активатора на одну пробу. Смесь необходимо приготовить с запасом на 1 образец. После приготовления реакционной смеси тщательно перемешать ее на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
- 2) Внести в каждую пробирку по 10 мкл готовой реакционной смеси.
- 3) В пробирки с реакционной смесью, используя наконечники с фильтром, внести до 15 мкл исследуемого препарата ДНК (в зависимости от концентрации исследуемого препарата) и довести Деионизованной водой до общего объема 25 мкл. При постановке реакции с контрольными образцами (Положительный контроль и Отрицательный контроль) внести в пробирки с реакционной смесью 5 мкл Деионизованной воды и 10 мкл раствора исследуемого Контрольного образца.
- 4) Осторожно перемешать пипетированием.

10.2. Проведение амплификации исследуемых локусов ДНК

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации «COrDIS MSI»

Шаг программы	Температура, °C	Время инкубации, сек.	Количество циклов
1	95	120	1
2	96	10	28
3	58	30	
4	72	30	
5	68	10 мин	1
6	15	∞	1

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации.
4. По окончании выполнения программы приступить к этапу проведения капиллярного электрофореза полученных ПЦР продуктов.

10.3. Проведение капиллярного электрофореза

Фрагментный анализ полученных ПЦР продуктов проводится в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper для Анализатора Генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ

2010/07007).

1. Предварительная настройка прибора

Предварительная настройка Анализатора Генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007) включает создание пользовательских протоколов для проведения исследования (**Instrument Protocol**)².

1.1 Создание Instrument Protocol

Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.
В разделе Analyze, выбрать вкладку Instrument Protocols. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового Instrument Protocol). В появившемся окне указать параметры нового Instrument Protocol:

Application Type

HID

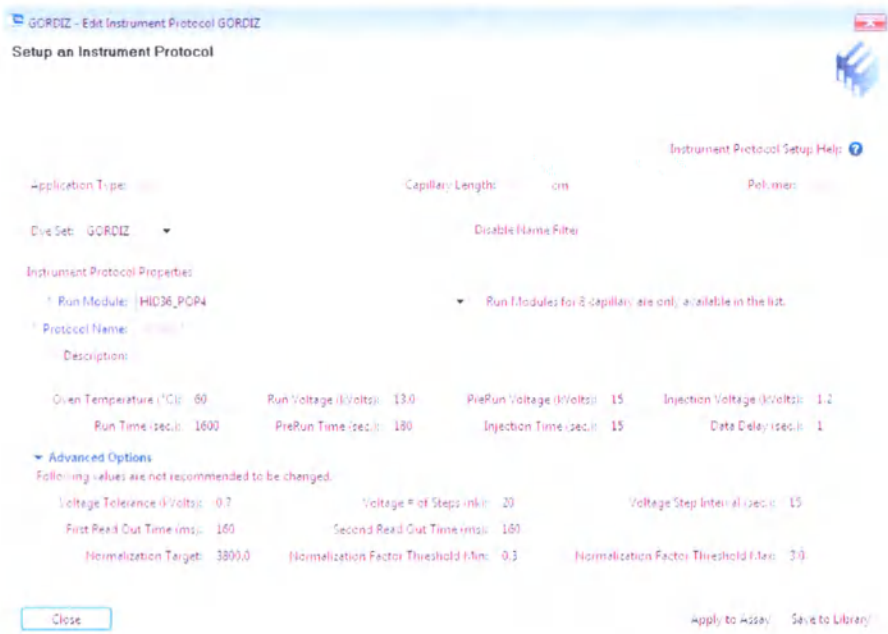
Run Module

например “HID36_POP4”

(выбрать протокол, соответствующий параметрам системы)

Protocol Name

COrDIS



Рекомендуемые параметры электрофореза:

Параметр	Значение
Oven Temperature	60
PreRun Voltage	15
PreRun Time	180
Injection Voltage	1.2
Injection Time	15
Data Delay Time	1

² При первичном использовании прибора требуется проведение спектральной калибровки Анализатора по каналам Blue, Green, Yellow, Red, Orange в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper для Анализатора Генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007)

Run Voltage	13.0
Run Time	1600

Нажать кнопку Save.

В зависимости от состояния используемого прибора параметр Injection Time может быть скорректирован пользователем для достижения оптимальной амплитуды флуоресцентного сигнала. Параметр Run Time также может быть скорректирован пользователем в случае, если рекомендуемое время фореза является избыточным (все фрагменты размерного стандарта детектируются существенно раньше отведенного времени) или недостаточным (не все фрагменты размерного стандарта детектируются за отведенное время). Оптимальное время фореза в наибольшей степени зависит от текущего состояния капилляров и полимера в генетическом анализаторе и может меняться со временем.

1.3 Создание Assay

Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.

В разделе Manage, выбрать вкладку Assays. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового Assay). В появившемся окне указать параметры нового Assay:

Assay Name	COrDIS
Application Type	HID
Instrument Protocol	COrDIS

Нажать кнопку Save.

1.4 Создание Size Standard

Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.

В разделе Analyze, выбрать вкладку Size Standards. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового Size Standard). В появившемся окне указать параметры нового Size Standard:

Size Standard

Description

Dye Color: Orange

Enter sizes in the field below, separated by a comma or space, or return then click the Add Size (H) button to add them to the current size standard definition.

Enter new Size Standard definition (e.g. 11.0, 34.2, 55):

Current Size Standard Definition:

60.0
70.0
80.0
90.0
100.0
120.0
140.0
160.0
180.0
200.0
220.0
250.0
280.0
300.0
320.0
340.0
360.0
380.0
400.0
420.0
440.0
450.0

Нажать кнопку Save.

1.5 Создание QC Protocol

Перейти в раздел Library в программе Data Collection Software.
В разделе Analyze, выбрать вкладку QC Protocols. В открывшемся меню нажать кнопку Create (откроется диалоговое окно создания нового QC Protocol). В появившемся окне указать параметры нового QC Protocol:

Protocol Name: 1

Description: 1

Size Standard: S450

Size Caller: SizeCaller v1.1.0

Analysis Settings: QC Settings

Analysis Range: Full

Sing Range: Full

Size Calling Method: Local Southern

Sing Start Size: 175

Sing Stop Size: 175

Peak Height Threshold: 175

Common Settings:

Size Smoothing: Light

Use Baseline (Baseline Window: 100)

Minimum Peak Half Width: 2

Peak Window Size: 15

Polynomial Degree: 3

Single Threshold Peak Start: 0.0

Single Threshold Peak End: 0.0

Size Quality:

Fail if Value is	Suspect Range	Pass if Value is
< 0.25	0.25 - 0.75	> 0.75

Broad Peak:

Activate Broad Peak flag if value < 1.5

Нажать кнопку Save.

Подготовка и загрузка продуктов амплификации

Для загрузки образцов в прибор необходимо приготовить смесь Hi-Di™ формамида и размерного стандарта S550 в следующем соотношении:

Компонент	Объем на один образец
Hi-Di™ формамид	10.0 мкл
Размерный стандарт S550	1.0 мкл

При расчете объемов компонентов смеси следует учесть, что формамидом должны быть заполнены все лунки, в которых будет происходить инъекция, в том числе и лунки, не содержащие образцы.

После перемешивания добавить по 10 мкл приготовленной смеси в каждую лунку планшета. Добавить в каждую лунку со смесью формамида и размерного стандарта S550 по 1 мкл полученного ПЦР продукта. При необходимости удалить пузыри со дна лунок планшета коротким центрифугированием. Накрыть планшет резиновым ковриком, загрузить в прибор и произвести запуск электрофореза.

2 Запуск прибора

Проведение капиллярного электрофореза на Анализаторе Генетическом Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007) проводится в соответствии с инструкцией пользователя, предоставляемой производителем. Для получения корректных результатов необходимо создать соответствующую спектральную калибровку, выполнив следующие шаги:

Шаг А – Создание планшета

Перед началом анализа необходимо создать Plate (планшет), описывающий расположение образцов на планшете и содержащий инструкции для прибора. Для этого необходимо перейти в меню Create New Plate программы Data Collection Software. Появится диалоговое окно, в котором необходимо указать параметры нового планшета:

Name Например COrDIS_[*dam*]

Plate Type Fragment

Нажать кнопку ОК. Появится новая таблица со схемой исследуемого планшета.

Шаг В – Заполнение таблицы

Для всех анализируемых лунок планшета необходимо указать:

Sample name имя объекта

Sample type тип образца

Assay COrDIS

Filename convention структура имени файла

Results group параметры сохранения файлов

Шаг С – Запуск прибора и информация о статусе прибора

После создания схемы расположения образцов на планшете, нажмите на кнопку Link Plate for Run. В открывшемся окне указать положение планшета в приборе и запустить электрофорез нажатием кнопки Start Run.

11. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

Детекция флуоресцентного сигнала продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из каналов детекции. Анализ полученных данных проводится в соответствии с Руководством для экспериментов по фрагментному анализу GeneMapper (на бумажном носителе или компакт-диске) для Анализатора генетического Applied Biosystems 3500, с принадлежностями (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007).

11.2. Интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам детекции:

- по каналу детекции Blue регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов NR-24, NR-27, BAT-26 в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4
- по каналу детекции Green регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов NR-21, BAT-25 в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4
- по каналу детекции Yellow регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов D12S391, CSF1PO в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4
- по каналу детекции Red регистрируется сигнал амплификации микросателлитных локусов vWA, D21S11 в диапазоне длин фрагментов, представленных в табл. 4

При этом, результаты электрофоретического исследования анализируемых образцов ДНК могут считаться достоверными только при условии обнаружения всех 26 фрагментов размерного стандарта S550 по каналу детекции Orange. В случае отсутствия на электрофореграмме по каналу детекции Orange хотя бы одного из фрагментов размерного стандарта S550, результаты исследования не могут считаться достоверными. В этом случае требуется провести повторное исследования образца.

Результаты анализа микросателлитных локусов BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27 интерпретируются на основании морфологии кривой сигнала флуоресценции.

Принцип интерпретации результатов анализа микросателлитной нестабильности:

- **Выявлена картина микросателлитной нестабильности**, если распределение интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации для данного локуса имеет более одного максимума (рис 3).
- **Микросателлитная нестабильность не выявлена**, если распределение интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации для данного локуса имеет один максимум (рис 4.).

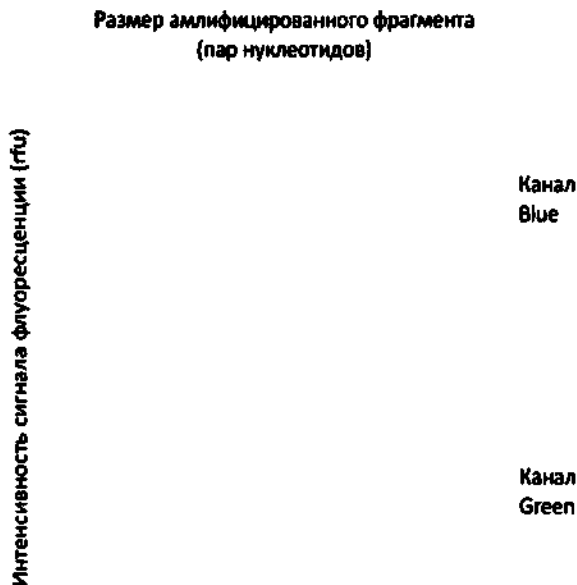


Рисунок 3. Примеры распределения интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации с более чем одним максимумом.

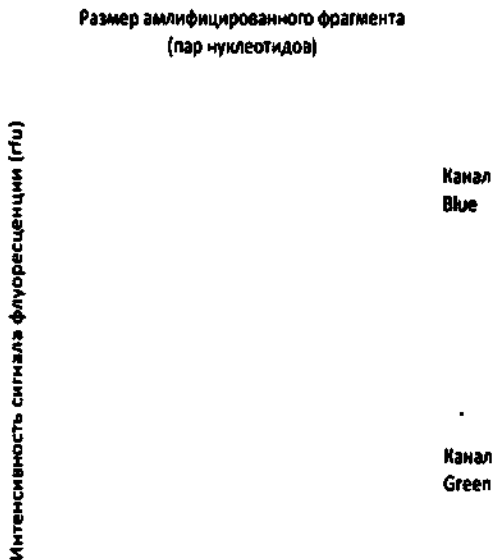


Рисунок 4. Примеры распределения интенсивности сигнала флуоресценции продуктов амплификации с одним максимумом

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены ожидаемые результаты для положительного и отрицательного контрольных образцов, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 4).

Таблица 4

Результаты оценки контрольных реакций на наличие MSI-положительных вариантов исследуемых маркеров

Канал детекции	Анализируемая мишень	Положительный контроль (результат исследования)	Отрицательный контроль (результат исследования)
Blue	NR-27	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длинны:	1 максимум интенсивности флюоресценции

		77- 100 п.н.	в диапазоне длины: 87-90 п.н.
Blue	NR-24	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 121-144 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 131-134 п.н.
Blue	BAT-26	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 171-194 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 181-184 п.н.
Green	NR-21	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 110-133 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 120-123 п.н.
Green	BAT-25	2 максимума интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 147-171 п.н.	1 максимум интенсивности флюоресценции в диапазоне длины: 158-161 п.н.

Принцип интерпретации результатов анализа происхождения биоматериала основан на сравнении результатов исследования нескольких образцов клинического материала, полученных от одного и того же пациента:

- **Происхождение клинического биоматериала от данного пациента подтверждено**, если аллельные варианты (молекулярный размер амплифицированных фрагментов) локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 выявленные в исследуемом образце биоматериала полностью совпадают с аллельными вариантами локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11, выявленными в ранее исследованных образцах биоматериала пациента.
- **Происхождение клинического биоматериала от данного пациента не подтверждено**, если аллельные варианты (молекулярный размер амплифицированных фрагментов) локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 выявленные в исследуемом образце биоматериала не совпадают (как минимум для одного из амплифицированных фрагментов) с аллельными вариантами локусов D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11, выявленными в ранее исследованных образцах биоматериала пациента.

Результаты анализа амплифицированных фрагментов полиморфных локусов хромосомной ДНК для идентификации биоматериала человека D12S391, CSF1PO, vWA, D21S11 для контрольных образцов Должны соответствовать следующим значениям:

Таблица 5.

Результаты оценки индивидуализирующих маркеров контрольных реакций

Канал детекции	Анализируемая мишень	Положительный контроль (результат исследования)	Отрицательный контроль (результат исследования)
Yellow	D12S391	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 112 до 165 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 112 до 165 пар нуклеотидов
Yellow	CSF1PO	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 166 до 220 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 166 до 220 пар нуклеотидов
Red	vWA	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 80 до 158 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 80 до 158 пар нуклеотидов
Red	D21S11	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 159 до 237 пар нуклеотидов	Не более 2 сигналов флюоресценции в диапазоне длины: от 159 до 237 пар нуклеотидов

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа хотя бы одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Положительный контроль не соответствуют ожидаемым, приведенным в Таблице 4 и Таблице 5. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести постановку реакции ПЦР еще раз.
2. Если результаты анализа хотя бы одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Таблице 4 и Таблице 5. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.
3. Если хотя бы для одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Положительный контроль отсутствует сигнал амплификации. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.
4. Если хотя бы для одного из исследуемых маркеров в пробе с образцом Отрицательный контроль отсутствует сигнал амплификации. Возможная причина: ошибки при постановке ПЦР реакции. Необходимо провести повторную постановку реакции ПЦР.

12. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 18 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать в течение 7 суток при температуре -25 до -20 °С.

13. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10. Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

14. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 121205 г. Москва, территория инновационного центра Сколково, ул. Большой Бульвар, д.42, стр. 1, эт.1 пом.337, тел./факс (499) 670-40-41, email: gordiz@gordiz.ru

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, 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.

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора «COrDIS MSI», следует обращаться в ООО «ГОРДИЗ» по адресу: Российская Федерация, 117246, Москва, Научный проезд, дом 20, строение 3, телефон/факс: 8 (499) 670-40-41, или e-mail: gordiz@gordiz.ru

16. ПЕРЕЧЕНЬ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ

	Названия документов
Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012	Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации
ГОСТ 31508-2012	Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации
ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003)	Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
ГОСТ 3885-73	Реактивы и особо чистые вещества. Правила приемки, отбор проб, фасовка и маркировка.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики invitro.
ГОСТ 17.2.3.02-2014	Правила установления допустимых выбросов загрязняющих веществ промышленными предприятиями
ГОСТ 17.2.3.01-1986	Охрана природы. Атмосфера. Правила контроля качества воздуха населенных пунктов
ГН 2.1.6.1338-03	ПДК загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест
ГН 2.2.5.1313-03	ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны
СП 2.2.2.1327-03	Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту
СП 1.3.2322-08	Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней
СанПиН 2.1.7.2790-10	Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!
Обратитесь к
инструкции по
применению



Код партии



Содержимого
достаточно для
проведения п-
количества тестов



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
инструкции по
применению



Температурный
диапазон



Не допускать
воздействия
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата изготовления



Изготовитель

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 28 ЛИСТОВ

«26» 04 2010 год



Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 22 ЛИСТОВ

«28» 04 2010 год



Ген. Директор
ООО «ГОРДИЗ»
Леонов С.Н.