

BIO-RAD

Date _____

From Bio-Rad Laboratories, Inc.

[Handwritten initials]

We Bio-Rad Laboratories, Inc. registered at the following address 5731 W. Las Positas Blvd PLEASANTON, CA 94588 UNITED STATES, hereby confirm that the attached operating instruction in Russian is correct and that its content is valid.

Sincerely,

[Handwritten signature of Mario Wijker]

Signature

Mario Wijker / 21 June 2021

Position

Senior Vice President of Quality Assurance and Regulatory Affairs

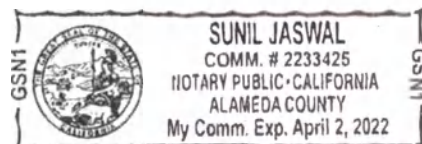
Authorized Signature: *[Handwritten signature of George De La Rosa]*
13-JU-2021
George De La Rosa

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

STATE OF CALIFORNIA COUNTY OF ALAMEDA
Subscribed and sworn to (or affirmed) before me on this
13 day of July, 2021 by George De La Rosa

proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) who appeared before me.

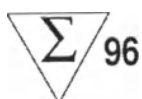
[Handwritten signature of Notary]
(Signature of Notary)



BIO-RAD

Инструкция по применению

Набор реагентов для количественного анализа транскриптов ДНК (QXDx BCR-ABL %IS Kit) в общем объеме РНК в цельной крови пациентов методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR), в составе:



США, Bio-Rad Laboratories, Inc., 5731 W. Las Positas Blvd,
Pleasanton, CA 94588



ФРАНЦИЯ, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430
Marnes-la-Coquette

Наименование медицинского изделия

Набор реагентов для количественного анализа транскриптов ДНК (QXDx BCR-ABL %IS Kit) в общем объеме РНК в цельной крови пациентов методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR), в составе:
Далее по тексту: Набор QXDx BCR-ABL %IS, Набор реагентов, изделие, набор QXDx BCR-ABL

Переводы на другие языки

Документация на продукцию на дополнительных языках предоставляется на электронных носителях.

Расшифровка символов

 Соответствует требованиям ЕС	 Производитель	 Уполномоченный представитель в Европейском союзе
 Номер партии	 Применение	 Для диагностики in vitro
 Предельная температура	 Каталожный номер	 Обратитесь к инструкциям по эксплуатации
 Количество тестов	 Для использования вместе с	 Серийный номер
Только по предписанию Использовать только по назначению	 Содержит латекс	

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА КОМПАНИИ Bio-Rad

За помощью и технической консультацией обращайтесь в Отдел технической поддержки ООО «БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ».

Телефон: (495) 721 14 04, diag_support_rcis@bio-rad.com, www.bio-rad.com Техническая поддержка онлайн и контактная информация по всему миру доступны на сайте www.consult.bio-rad.com, diag_support_rcis@bio-rad.com, www.bio-rad.com

ПРАВОВЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Никакая часть данной публикации не может быть воспроизведена или передана в любой форме и любыми средствами, электронными или механическими, включая фотокопирование, запись, любое хранение информации или информационно-поисковые системы, без письменного разрешения Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториез, Инк.". Компания Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториез, Инк." оставляет за собой право в любое время вносить изменения в свои продукты и услуги. Данное руководство по эксплуатации может быть изменено без предварительного уведомления. Несмотря на точность предоставляемой информации, компания Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториез, Инк." не несет ответственности за ошибки или ущерб, вызванный применением или использованием этой информации.

Windows и Excel являются торговыми марками компании Microsoft Corporation.

FAM и VIC являются торговыми марками компании Applera Corporation.

TaqMan является торговой маркой компании Roche Molecular Systems, Inc.

Все торговые марки, упомянутые в настоящем документе, являются собственностью соответствующих владельцев.

На термоциклеры и термоциклеры реального времени Bio-Rad распространяется действие одного или нескольких следующих патентов США или их зарубежных аналогов, принадлежащих компании Eppendorf AG: США Патенты США

№ 6 767 512 и № 7 074 367.

Использование данного продукта защищено одним или несколькими из следующих патентов США и соответствующими патентными притязаниями за пределами США, держателем лицензии или владельцем которых является компания Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториз, Инк.". Приобретение данного продукта включает в себя ограниченное, не подлежащее передаче право согласно соответствующему законодательству об интеллектуальной собственности на использование продукта только в исследовательских целях. Права использования продукта в коммерческих целях любого рода, включая, помимо прочего, изготовление, контроль качества или коммерческие услуги, такие как услуги по договору или плата за оказание услуг, не предусмотрены. Информация о лицензиях на использование в подобных целях может быть получена у компании Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториз, Инк.". Покупатель / конечный пользователь обязан приобрести любые требуемые дополнительные права на интеллектуальную собственность.

СОБЛЮДЕНИЕ ПРАВИЛ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ И УСТАНОВЛЕННЫХ НОРМ

Система QX200™ прошла испытания и признана соответствующей всем действующим требованиям следующих стандартов по безопасности и электромагнитной совместимости:

1. IEC 61010-1:2010 (3-е изд.), EN 61010-1:2010 (3-е изд.). Электрооборудование для проведения измерений, управления и лабораторного использования. Часть 1: Общие требования.
2. EN 61326-1:2006 (Класс А). Электрооборудование для проведения измерений, управления и лабораторного использования. Требования к электромагнитной совместимости, Часть 1: Общие требования.
3. UL 61010-1:2004, Лабораторное оборудование, контрольное и измерительное оборудование и органы управления технологическим процессом.
4. CAN/CSA 22.2 No 61010-1-04, Электрооборудование для проведения измерений, управления и лабораторного использования. Требования безопасности. Часть 1. Общие требования.
5. Настоящее оборудование создает, использует и может излучать радиочастотную энергию, а в случае его установки и эксплуатации без соблюдения требований, указанных в руководстве по эксплуатации, может создавать недопустимые помехи для средств радиосвязи. Эксплуатация данного оборудования в жилой зоне может вызывать помехи, и в этом случае пользователь должен устранить их за свой счет.



Маркировка CE означает, что изготовитель гарантирует соответствие продукта основным требованиям Директивы 98/79/ЕС Европейского Парламента и Совета по диагностическому медицинскому оборудованию in vitro.



Знак CSA указывает на то, что изделие протестировано Канадской или Американской ассоциацией по стандартизации и отвечает требованиям действующих стандартов.

Это оборудование протестировано и соответствует ограничениям Класса А цифровых устройств согласно Части 15 Правил Федеральной комиссии связи США (FCC). Данные ограничения разработаны для обеспечения разумной защиты от вредных помех при эксплуатации оборудования в коммерческой среде.



Символ Предписания по Утилизации электрического и электронного оборудования указывает на то, что если конечный пользователь хочет выбросить данный продукт, то его следует направить на отдельный объект сбора отходов для утилизации и переработки.

К эксплуатации данного прибора допускается только подготовленный персонал.

Устанавливайте оборудование таким образом, чтобы не возникали трудности с подключением/отключением кабеля питания прибора. Сетевой штепсель является устройством отключения.

Прибор не содержит обслуживаемых пользователем компонентов.

Набор реагентов для количественного анализа транскриптов ДНК (QXDx BCR-ABL %IS Kit) в общем объеме РНК в цельной крови пациентов методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) ДЛЯ СИСТЕМЫ QX200 — ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для диагностики in vitro. Только для профессионального использования в сфере здравоохранения.

К работе с данным набором допускается только квалифицированный персонал, обученный лабораторным процедурам и ознакомленный с правилами техники безопасности при работе с данными реагентами. Надевайте соответствующую защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз/лица и строго следуйте правилам Надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practices).

ОБУЧЕНИЕ ПРАВИЛАМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИЗ (СРЕДСТВ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ)

При работе с маслами и планшетами рекомендуется надлежащее применение перчаток. Согласно требованиям OSHA (Управление США по охране труда и промышленной гигиене) к средствам индивидуальной защиты, изложенным в Своде федеральных правил (CFR) в 29 CFR 1910.132 (Общие требования); 29 CFR 1910.138 (Защита рук); 29 CFR 1926.95 (Критерии для стандартных средств индивидуальной защиты). Следует выбросить или заменить любые перчатки с нарушенной защитной способностью. При принятии решения о повторном использовании перчаток, подвергаемых химическому воздействию, учитывать токсичность химических веществ и такие факторы, как продолжительность воздействия, хранения и температуры. Характерные особенности выбора перчаток для работы с приборами, пробами, маслами и очищающими растворителями:

- Бутилкаучуковые перчатки изготовлены из синтетической резины и защищают от пероксида, фтористоводородной кислоты, сильных щелочей, альдегидов и кетонов.
- Перчатки из натурального каучука (латекса) удобны при работе и отличаются повышенной прочностью на разрыв, эластичностью и термостойкостью.
- Неопреновые перчатки изготовлены из синтетической резины и отличаются хорошей эластичностью, удобством для пальцев, высокой плотностью и прочностью на разрыв; они защищают от воздействия спиртов, органических кислот и щелочей.
- Нитриловые перчатки, изготовленные из сополимера, обеспечивают защиту от воздействия хлорсодержащих растворителей, например трихлорэтилена и тетрахлорэтилена, и защиту при работе с маслами, жирами и едкими веществами.

НАЗНАЧЕНИЕ

Изделие предназначено для амплификации нуклеиновых кислот *in vitro* в ходе количественного анализа транскриптов ДНК (BCR-ABL1 и ABL1) в общем объеме РНК в цельной крови пациентов с диагнозом t(9;22)-положительный хронический миелоидный лейкоз (CML), с экспрессией слитых транскриптов BCR-ABL1 типа e13a2 и/или e14a2. В ходе тестирования проводится измерение транскриптов BCR-ABL1 типов e13a2 и/или e14a2, нормализованных к эндогенному контролю ABL1. Результаты регистрируются как снижение от базовой линии 100% по международной шкале (%IS) и по логарифмической шкале (MR).

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Изделие предназначено для амплификации нуклеиновых кислот *in vitro* в ходе количественного анализа транскриптов ДНК (BCR-ABL1 и ABL1) в общем объеме РНК в цельной крови пациентов с диагнозом t(9;22)-положительный хронический миелоидный лейкоз (CML), с экспрессией слитых транскриптов BCR-ABL1 типа e13a2 и/или e14a2.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Не применимо.

ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

Набор QXDx BCR-ABL %IS предназначено для профессионального применения и может использоваться только квалифицированным персоналом в области клинической лабораторной диагностики (медицинским лабораторным техником или врачом клинической лабораторной диагностики), прошедшим специальное обучение и получившим инструктаж по методике ddPCR и диагностическим процедурам *in vitro*.

КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Набор реагентов для количественного анализа транскриптов ДНК (QXDx BCR-ABL %IS Kit) в общем объеме РНК в цельной крови пациентов методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR), в составе:

1. Смесь праймеров и зондов набора QXDxBCR-ABL primers&probes, 250 мкл в 1 флаконе – 1 флакон;
2. Вода, не содержащая нуклеаз QXDxNuclease Free Water, 1500 мкл в 1 флаконе – 2 флакона;
3. Смесь QXDx5x iScript Select Reaction Mix, 500 мкл в 1 флаконе – 1 флакон;
4. Супермикс QXDx 2XSupermix, 1 мл в 1 флаконе – 3 флакона;
5. Набор для обратной транскрипции QXDxiScript Advanced Reverse Transcriptase, 125 мкл в 1 флаконе – 1 флакон;
6. Смесь праймеров для обратной транскрипции QXDx RTPrimers, 500 мкл в 1 флаконе – 1 флакон;
7. Калибратор 0,1% QXDxBCR-ABL 0,1%IS, 50 мкл в 1 флаконе – 2 флакона;
8. Калибратор 10% QXDx BCR-ABL 10%IS, 50 мкл в 1 флаконе – 2 флакона;
9. Высокоуровневый контроль QXDx BCR-ABL H-CTRL, 50 мкл в 1 флаконе – 2 флакона;
10. Низкоуровневый контроль QXDx BCR-ABL L-CTL, 50 мкл в 1 флаконе – 2 флакона;
11. Отрицательный контроль QXDx BCR-ABL Neg-CTRL, 50 мкл, в 1 флаконе – 2 флакона;
12. Инструкции по применению - 1 шт.

ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Набор QXDx BCR-ABL %IS обратную транскрипцию с использованием случайных праймеров в сочетании с

технологией цифровой капельной ПЦР (ddPCR). Транслокации BCR-ABL типов e13a2 (b2a2) и e14a2(b3a2) одновременно амплифицируются, детектируются, а также подвергаются количественному анализу. Набор QXDx BCR-ABL %IS позволяет проводить количественный анализ копий двух слитых транскриптов BCR-ABL типов e13a2 (b2a2) и/или e14a2 (b3a2) в канале FAM, а также транскрипта ABL в качестве эндогенного контроля в канале HEX, с использованием общей РНК, извлеченной из крови человека¹⁻⁴. Набор QXDx BCR-ABL %IS позволяет проводить количественный анализ транскриптов BCR-ABL как отношение BCR-ABL/ABL, после чего полученное значение пересчитывается по международной шкале.

Набор QXDx BCR-ABL %IS предназначен для использования с системой цифровой капельной ПЦР Bio-Rad QXDx (ddPCR). Система QXDx AutoDG ddPCR включает в себя Генератор капель автоматический "AutoDG" для проведения цифровой капельной ПЦР (ddPCR), с принадлежностями, в составе, (AutoDG) и Ридер «QX200 Droplet Reader» для детекции флуоресценции капель в методе цифровой капельной ПЦР, с принадлежностями, в составе, считыватель капель (DR). В набор QXDx BCR-ABL %IS входят реагенты в количестве, достаточном для 96 образцов вместе с калибраторами и контролями. В каждый набор входят два калибратора IS с привязкой к партии. Калибраторы IS разработаны на базе значения BCR-ABL/ABL ок. 0,1%, которое находится в точке большого молекулярного ответа (MMR или MR3), и на базе значения BCR-ABL/ABL (MR1) ок. 10%. Калибраторы IS прослеживаются к стандартам Первой международной эталонной панели ВОЗ по вопросам генетики (09/138)⁵. Калибраторы используются для подтверждения того, что анализ прослеживается к стандартам Первой международной эталонной панели ВОЗ.

Кроме эндогенного контроля (ABL), в набор QXDx BCR-ABL %IS также входят 3 внешних контроля: сильноположительный контроль, слабоположительный контроль и BCR-ABL-отрицательный/ABL-положительный контроль (отрицательный контроль).

Формат регистрации данных: %IS и MR

Для мониторинга CML, как правило, применяется два метода.

1. Значение по международной шкале (%IS), вычисляемое как отношение количества копий BCR-ABL к количеству эталонных копий ABL, умноженное на 100, а затем умноженное на поправочный коэффициент, принятый в лаборатории (CF) (Baccarani и др. 2006)¹.
2. Значение по логарифмической шкале (MR) (Hughes и др. 2006, Branford и др., 2006, 2008)⁴, которое относится к значению %IS как $\log_{10}$.

$$\%IS = \frac{\text{копии BCR - ABL}}{\text{копии BCR}} * 100 * CF$$

$$MR = \log_{10}(100\%IS) - \log_{10}(\%IS) = 2 - \log_{10}(\%IS)$$

Значение %IS регистрируется по линейной шкале, а значение MR выражается как отношение %IS, пересчитанное по логарифмической шкале и вычитенное из базовой линии; $MR0.0 = 100\%IS$. В данном документе будет использоваться обозначение вида $MR_{x,y}$, соответствующее значению MR, где x,y — измеренное числовое значение. Например, обозначение $MR3.0$ соответствует тысячекратному (10^3) снижению от номинального значения $MR0.0$. Также его можно охарактеризовать как отношение 0,1% между числом обнаруженных копий BCR-ABL и числом копий ABL, скорректированное до значения IS.

При тестировании с использованием набора QXDx BCR-ABL %IS регистрируются значения %IS и MR. в качестве промежуточного результата регистрируется число обнаруженных копий транскриптов BCR-ABL и ABL, которое можно использовать для оценки определенности измерения. Значения %IS прослеживаются к стандартам Основных эталонных материалов ВОЗ (White и др. 2010)⁶, в которых рассматриваются четыре значения %IS: 10%IS, 1%IS, 0,1%IS, 0,01%IS или (MR1, MR2, MR3 или MR4), соответственно.

Статистические величины, например среднее значение или среднеквадратичное отклонение, в данном документе выражаются в единицах MR или %IS. В таблице 1 ниже приведено отношение между значениями %IS и связанными с ними соответствующими значениями MR.

%IS	MR
10	1,0
1	2,0
0,32	2,5
0,1	3,0 (MMR)

0,032	3,5
0,01	4,0
0,0032	4,5
0,002	4,7
0,001	5,0

Таблица 1: Значения %IS и связанные с ними значения MR

Описание процедуры тестирования с помощью набора QXDx BCR-ABL %IS

Стандартная процедура тестирования и время выполнения каждого этапа приведены в таблице 2 ниже.

Этап	Описание	Назначение	Расчетное время работы оператора	Расчетное время работы прибора
1	Извлечение ДНК из цельной крови в пробирках с ЭДТА	Переменная	Переменная	Переменная
2	Реакция обратной транскриптазы		<30 мин	~60 мин
3	Настройка планшетов и генерации капель		<30 мин	~1 мин/тест ~48 мин/планшет
4	Аmplификация ПЦР		<5 мин	~120 мин

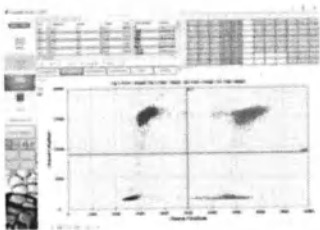
Этап	Описание	Назначение	Расчетное время работы оператора	Расчетное время работы прибора
5	Ридер «QX200 Droplet Reader» для детекции флуоресценции капель в методе цифровой капельной ПЦР		<5 мин	~2,5 мин/тест ~120 мин/планшет
6	Ручная настройка пороговых уровней, экспорт данных в формате CSV		10-20 мин/планшет	Неприменимо
7	Агрегирование и регистрация данных		~15 мин/планшет или Переменная, инструменты сторонних производителей	Неприменимо

Таблица 2: Тестирование с помощью набора QXDx BCR-ABL %IS – CE-IVD

Извлечение РНК, этап 1, может выполняться различными стандартными методами, включая Maxwell® CSC RNA Blood Kit, Qiagen RNeasy® Mini и Trizol. Этапы 2–5 выполняются с использованием реагентов и приборов, поставляемых компанией Bio-Rad, см. ниже. Ручная настройка пороговых значений и экспортирование данных выполняется из программного обеспечения QuantaSoft v 1.7.4. Финальный этап агрегирования и регистрации данных может выполняться с использованием инструментов, предоставленных лабораторией или сторонними организациями.

Инструкции по загрузке и использованию инструментов, предоставляемых сторонними организациями, см. на веб-странице BCR-ABL. Эти инструменты позволяют выразить необработанные данные, сгенерированные программным обеспечением QS 1.7.4, в виде значений IS% или MR.

РЕАГЕНТЫ И ПРИБОРЫ

Предоставляемые материалы

	В набор QXDx BCR-ABL %IS входят реагенты в количестве, достаточном для работы с 96 образцами или контроля качества образцов в формате 2 лунки на образец. В набор входят следующие компоненты:
---	--

Имя	К-во (пробирки)	Объем	Условия хранения
Набор QXDx BCR-ABL %IS Kit	1	---	От -25 до -15°C
Праймеры и зонды набора QXDx BCR-ABL	1	250 мкл	От -25 до -15°C
QXDx Вода, не содержащая нуклеазы	2	1500 мкл	От -25 до -15°C
Смесь QXDx 5x iScript Select Reaction	1	500 мкл	От -25 до -15°C
Супермикс QXDx 2X	3	1000 мкл	От -25 до -15°C

Имя	К-во (пробирки)	Объем	Условия хранения
Набор QXDx iScript Advanced Reverse Transcriptase	1	125 мкл	От -25 до -15°C
Праймеры QXDx RT	1	500 мкл	От -25 до -15°C
QXDx BCR-ABL 0,1%IS	2	50 мкл	От -25 до -15°C
QXDx BCR-ABL 10%IS	2	50 мкл	От -25 до -15°C
QXDx BCR-ABL H-CTRL	2	50 мкл	От -25 до -15°C
QXDx BCR-ABL L-CTL	2	50 мкл	От -25 до -15°C
QXDx BCR-ABL Neg-CTRL	2	50 мкл	От -25 до -15°C
QXDx BCR-ABL iScript RT	1	500 мкл	От -25 до -15°C

ПРИМЕЧАНИЕ: Паспорта безопасности см. на сайте www.bio-rad.com

Хранение и обращение

- Все компоненты должны храниться в морозильной камере при постоянной температуре в интервале от -25 до -15°C.
- Все контроли РНК должны храниться при температуре -80°C.
- Не использовать вихревую мешалку при работе с обратной транскриптазой (RT).
- RT должна храниться в морозильной камере до использования, а после использования — снова возвращаться в морозильную камеру.
- Берегите смесь праймер/зонд BCR-ABL1/ABL1 от длительного воздействия солнечного света, храните при комнатной температуре.
- Тщательно перемешайте смесь праймер/зонд BCR-ABL1/ABL1 до однородного состояния, избегайте образования пузырьков.
- Перед тем как открывать все остальные флаконы, выполните их бережное перемешивание в вихревой мешалке и центрифугирование.
- Не используйте вихревую мешалку для перемешивания флаконов с калибраторами или контролями.
- Не допускается выполнять более 5 циклов заморозки/разморозки супермиксов QXDx.
- Срок годности каждого реагента указан на соответствующей этикетке.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Реагенты и расходные материалы

Для системы QX200 AutoDG ddPCR:

Имя	К-во (пробирки)	Объем	Условия хранения
QX200 AutoDG ddPCR			
Фольга для запаивания планшетов	50 шт/уп		От 15 до 30°C
Планшеты 96-луночные для цифровой капельной ПЦР, 5 шт. в 1 упаковке	3 уп		От 15 до 30°C
Картриджи DG32, 15 шт в 1 упаковке	1 уп		От 15 до 30°C
Наконечники для пипеток, 96 шт. в 1 упаковке	10 уп		От 15 до 30°C
Масло для автоматического генератора капель, 50 мл в 1 флаконе	1 уп		От 15 до 30°C

Имя	К-во (пробирки)	Объем	Условия хранения
Масло для ридера капель QXDx	1	1 л	От 15 до 30°C

Приборы

Описание
Ридер «QX200 Droplet Reader» для детекции флуоресценции капель в методе цифровой капельной ПЦР с принадлежностями, в составе
Генератор капель автоматический "AutoDG" для проведения цифровой капельной ПЦР (ddPCR), с принадлежностями, в составе

Описание
Термоциклер
Требования: Используемые термоциклеры должны иметь следующие характеристики: • Достоверность: $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ • Равномерность: $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ между лунками в течение 10 с • Регулируемая скорость линейного изменения: до $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$ • Интервал температур: $0-100^{\circ}\text{C}$

Описание
Автоматический запаиватель планшет PX-1

Описание
Стандартное лабораторное оборудование
• Пипетки (Rainin или Eppendorf) ○ Центрифуга для планшетов 1–10 мкл, 10–100 мкл, 20–200 мкл и 100–1000 мкл • Пипетки с вихревой мешалкой (Rainin или Eppendorf) ○ 1–10 мкл, 10–100 мкл, 20–200 мкл и 100–1000 мкл

Прочие реагенты и расходные материалы

Описание
Реагенты для очистки РНК
Допускается любая методология подготовки образцов из доступных на рынке, валидированная в лаборатории. Пример: Набор Qiagen, Trizol, Promega Maxwell RNA Blood Kit.

Описание
Контрольный буфер ddPCR 2x
Для использования с маслом для генерации капель в лунках для холостых проб

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro* (IVD).
- Только для профессионального использования.
- При обращении с любыми биологическими образцами принимайте меры, необходимые при работе с инфекционно-опасными материалами. Все образцы с материалами человеческого происхождения требуют стандартных мер предосторожности. Правила обращения с образцами можно получить, обратившись во Всемирную организацию здравоохранения или Центры США по профилактике и контролю заболеваемости.
- При работе с химическими соединениями и биологическими образцами соблюдайте лабораторные правила техники безопасности.
- При работе с реагентами и их транспортировке надевайте защитные перчатки.
- Протирайте рабочие поверхности смесью хлорной извести (10%) и спирта (70%).
- Убедитесь, что генератор и ридер капель установлены в специальных местах, отделенных друг от друга, во избежание загрязнения ампликона.
- Несоблюдение процедур и указаний, приведенных в этом документе, а также использование реагентов, отличающихся от входящих в набор, может вызвать ошибки в результатах и другие нежелательные последствия.

- Не допускается заменять реагенты из набора QXDx BCR-ABL %IS какими-либо другими реагентами.
- Не допускается смешивать реагенты из набора QXDx BCR-ABL %IS из разных партий в одной постановке.
- При использовании одного термоциклера для обратной транскриптазы и ПЦР установите его рядом с генератором капель или в месте, отделенном от ридера капель.

ПРИМЕЧАНИЕ: Во время амплификации ПЦР планшет заклеивается пленкой.

- Настройку теста и добавление шаблонов необходимо проводить в разных местах разными пипетками и пипетторами.
- Из-за высокой чувствительности РНК и цифровой капельной ПЦР следует проводить все тесты в отсутствии рибонуклеазы/дезоксирибонуклеазы.
- Оптимизируйте рабочий процесс и рабочее пространство, чтобы предотвратить межлуночное загрязнение.
- Убедитесь, что все оборудование проходит регулярное обслуживание и калибровку согласно инструкциям производителя.
- Используйте наконечники пипеток и реагенты, не содержащие нуклеазы; регулярно очищайте пипетки.
- Для получения оптимальных результатов убедитесь, что используется только рекомендуемый протокол термоциклирования.
- Не используйте воду, обработанную диэтилпилокарбонатом, для амплификации ПЦР.
- Некоторые вещества могут пагубно повлиять на результаты теста: лекарственные средства (например, гепарин), гиперлипемические и гемолизированные образцы, желтушные образцы, а также образцы с высоким содержанием белка.
- Обратитесь в отдел по утилизации отходов вашей организации по вопросам утилизации использованных планшетов, расходных материалов и реагентов. Данный материал может иметь свойства, подпадающие под действие Акта о сохранении и восстановлении природных ресурсов (RCRA), выпущенного Агентством по охране окружающей среды (EPA), в отношении опасных отходов, требующих утилизации по особым правилам.
- Проверяйте, отличаются ли нормы и правила по утилизации отходов, действующие на местном уровне, от соответствующего федерального законодательства. Организациям должны следить за актуальным законодательством по утилизации отходов, действующим в соответствующей стране.
- Качество результатов теста в значительной степени зависит от количества и качества образцов, проходящих анализ. Рекомендуется измерять качество и количество образцов РНК согласно указаниям настоящего руководства.

СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Соберите образцы цельной крови в объеме минимум 5 мл в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА).
- Неиспользуемые образцы цельной крови должны храниться при температуре 2–8°C в течение максимум 72 ч.

ПРОТОКОЛ ТЕСТИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ НАБОРА QXDx BCR-ABL %IS

Общие сведения

В набор входят реагенты в количестве, достаточном для максимум 192 лунок для цифровой капельной ПЦР. Если обработка всех образцов, контролей и калибраторов выполняется в двухлуночном формате, реагентов из набора достаточно для работы с 84 образцами. Если требуется большая чувствительность, работа с образцами неизвестного происхождения должна выполняться более чем в 2 лунках (например, в 4). В этом случае реагентов из набора должно хватить на меньшее количество образцов.

Схемы планшетов

Каждый планшет рассчитан на работу с 6 образцами известного происхождения: Отсутствует ДНК-мишень (NTC), сильноположительный контроль QXDx (Hi Pos), отрицательный контроль QXDx (Neg), слабоположительный контроль QXDx (Lo Pos), калибратор QXDx ~10%IS Cal и калибратор QXDx ~0,1%IS Cal. Обработка всех этих образцов известного происхождения всегда выполняется в двухлуночном формате. Оценка качества проводится на основе данных, полученных от контролей и калибраторов (см. ниже). Обработка образцов неизвестного происхождения выполняется в двухлуночном формате. Если требуется большая чувствительность, работа с образцами неизвестного происхождения должна выполняться в 4-луночном формате. Данные по всем лункам, в которых находится один и тот же образец, подвергаются цифровому агрегированию и подсчету общего числа молекулярных мишеней; также для образцов вычисляются значения %IS и MR. Можно использовать особый тип образцов (контрольный буфер 2х), но такие образцы не участвуют в анализе и не регистрируются. Контрольный буфер 2х помещается в пустые лунки для буферов, которые предусмотрены в каждой колонке с образцами (см. рис. 1-3).

буферов, которые предусмотрены в каждой колонке с образцами (см. рис. 1.1)												
	Образцы известного происхождения		Образцы неизвестного происхождения									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Отсутствует ДНК-мишень	Отсутствует ДНК-мишень	Образец 3	Образец 3	Образец 11	Образец 11	Образец 19	Образец 19	Образец 27	Образец 27	Образец 35	Образец 35
B	Сильноположительный	Сильноположительный	Образец 4	Образец 4	Образец 12	Образец 12	Образец 20	Образец 20	Образец 28	Образец 28	Образец 36	Образец 36
C	Отрицательный	Отрицательный	Образец 5	Образец 5	Образец 13	Образец 13	Образец 21	Образец 21	Образец 29	Образец 29	Образец 37	Образец 37
D	Слабоположительный	Слабоположительный	Образец 6	Образец 6	Образец 14	Образец 14	Образец 22	Образец 22	Образец 30	Образец 30	Образец 38	Образец 38
E	~0,1% IS	~0,1% IS	Образец 7	Образец 7	Образец 15	Образец 15	Образец 23	Образец 23	Образец 31	Образец 31	Образец 39	Образец 39
F	~10% IS	~10% IS	Образец 8	Образец 8	Образец 16	Образец 16	Образец 24	Образец 24	Образец 32	Образец 32	Образец 40	Образец 40
G	Образец 1	Образец 1	Образец 9	Образец 9	Образец 17	Образец 17	Образец 25	Образец 25	Образец 33	Образец 33	Образец 41	Образец 41
H	Образец 2	Образец 2	Образец 10	Образец 10	Образец 18	Образец 18	Образец 26	Образец 26	Образец 34	Образец 34	Образец 42	Образец 42
Образцы известного и неизвестного происхождения												

Рис. 1: Схема планшета, согласно которой обработка образцов известного и неизвестного происхождения выполняется в двухлуночном формате. Один планшет содержит 42 образца неизвестного происхождения.

выполняется в двухлуночном формате. Сопл. планшетами 1000												
	Образцы известного происхождения		Образцы неизвестного происхождения									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Отсутствует ДНК-мишень	Отсутствует ДНК-мишень	Образец 3	Образец 3	Образец 11	Образец 11						
B	Сильноположительный	Сильноположительный	Образец 4	Образец 4	Образец 12	Образец 12						
C	Отрицательный	Отрицательный	Образец 5	Образец 5	Образец 13	Образец 13						
D	Слабоположительный	Слабоположительный	Образец 6	Образец 6	Образец 14	Образец 14						
E	~0,1% IS	~0,1% IS	Образец 7	Образец 7	Буфер	Буфер						
F	~10% IS	~10% IS	Образец 8	Образец 8	Буфер	Буфер						
G	Образец 1	Образец 1	Образец 9	Образец 9	Буфер	Буфер						
H	Образец 2	Образец 2	Образец 10	Образец 10	Буфер	Буфер						
Последние 8 лунок заполняются												

Рис. 2: Схема планшета с менее чем 42 образцами неизвестного происхождения. Последние 8 лунок заполняются буфером (не считаются), 8 образцов на колонку. Остальные пустые колонки не заполняются и не

считаются.

	Образцы известного происхождения		Образцы неизвестного происхождения									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Отсутствует ДНК-мишень	Отсутствует ДНК-мишень	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3	Образец 3		
B	Сильноположительный	Сильноположительный	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4	Образец 4		
C	Отрицательный	Отрицательный	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5	Образец 5		
D	Слабоположительный	Слабоположительный	Образец 6	Образец 6	Образец 6	Образец 6	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер		
E	~0,1% IS	~0,1% IS	Образец 7	Образец 7	Образец 7	Образец 7	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер		
F	~10% IS	~10% IS	Образец 8	Образец 8	Образец 8	Образец 8	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер		
G	Образец 1	Образец 1	Образец 9	Образец 9	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер		
H	Образец 2	Образец 2	Образец 10	Образец 10	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер	Буфер		

Рис. 3: Схема планшета, в которой обработка образцов неизвестного происхождения выполняется в 2, 4-луночном формате. 8 образцов на колонку заполняются буфером. Остальные пустые колонки не заполняются и не считаются.

Рекомендуется распределять образцы между лунками по горизонтали. В этом случае при возникновении ошибок на уровне чипа генератора капель (т.е. на уровне колонки) остальные лунки дадут возможность получить информацию, достаточную для оценки образца. Используйте 2х контрольный буфер, разведенный водой в пропорции 1:1, во всех пустых лунках каждой колонки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Как и в случае молекулярного тестирования на основе ПЦР, необходимо обеспечить защиту от загрязнения нуклеиновыми кислотами, проводя регулярную очистку рабочих поверхностей и пипеток, обеспечив, чтобы работа с РНК/ДНК и подготовка анализа выполнялись в разных местах, а также пользуясь средствами индивидуальной защиты. Рекомендуется отделять друг от друга места, где ведется и где не ведется работа с шаблонами, использовать отдельные пипетки и инструменты, а также проводить регулярную очистку.

ЭТАПЫ ПОДГОТОВКИ К АНАЛИЗУ

Обычные методы пробоподготовки, используемые для извлечения общей РНК из цельной крови или лейкоцитной пленки, совместимы с методами цифровой капельной ПЦР. Наиболее часто используемыми методологиями извлечения РНК являются Maxwell® CSC RNA Blood Kit, Qiagen RNeasy® Mini и Trizol. Для достижения оптимальных результатов необходимо собрать минимум 10 млн. (1×10^7) ядросодержащих клеток и извлечь из них РНК. Поскольку известно, что РНК распадается под действием рибонуклеазы, обильно содержащейся в образцах человеческого происхождения, рекомендуется свести к минимуму работу с образцами, а с образцами крови работать на протяжении 24 часов сбора в случае наиболее высокочувствительных количественных измерений BCR-ABL (Hughes и др., 2006)⁴. От качества, чистоты и количества РНК в значительной степени зависят результаты анализа. Таким образом, рекомендуется, однако не в обязательном порядке, проводить оценку качества и чистоты очищенной общей РНК стандартными спектрофотометрическими методами. Соответствующая концентрация OD260 должна составлять ~100 нг/мкл; расчетная чистота, определяемая по отношению OD260/OD280, должна составлять >1,6, а отношение OD260/OD230 должно составлять >1,2.

Чувствительность теста зависит от входящей РНК. Рекомендуется выполнять валидацию метода изоляции РНК, если выход превышает 100 нг/мкл. Для обеспечения эффективности настройки теста очищенная общая РНК должна быть приведена к целевой концентрации ~100 нг/мкл, храниться в морозильной камере при температуре -80°C до проведения теста, а сам тест должен проводиться сразу же после извлечения.

Категория	Описание мишени
Объем крови	1,5–10 мл
Количество клеток	$\geq 1 \times 10^7$
Концентрация РНК	75–125 нг/мкл
Чистота РНК	Отношение OD260/OD280 > 1,6
	Отношение OD260/OD230 > 1,2

ПОДГОТОВКА К РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

- Разморозьте очищенную РНК при комнатной температуре в течение 10 мин, затем поместите пробирки с материалом на ледяной или холодный блок.

ПРИМЕЧАНИЕ: Не используйте вихревую мешалку; допускается центрифугирование пробирок.

- Приведите образцы РНК к концентрации ~100 нг/мкл.
- После извлечения из морозильной камеры поместите набор iScript Advanced Reverse Transcriptase, готовый к использованию, на ледяной или холодный блок.

ПРИМЕЧАНИЕ: Не использовать вихревую мешалку при работе с набором Advanced Reverse Transcriptase.

- Следующие компоненты должны размораживаться до комнатной температуры в течение минимум 15 мин.
 - Смесь QXDx 5x iScript Select Reaction
 - Праймеры QXDx RT
 - Вода, не содержащая нуклеазы, QXDx
- Тщательно перемешайте обычным способом или в вихревой мешалке все компоненты в пробирках с закрытыми крышками (шаг 4), а затем проведите центрифугирование в течение короткого времени, чтобы собрать материал на дне пробирок.
- Поместите все компоненты на ледяной или холодный блок.
- Подготовка смеси RT Master Mix и загрузка планшета с обратной транскриптазой.
 - Подготовка смеси RT Master Mix должна осуществляться с учетом количества обработанных образцов, контролей и калибраторов.
 - Значения объема для подготовки смеси RT Master Mix см. в таблице 3.
 - ПРИМЕЧАНИЕ:** При загрузке планшеты с обратной транскриптазой можно поместить на ледяной блок.

Объем смеси RT Master Mix		Кол-во образцов * (образцы + излишек) Объем				
Кол-во образцов		1	16	32	48	96
Планшеты			1/3 планшета	2/3 планшета	1 планшет	2 планшета
Компоненты	Объем	1x	(16+2)x	(32+3)x	(48+4)x	(96+4)x
Вода, не содержащая нуклеазы, QXDx	мкл	~3,75	~67,50	~131,25	~195	~375
Смесь QXDx 5x iScript Select Reaction	мкл	5	90	175	260	500
Праймеры QXDx RT (сторонний производитель)	мкл	5	90	175	260	500
Набор QXDx iScript Advanced Reverse Transcriptase	мкл	1,25	22,5	43,75	65	125
Образец РНК * (750-1250 нг)	мкл	10				
Итого	мкл	25	450	875	1300	2500

Таблица 3: Объем смеси Master Mix в зависимости от количества образцов

ПРИМЕЧАНИЕ: * Образцы, задействованные в обработке на планшете, включают в себя образцы материалов пациентов, контроли и калибраторы.

- При работе с несколькими образцами рекомендуется выполнять подготовку смеси RT Master Mix с указанными компонентами (кроме РНК), которые затем с помощью дозатора должны распределяться по лункам.
 - Требуемые схемы планшетоов см. на рис. 4.

	Образцы известного происхождения		Образцы неизвестного происхождения									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Отсутствует ДНК-мишень		Образец 3		Образец 11							
B	Сильноположительный		Образец 4		Образец 12							
C	Отрицательный		Образец 5		Образец 13							
D	Слабоположительный		Образец 6		Образец 14							
E	~0,1% IS		Образец 7		Буфер							
F	~10% IS		Образец 8		Буфер							
G	Образец 1		Образец 9		Буфер							
H	Образец 2		Образец 10		Буфер							

Рис. 4: Требуемая схема планшета с обратной транскриптазой

- б. Все компоненты смеси RT Master Mix (кроме РНК) необходимо тщательно перемешать, разделить на алиquotы в объеме 15 мкл на образец и поместить во все другие колонки 96-луночного планшета для ПЦР.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для максимальной эффективности рекомендуется пользоваться пипеткой-репитером.

- в. Добавьте калибраторы и контроли в объеме 10 мкл в соответствующие лунки с обратной транскриптазой.
 г. Добавьте образцы извлеченной РНК в объеме 10 мкл в соответствующие лунки с обратной транскриптазой.
 д. Бережно перемешайте содержимое лунок, используя пипетку (10 раз) и избегая образования пузырьков.
 е. Запечатайте планшет пленкой при помощи запаивателя планшетов для ПЦР РХ1.

- Разверните запаиватель планшетов РХ-1 на 180 градусов на 5 с (нестандартное положение).
- Поместите планшет с обратной транскриптазой на алюминиевый блок при комнатной температуре.
- Запечатайте планшет пленкой так, чтобы, когда пленка закрывает планшет, была видна красная полоса.
- Чтобы запечатать планшет, нажмите кнопку **Seal** (закроется дверца, и начнется запаивание).

ПРИМЕЧАНИЕ: Не допускается использовать металлическую раму.

- Выньте планшет вместе с блоком из запаивателя планшетов РХ-1.
- Убедитесь, что все лунки планшета заклеены; на пленке должны быть видны следы каждой лунки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подробные указания см. в руководстве по эксплуатации запаивателя планшетов РХ1.

- ж. Центрифугируйте планшет в течение 1 мин с ускорением 1000 g, чтобы удалить все пузырьки. Если пузырьки остаются, повторите центрифугирование.

- з. После заклеивания и центрифугирования планшет готов к термоциклированию.

ПРИМЕЧАНИЕ: Не забудьте вынуть металлический блок из запаивателя планшетов для ПЦР РХ1, в противном случае планшет может перегреться.

9. Поместите планшет в термоциклер и выполните протокол, приведенный в таблице 4.

Связывание праймеров	10 мин при 25°C
Обратная транскриптаза	45 мин при 42°C
Инактивация обратной транскриптазы	5 мин при 85°C
Удержание	До 24 ч при 4 °C

Таблица 4: Протокол термоциклера

***ПРИМЕЧАНИЕ:** Удержание при температуре 4°C позволяет хранить обратную транскриптазу в течение 24 ч до начала работы.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании термоциклера установите объем образца 25 мкл, а температуру крышки — 105 °C.

10. По завершении подготовки обратной транскриптазы (комплементарной ДНК) центрифугируйте планшет в течение

1 мин с ускорением 1000 g, чтобы собрать конденсат.

11. Комплементарную ДНК следует хранить на ледяном блоке, если предполагается использовать ее немедленно; в противном случае хранить при температуре 4°C до 24 ч.

НАСТРОЙКА ПРОЦЕДУР ЦИФРОВОЙ ПЦР И ГЕНЕРАЦИИ КАПЕЛЬ

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Перед извлечением всех компонентов убедитесь, что рабочие поверхности тщательно очищены смесью хлорной извести (10%) и спирта (70%).

1. Следующие компоненты должны размораживаться до комнатной температуры в течение ок. 15 мин.
 - а. Супермикс QXDx 2x
 - б. Праймеры и зонды набора QXDx BCR-ABL
 - в. Образцы комплементарной ДНК * планшет (~640 нг/тест)
2. Тщательно перемешайте пробирки с отдельными компонентами в вихревой мешалке до достижения однородности; убедитесь в отсутствии осадка. В противном случае тщательно перемешайте содержимое пробирки, а затем центрифугируйте.

ПРИМЕЧАНИЕ: Материал супермиксов более вязкий, чем другие компоненты.
3. Центрифугируйте все пробирки с компонентами в течение 30 секунд с ускорением 1000 g так, чтобы собрать содержимое на дне пробирок.
4. Подготовьте смесь ddPCR Master Mix на несколько реакций согласно таблице 5.

Объем цифровой капельной ПЦР	Кол-во образцов * (образцы + излишек) Объем					
Компоненты	Объем	1x	(16+2)x	(32+3)x	(48+4)x	(96+4)x
Вода, не содержащая нуклеазы, QXDx	мкл	6,5	117	227,5	338	650
Супермикс QXDx ddPCR	мкл	25	450	875	1300	2500
Праймеры/зонды набора QXDx 20X BCR-ABL	мкл	2,5	45	87,5	130	250
Образцы комплементарной ДНК*	мкл	16				
Итого	мкл	50	900	1750	2600**	5000*

Таблица 5: Объем планшетов для цифровой капельной ПЦР в зависимости от количества образцов (для планшетов с обратной транскриптазой).

ПРИМЕЧАНИЕ:** Общий объем 2600 мкл на 48 образцов (1 планшет) и 5000 мкл на 96 образцов (2 планшета) превышает объем пробирки 2 мл. При работе с такими образцами рекомендуется использовать пробирки объемом 5 мл.

ПРИМЕЧАНИЕ: * Образцы, задействованные в обработке на планшете, включают в себя образцы материалов пациентов, контроля и калибраторы.

5. При работе с несколькими образцами рекомендуется выполнять подготовку смеси ddPCR Master Mix с указанными компонентами (кроме комплементарной ДНК), которые затем с помощью дозатора должны распределяться по лункам планшета для цифровой капельной ПЦР.
 - а. Требуемые схемы планшетов см. на рис. 5.
 - б. Тщательно перемешайте компоненты смеси ddPCR Master Mix в вихревой мешалке.
 - в. Разделите на аликвоты объемом 34 мкл на лунку планшета (без образца комплементарной ДНК), как показано на рис. 5.
 - г. 8-канальным пипеттором объемом 50, 100 или 200 мкл, оснащенным наконечниками с фильтром, сделайте прокол в пленке планшета с комплементарной ДНК.

ПРИМЕЧАНИЕ: Как показывает практика, наконечники пипеток P20 не способны проколоть пленку, закрывающую планшет. Старайтесь не пользоваться пипеттором P20 для выполнения этой операции.

Наиболее эффективные практики извлечения необходимого объема комплементарной ДНК:

- i. Установите нужный объем пипетки и, не нажимая на поршень, сделайте прокол в пленке, закрывающей планшет. Наконечники пипетки должны проникать под пленку не глубже чем на 2 мм.
- ii. Сделав прокол, поднимите наконечники пипетки над пленкой и нажмите на поршень.

- iii. Нажав на поршень, опускайте наконечники в лунки, расширяя отверстия покачиванием наконечников пипетки вперед-назад. Это даст возможность достать наконечниками пипетки до дна лунок, тем самым позволив извлечь комплементарную ДНК в полном объеме.
- iv. Не вынимая наконечники пипетки из лунок с комплементарной ДНК, медленно выполните забор материала в требуемом объеме. Выполнив забор материала, оставьте наконечники пипетки в лунках еще на 5 с, чтобы выровнять давление.
- д. Добавьте образец комплементарной ДНК в объеме 16 мкл (образцы с материалом пациентов, контроли, калибраторы или буфер) в каждую лунку планшета для цифровой капельной ПЦР.
- е. Бережно поднимите и опустите поршень примерно 5 раз для перемешивания смеси ddPCR Master Mix, после чего извлеките весь образец.
- ж. Повторите эту операцию для всех образцов.
- з. После того как все образцы комплементарной ДНК будут добавлены в лунки планшета, используйте пипеттор объемом 50 или 100 мкл, установив объем пипетирования 35 мкл (можно использовать многоканальный пипеттор).
- и. Бережно поднимите и опустите поршень примерно 15 раз при 50% (25 мкл) от общего объема (50 мкл), избегая образования пузырьков.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Поднимите и опустите поршень 15 раз, так чтобы вязкий материал тщательно перемешался.

- к. Перенесите 25 мкл каждого образца в соседнюю лунку, чтобы создать дублирующие лунки, как показано на рис. 5.

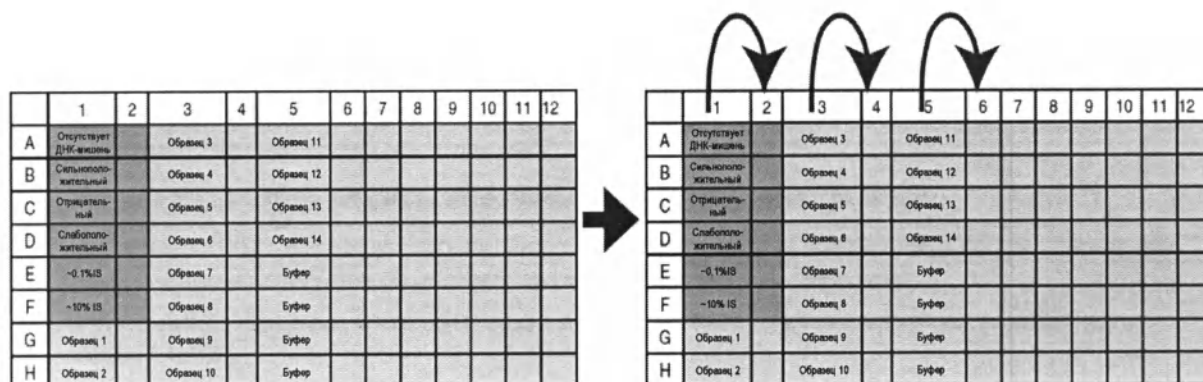


Рис. 5: Схема планшета для цифровой капельной ПЦР

ПРИМЕЧАНИЕ: Если общее количество образцов и контролей меньше числа, кратного 8 (т.е. 8, 16, 24 и т. д.), заполните остальные лунки контрольным буфером для цифровой капельной ПЦР в объеме 25 мкл или излишками реагентов. Если лунки останутся пустыми, капли не сформируются.

6. Запечатайте планшет пленкой в запаивателе планшетов PX-1.
 - i. Разверните запаиватель планшетов PX-1 на 180 градусов на 5 с (нестандартное положение).
 - ii. Поместите планшет с обратной транскриптазой на блок при комнатной температуре.
 - iii. Запечатайте планшет пленкой так, чтобы, когда пленка закрывает планшет, была видна красная полоса.
 - iv. Чтобы запечатать планшет, нажмите кнопку Seal (закроется дверца, и начнется запаивание).

ПРИМЕЧАНИЕ: Не допускается использовать металлическую раму.

- v. Выньте планшет вместе с блоком из запаивателя планшетов PX-1.
7. Центрифугируйте все пробирки с компонентами в течение 30 секунд с ускорением 1000 g так, чтобы собрать содержимое на дне пробирок; удалите пузырьки.

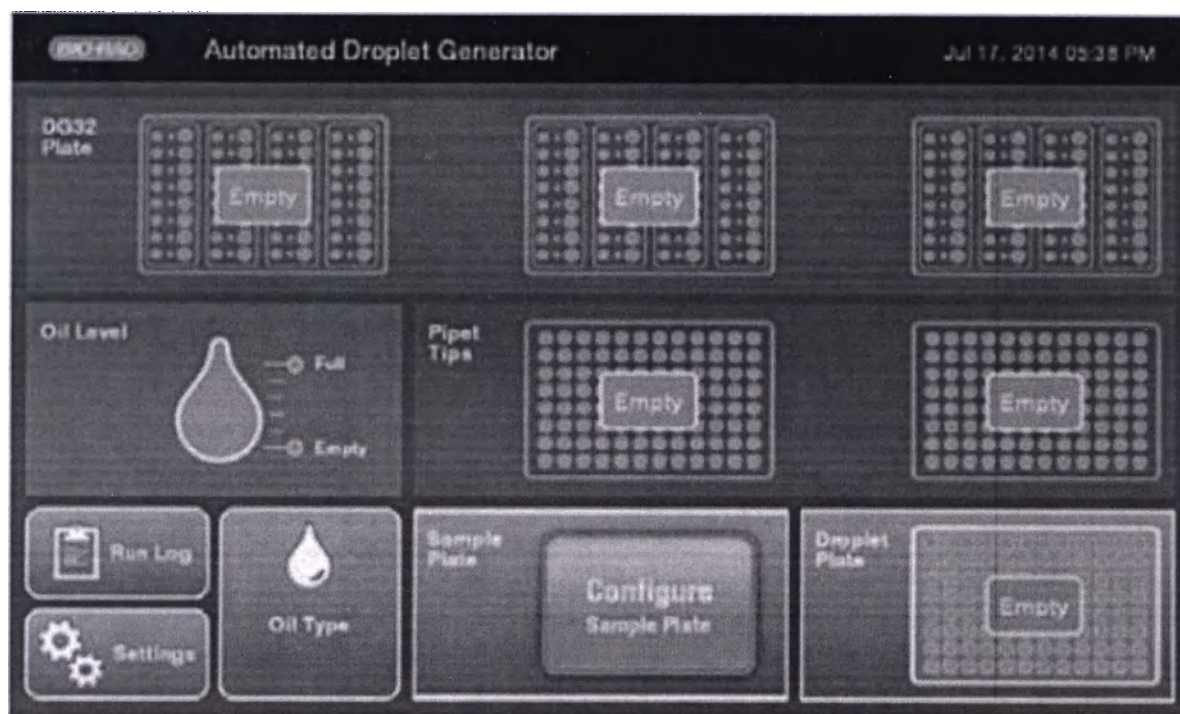
Генерация капель

Рисунок 6: Схема автоматической системы генерации капель

ПРИМЕЧАНИЕ: Подробные и полные инструкции см. в руководстве по эксплуатации автоматического генератора капель QX200.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Перед настройкой не забудьте тщательно очистить рабочие поверхности и поверхности приборов смесью хлорной извести (10%) и спирта (70%).

1. Соберите все расходные материалы, необходимые для настройки генератора капель.
 - Картриджи DG32, наконечники пипеток, масло для генерации капель, планшеты для образцов, планшеты для формирования капель (генерация капель происходит по завершении обработки).

ПРИМЕЧАНИЕ: Убедитесь, что контейнер для отходов установлен в соответствующем положении на системе AutoDG.

2. Откройте дверцу системы AutoDG и загрузите 96-луночный планшет для цифровой капельной ПЦР в автоматический генератор капель QX200 (в положении «планшет с образцами»). Светодиодный индикатор должен загореться зеленым цветом.
3. Нажмите кнопку **Configure Sample Plate** на передней панели системы AutoDG и введите номера колонок, где расположены образцы. (В качестве опции можно задать название планшета и оставить комментарии к планшету.) Нажмите **OK**.

ПРИМЕЧАНИЕ: Если общее количество образцов и контролей меньше числа, кратного 8, для одной колонки планшета, заполните дополнительные лунки в колонке контрольным буфером ddPCR 1X в объеме 25 мкл или излишком смеси Master Mix, чтобы капли смогли сформироваться.

ПРИМЕЧАНИЕ: В меню настройки конфигурации системы AutoDG можно выбрать только заполненные колонки (см. рис. 7).

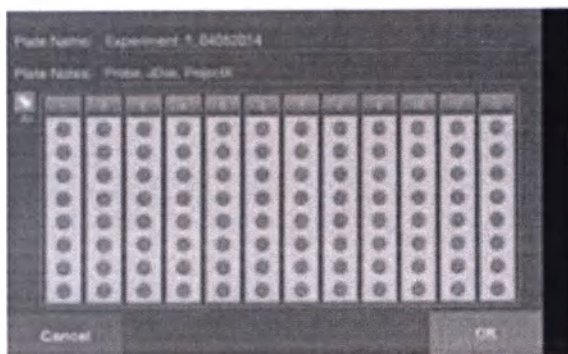
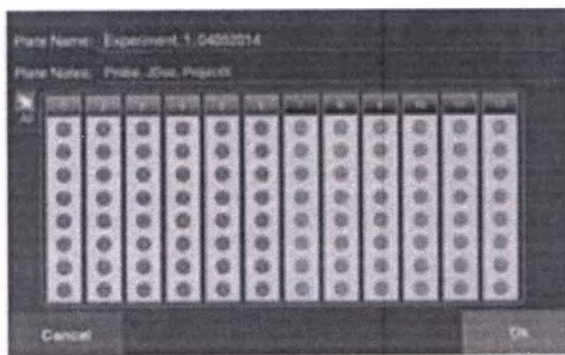
A

B


Рис. 7: В планшете A 96 лунок выбраны для 48 образцов; в планшете B 48 лунок выбраны для 24 образцов.

4. В зависимости от числа колонок, выбранных на планшете с образцами, расходные материалы, необходимые для загрузки в прибор, будут отмечаться желтым светодиодным индикатором.
5. Откройте дверцу системы AutoDG и загрузите соответствующие расходные материалы, после чего соответствующие светодиодные индикаторы загорятся зеленым.

- а. Вставьте картриджи DG32 (зеленые прокладки должны располагаться справа) в держатели планшетов в задней части системы. Если держатели установлены правильно, соответствующий светодиодный индикатор загорится зеленым.
- б. Установите наконечники пипетки вдоль центрального ряда на приборе, предварительно сняв пластиковую пленку и крышку коробки.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Загрузке подлежат только полные коробки с наконечниками.

- в. Установите пустой 96-луночный планшет вместе с синим охлаждающим блоком в соответствующую позицию; соответствующий светодиодный индикатор должен загореться зеленым.
- г. Установите бутылку с маслом с левой стороны системы AutoDG и зафиксируйте в держателе, повернув бутылку. Выберите тип масла для системы AutoDG в меню прибора Droplets for Probes; выбранный тип масла будет подсвечен синим цветом. Значок уровня масла на экране выделится синим цветом, и на дисплее отобразится фактический уровень масла в бутылке.

ПРИМЕЧАНИЕ: Выполняйте эту операцию, только если уровень масла ниже нормы.

6. После того как все светодиодные индикаторы системы AutoDG загорятся зеленым цветом, нажмите синюю кнопку Start Droplet Generation.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Отойдите от прибора на некоторое расстояние, чтобы дверца смогла закрыться, а процедура обработки — запуститься.

7. На дисплее системы AutoDG отобразится сообщение, требующее подтвердить начало обработки. Обработка не запустится до тех пор, пока не будет нажата кнопка **Start Run**.

ПРИМЕЧАНИЕ: На дисплее отобразится время, остающееся до завершения генерации капель и готовности системы. Если генерация капель прервется по какой-либо причине, на дисплее системы AutoDG отобразится сообщение Run Terminated. В этом случае найдите и устраните причину неисправности, следуя инструкциям в разделе диагностики.

8. Если генерация капель выполнена успешно, выньте и запечатайте планшет запаивательной пленкой в течение 30 мин после завершения процедуры.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: В течение 30 мин после завершения процедуры системы AutoDG запечатайте планшет пленкой и выполните термоциклирование.

- i. Разверните запаиватель планшетов PX-1 на 180 градусов на 5 с (нестандартное положение).
- ii. Поместите планшет с обратной транскриптазой на блок при комнатной температуре.
- iii. Запечатайте планшет пленкой так, чтобы, когда пленка закрывает планшет, была видна красная полоса.
- v. Чтобы запечатать планшет, нажмите кнопку Seal (закроется дверца, и начнется запаивание).

ПРИМЕЧАНИЕ: Не допускается использовать металлическую раму.

- v. Выньте планшет вместе с блоком из запаивателя планшетоv PX-1.

9. Теперь планшет готов к термоциклированию.

АМПЛИФИКАЦИЯ ПЦР (ТЕРМОЦИКЛИРОВАНИЕ)

После заклеивания 96-луночного планшета с каплями поместите его в термоциклер для амплификации методом ПЦР.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Перед настройкой не забудьте тщательно очистить рабочие поверхности и поверхности приборов смесью хлорной извести (10%) и спирта (70%).

Для обеспечения оптимальных результатов набора QXDx BCR-ABL выполните протокол термоциклирования (см. таблицу 6).

Этап	Количество циклов	Температура (°C)	Время	Скорость линейного изменения
Активация ферментов	1	95	10 мин	2°C/c
Денатурация	5	94	30 с	
Нагревание/элонгация		60	1 мин	
Денатурация	35	94	30 с	
Нагревание/элонгация		64	1 мин	
Деактивация ферментов	1	95	10 мин	
Стабилизация капель	1	4	30 мин	
Удержание (дополнительно)	1	4	24 ч	

Таблица 6: Протокол термоциклирования набора BCR-ABL/ABL1

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Скорость линейного изменения должна быть обязательно установлена на 2°C/c, поскольку значения по умолчанию отличаются для разных термоциклеров.

ПРИМЕЧАНИЕ: При использовании термоциклера C1000 установите температуру крышки 105°C, а объем образцов 40 мкл (объем по умолчанию 30 мкл). Также см. инструкции по конфигурированию протокола в руководстве на термоциклер C1000.

Информацию о настройке других термоциклеров см. в Приложении А.

СЧИТЫВАНИЕ КАПЕЛЬ

Подготовка к сбору данных

1. Перед началом считывания выполните настройку файла шаблона для планшета. Это можно сделать либо с ПК, к которому подключен прибор, либо с рабочей станции с ПО QuantaSoft 1.7.4. Настройка планшета выполняется следующим образом:

- Эксперимент RED
- Супермикс: ddPCR для зондов (без dUTP)
- Мишень 1: Имя: BCR-ABL
- Мишень 1: Тип: Канал 1 Неизвестный
- Мишень 2: Имя: ABL
- Мишень 2: Тип: Канал 2 Неизвестный

На рис. 8 показана панель QuantaSoft с заданными настройками.

Рис. 8: Настройка параметров ридера капель

- Каждому образцу, помещаемому в лунку, должно присваиваться имя. Стандартные имена образцов известного происхождения:
 - NTC — отсутствует ДНК-мишень
 - Hi Pos — сильноположительный контроль
 - Neg — отрицательный контроль
 - Lo Pos — слабоположительный контроль
 - ~0.1% IS — проверка калибратором при ок. 0.1% IS
 - ~10% IS — проверка калибратором при ок. 10% IS
 - Буфер — образцы, считывание которых не будет выполняться; добавляются в частично заполненные колонки.
- Имена образцам присваиваются согласно правилам, принятым в конкретной лаборатории. За подробными инструкциями обратитесь к руководству по работе с программным обеспечением.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Убедитесь, что во всех колонках, считывание из которых выполняется, заполнены все 8 лунок. Пустые лунки заполняются соответствующим буферным раствором.

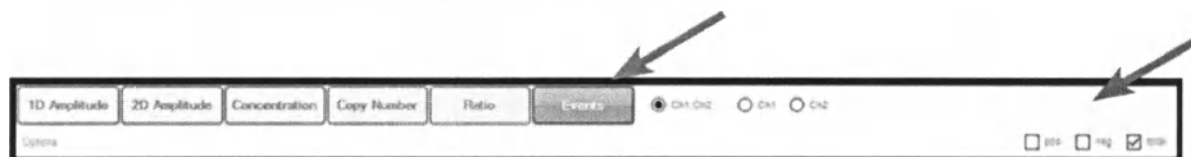
Сбор данных

- С ПК, к которому подключен прибор, запустите ПО QuantaSoft и загрузите файл шаблона для соответствующего планшета. Убедитесь, что все данные достаточно полные и точные.
- Нажмите кнопку **Run** на панели слева. Считыватель капель начнет работу с указанных лунок, выполнив предварительный автоматический анализ. Во время работы можно следить за ходом ее выполнения и качеством собираемых данных. **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** Не вмешивайтесь в процесс сбора данных: не выполняйте других задач на ПК, берегите систему от воздействия вибрации.
- По завершении работы файл с расширением .qfr будет сохранен на жестком диске ПК, к которому подключен прибор. Анализ этого файла можно выполнить с того же ПК либо с рабочей станции, на которой установлено ПО QuantaSoft 1.7.4.
- Утилизация планшета выполняется в соответствии с применимым местным, региональным или федеральным законодательством, нормами и правилами.

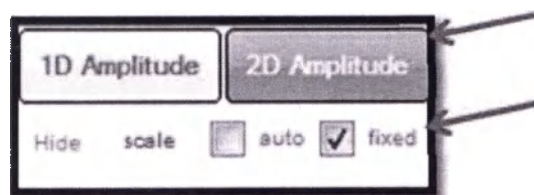
АНАЛИЗ

Загрузите файл с расширением .qfr, который сгенерировал считыватель капель, и выберите пункт Analyze на панели слева.

- Убедитесь в том, что события являются допустимыми.
 - Выберите все лунки.
 - Нажмите кнопку Events, поставьте галочку в поле Total.



- в. Лунки, которым соответствует менее 10 000 принятых событий, исключаются из последующего анализа.
- г. Запишите все исключенные лунки.
2. Подготовьтесь к диагностике неисправностей.
 - а. Нажмите кнопку **2D Amplitude**
 - б. Нажмите **Options**, а затем **fixed**, чтобы заблокировать ось прибора.



3. Выполните верификацию положительных контролей и пороговых значений.
 - а. Выберите лунки с сильноположительными образцами.
 - б. Настройте пороговые значения примерно на 1/3 между отрицательным и положительным кластером для каждого канала. Построенный двухмерный график должен выглядеть, как показано на рис. 9.

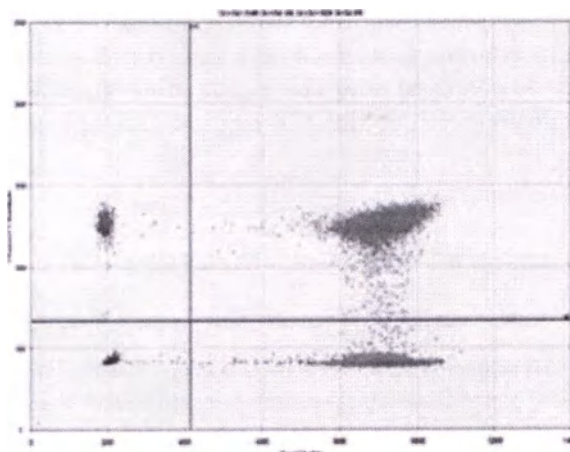
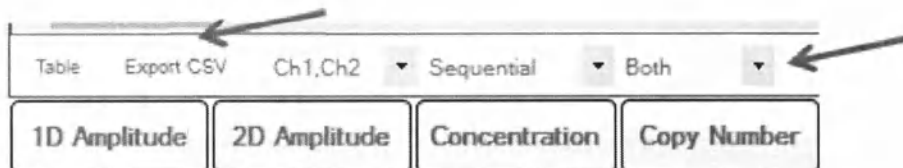


Рис. 9: Двухмерный график, положительный контроль.

- в. Запишите пороговые значения.
4. Настройте пороговые значения для всего планшета.
 - а. Выберите все лунки.
 - б. Примените пороговые значения, общие для всего планшета, к выбранным лункам, выполнив их настройку на уровне пороговых значений сильноположительных образцов.
5. Проверьте пороговые значения других контролей и калибраторов.
 - а. Отсутствует ДНК-мишень — Если обнаружено более чем 10 копий ABL или 1 копия BCR-ABL, прекратите работу.
 - б. Прочие образцы неизвестного происхождения — убедитесь, что линии пороговых значений не проходят через кластеры.
6. Изучите пороговые значения для образцов неизвестного происхождения
 - а. Убедитесь, что линии пороговых значений не проходят через кластеры.
 - б. Проверьте образцы на предмет любых признаков нестандартного фенотипа.
 - о Примеры нестандартного фенотипа см. в Приложении.
 - в. Лунки, вызывающие подозрения, исключите из дальнейшего анализа, либо скорректируйте пороговые значения, если необходимо.

Экспорт данных

1. Сначала выберите все лунки, а затем выберите те, которые нужно исключить, и щелкните по ним, нажав Ctrl+.
2. Выберите пункт **Both** из выпадающего меню и нажмите **Export CSV**, чтобы сохранить данные в объединенном или двухлуночном формате как файл с расширением .csv.



Все образцы, по которым принято несколько лунок, объединяются на уровне цифровой капельной ПЦР. Если для образца тест прошла только одна лунка, она регистрируется в однолуночном формате. Цифровое объединение лунок представляет собой высокоточный метод агрегирования данных, отличающийся максимальной чувствительностью и робастностью измерений.

Результаты

В файле CSV содержатся данные в виде таблицы. Каждой строке таблицы соответствует отдельный образец (объединенный или не объединенный). Если применяется объединение, оно отражается в обозначении лунки, которое принимает вид Mxx. Если лунки не объединялись, обозначение лунки остается прежним (A01, A02 и др.). Колонка с заголовком Ratio содержит данные о соотношении копий BCR-ABL/ABL. Соотношение %IS и MR вычисляется по следующим формулам:

$$\%IS = \text{Отношение} \times 100 \times CF$$

$$MR = \log_{10}(100\%IS) - \log_{10}(\%IS) = 2 - \log_{10}(\%IS)$$

CF — коэффициент пересчета по партии, который указывается во вкладыше набора.

Если какие-либо лунки исключались, для некоторых образцов может регистрироваться только одна лунка. Результаты (BCR-ABL и ABL) по таким отдельным лункам сохраняются в виде файла CSV под результатами объединенных лунок.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроли

Набор поставляется с тремя контролями. Чтобы образцы неизвестного происхождения были зарегистрированы, они должны отвечать следующим критериям:

Имя контрольного образца	Назначение	Предполагаемые результаты
Hi Pos	Сильноположительный контроль	MR0,3-MR1 (10%-50%IS)
Neg	Отрицательный контроль	Neg. (менее MR5,3 / 0,0007%IS)
Lo Pos	Слабоположительный контроль	MR3-MR5 (0,001-0,1%IS)

Калибраторы

В набор входят два калибратора. Они предназначены для валидации количественного анализа, выполняемого с помощью набора. Значения, полученные для каждого калибратора, не изменяют регистрируемые значения для образцов неизвестного происхождения. Убедитесь, что регистрируемые значения %IS следующие:

Имя калибратора	Предполагаемые результаты
~0,1% IS	Между минимальным и максимальным значениями, указанными во вкладыше.
~10% IS	Между минимальным и максимальным значениями, указанными во вкладыше

Схема прослеживаемости калибраторов к стандартам ВОЗ



Калибраторы используются для подтверждения того, что анализ прослеживается к стандартам Первой международной эталонной панели ВОЗ по вопросам генетики.

Образцы неизвестного происхождения

Данный тест позволяет использовать 2 и более лунок на образец неизвестного происхождения. По каждой лунке должно быть зарегистрировано минимум 10 000 копий ABL **согласно рекомендациям Кросса⁶**. Можно использовать лунки с менее чем 10 000 копий, однако это может стать причиной низкой чувствительности для выбранного образца. При цифровом объединении лунок все копии транскриптов ABL и BCR-ABL агрегируются между всеми теми лунками, которые используются для вычисления общего отношения копий BCR-ABL/ABL, выраженного как уровень %IS и MR. При необходимости можно выполнить дополнительные проверки на предмет соответствия между лунками.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: В случае если валидируется только одна лунка на образец, число копий ABL может оказаться недостаточным для оценки уровня MR. Для верификации чувствительности проверьте число копий ABL на лунку в файле CSV.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если тест с контрольными образцами и калибраторами пройден, результаты по образцам неизвестного происхождения могут быть зарегистрированы. В целом, использование большего числа лунок на образец позволяет добиться большей чувствительности.

Европейская сеть по изучению лейкозов (ELN) дает следующие рекомендации:

BCR-ABL (IS)	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	>12 месяцев
>10%				
1%–10%				
0,1% – <1%				
<0,1%				

Код	Клиническая ценность
КРАСНЫЙ	Мутационный анализ оценки комплаентности пациента и взаимодействия лекарственных средств
ЖЕЛТЫЙ	Мутационный анализ оценки комплаентности пациента и взаимодействия лекарственных средств
ЗЕЛЕНый	Мониторинг отклика и побочных эффектов

ДИАГНОСТИКА НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Цифровая капельная ПЦР — это технология, позволяющая с высокой чувствительностью, робастностью и достоверностью обнаруживать и характеризовать проблемы с образцом, реакциями или оборудованием. Ниже приведены наиболее распространенные типы неисправностей с соответствующими фенотипами, описаниями и предлагаемыми способами устранения.

Разрушение капель — некоторые капли разрушились, в основном во время считывания (см. рис. 10).

Меры: Не пользоваться данными; исключить лунки. Если проблема сохраняется, проверьте образец на предмет загрязнения твердыми частицами.

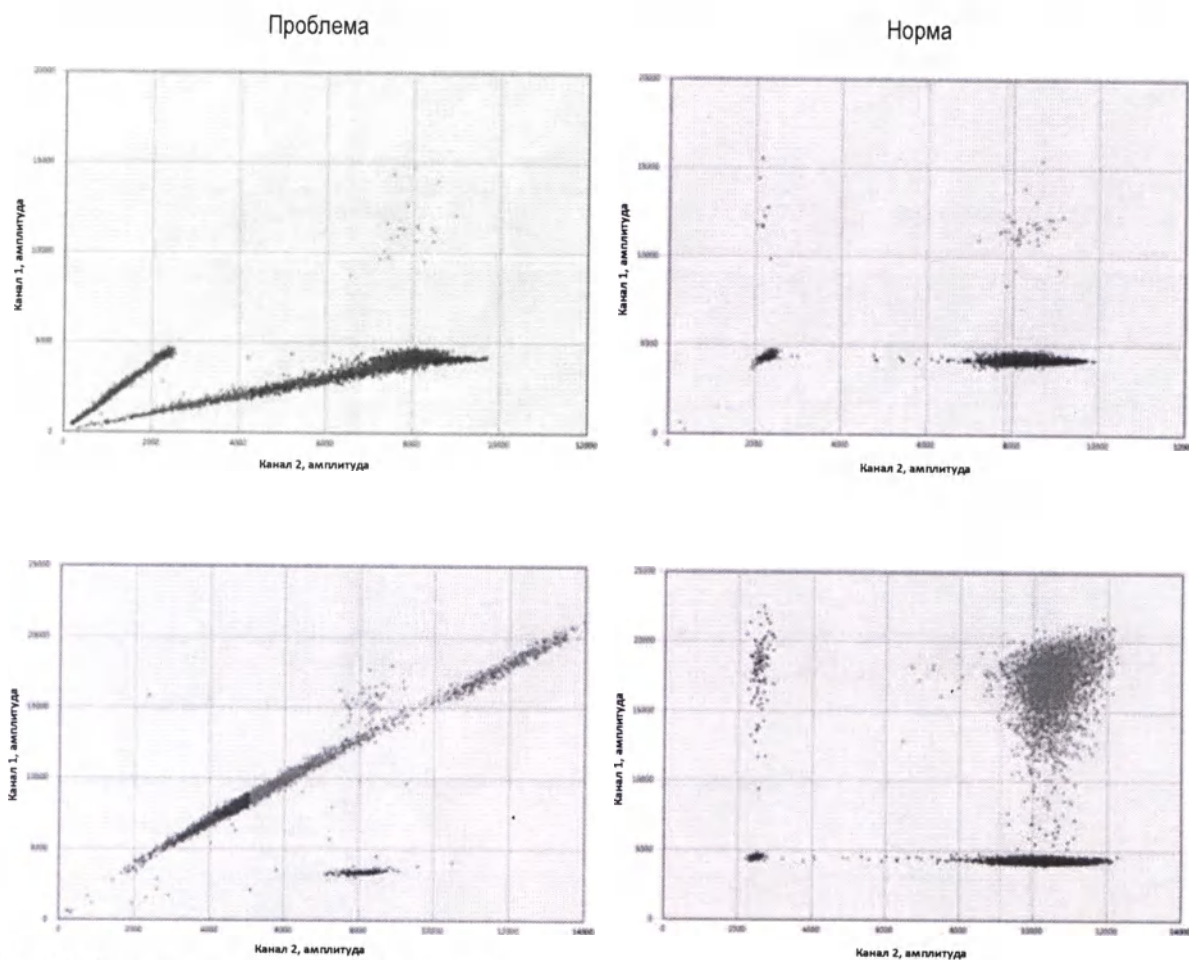


Рис. 10: Разрушение капель — Проблема vs Норма

Разбитые кластеры — популяции каплей не разделены достаточно четко, как правило, из-за проблем с реакцией обратной транскриптазы (см. рис. 11).

Меры: По возможности скорректируйте пороговые значения для лунок; как правило, значения не меняются значительно. В противном случае исключите лунки.

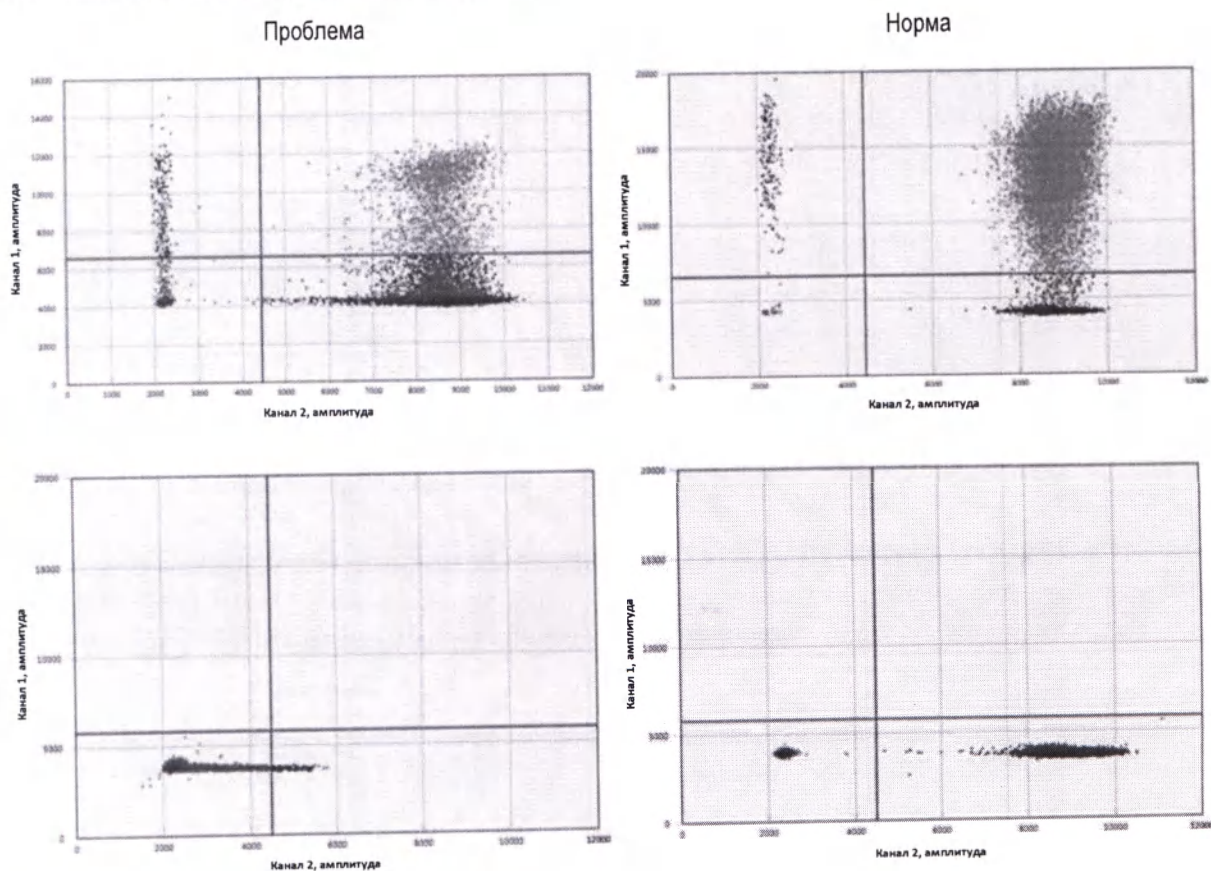


Рис. 11: Разбитые кластеры — Проблема vs Норма

Симметричность — капли представлены в двух разных размерах (см. рис. 12).

Меры: Исключите лунки из анализа.

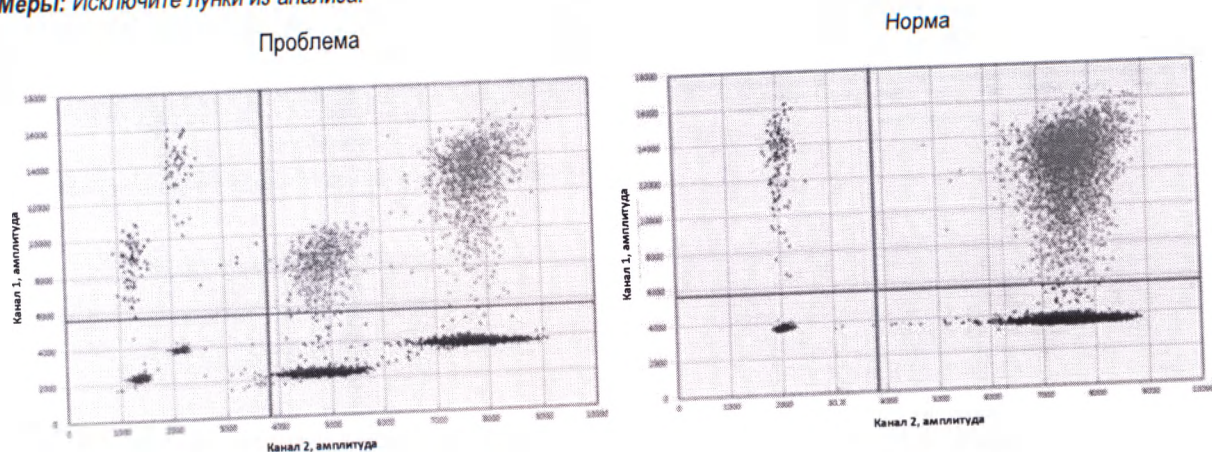


Рис. 12: Симметричность — Проблема vs Норма

Неисправность термоциклера — абберации температурного профиля снижают качество ПЦР (см. рис. 13).

Меры: Исключите лунки из анализа. Проверьте характеристики термоциклера.

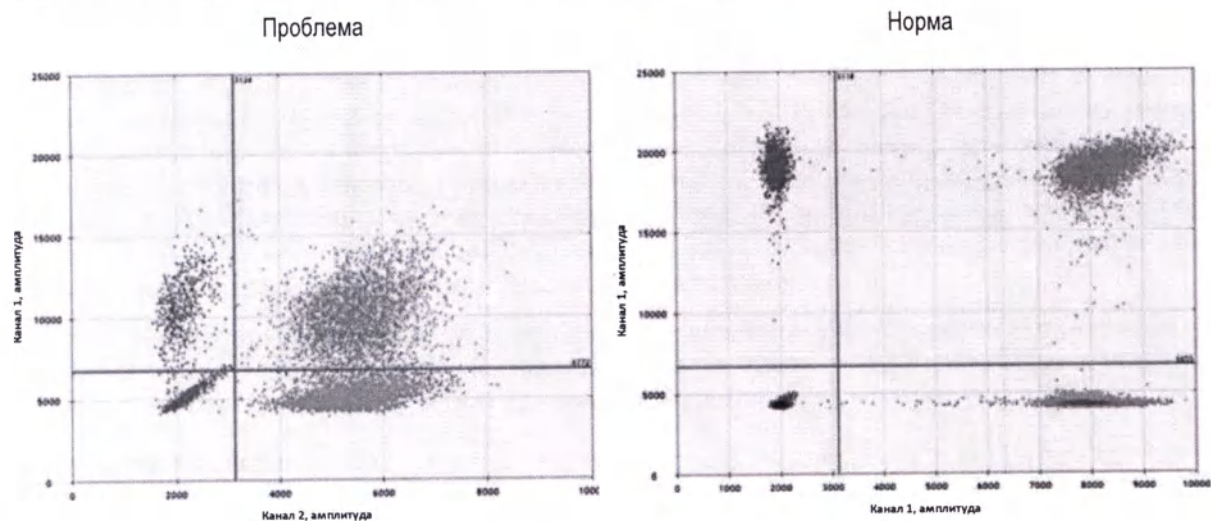


Рис. 13: Термоциклирование — Проблема vs Норма

Повреждение пленки планшета — пленка планшета повреждена, и в результате испарения капли приобрели разный объем (см. рис. 14)

Меры: Исключите лунки из анализа. Проверьте характеристики термоциклера.

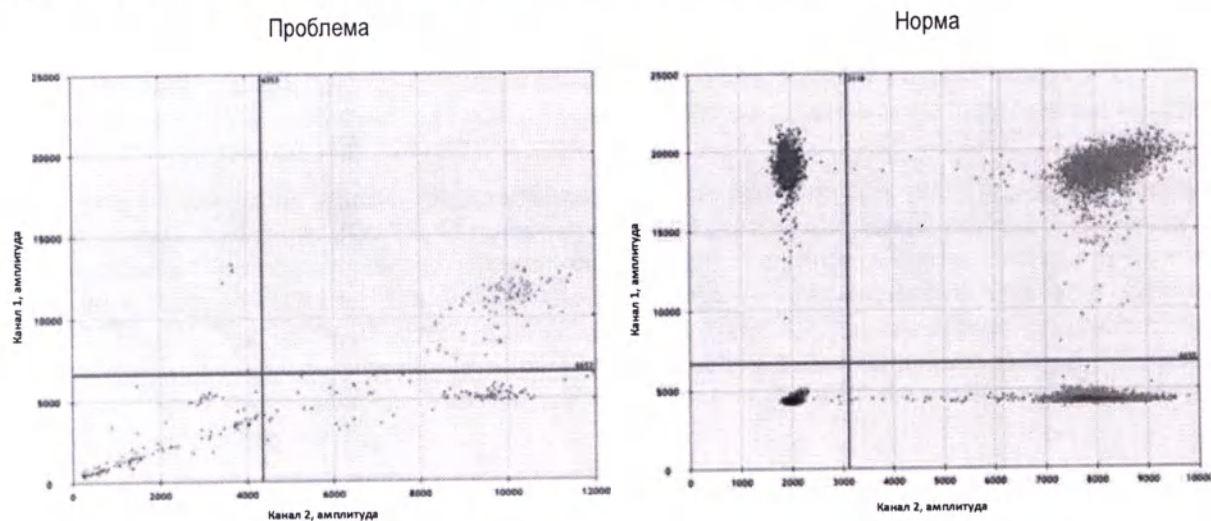


Рис. 14: Повреждение пленки планшета — Проблема vs Норма

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Максимальное значение для холостой пробы (LoB)

Данное исследование было проведено в соответствии с требованиями документа CLSI EP17-A2 Оценка способности к обнаружению для методик измерения, используемых клиническими лабораториями. Использовались 36 образцов, отобранных от разных партий РНК пациентов, не больных лейкозией, с отрицательными результатами на наличие BCR-ABL. Каждый образец с отрицательными результатами проходил тестирование в 2-луночном формате с использованием 1 прибора, 1 оператора, 2 партий в течение более 3 дней, общее число независимо проведенных измерений 72. Все результаты были классифицированы по общему числу обнаруженных копий BCR-ABL. 95% квантиль находился между образцами классов 68 и 69, в каждом из которых не было ни одной копии BCR-ABL. Таким образом, значение LoB при 95% составляло 0 копий BCR-ABL на 2 лунки.

Кроме того, 48 образцов без ДНК-мишени (NTC) проходили тестирование в 2 лунках с использованием 1 прибора, 1 оператора, 2 партий и 3 тестов. Образцы были классифицированы по общему числу обнаруженных копий BCR-ABL. 95% квантиль находился между классами 46 и 47. Для обеих партий значение LoB составляло 0 копий BCR-ABL.

Предел детектирования (LoD)

Данное исследование было проведено в соответствии с требованиями документа CLSI EP17-A2 Оценка способности к обнаружению для методик измерения, используемых клиническими лабораториями. Три пула образцов BCR-ABL РНК пациентов с положительными результатами были подготовлены к получению значения MR ок. 4,0. В пуле 1 находилась смесь из 15 образцов пациентов с положительными результатами на наличие вариантов E13a2 и/или E14a2. В пуле 2 находились 5 образцов пациентов с положительными результатами на наличие варианта E13a2. В пуле 3 находились 5 образцов пациентов с положительными результатами на наличие варианта E14a2. Был подготовлен один пул образцов BCR-ABL РНК, который использовался для разведения пулов образцов с положительными результатами. Каждый пул образцов с положительными результатами подвергался последовательному разведению пулом образцов с отрицательными результатами. Полученные значения MR находились в интервале от 4,0 до 6,0. Разведенные образцы проходили тестирование в виде 20 повторных образцов: 1 оператор, 1 система, 4 независимых партии, 2 лунки на тест. Методом пробит-анализа было получено LoD при доверительном интервале 95% и MR 4,7 (0,002%IS).

Кроме того, анализировался образец, предоставленный Коллегией патологов США (CAP) в рамках программы проверки квалификации MR 4,7 (CAP), в 60 одинарных лунках (20 независимых реакций обратной транскриптазы, каждая включает 3 независимых реакции цифровой капельной ПЦР, 1 оператор, 1 партия, 1 прибор). Цифровое объединение отдельных лунок в тест 1-луночного, 2-луночного и 4-луночного формата позволило достигнуть одного и того же LoD при MR 4,4 в 1-луночном формате, одного и того же LoD при MR 4,7 в 2-луночном формате и одного и того же LoD при MR 5,0 в 4-луночном формате. Тест в 1-луночном и 4-луночном формате с использованием одних и тех же данных, полученных пробит-анализом, позволили получить LoD при MR 4,4 и MR 5,0 для теста в 1-луночном 4-луночном формате, соответственно.

	1 лунка	2 лунки	4 лунки
Значение %IS	0,004	0,002	0,001
MR	4,4	4,7	5,0

Предел количественного определения (LoQ)

Предел количественного определения (LoQ)

Данное исследование было проведено в соответствии с требованиями документа CLSI EP17-A2 Оценка способности к обнаружению для методик измерения, используемых клиническими лабораториями. Использовался тот же набор образцов и экспериментов, как и в случае исследования на LoD. Интервал разведений составлял от MR 4,0 до MR 6,0. Измеренное значение %CV было ниже 76%, обусловленное MR 4,7 (0,002%IS). Предел количественного определения составлял MR 4,7 (0,002%IS) для в 2 лунки. Кроме того, были получены значения (0,0045%IS) или MR 4,34 в 1-луночном формате, 0,0008%IS или MR 5,0.

Нижний предел Предел количественного определения (LoQ).

Общий коэффициент вариации не должен превышать 50% минимальной концентрации аналита в образце:

о при MR 0,3-2,49 ≤ 10%

о при MR 2,5-3,49 ≤ 20%

о при MR 3,5-4 ≤ 50%

о при MR 4-5 ≤ 76%

Прецизионность

Прецизионность была верифицирована как $SD \leq 0,25$ для значений $MR \leq 4,6$. Данное исследование было проведено в соответствии с требованиями документа CSLI EP5-A3 Оценка точности методик количественного измерения. Исследование проводилось в течение 3 дней, с использованием 2 приборов и 3 партий реагентов, 2 оператора, 3 тестирования повторных образцов. Тестировались образцы при 8 разных значениях %IS — MR0,7; MR1,4; MR2,4; MR2,8; MR 3,3; MR 3,6; MR 4,1 и MR 4,6. В таблице 7 приведены измеренные общие значения сходимости в единицах MR и %IS.

Идентификатор образца	N	Среднее значение MR	Общая точность MR		Среднее значение %IS	% BCR-ABL	Общая точность
			Средне-квадратичное отклонение	%CV		Средне-квадратичное отклонение	%CV
MR1	108	1,40	0,031	2,214	3,98	0,277	6,977
MR2	108	2,47	0,046	1,862	0,34	0,035	10,346
MR2,5	108	2,80	0,049	1,750	0,16	0,018	11,132
MR3	108	3,31	0,081	2,447	0,05	0,009	18,000
MR3,5	108	3,63	0,103	2,837	0,02	0,005	22,314
MR4	108	4,13	0,165	3,995	0,0079	0,003	36,709
Контроль линии клеток 1	108	0,73	0,017	2,329	18,73	0,714	3,815
Контроль линии клеток 1	108	4,66	0,251	5,386	0,0023	0,002	69,565

Таблица 7: Выводы

Коэффициент вариации должен быть меньше 15%.

Линейность

Линейность была продемонстрирована в интервале от не менее MR 0,3 (50%IS) до MR 4,7 (0,002%IS). Данное исследование было проведено в соответствии с требованиями документа CSLI EP6-A2 Оценка линейности методик количественного измерения. 10 CML-положительных образцов человеческого происхождения с двумя транскриптами e13 и e14 (по 5 на каждый) подвергались перемешиванию и разведению, чтобы получить CML-отрицательный образец человеческой крови. Степень разведения находилась в интервале от MR0,3 (50 %IS) до MR4,7 (0,002%IS). В смесь e14 дополнительно добавлялась РНК, извлеченная из неактивной линии клеток 3t3 с положительными результатами, и нормализовывалась до 100 нг/мкл. Тестирование выполнялось с использованием двух термоциклеров и двух ридеров капель в течение 4 дней, 1 оператор. Смеси e13 и e14 продемонстрировали линейность при $R^2 = 0,996$ для обоих случаев (см. рис. 15 и 16). Измеренный наклон кривой составлял 1,03 и 1,04 соответственно. Также выполнялась оценка аппроксимации с помощью полинома 2-го и 3-го порядка. Для аппроксимации 2-го порядка абсолютное отклонение от линейности 1-го порядка составило $\leq 0,09$ MR по всем уровням.

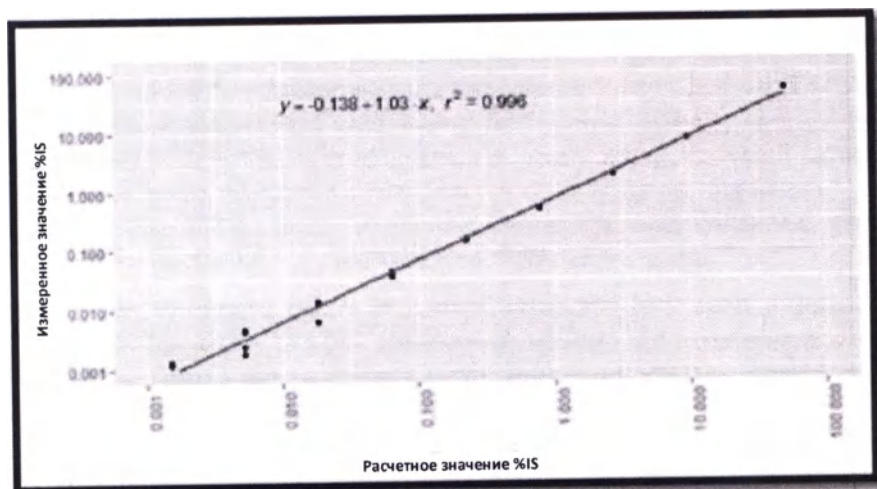


Рис. 15: Линейность e13a2

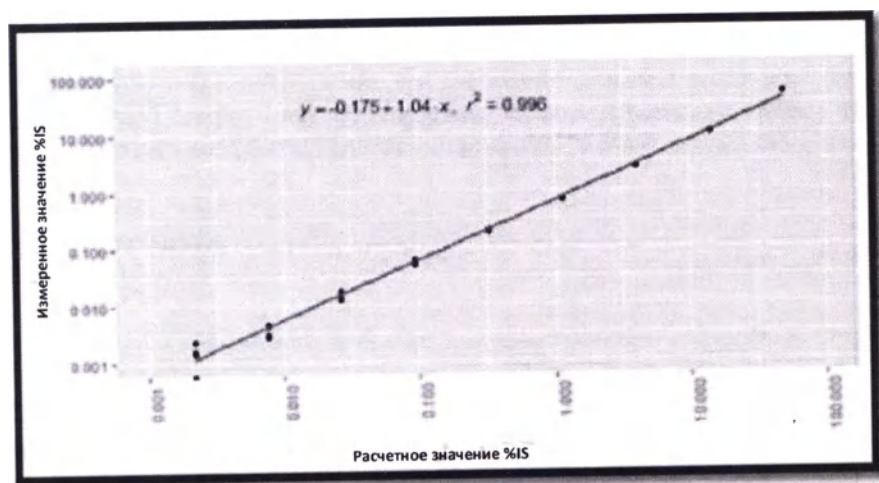


Рис. 16: Линейность e14a2

РЕГИСТРИРУЕМЫЙ ДИАПАЗОН

Регистрируемый интервал составляет от верхнего порогового значения MR0,3 (50%IS) до LoQ MR4,7 (0,002%IS) для 2 пунок.

Прослеживаемость

Прослеживаемость к требованиям Основных эталонных материалов ВОЗ верифицировалась при наклоне кривой 1,0 и значении свободного члена 0,0–0,1. Прослеживаемость к требованиям Первой международной эталонной панели ВОЗ по генетике в отношении количественного определения транслокации BCR-ABL методом количественной ПЦР реального времени (код NIBSC: 09/138) была продемонстрирована с использованием 3 партий калибраторов и 5 партий независимых реагентов. Измеренные значения сопоставлялись со значениями, опубликованными в Руководстве по эксплуатации (NIBSC, 2012). Каждый из 4 членов Эталонной панели ВОЗ провел тестирование 5 партий реагентов, 4 повторных образца, 5 тестирований (1 тестирование на партию).

Измеренные значения MR по каждому уровню Эталонной панели ВОЗ были скорректированы с использованием общего поправочного коэффициента CF=0,93. Измеренные значения MR сопоставлялись с опубликованными значениями MR с использованием дополнительного регрессионного анализа для определения значений наклона кривой и свободного члена. Анализ продемонстрировал превосходную корреляцию со значениями $R^2 = 1,0$. Значения наклона кривой находились в интервале от 0,98 и 1,04, а значения свободного члена — в интервале от -0,06 до 0,07.

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность позволяет обнаруживать транскрипты BCR-ABL1 типов e13a2 и e14a2 без перекрестных реакций с транскриптами e1a2 (p190) и e19a2 (p230) до уровня MR5,0. Были подготовлены два (2) образца как смесь транскриптов p190 или p230, приготовленная *in vitro*, с РНК, извлеченной из нормальной крови человека, полученной от двух доноров. Были выполнены четыре (4) разведения каждого образца, отличающиеся по количеству РНК с отрицательными результатами, для достижения уровней в диапазоне 0,005–30%. Все образцы тестировались в условиях: 1 прибор, 1 партия, 1 оператор, минимум 4 повторных образца. По результатам всех измерений было получено значение 0,000%IS для транскриптов e13a2 и e14a2. Данный набор соответствует значению MR5,0.

Интерферирующие вещества

Эндогенные

Влияние структурно не связанных веществ, например эндогенных компонентов крови (белки и липиды), а также экзогенных молекул, например антикоагулянтов, на работу набора QXDx™ BCR-ABL %IS определялось методом извлечения РНК из образцов цельной крови в присутствии и отсутствии таких веществ. Потенциально интерферирующие вещества добавлялись в образцы цельной крови перед извлечением РНК. По каждому интерферирующему веществу тестировался контрольный образец без добавления этого интерферирующего вещества.

И для контрольных, и для тестовых образцов выполнялось извлечение РНК из 5 повторных образцов с использованием набора Promega Maxwell CSC RNA Blood Kit. После извлечения РНК измерялась оптическая плотность при 260 нм, а повторные образцы были скорректированы до значения 100 нг/мкл за счет добавления ДНК в виде суспензии, по мере необходимости. Каждый образец с извлекаемой РНК тестировался попарно, всего 10 тестов на каждое интерферирующее вещество. Ни по одному из протестированных веществ интерференция не наблюдалась.

Тестирование эндогенных веществ

Тест	N	%IS в пределах коэффициента вариации %CV для тестирования	Среднее значение %IS	Доверительный интервал %IS 95%	Попадает ли тестовый интервал в интервал точности?
Холестерин	10	36,5	0,005%	0,002% – 0,007%	Да — пройдено
Конъюгированный билирубин	10	36,5	0,007%	0,004% – 0,01%	Да — пройдено
ЭДТА	10	10,7	0,094%	0,075% – 0,113%	Да — пройдено
Гемоглобин	10	17,9	0,045%	0,041% – 0,049%	Да — пройдено
Гепарин	10	10,7	0,100%	0,088% – 0,112%	Да — пройдено
Триглицериды	10	36,5	0,004%	0,002% – 0,006%	Да — пройдено
Неконъюгированный билирубин	10	37	0,005%	0,002% – 0,007%	Да — пройдено

Тестирование экзогенных веществ

Тест	Измеренное среднее значение MR	Доверительный интервал MR 95%	Допустимый интервал MR (Доверительный интервал контрольного образца $\pm 0,5 \text{ Log}$)	Результаты (Попадает ли доверительный интервал тестового образца в доверительный интервал контрольного образца $\pm 0,5 \text{ Log}$?)
Гуанидиновый лизирующий буфер	3,57	3,49 – 3,68	3 – 4,09	ПРОЙДЕНО
Этанол	3,5	3,45 – 3,56	3 – 4,09	ПРОЙДЕНО
Фенол	3,53	3,46 – 3,63	3 – 4,09	ПРОЙДЕНО
Буфер для финальной промывки	3,53	3,47 – 3,59	3 – 4,1	ПРОЙДЕНО
Геномная ДНК	3,58	3,53 – 3,63	3 – 4,1	ПРОЙДЕНО

Входящая РНК

Для определения требований к входящей РНК были созданы четыре (4) образца РНК смешиванием РНК из одного (1) образца донорской крови с отрицательными результатами с четырьмя (4) пулами РНК, два (2) пациента на каждый пул, извлеченной из донорской крови с CML-положительными результатами. Образцы разводились до концентрации 200 нг/мкл, тестирование проходили образцы разного объема для получения 125–1500 нг входящей РНК. По всем образцам были получены эквивалентные результаты до 125 нг/мкл на одно тестирование, однако при меньших значениях входящей РНК наблюдалось снижение точности.

Группа MR	Входящая РНК (нг)	+/-n тестов	Среднее значение IS	Коэффициент вариации IS	Среднее значение MR	Среднеквадратичное отклонение MR
MR1	125,0	4/4	17,844%	0,84	0,75	0
MR1	250,0	4/4	18,056%	1,46	0,74	0,01
MR1	500,0	4/4	18,698%	0,91	0,73	0
MR1	1000,0	4/4	17,138%	0,72	0,77	0
MR1	1500,0	4/4	14,840%	1,47	0,83	0,01
MR2	125,0	4/4	0,879%	9,75	2,06	0,04
MR2	250,0	4/4	0,969%	6,44	2,01	0,03
MR2	500,0	4/4	1,016%	0,51	1,99	0
MR2	1000,0	4/4	0,972%	3,95	2,01	0,02
MR2	1500,0	4/4	0,966%	3,27	2,02	0,01
MR3	125,0	8/8	0,087%	24,76	3,06	0,12
MR3	250,0	8/8	0,085%	13,09	3,07	0,05
MR3	500,0	8/8	0,096%	9,06	3,02	0,04
MR3	1000,0	8/8	0,092%	12,58	3,04	0,06
MR3	1500,0	8/8	0,084%	16,09	3,08	0,07
MR4	125,0	8/8	0,017%	55,73	3,77	0,28
MR4	250,0	8/8	0,012%	27,54	3,92	0,12
MR4	500,0	8/8	0,018%	28,08	3,74	0,15
MR4	1000,0	8/8	0,016%	32,7	3,81	0,17
MR4	1500,0	8/8	0,014%	20,96	3,87	0,09

КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Тридцать четыре (34) клинических образца были собраны и протестированы в независимой европейской лаборатории. Соблюдались стандартные лабораторные процедуры тестирования и анализа образцов методом количественной ПЦР, калибровка выполнялась в соответствии с международными стандартами ВОЗ. Тестирование QXDx BCR-ABL %IS выполнялось в 4 лунках. Анализ данных выполнялся в 4-луночном формате и с 6 повторными образцами 2-луночного формата (описание формата см. на рис. 17). На материале 6 повторных образцов в 2-луночном формате была получена превосходная воспроизводимость, максимальный коэффициент вариации 46% (в единицах %IS) для образцов со значением MR, близким к 4.0, сопоставимая со значениями, полученными по данным анализа воспроизводимости.

Совпадение между результатами клинических тестов на количественную ПЦР, разработанных в лаборатории, и теста с использованием набора QXDx BCR-ABL %IS, была также превосходной: $R^2 = 0,976$, наклон кривой 1,03. Совпадение значений MMR (MR3 или 0,1%IS) было превосходным при 98%. Был обнаружен один несоответствующий образец (0,35 log).

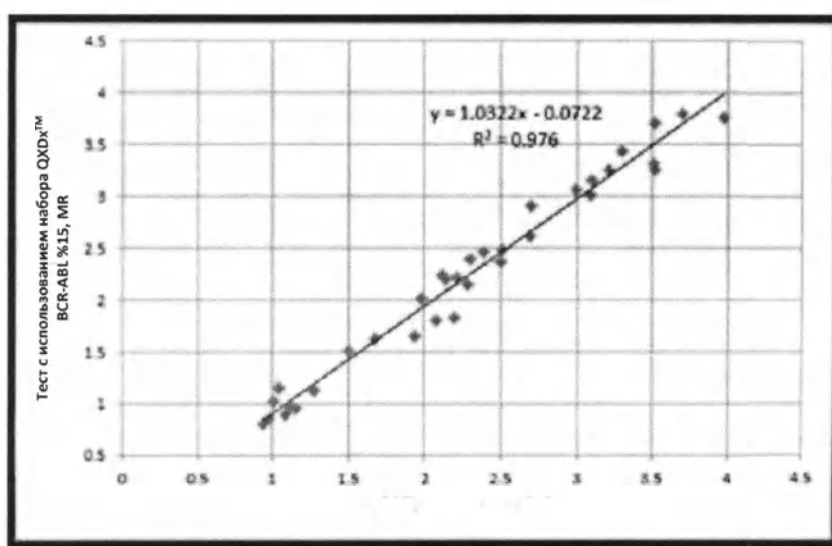


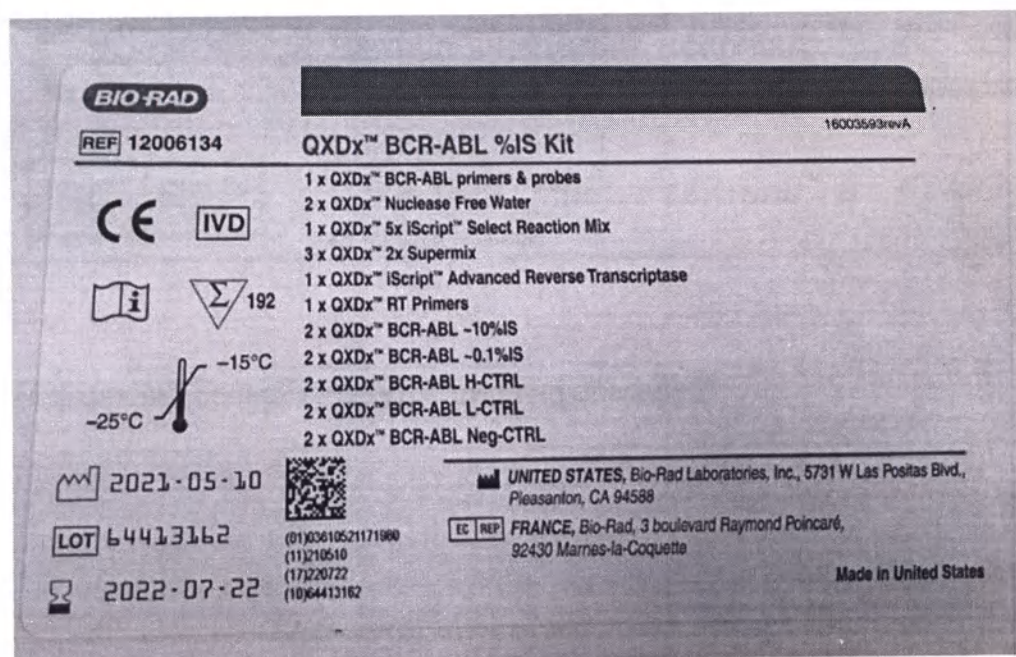
Рис. 17: Клинические характеристики

ОГРАНИЧЕНИЯ

Данный тест разработан только для обнаружения слитых транскриптов e13a2 и e14a2, а не транскриптов e1a2, e19a2 или других редких транскриптов, обусловленных t(9;22).

МАРКИРОВКА И УПАКОВКА

Маркировка

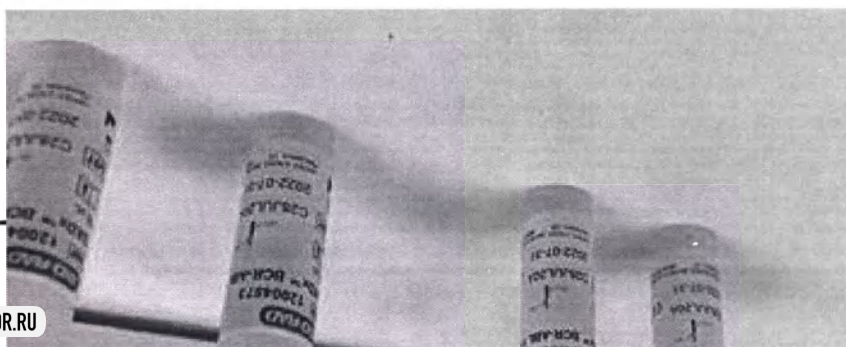
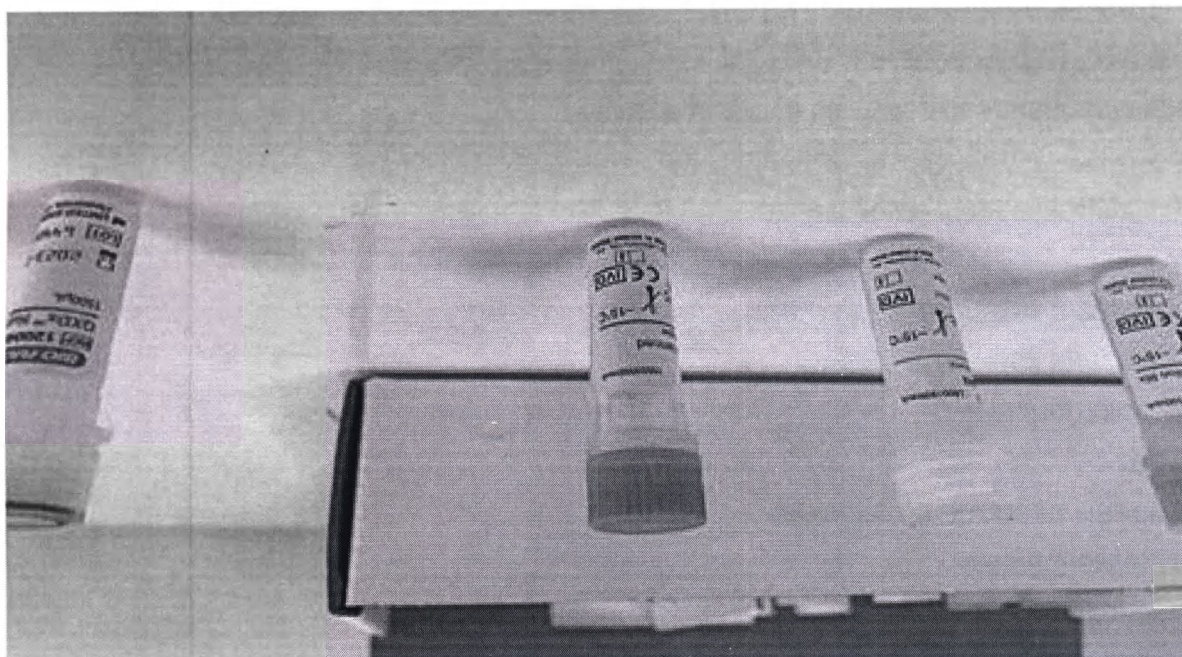


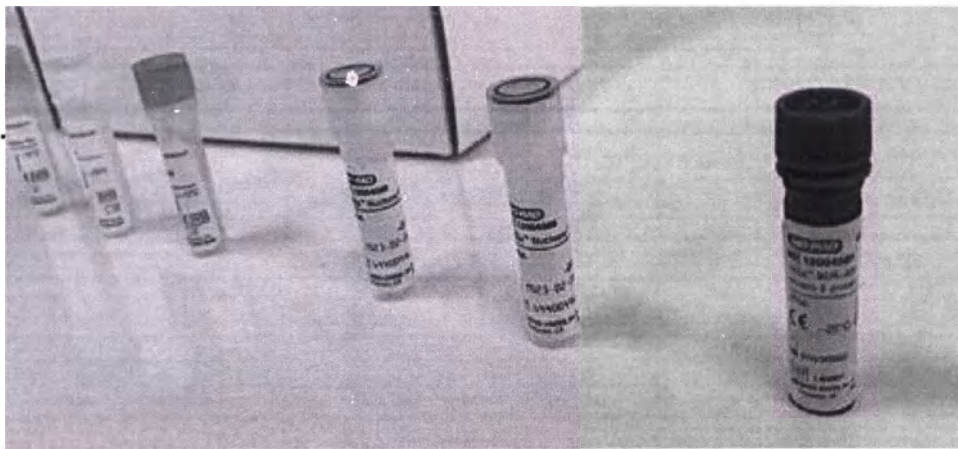
List of symbols are below/Список символов ниже:

Символ	Описание
	Обратитесь к инструкции по применению

	Номер в каталоге
	Дата изготовления
	Лот
	Годен до
	Изготовитель
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимое достаточно для проведения
	Данное изделие соответствует основным требованиям соответствующей директивы ЕС
	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе

Маркировка содержит следующую информацию:





Маркировка содержит следующую информацию:

- логотип Bio-Rad
- данные о контроле качества
- срок годности
- условия хранения
- наименование
- объем реагента во флаконе
- лот
- срок годности
- условия хранения
- номер в каталоге

Маркировка на русском языке

наименование изделия на русском языке

- о месте производства
- страна происхождения
- номер по каталогу
- лот
- дата и номер регистрационного удостоверения
- маркировку в соответствии с данными деклараций соответствия
- предупреждающие и информационные надписи и обозначения

Примечание: фактическое содержание маркировки может отличаться от представленной ниже.

12006134

IVD

Набор реагентов для количественного анализа транскриптов ДНК (BCR-ABL1 ABL1) в общем объеме РНК в цельной крови пациентов методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR), в составе:

1. Смесь праймеров и зондов набора QXDx BCR-ABL, 250 мкл в 1 флаконе – 1 флакон;
2. QXDx Вода, не содержащая нуклеаз, 1500 мкл в 1 флаконе – 2 флакона.
3. Смесь QXDx 5x iScript Select Reaction, 500 мкл в 1 флаконе – 1 флакон;
4. Смесь QXDx 5x iScript Advanced Reverse Transcriptase, 125 мкл в 1 флаконе – 3 флакона;
5. Набор для обратной транскрипции QXDx iScript Advanced Reverse Transcriptase, 125 мкл в 1 флаконе – 1 флакон;

Информация об упаковке

Вторичная упаковка: картонная коробка

Размеры вторичной упаковки: (82.55 x 184.15 x 50.80) $\pm 5\%$ мм

Вес: (0.300 кг) $\pm 5\%$

СРОК ГОДНОСТИ

Максимальный срок годности – 12 месяцев

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Набор расходных материалов подлежит транспортировке и хранению при соблюдении условий, указанных ниже

- Все компоненты должны храниться в морозильной камере при постоянной температуре в интервале от -25 до -15°C .

•

RT должна храниться в морозильной камере до использования, а после использования — снова возвращаться в морозильную камеру.

- Берегите смесь праймер/зонд BCR-ABL1/ABL1 от длительного воздействия солнечного света, храните при комнатной температуре.
- Тщательно перемешайте смесь праймер/зонд BCR-ABL1/ABL1 до однородного состояния, избегайте образования пузырьков.
- Перед тем как открывать все остальные флаконы, выполните их бережное перемешивание в вихревой мешалке и центрифугирование.
- Не используйте вихревую мешалку для перемешивания флаконов с калибраторами или контролями.

- Не допускается выполнять более 5 циклов заморозки/разморозки супермиксов QXDx.
- Срок годности каждого реагента указан на соответствующей этикетке.

СТЕРИЛЬНОСТЬ

Не применимо. Изделие поставляется не стерильным.

Перечень национальных и международных нормативных документов, которым соответствует медицинское изделие

Номер стандарта	Описание
ГОСТ ISO 13485-2016	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ ISO 14971:2012	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
ГОСТ Р EN 13640:2002	Исследование стабильности реагентов для диагностики in vitro
EN 13975:2003	Процедуры отбора проб, используемые для приемных лабораторных испытаний медицинского диагностического оборудования. Статистические аспекты.
EN ISO 15193:2009	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Измерение величин в образцах биологического происхождения. Требования к содержанию и представлению референтных процедур измерения
EN ISO 15194:2009	Медицинские изделия для in vitro диагностики. Измерение величин в образцах биологического происхождения. Требования к аттестованным стандартным образцам и содержанию сопроводительной документации
EN ISO 17511:2003	Оборудование медицинское для диагностики in vitro. Количественные измерения в биологических образцах. Метрологическая прослеживаемость величин, заданных для калибраторов и контрольных материалов
EN ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования
EN ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для

	диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
EN 62366-1:2015	Изделия медицинские. Часть 1. Провктирование медицинских изделий с учетом эксплуатационной пригодности
EN 15223-1:2016	Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

ПОРЯДОК И УСЛОВИЯ УТИЛИЗАЦИИ

Отходы относятся к классу Б и должны быть утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Компания Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк.", гарантирует качество выпускаемой продукции и соответствие требованиям технической и эксплуатационной документации производителя, а также требованиям нормативной документации.

По вопросам, связанным с качеством продукции, обращаемой на территории РФ обращаться к представителю производителя ООО «БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ»

ПРАВИЛА ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ РЕКЛАМАЦИЙ

Поддержка пользователей осуществляется компанией:

Общество с ограниченной ответственностью "БИО-РАД ЛАБОРАТОРИИ"

Запросы и рекламации могут направляться по адресу:

105064, г. Москва, переулок Нижний Сусальный, д. 5, стр. 5а **СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

1. Baccarani M, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013, 122:872-884
2. Branford S, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 2008, 112:3330-38.
3. Brown JT, et al. Establishment of a standardized multiplex assay with the analytical performance required for quantitative measurement of BCR-ABL1 on the international reporting scale. *Blood Cancer Journal* 2011, 1:e13.
4. Hughes T, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006, 108:28-37.
5. White HE, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* 2010, 116: e111-e117
6. Cross NC et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 May;29(5):999-1003. doi: 10.1038/leu.2015.29
7. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myelogenous Leukemia. v.1.2015.
8. <https://www.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/recommendations/>

ПРИЛОЖЕНИЕ А: ТЕРМОЦИКЛЕРЫ

Требуемые характеристики: Используемые термоциклеры должны иметь следующие характеристики:

- Достоверность: $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$
- Равномерность: $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ между лунками в течение 10 с
- Регулируемая скорость линейного изменения: до $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$
- Интервал температур: $0-100^{\circ}\text{C}$

Термоциклеры: Было проведено исследование, призванное продемонстрировать пригодность термоциклеров для использования вместе с набором QXDx BCR-ABL %IS. Термоциклер, приведенный ниже, отвечает требованиям, указанным выше. В исследовании проводилась оценка следующих 4 термоциклеров:

Термоциклер	Идентификационный номер	Тип	Скорость линейного изменения	Результат
Термоциклер Bio-Rad C1000 Touch™ с модулем Deep Well для 96-луночных планшетов	185-1197	Эталонный	$2^{\circ}\text{C}/\text{с}$	
Термоциклер C1000 Touch с 96-луночным реакционным модулем для быстрого перемешивания	185-1196	Тест	$2^{\circ}\text{C}/\text{с}$	Пройдено
Термоциклер Life Technologies Veriti Dx, 96-луночный, 0,2 м	4452300	Тест	$2^{\circ}\text{C}/\text{с}$ (скорость линейного изменения 93%)	Пройдено
Eppendorf Mastercycler® Pro, с панелью управления, 230 В / 50–60 Гц	6321000515	Тест	Скорость линейного изменения 20%	Пройдено

Для каждого образца вычислялся допустимый интервал как среднее значение MR, полученное с помощью эталонного термоциклера (Bio-Rad C1000 Touch с модулем Deep Well для 96-луночных планшетов) $\pm 0,5 \log$. Все образцы, задействованные в тестировании, попадают в доверительный интервал 95%.

Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк."

Для получения подробной информации свяжитесь с ближайшим представителем компании Bio-Rad Laboratories, Inc. / "Био-Рад Лабораториес, Инк." или посетите сайт www.bio-rad.com/diagnostics

Группа клинической диагностики

Австралия, Bio-Rad Laboratories Pty Ltd, Level 5, 440 Victoria Road, Gladesville NSW 2111 • Телефон 61-2-9914-2000 • Телефон 61-2-9914-2000
 Бельгия, Bio-Rad Laboratories Group B.V., Houtlandseweg 88D-6, A-1200 Willebroek • Телефон 32-2-737-6001 • Телефон 32-2-737-6000
 Бразилия, Bio-Rad Laboratories N.V., Willebroekseweg 88D-6, A-1200 Willebroek • Телефон 32-2-737-6001 • Телефон 32-2-737-6000
 Великобритания, Bio-Rad Laboratories (UK) Ltd, The Alderley Edge, 100, Leggo Road, Alderley Edge, Cheshire, M20 9BQ, UK • Телефон 44-161-275-0001 • Телефон 44-161-275-0000
 Германия, Bio-Rad Laboratories GmbH, 3403 Griesheim Street, Griesheim, Hessen 65926 • Телефон 49-69-255-4415 • Телефон 49-69-255-4415
 Гонконг, Bio-Rad Laboratories (Hong Kong) Ltd, 2nd Floor, 910 Chung Hong Road, Block 6, Poly Plaza, Kowloon, Hong Kong, PRC 230120 • Телефон 86-21-5100-0000 • Телефон 86-21-5100-0000
 Италия, Bio-Rad Laboratories, Via S. Maria 111/117, 147 00 Pavia • Телефон 39-0321-430-000 • Телефон 39-0321-430-000
 Япония, Bio-Rad Laboratories, SynGene Science Park, Fuchijung 2, DK-2100 Copenhagen East • Телефон 45-4459-1000 • Телефон 45-4459-1001
 Канада, Bio-Rad Laboratories, 10000 Steeles Avenue East, Unit 100, Richmond Hill, Ontario L4B 1N1 • Телефон 1-800-387-0000 • Телефон 1-800-387-0000
 Франция, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Nanterre-la-Défense • Телефон 33-1-47-00-00-00 • Телефон 33-1-47-00-00-00
 Греция, Bio-Rad Laboratories (Greece) Ltd, 10000 Steeles Avenue East, Unit 100, Richmond Hill, Ontario L4B 1N1 • Телефон 30-210-777-0000 • Телефон 30-210-777-0000
 Испания, Bio-Rad Laboratories S.L., 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 34-91-555-1000 • Телефон 34-91-555-1000
 Италия, Bio-Rad Laboratories S.p.A., 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 39-0321-430-000 • Телефон 39-0321-430-000
 Китай, Bio-Rad Laboratories (China) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 86-21-5100-0000 • Телефон 86-21-5100-0000
 Мексика, Bio-Rad Laboratories S.A. de C.V., 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 52-55-555-1000 • Телефон 52-55-555-1000
 Нидерланды, Bio-Rad Laboratories B.V., 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 31-20-555-1000 • Телефон 31-20-555-1000
 Новая Зеландия, Bio-Rad Laboratories (New Zealand) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 64-9-555-1000 • Телефон 64-9-555-1000
 Норвегия, Bio-Rad Laboratories AS, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 47-22-555-1000 • Телефон 47-22-555-1000
 Польша, Bio-Rad Laboratories Sp. z o.o., 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 48-22-555-1000 • Телефон 48-22-555-1000
 Португалия, Bio-Rad Laboratories Lda, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 351-21-555-1000 • Телефон 351-21-555-1000
 Россия, Bio-Rad Laboratories (Russia) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 7-495-721-1472 • Телефон 7-495-721-1472
 США, Bio-Rad Laboratories, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 1-800-387-0000 • Телефон 1-800-387-0000
 Тайвань, Bio-Rad Laboratories (Taiwan) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 886-2-555-1000 • Телефон 886-2-555-1000
 Украина, Bio-Rad Laboratories (Ukraine) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 380-44-555-1000 • Телефон 380-44-555-1000
 Филиппины, Bio-Rad Laboratories (Philippines) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 63-2-555-1000 • Телефон 63-2-555-1000
 Финляндия, Bio-Rad Laboratories Oyj, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 358-9-555-1000 • Телефон 358-9-555-1000
 Франция, Bio-Rad Laboratories S.A., 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 33-1-555-1000 • Телефон 33-1-555-1000
 Чехия, Bio-Rad Laboratories s.r.o., 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 42-22-555-1000 • Телефон 42-22-555-1000
 Швеция, Bio-Rad Laboratories AB, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 46-8-555-1000 • Телефон 46-8-555-1000
 Швейцария, Bio-Rad Laboratories AG, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 41-41-555-1000 • Телефон 41-41-555-1000
 Таиланд, Bio-Rad Laboratories (Thailand) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 66-2-555-1000 • Телефон 66-2-555-1000
 Южная Африка, Bio-Rad Laboratories (South Africa) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 27-21-555-1000 • Телефон 27-21-555-1000
 Южная Корея, Bio-Rad Laboratories (South Korea) Ltd, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114, 114 P.O. Box 114 • Телефон 82-2-555-1000 • Телефон 82-2-555-1000

BIO-RAD

Дата _____

От компании Био-Рад Лабораториз, Инк.

Мы, Био-Рад Лабораториз, Инк., компания, зарегистрированная по адресу: 4000 Альфред Нобель Драйв, Геркулес, Калифорния 94547, США, настоящим подтверждаем, что прилагаемая инструкция по эксплуатации на русском языке верна, ее содержание соответствует действительности.

С уважением,

Подпись _____ /подпись/

_____ Марио Вейкер _____ / 21 июня 2021 г. _____

Должность

Старший вице-президент по обеспечению качества и нормативно-правовому регулированию

Подпись уполномоченного лица
13 июля 2021 г.

/подпись/
Джордж де ла Роз

Нотариус или другое должностное лицо, заполняющее этот сертификат, проверяет только личность человека, подписавшего документ, к которому прилагается этот сертификат, и не проверяет правдивость, точность или действительность этого документа.

ШТАТ КАЛИФОРНИЯ ОКРУГ АЛАМИДА

Подписал и дал присягу (или подтвердил) в моем присутствии в день
13 июля 2021 г. Джордж де ла Роз

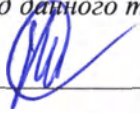
_____ ,
доказав мне на основании достаточных свидетельств, что он является
лицом, находящимся передо мной.

_____ /подпись/
(Подпись нотариуса)

Печать нотариуса
СУНИЛ ДЖАСВАЛ
№ 2233425
КАЛИФОРНИЯ
ОКРУГ АЛАМИДА

_____ /подпись/

Перевод данного текста выполнен переводчиком Котляровым Антоном Игоревичем.



Российская Федерация

Город Москва

Восемнадцатого октября две тысячи двадцать первого года

Я, Родина Ульяна Алексеевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Корсика Владимира Константиновича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Котлярова Антона Игоревича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре № 77/2138-н/77-2021- **46-2411**

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



У.А. Родина

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью **49** лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса

