

29
КОПИЯ

УТВЕРЖДАЮ

ЭнтроГен, Инк.

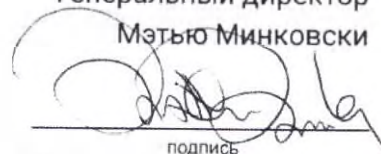
20950 Ворнер центр Лн.,

офис Б, Вудлэнд Хиллс,

Калифорния, 91367, США

Генеральный директор

Мэтью Минковски



подпись

December 13th, 2021

дата

Инструкция по применению медицинского изделия

**“Набор реагентов для in vitro диагностики
наличия мутаций гена BRAF методом
полимеразной цепной реакции в режиме
реального времени в образцах пациентов
фиксированных в формалине и залитых в
парафин, 64 реакции”**

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

CIVIL CODE § 1189

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 LOS Angeles)
 On 12/13/2001 before me, MITRA N. KATZ Notary Public
 Date Here Insert Name and Title of the Officer
 personally appeared Matthew Minkovsky
 Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature [Signature]
 Signature of Notary Public



Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though this section is optional, completing this information can deter alteration of the document or fraudulent reattachment of this form to an unintended document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: INSTRUCTIONS for use for Medical device

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Individual ☐ Attorney in Fact

☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Individual ☐ Attorney in Fact

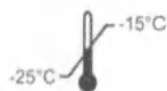
☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



Для диагностики
in-vitro



Хранить при
температуре от -25 °C
до -15 °C

REF

BRAFX-RT64

Набор реагентов для in vitro диагностики наличия мутаций гена BRAF методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов фиксированных в формалине и залитых в парафин, 64 реакции

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени	ФСЗ 2009/03609 от 06.06.2016 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

Инструкция по применению — Версия 2.8

Содержание

Наименование медицинского изделия	5
Производитель и его уполномоченный представитель	5
Назначение медицинского изделия	5
3.1. Описание целевого анализа	6
3.2. Функциональное назначение медицинского изделия	6
3.3. Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено изделие	6
3.4. Тип анализируемого образца	6
Описание функциональных элементов и составных частей	6
4.1. Комплектность	6
4.2. Состав реагентов	7
4.3. Описание характеристик	9
4.3.1. Внешний вид	9
4.3.2 Рабочие характеристики изделия	9
4.3.3 Диагностические характеристики изделия	10
Сведения о предназначении изделия для клинической лабораторной диагностики	10
Перечень и описание материалов медицинского изделия, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента	11
Предназначение изделия с указанием пользователя	11
Принцип действия медицинского изделия	11
8.1. Проведение анализа	11
8.1.1. Выделение ДНК	11
8.1.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)	12
8.1.3. Настройки прибора	14
8.2. Анализ данных	17
8.2.1. Настройки приборов для проведения анализа	18
8.2.2 Интерпретация результатов	19
9.1. Реагенты	22
9.2. Оборудование	22
9.3. Вспомогательные материалы	23
Сведения для идентификации медицинских изделий с целью получения безопасной комбинации и информация об известных ограничениях по совместному использованию медицинских изделий	23

Условия хранения и обслуживания медицинского изделия	23
Информация о порядке действий в случае нарушения упаковки, о стерильном состоянии и методе стерилизации	24
Информация для пользователей	24
13.1. Сведения и меры предосторожности, предпринимаемые в отношении потенциально инфекционного материала, содержащегося в изделии	24
13.2. Сведения о мерах предосторожности и меры, предпринимаемые в случае сбоя или отклонений в функционировании изделия, определяемых по внешним признакам	25
13.3. Сведения о безопасности от воздействия химических и загрязняющих веществ, в том числе предельно допустимые концентрации веществ или входящих в него компонентов	25
13.4. Сведения о пожарной безопасности	25
13.5. Сведения о взрывобезопасности	25
13.6. Сведения о радиационной безопасности	25
13.7. Сведения о безопасности при обслуживании изделия, в том числе требования безопасности при ошибочных действиях обслуживающего персонала и самопроизвольном нарушении функционирования	25
13.8. Сведения о защитных средствах и мероприятиях обеспечения безопасности	25
13.9. Требования к помещениям	26
13.10. Меры предосторожности при использовании изделия по назначению	26
13.11. Меры предосторожности в случае предсказуемого риска	27
13.12. Меры по защите окружающей среды	27
13.13. Информация о токсикологическом воздействии	27
13.14. Информация об обстоятельствах, при которых пользователь должен проконсультироваться с медицинским специалистом	27
Кратность применения и техническое обслуживание	28
Информация о надлежащей обработке изделия для его повторного использования, включая очистку, дезинфекцию, упаковку и при необходимости метод повторной стерилизации	28
Специальные требования в отношении помещений, специальной подготовки или особой квалификации пользователя и третьих лиц	28
Информация об условиях, необходимых для сбора, обработки и подготовки образцов, данные по стабильности анализируемых образцов, в том числе условия и длительность хранения, условия транспортировки, ограничения по циклам заморозки (размораживания)	28
Информация о подготовке к использованию изделия	29
Информация, необходимая для проверки правильности установки изделия и его готовности к безопасной работе по назначению	29
19.1. Методы снижения рисков при работе с изделием	29

Рекомендации в отношении процедур контроля качества	32
Информация о прослеживаемости значений, заданных для калибраторов или контрольных материалов, которая обеспечивается посредством доступных референтных методик измерения и эталонов	33
22. Биологический референтный интервал	33
23. Информация об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования	33
24. Утилизация	33
25. Информация о необходимости направления сообщения производителю или его уполномоченному представителю о нежелательных событиях, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента)	34
26. Дополнительная информация	
Приложение	35

1. Наименование медицинского изделия

“Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена BRAF методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов фиксированных в формалине и залитых в парафин, 64 реакции”

Примечание: Далее наименование также читать, как: Набор для определения мутации гена BRAF; Набор; Изделие.

2. Производитель и его уполномоченный представитель

Сведения о производителе:

Производитель изделия	EntroGen, Inc. ЭнтроГен, Инк.
Адрес производителя	20950 Warner Center Ln., suite B, Woodland Hills, California, 91367, USA / 20950 Ворнер центр Лн., офис Б, Вудлэнд Хиллс, Калифорния, 91367, США
Номера телефонов	1 818 716 1070
Адрес электронной почты	info@entrogen.com

Сведения об уполномоченном представителе:

Уполномоченный представитель	Общество с ограниченной ответственностью "БиоВитрум"
Адрес представителя	Российская Федерация, 199106, Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 68, лит. А
Номера телефонов	7 (812) 305 06 06
Адрес электронной почты	zakaz@biovitrum.ru

3. Назначение медицинского изделия

Изделие предназначено для определения мутаций комплекса V600E/E в гене BRAF (GTG>GAG/GTG>GAA), V600K (GTG>AAG), V600R (GTG>AGG), V600D (GTG>GAT), V600M (GTG>ATG) в геномной ДНК человека из опухолевых тканей пациентов, у которых диагностировали меланому.

3.1. Описание целевого анализатора

Набор предназначен для выявления соматических мутаций V600E, V600K, V600D, V600R, V600M в 600 кодоне гена BRAF в геномной ДНК человека при меланоме кожи для отбора больных на терапию низкомолекулярными ингибиторами BRAF-киназы.

Таблица 1. Перечень мутаций в гене BRAF, определяемых настоящим набором.

Ген	Экзон	Аминокислотная замена	Нуклеотидная замена	Идентификатор Cosmic	Обнаружено праймером №
BRAF	15	Комплекс V600E/ V600E	c.1799T>A/ c.1799_1800delTGins AA	476/ 475	V600E
		V600K	c.1798_1799GT>AA	473	V600K
		V600R	c.1798_1799GT>AG	474	V600R
		V600D	c.1799_1800TG>AT	477	V600D
		V600M	c.1798G>A	1130	V600M

Данный набор не определяет какие-либо другие мутации в гене BRAF, которые не указаны в перечне выше.

3.2. Функциональное назначение медицинского изделия

Изделие используется для прогнозирования ответа на таргетную терапию или сопротивляемость ей при местно-распространенном или метастатическом немелкоклеточном раке лёгкого.

3.3. Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено изделие

Изделие используется для проведения молекулярно-генетических исследований для определения наличия или отсутствия мутаций V600E, V600K, V600D, V600R, V600M в гене BRAF.

3.4. Тип анализируемого образца

Геномная ДНК, выделенная из фиксированных в формалине и залитых парафином блоков или свежемороженых срезов образцов опухолевой ткани.

4. Описание функциональных элементов и составных частей

4.1. Комплектность

В состав изделия входит:

Наименование	Количество пробирок (шт)	Объем пробирки (мкл)
Реакционная смесь для выявления мутации (2X)	4	1300
Смесь праймеров [†] для выявления BRAF V600E [†]	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600K	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600R	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600D	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600M	1	400
Смесь положительных контролей BRAF V600E/K/R/D/M [§]	1	100
Краткая инструкция (при необходимости) – 1 шт.*		

§ Смесь положительных контролей содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором в фоновой геномной ДНК дикого типа (ДНК WT). и внутренним контролем. Отношение мутантных молекул и молекул дикого типа равно примерно 1:1

† В каждой пробирке содержится особая смесь праймеров для амплификации конкретных мутаций. Содержимое этих пробирок не следует смешивать.

* Полная инструкция по применению изделия размещена на сайте <https://biovitrum.ru/directions/oncodiagnostics.html>

4.2. Состав реагентов

Наименование	Состав	№ CAS	Концентрация	Общий объем
Реакционная смесь для выявления мутации (2X) (Фиолетовая крышка)	ДНК-полимераза	-	5 Ед/мкл	4 x 1300 мкл
	дНТФ (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты): - дАТФ (дезоксиаденозинатрифосфат) - дГТФ (дезоксигуанозинатрифосфат) - дЦТФ (дезоксцитидинтрифосфат) - дТТФ (дезокситимидинтрифосфат)	1927-31-7 2564-35-4 951-77-9 365-08-2	400 ммоль дНТФ	
	ПЦР-буфер (коммерчески доступный буфер)	56-81-5 7786-30-3	0,1-1 % глицерол 3 ммоль магния хлорид	
Смесь праймеров для выявления BRAF V600E (Коричневая крышка с отметкой E)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8) (трис+ЭДТА)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	88,8 % вода 11,2 % IDTA 12,6 нг/мкл олигонуклеотиды	1 x 400 мкл

Смесь праймеров для выявления BRAF V600K (Коричневая крышка с отметкой K)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	88,8 % вода 11,2 % IDTA 12,6 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 400 мкл
Смесь праймеров для выявления BRAF V600R (Коричневая крышка с отметкой R)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	88,8 % вода 11,2 % IDTA 12,6 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 400 мкл
Смесь праймеров для выявления BRAF V600D (Коричневая крышка с отметкой D)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	88,8 % вода 11,2 % IDTA 12,6 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 400 мкл
Смесь праймеров для выявления BRAF V600M (Коричневая крышка с отметкой M)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	88,8 % вода 11,2 % IDTA 12,6 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 400 мкл
Смесь положительных контролей (ПК) (Красная крышка)	- Смесь синтетических специфических последовательностей олигонуклеотидов - Вода*	- 7732-18-5	0,50 фг/мкл 99 % вода Прошел финальную проверку Положителен для	1 х 100 мкл

			определяемых мутаций	
--	--	--	----------------------	--

4.3. Описание характеристик

4.3.1. Внешний вид

Параметр	Наименование						
	Реакционная смесь для определения мутации (2X)	Смесь праймеров для определения BRAF V600E	Смесь праймеров для определения BRAF V600K	Смесь праймеров для определения BRAF V600R	Смесь праймеров для определения BRAF V600D	Смесь праймеров для определения BRAF V600M	Смесь положительного контроля BRAF V600E/K/R/D/M
Количество (шт)	4	1	1	1	1	1	1
Объем реагента (мкл)	1300	400	400	400	400	400	100
Материал пробирки	Поли-пропилен	Поли-пропилен	Поли-пропилен	Поли-пропилен	Поли-пропилен	Поли-пропилен	Поли-пропилен
Цвет крышки пробирки	Фиолетовая	Коричневая	Коричневая	Коричневая	Коричневая	Коричневая	Красная
Высота пробирки, мм*	44	44	44	44	44	44	44

*допустимое отклонение составляет $\pm 5\%$.

4.3.2 Рабочие характеристики изделия

Таблица 19.

Рабочие характеристики изделия

Характеристика	Реакция	Мутация		Репортер	Значение
Предел обнаружения	1	Комплекс V600E/V600E2	V600E	FAM	1,0 %
			V600E2	FAM	0,5 %
	2	V600K		FAM	1,0 %

	3	V600R		FAM	1,0 %		
	4	V600D		FAM	1,0 %		
	5	V600M		FAM	2,0 %		
Характеристика	Реакция	Мутация		Значение			
Аналитическая специфичность	1	Комплекс V600E/V600E2	V600E	- Значение Ct канала VIC для мутантных образцов должно находиться в диапазоне 28 - 31.5. - Если какой-либо образец имеет несколько сигналов FAM, со значениями в диапазоне утверждения, верным должен считаться наиболее ранний сигнал.			
			V600E2				
	2	V600K					
	3	V600R					
	4	V600D					
	5	V600M					
Характеристика	Реакция	Мутация		Значение			
Прецизионность	1	Комплекс V600E/V600E2	V600E	- Значения Ct для ПК должны попадать в следующие диапазоны: по VIC от 29.0 до 32.0; по FAM < 30.0 - KB ≤ 5 %			
			V600E2				
	2	V600K					
	3	V600R					
	4	V600D					
	5	V600M					

4.3.3 Диагностические характеристики изделия

Таблица 20.

Рабочие характеристики изделия

Характеристика	Значение
Диагностическая чувствительность	100 % (15/15 $CI_{0,05\%}$ 79,61-100)

5. Сведения о предназначении изделия для клинической лабораторной диагностики

Область применения - клиническая лабораторная диагностика (in vitro).

6. Перечень и описание материалов медицинского изделия, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента

Набор для определения мутации гена BRAF не содержит материалов, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента (телом человека).

7. Предназначение изделия с указанием пользователя

Набор для определения мутации гена BRAF предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике (in vitro) квалифицированным персоналом со средним и высшим медицинским образованием, дополнительно прошедшим специальное обучение для работы изделием.

8. Принцип действия медицинского изделия

Ген BRAF кодирует серин-треониновую протеинкиназу, которая играет ключевую роль в регулировании сигнального пути MAPK/ERK, влияя на рост клеток, дифференциацию и пролиферацию. В 600 кодоне 15 экзона гена BRAF часто возникают мутации при различных типах рака. Мутации приводят к конститутивно активной форме белка, которая может привести к онкогенезу и прогрессированию рака.

Исследования показали, что пациенты с прогрессирующей меланомой, которая содержит мутации гена BRAF в 600 кодоне, вероятно, ощутят клиническую пользу от лечения ингибиторами киназы, которые нацелены на белок, который несет мутацию.

8.1. Проведение анализа

8.1.1. Выделение ДНК

Геномная ДНК из замороженных или зафиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: "Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" (РЗН 2021/15704).

Проведите процедуру выделения геномной ДНК в соответствии с протоколом производителя. Достаточное количество ДНК может быть выделено из зафиксированных формалином и залитых в парафин блоков (FFPE) или свежих замороженных срезов (около 2–10 мкг). После выделения ДНК следует измерить концентрацию с помощью спектрофотометрического или флуоресцентного анализа (например, на приборах Nanodrop, УФ-спектрофотометр, Qubit) и довести концентрацию ДНК до 10 нг/мкл. Если концентрация ниже 10 нг/мкл, то её компенсируют объемом воды во время постановки реакции.

Для анализа требуется примерно 100 нг ДНК, 20 нг образца на реакцию. Однако качество ДНК, выделенной из FFPE блоков, может варьироваться из-за фрагментации. Таким образом, концентрация ДНК не отражает количество амплифицируемой ДНК, доступной для анализа. Для определения оптимального количества ДНК для проведения какого-либо анализа методом ПЦР-РВ рекомендуется использовать набор анализа внутреннего контроля качества компании «ЭнтроГен» (кат. № IQCA-RT50).

8.1.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)

Разморозить необходимые пробирки смеси праймеров/проб, смеси положительных контролей и 2X реакционной смеси для запуска.

В каждой реакционной пробирке 2X мастер-микса в наборе содержится достаточное количество реагентов для выполнения 16 реакций (включая контроли) с допустимым избытком 5 % на смесь праймеров (всего 80 реакций).

Перемешать каждую пробирку на вортексе и центрифугировать в течение 10 секунд при комнатной температуре на 2000об/мин..

Общий объем реакционных смесей для ПЦР составляет 30 мкл/реакция. Предварительно стоит подготовить мастер микс для всех испытываемых образцов (в том числе для контрольных образцов) с 5-10% избытком объема, чтобы компенсировать потери пипетирования.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Компоненты	Объем
2X Реакционная смесь для ПЦР	15 мкл
Смесь праймеров	6 мкл
Образец ДНК	20 нг
Сверхчистая вода	довести до 30 мкл

Каждый образец анализируется в 5 реакциях (по 1 на каждую мутацию). Максимальное количество неизвестных образцов, которые могут быть проанализированы с помощью одного запуска, варьируется в зависимости от используемого прибора.

Прибор	Вместимость ротора	Количество образцов на анализ
Applied Biosystems (за исключением StepOne)	96 лунок	17
StepOne, Applied Biosystems	48 лунок	7
RotorGene	100 лунок	18
LightCycler 480. Roche	96 лунок	17

1. Подготовить мастер-микс для каждого образца в соответствии с таблицей ниже:

Реагенты	Конечная концентрация	Объем для каждого образца
----------	-----------------------	---------------------------

		(с допустимым избытком 5 %)
Реакционная смесь для определения мутации 2X	1X	78,75 мкл
Смесь положительных контролей*, вода или ДНК	20 нг	5,25 мкл
Вода без нуклеаз		42 мкл

*5,5 мкл положительного контроля (ПК) на мастер-микс с допустимым избытком эквивалентно 1 мкл ПК на реакцию.

2. Перемешать каждую пробирку на вортексе и центрифугировать в течение 10 секунд при комнатной температуре.
3. Распределить по 24 мкл мастер-микса на лунку, как показано на рисунке 1.
4. Добавить по 6 мкл каждой смеси праймеров для определения мутации (V600E, V600K, V600R, V600D или V600M) в соответствии с рисунком 1.
5. Перемешать смесь пипетированием несколько раз.
6. Заклеить плашку оптической герметичной пленкой (плашки ABI/«Рош») или закрыть крышками (для пробирок Rotor-Gene).
7. (Дополнительно, но рекомендуется для приборов ABI и «Рош») Центрифугировать плашку в течение 1 минуты на скорости 1500 об./мин..

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC V600E	PC V600K	PC V600D	PC V600R	PC V600M		S7 V600E	S7 V600K	S7 V600D	S7 V600R	S7 V600M	
B	NTC V600E	NTC V600K	NTC V600D	NTC V600R	NTC V600M		S8 V600E	S8 V600K	S8 V600D	S8 V600R	S8 V600M	
C	S1 V600E	S1 V600K	S1 V600D	S1 V600R	S1 V600M		S9 V600E	S9 V600K	S9 V600D	S9 V600R	S9 V600M	
D	S2 V600E	S2 V600K	S2 V600D	S2 V600R	S2 V600M		S10 V600E	S10 V600K	S10 V600D	S10 V600R	S10 V600M	
E	S3 V600E	S3 V600K	S3 V600D	S3 V600R	S3 V600M		S11 V600E	S11 V600K	S11 V600D	S11 V600R	S11 V600M	
F	S4 V600E	S4 V600K	S4 V600D	S4 V600R	S4 V600M		S12 V600E	S12 V600K	S12 V600D	S12 V600R	S12 V600M	
G	S5 V600E	S5 V600K	S5 V600D	S5 V600R	S5 V600M		S13 V600E	S13 V600K	S13 V600D	S13 V600R	S13 V600M	
H	S6 V600E	S6 V600K	S6 V600D	S6 V600R	S6 V600M		S14 V600E	S14 V600K	S14 V600D	S14 V600R	S14 V600M	

Рисунок 1. Предложенный макет плашки для одного эксперимента при анализе 14 образцов. ПК: смесь положительного контроля; KBM: контроль без матрицы (вода); S1-14: неизвестные образцы.

8.1.3. Настройки прибора

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

1. В «Мастере запуска» (Startup Wizard) выбрать «Создать новый эксперимент» (Create New Experiment) и убедиться, что в раскрывающемся списке выбрано CFX96. Нажать ОК.
2. Во вкладке «Протокол» (Protocol) окна «Установка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры цикла.

Этап	Температура	Время
1	95 °C	10 мин
2	95 °C	15 сек.
3	58 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
4	Повторить с шага 2 еще 39 раз	
	ЗАВЕРШЕНИЕ	

3. Изменить объем образца на 30 мкл.
4. После завершения нажать «ОК», чтобы сохранить шаблон протокола. Обратить внимание на расположение сохраняемого файла шаблона, чтобы использовать его для последующих анализов. Нажать «Дальше» (Next), чтобы перейти к окну «Установка плашки» (Plate Setup).
5. Во вкладке «Плашка» (Plate) нажать «Создать новый» (Create New), чтобы создать макет плашки.
6. Нажать на кнопку «Выбрать флуорофоры» (Select Fluorophores) и отметить поля рядом с FAM и VIC. Все другие поля должны остаться не отмеченными. Нажать ОК.
7. Выберите строку A1-A5 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на Положительный контроль (Positive Control).
8. Выберите строку B1-B5 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на КБМ (контроль без матрицы).
9. Выбрать оставшиеся лунки (C1-H5; A-H 7-11) на макете плашки и изменить «Тип образца» (Sample Type) на «Неизвестные» (Unknown).
10. Выделите каждую строку отдельно (начиная с C1-C5) и введите название образца в поле Наименование образца (Sample Name). Когда закончите, нажмите Enter на клавиатуре, чтобы записать название образца. Выполните этот шаг для каждого образца.
11. Нажать на «Настройки» (Settings) и выбрать тип используемой плашки (например, BR Белая (White) или BR Прозрачная (Clear)).
12. После этого нажать кнопку ОК, чтобы сохранить макет плашки.
13. Нажать «Дальше» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

1. Запустить программу SDS, затем перейти к «Файл» (File) > «Новый эксперимент» (New Experiment) > «Установка эксперимента» (Experiment Setup).
2. Введите имя эксперимента, затем выберите систему QuantStudio 5TM. Выберите тип блока (96-луночный блок 0,2 мл).
3. Выберите Количественное определение (Quantitation) > - Сравнительный CT ($\Delta\Delta CT$) (Comparative CT ($\Delta\Delta CT$)) для типа эксперимента.
4. Выберите TaqMan® для химического анализа и выберите «Быстрый» (Fast) для режима анализа.
5. Перейти к разделу «Метод» (Method) и в поле «Характеристики плашки» (Plate Attributes) убедиться в том, что Пассивный референсный краситель (Passive Reference Dye) установлен на «ОТСУТСТВУЕТ» (NONE). Перейти к вводу следующих параметров:

Объем 30 мкл крышка 105°

Температура	Время	Циклы	Сбор данных
95 °C	10 мин	X1	Отсутствует
95 °C	15 сек.	X40	Отсутствует
60 °C	30 сек.		Вкл.

6. Перейти к разделу «Плашка» (Plate) и в поле «Характеристики плашки» (Plate Attributes) убедиться в том, что Пассивный референсный краситель (Passive Reference Dye) установлен на «ОТСУТСТВУЕТ» (NONE).
7. Перейти к вкладке «Расширенная настройка» (Advanced Setup). В поле «Мишени» (Targets) необходимо изменить название Цели 1 на FAM и убедиться в том, что детектором является FAM. Установить гаситель люминисценции на «Отсутствует» (None) или NFQ-MGB.
8. Нажать кнопку «Добавить» (Add), чтобы добавить второй детектор и назвать его IC. Изменить репортер для этого детектора на VIC и установить гаситель люминисценции на «Отсутствует» (None) или NFQ-MGB.
9. В поле «Образцы» (Samples) необходимо добавить ПК для смеси положительного контроля, КБМ для контроля без матрицы (вода), а также наименования образцов.
10. «Назначить мишени и образцы» (Assign Targets and Samples) в разметку плашки, как рекомендовано выше. Оба детектора должны быть добавлены в каждую лунку, содержащую образец, реакцию ПК или КБМ.
11. Убедиться в том, что объем реакционной смеси установлен на 30 мкл, а «Сбор данных» (Data Collection) включен на этапе при температуре 60 °C.

12. Поставить реакционную плашку в прибор, нажать «ЗАПУСТИТЬ АНАЛИЗ» (START RUN).

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

1. Выбрать «Файл» (File) > «Новый» (New), в диалоговом окне нажать вкладку «Расширенные» (Advanced), выбрать «Двухэтапный» (Two Step) и нажать «Новый» (New).
2. Выбрать 72-луночный ротор, отметить поле «Предохранительное кольцо присоединено» (Locking Ring Attached) и нажать «Далее» (Next), затем Мастер пропуска (Skip Wizard).
3. Перейти к «Вид» (View) > «Настройки анализа» (Run Settings), ввести 30 мкл для объема реакционной смеси и нажать «ОК».
4. Перейти к Вид (View)> Редактор профиля (Profile Editor). В поле должно быть указано два цикла; «Инкубация» (Hold) и «Циклирования» (Cycling).
5. Ввести следующие параметры этапа, нажав на каждый этап на панели справа:

Этап	Температура	Время	Сбор данных
Инкубация	95 °C	10 минут	Не производится
Установленный этап	95 °C	15 секунд	Не производится
Установленный этап 40 циклов	60 °C	30 секунд	Запрашиваемые каналы: зеленый (Green) и желтый (Yellow)

6. Нажмите ОК. Также, вы можете сохранить такой шаблон для дальнейших запусков, нажав на кнопку «Сохранить как» сверху диалогового окна.
7. Перейти к «Вид» (View) > «Оптимизация уровня сигнала» (Gain Optimization), из раскрывающегося списка «Настройки каналов» (Channel Settings) выбрать «Все каналы» (All Channels) и задайте калибровку перед первым измерением (Perform Optimization Before 1st Acquisition). Примечание: Этот этап нужно выполнять только один раз при использовании новой партии реагентов. После определения Оптимизации уровня сигнала (Gain Optimization) используйте те же настройки для будущих запусков с реагентами с тем же номером партии.
8. Загрузить стрипы пробирок в ротор.
9. Перейти к «Анализ» (Run) > «Запустить анализ» (Start Run), затем нажать кнопку «Запустить» (Start), чтобы начать анализ.

Примечание: диалоговое окно «Редактировать образцы» (Edit Samples) открывается сразу после запуска анализа. Информацию об образцах можно вводить во время работы прибора или после завершения анализа.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени

1. В «Навигации» (Navigator) необходимо нажать «Новый» (New), чтобы запустить новый эксперимент LightCycler® 480.
2. Выбрать «Двухцветная гидролизуемая проба / UPL проба» (Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe) для «Формата обнаружения» (Detection Format).
3. Нажать «Настроить» (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
4. Изменить объем реакционной смеси на 30 мкл.
5. Добавьте следующие целевые значения программы и температуры:

Наименование программы	Циклы	Режим анализа
Денатурация	1	Нет
Циклирование	40	Количественная оценка

Для этапа Денатурации:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Удержание (чч:мм:сс)
95	Нет	00:10:00

Для этапа Циклирования:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Удержание (чч:мм:сс)	Скорость линейного изменения (°C/сек.)
95	Нет	00:00:15	4.4
60	Однократное	00:00:30	2.2

6. Перейти к «Редактору образца» (Sample Editor) и выбрать «Относительный количественный анализ» (Rel Quant) в качестве «Рабочего процесса» (Workflow), затем назначить образцы для плашки.
7. Выбрать кнопку «Эксперимент» (Experiment) и нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы сохранить файл и начать анализ.

8.2. Анализ данных

Важно: для пороговых значений может потребоваться корректировка с учетом чувствительности флуоресцентной детекции каждого термоциклера. В качестве исходной точки необходимо использовать перечисленные ниже параметры.

8.2.1. Настройки приборов для проведения анализа

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Manual threshold (Ручное пороговое значение): (см. Пороговое значение ниже)
- Baseline (Исходные данные): Auto Calculated (Рассчитано автоматически)

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение VIC
CFX	135	220

Примечание: пороговые значения, возможно, потребуется скорректировать с учетом различий в оптике и аппаратном обеспечении прибора Термоциклера для амплификатора нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Ручное пороговое значение (см. Пороговое значение ниже)
- Исходный уровень:

FAM: 3-22
VIC 3-15

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение VIC
QuantStudio 5™	50 000	25 000

Примечание: пороговые значения, возможно, потребуется скорректировать с учетом различий в оптике и аппаратном обеспечении прибора ABI.

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Динамическое изменение кривизны: вкл.
- Поправка наклона: вкл.

- Удаление выбросов: 5 %
- Пороговое значение зеленого канала: 0,02
- Пороговое значение желтого канала: 0,04

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Выбрать «Абсолютная количественная оценка/Базовые точки» (Abs Quant/fit Points)
- Полоса шумов (STD Mult): VIC [60], FAM [30]

8.2.2 Интерпретация результатов

Для анализа полученных результатов для каждого образца используйте таблицу и **Рисунок 2** ниже.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени:

VIC Ct	FAM Ct	Результат
$0 < Ct < 26$	$Ct > 37,5$;	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$0 < Ct < 26$	$Ct \leq 37,5$; $Ct = 0$	Повторный анализ с меньшей концентрацией ДНК.
$26 \leq Ct \leq 31$	$Ct > 37,5$; $Ct = 0$	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$26 \leq Ct \leq 31$	$Ct \leq 37,5$	Положительный тест на мутацию.
$Ct > 31$; $Ct = 0^{\dagger}$	$Ct > 37,5$; $Ct = 0$	Повторный анализ с большей концентрацией ДНК.
$Ct > 31$;	$Ct \leq 37,5$	Положительный тест на мутацию.

Все прочие приборы:

VIC Ct	FAM Ct	Результат
$0 < Ct < 26$	$Ct > 37,0$	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$0 < Ct < 26$	$36,5 \leq Ct \leq 37$; $Ct = 0$	Повторный анализ с меньшей концентрацией ДНК.
$0 < Ct < 26$	$0 < Ct < 36,5$	Положительный тест на мутацию.

$26 < Ct < 31$	$37,0 < Ct; Ct=0$	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$26 \leq Ct \leq 31$	$Ct \leq 37,0$	Положительный тест на мутацию.
$Ct > 31; Ct = 0^{\dagger}$	$37,0 < Ct; Ct=0$	Повторный анализ с большей концентрацией ДНК.
$Ct > 31; Ct = 0^{\dagger}$	$Ct \leq 37,0$	Положительный тест на мутацию.

[†] Значения Ct для канала VIC у одного образца для всех 5 реакций должны отличаться не более, чем $\pm 2,5$ Ct. Если различие значений Ct канала VIC $> 2,5$ Ct, то образец необходимо повторно исследовать с большим или меньшим количеством ДНК в зависимости от того, является ли предположительная проблема плохого качества образца или ПЦР ингибиторов.

Гомология последовательностей между мутантными вариантами V600E приводит к сигналам перекрестной реактивности. Для определения статуса мутации образцов необходимо использовать нижеприведенные графики амплификации. Из-за ингибирующего эффекта меланина в образцах, сигнал от реакций, которые появляется после цикла 34, считается поздними значениями Ct. Эти поздние значения Ct могут не пересекать шкалу порогового значения или вообще не появляться.

Если имеются явные положительные сигналы, которые не соответствуют вышеописанным профилям, то образец является положительным для мутации, соответствующей реакции с первым/самым ранним значением Ct.

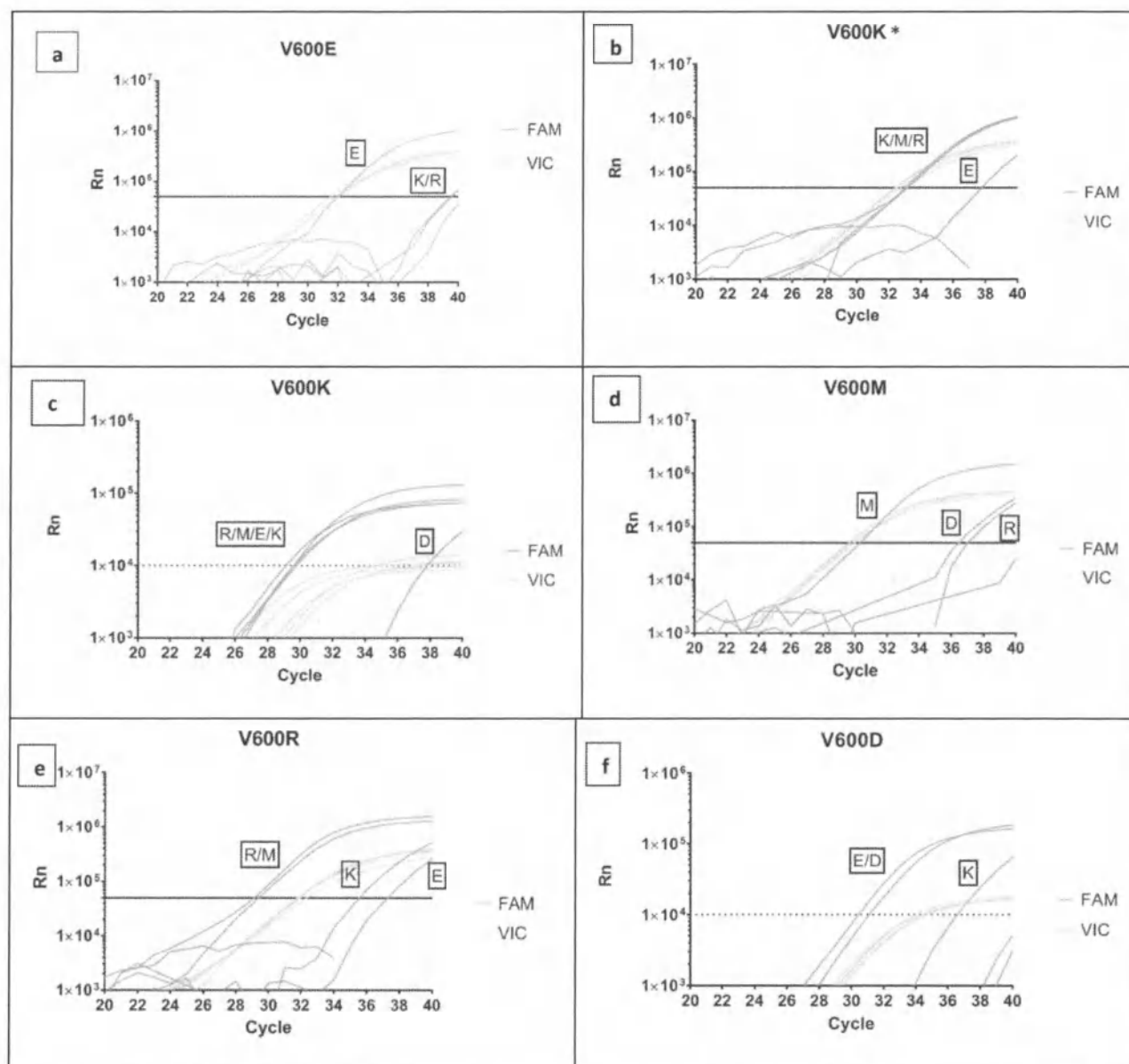


Рисунок 2. Принцип анализа мутаций в 600 кодоне гена BRAF: профили перекрестной реактивности каждой мутации.

Определение статуса мутации из схем реакций:

1. Необходимо использовать таблицу St , приведенную выше, для определения статуса образца на реакцию (положительный, отрицательный, избыточная концентрация, недостаточная концентрация).
2. Из-за гомологии последовательностей в результатах может обнаруживаться перекрестная реактивность. На **Рисунке 2** и ниже описаны возможные варианты подобных результатов и принцип их анализа.

а. V600E

- i. Раннее значение Ct: V600E
 - ii. Поздние значения Ct: V600K/R
- b. V600K*
 - i. Ранние значения Ct: V600K/M/R (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Позднее значение Ct: V600E
- c. V600K
 - i. Ранние значения Ct: V600K/M/R/E (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Позднее значение Ct: V600D
- d. V600M
 - i. Ранние значения Ct: V600M
 - ii. Позднее значение Ct: V600D/R
- e. V600R
 - i. Ранние значения Ct: V600R/M (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Поздние значения Ct: V600K/E
- f. V600D
 - i. Раннее значение Ct: V600E/D (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Поздние значения Ct: V600K

9. Перечень материалов и специальных материалов, которые требуются для проведения тестирования, но не содержатся в комплекте поставки изделия

9.1. Реагенты

Геномная ДНК из замороженных или зафиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit” (РЗН 2021/15704).

Для проведения данного анализа также требуется вода без нуклеаз активности (вода для ПЦР), которая не входит в комплектацию набора.

70 % этанол; 20 % хлорсодержащий отбеливатель (или эквивалент).

9.2. Оборудование

Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени, Микроцентрифуга для микроцентрифужных пробирок 0,2 мл и 2,0 мл, Вортекс.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
--	---

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени	ФСЗ 2009/03609 от 06.06.2016 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

9.3. Вспомогательные материалы

Одноразовые неопудренные перчатки, Стерильные наконечники пипеток с фильтром, Пипетки переменной емкости, Оптическая герметизирующая пленка для ПЦР плашек, 96-луночные ПЦР плашки, Микроцентрифужные пробирки 0,2 мл (дополнительно) и 2,0 мл.

10. Сведения для идентификации медицинских изделий с целью получения безопасной комбинации и информация об известных ограничениях по совместному использованию медицинских изделий

Неприменимо.

11. Условия хранения и обслуживания медицинского изделия

Срок годности изделия: 12 месяцев.

Набор поставляется с хладоэлементами. Содержимое партии после получения следует хранить в низкотемпературном холодильнике с неомержающим испарителем при температуре от -25 °C до -15 °C.

- Все не вскрытые компоненты следует хранить в оригинальных упаковках.
- Смеси праймеров/проб следует защищать от воздействия света во избежание фото-обесцвечивания флуоресцентных красителей. Постановку анализа следует проводить, выключив свет в вытяжном шкафу, т.к. пробы могут подвергаться фото-обесцвечиванию прямым воздействием света в момент аликвотирования в реакционную плашку.
- Перед открытием необходимо центрифугировать пробирки.
- Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована. **Для пробирок без даты истечения срока годности необходимо использовать дату истечения срока годности, указанную на этикетке коробки.**

Краткое описание условий хранения и обращения, необходимых для обеспечения оптимальной стабильности набора:

Реакционный мастер-микс: хранить при температуре от -25°C до -15°C. За один раз рекомендуется размораживать одну пробирку и хранить ее при температуре от 4°C до 8°C не более 60 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность фермента.

Если ожидается, что одна пробирка реагента будет расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки.

Смесь праймеров /проб: хранить при температуре от 4°C до 8°C. После размораживания смесь остается стабильной в течение 3 недель. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования.

Смесь положительных контролей: хранить при температуре от 4°C до 8°C в течение 3 недель после первой разморозки. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования. Следует избегать повторных циклов замораживания-размораживания (не более 3).

Хранение и обращение с компонентами данного изделия в условиях, отличных от вышеописанных, могут повлиять на эффективность данного анализа и отрицательно повлиять на результаты.

Транспортировка изделия осуществляется всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

При транспортировке, осуществлении погрузки и выгрузки изделия должны быть приняты меры, предохраняющие тару от механических повреждений, воздействия атмосферных осадков, горючих материалов и кислот.

При соблюдении условий хранения, эксплуатации и транспортировки, изделие остается стабильным до истечения срока годности, указанного на внешней этикетке.

12. Информация о порядке действий в случае нарушения упаковки, о стерильном состоянии и методе стерилизации

Неприменимо. Изделие поставляется нестерильным и не требует стерилизации.

13. Информация для пользователей

При соблюдении требований инструкции возникновение нежелательных событий маловероятно. Для соблюдения требований безопасности необходим инструктаж персонала и выполнение соответствующих обязательных инструкций по технике безопасности и технологических процессов.

13.1. Сведения и меры предосторожности, предпринимаемые в отношении потенциально инфекционного материала, содержащегося в изделии

Неприменимо. Изделие не содержит потенциально инфицированный материал.

13.2. Сведения о мерах предосторожности и меры, предпринимаемые в случае сбоя или отклонений в функционировании изделия, определяемых по внешним признакам

Не используйте изделие с истекшим сроком годности, при нарушении целостности упаковки. В случае отклонения внешнего вида изделия от нормального проверьте функционирование изделия на заведомо пригодном образце биоматериала.

13.3. Сведения о безопасности от воздействия химических и загрязняющих веществ, в том числе предельно допустимые концентрации веществ или входящих в него компонентов

Неприменимо. Набор для определения мутации гена BRAF не содержит загрязняющих веществ.

13.4. Сведения о пожарной безопасности

Неприменимо. Набор для определения мутации гена BRAF не является пожароопасным.

13.5. Сведения о взрывобезопасности

Неприменимо. Набор для определения мутации гена BRAF не является взрывоопасным.

13.6. Сведения о радиационной безопасности

Неприменимо. Набор для определения мутации гена BRAF не содержит источников излучения.

13.7. Сведения о безопасности при обслуживании изделия, в том числе требования безопасности при ошибочных действиях обслуживающего персонала и самопроизвольном нарушении функционирования

При использовании изделия квалифицированным персоналом согласно инструкции по эксплуатации и с соблюдением мер предосторожности, ошибочные действия персонала и нарушения функционирования исключены.

13.8. Сведения о защитных средствах и мероприятиях обеспечения безопасности

При использовании Набор для определения мутации гена BRAF по назначению и соблюдении мер предосторожности (использовании специальной лабораторной одежды: халат и одноразовые перчатки, фартук) контакт с организмом человека исключен.

Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с разделом 24. "Утилизация".

При работе с жидкими реагентами использовать лицевой щиток или очки для защиты глаз.

13.9. Требования к помещениям

Работы должны проводиться в проветриваемых помещениях или в помещениях, оборудованных приточно-вытяжной вентиляцией. Кратность обмена воздуха – не менее 8.

На рабочих местах должны быть обеспечены допустимые параметры микроклимата согласно нормативным актам.

В помещениях должно быть обеспечено наличие кипяченой воды и аптечки с медикаментами для оказания первой медицинской помощи.

Требования к помещениям регулируются действующими локальным законодательством и нормативными актами.

13.10. Меры предосторожности при использовании изделия по назначению

При контакте с биоматериалом необходимо соблюдать меры предосторожности. Во время работы следует пользоваться перчатками и специальной лабораторной одеждой, так как образцы биоматериала следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любого другого возбудителя инфекции.

Меры предосторожности: при работе с изделием необходимо использовать СИЗ и средства защиты глаз. При попадании в глаза промыть водой и немедленно обратиться к врачу. При проглатывании обратиться к врачу.

ПЦР амплификация отличается высокой чувствительностью к перекрестной контаминации. Очень важно проводить этапы, предшествующие амплификации (т.е. выделение ДНК, приготовление ПЦР реакции), в отдельных местах, в идеале в отдельных помещениях с изолированными системами вентиляции. Особенно важно, чтобы подготовка ПЦР реакции осуществлялась в помещении с положительным давлением воздуха (или в ламинарном шкафу).

Во избежание контаминации между образцами/реагентами при работе с ДНК и реагентами для ПЦР необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности:

- Протирать рабочую зону, пипеточные дозаторы и оборудование, предназначенное для использования вблизи рабочей зоны, дезинфицирующим средством для очистки поверхностей (20%-отбеливатель или аналог), с тем чтобы устранить ДНК и ДНКазы, с последующим использованием 70 % этилового спирта.
- Перед применением каждую пробирку следует перемешать на вортексе.
- Центрифугировать все пробирки перед открытием.
- После перемешивания/смешивания на вортексе каждую микроцентрифужную пробирку открывать осторожно, при этом следует избегать касания внутренней части крышки.
- Во избежание перекрестной контаминации для всех этапов пипетирования следует использовать аэрозоль-устойчивые (с фильтром) наконечники.
- Между всеми переносами жидкостей необходимо менять наконечники пипеток.
- При работе с ДНК/реагентами всегда следует надевать перчатки и менять перчатки между этапами, предшествующими амплификации, и пост-амплификации.
- Перемещение пробирок, штативов, пипеток и другого используемого оборудования должно идти в направлении от пре-амплификации до пост-амплификации, и никогда наоборот.

13.11. Меры предосторожности в случае предсказуемого риска

Если в ходе предварительного анализа рисков выявляются риски, требующие мероприятий по снижению уровня риска до приемлемого, то к ним применяются процедуры этапа по управлению рисками.

Меры по уменьшению вреда и вероятности риска для изделия направлены на то, чтобы остаточный риск снизился до приемлемого.

В результате возможные риски для изделия являются допустимыми: преимуществ для пациента и медицинского работника больше, чем возможных опасностей.

13.12. Меры по защите окружающей среды

Не допускайте попадания изделия в канализацию.

После использования изделия образцы следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любого другого возбудителя инфекции. Образцы должны утилизироваться в соответствии с действующими локальным законодательством и нормативными актами в отношении биологически опасных отходов.

Жидкие отходы (загрязненная вода, образующаяся после промывки оборудования) должны быть собраны в специально предназначенные емкости и своевременно вывезены в места захоронения.

13.13. Информация о токсикологическом воздействии

Информация о токсикологическом воздействии представлена в таблице 3.

Таблица 3. Информация о токсикологическом воздействии.

Наименование медицинского изделия (модификаций при наличии)	Состав
Набор реагентов для in vitro диагностики наличия мутаций гена BRAF методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов фиксированных в формалине и залитых в парафин, 64 реакции	Отсутствует

13.14. Информация об обстоятельствах, при которых пользователь должен проконсультироваться с медицинским специалистом

При случайном попадании изделия в желудочно-кишечный тракт немедленно обратитесь к врачу.

При попадании на кожу или слизистую оболочку глаз немедленно обратитесь к врачу.

14. Кратность применения и техническое обслуживание

Набор для определения мутации гена BRAF для многократного применения.

Изделие не требует технического обслуживания.

15. Информация о надлежащей обработке изделия для его повторного использования, включая очистку, дезинфекцию, упаковку и при необходимости метод повторной стерилизации

Неприменимо. Набор для определения мутации гена BRAF не требует обработки при повторном использовании.

16. Специальные требования в отношении помещений, специальной подготовки или особой квалификации пользователя и третьих лиц

Набор для определения мутации гена BRAF предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике (in vitro) квалифицированным персоналом со средним и высшим медицинским образованием, дополнительно прошедшим специальное обучение для работы изделием.

Работы должны проводиться в проветриваемых помещениях или в помещениях, оборудованных приточно-вытяжной вентиляцией. Кратность обмена воздуха – не менее 8.

На рабочих местах должны быть обеспечены допустимые параметры микроклимата:

- температура воздуха: 17-23°C (в холодный период года);
- 18-27°C (в теплый период года);
- влажность воздуха 15-75 %.

В помещениях должно быть обеспечено наличие кипяченой воды и аптечки с медикаментами для оказания первой медицинской помощи.

Для соблюдения требований безопасности необходим инструктаж персонала и выполнение соответствующих обязательных инструкций по технике безопасности и технологических процессов. Регулируется действующими локальным законодательством и нормативными актами.

17. Информация об условиях, необходимых для сбора, обработки и подготовки образцов, данные по стабильности анализируемых образцов, в том числе условия и длительность хранения, условия транспортировки, ограничения по циклам заморозки (размораживания)

Реакционный мастер-микс: хранить при температуре от -25°C до -15°C. За один раз рекомендуется размораживать одну пробирку и хранить ее при температуре от 4°C до 8°C не более 60 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность фермента. Если ожидается, что одна пробирка реагента будет расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки.

Смесь праймеров /проб: хранить при температуре от 4°C до 8°C. После размораживания смесь остается стабильной в течение 3 недель. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования.

Смесь положительных контролей: хранить при температуре от 4°C до 8°C в течение 3 недель после первой разморозки. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования. Следует избегать повторных циклов замораживания-размораживания (не более 3).

При условии, что условия хранения и обращения, описанные выше, соблюдаются должным образом, данное изделие и его компоненты сохраняют свои характеристики в течение всего срока годности, указанного на этикетках каждой пробирки.

18.Информация о подготовке к использованию изделия

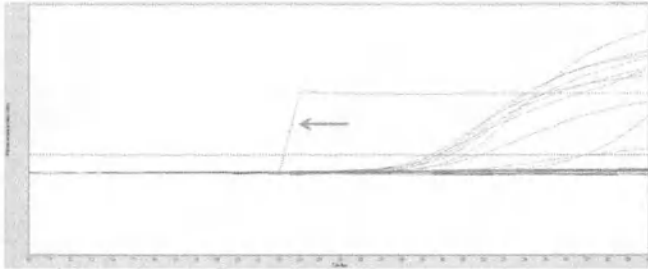
Неприменимо. Набор для определения мутации гена BRAF готово к использованию.

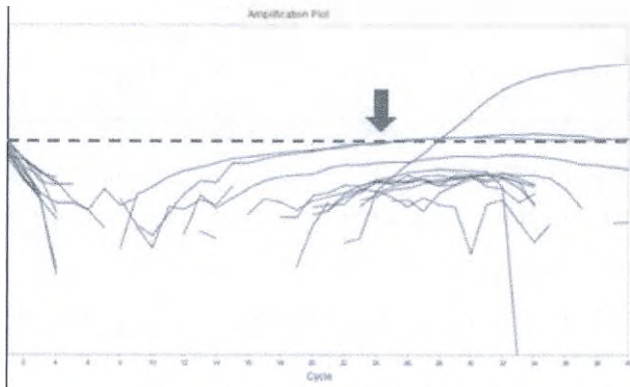
19.Информация, необходимая для проверки правильности установки изделия и его готовности к безопасной работе по назначению

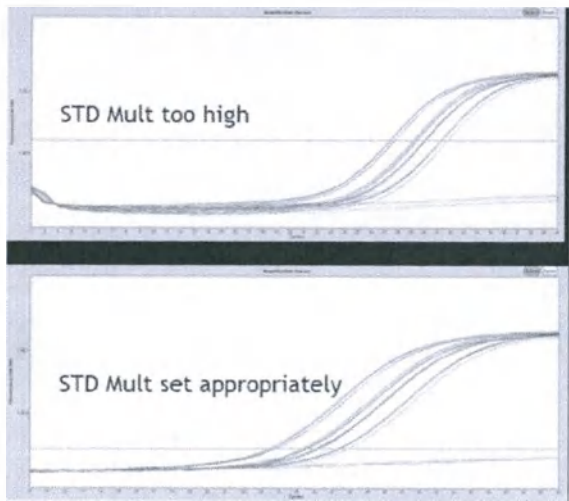
Неприменимо. Изделие не требует установки.

19.1. Методы снижения рисков при работе с изделием

Проблема	Решение
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение Ct выше, чем верхнее пороговое значение Ct, указанное в разделе 8.	· Если положительный целевой сигнал (например, FAM, ROX, Cy5) возникает до порогового значения Ct, значит образец является положительным. См. таблицу Ct в разделе 8. · Если целевой сигнал возникает после порогового значения или не возникает, реакция была недостаточно насыщена (недостаточно ДНК), необходимо провести повторный анализ с большим количеством ДНК. · Если анализ образца, в котором, как известно, имеются ингибиторы ПЦР (например, образцы меланомы имеют меланин, который является ингибитором ПЦР), необходимо провести повторный анализ образца с меньшим количеством ДНК или разбавить

	образец водой в соотношении 1:5 и повторно провести анализ. - Если увеличение/уменьшение объема ДНК не решает проблему: - Повторно выделить ДНК (при возможности). - Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. - Использовать коммерчески доступный концентрат ДНК.
Целевой и внутренний контрольные сигналы являются отрицательными для положительного контроля (ПК).	- Реагенты могут деградировать. Для получения дополнительной информации необходимо связаться со своим поставщиком. - Во избежание последующих сбоев в работе реагента необходимо выполнять инструкции по хранению и обращению, которые содержатся в разделе 11 настоящей инструкции.
Аномальный пик на графике усиления образца с помощью прибора ABI.  Fluorescence Флуоресценция Cycle Цикл	- Аномальная линия пика может быть результатом пузырьков в лунке, содержащей образец. Центрифугировать плашку перед повторным запуском образца. - Аномальный пик может быть ошибкой детекции флуоресценции прибором. Провести повторный анализ другой плашки, чтобы убедиться в отсутствии воспроизводимости. Если пик воспроизводится, необходимо связаться с производителем прибора.
Сигнал в контроле КБМ.	- Указывает на контаминацию геномной ДНК. Оценить лабораторную процедуру. Предложения по сведению к минимуму загрязнения рабочей поверхности см. в разделе 13.10 настоящей инструкции. - Если присутствует только сигнал внутреннего контроля и значение Ct

	≥ 36, результаты можно использовать для определения мутационного статуса образца. · Если присутствует только целевой сигнал, результаты могут дать ложноположительный результат, требуется повторный запуск. · Если присутствуют и целевой сигнал, и сигнал внутреннего контроля, результаты могут дать ложноположительный результат, требуется повторный запуск.
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ при проведении анализа на приборе ABI.  <i>Amplification Plot</i> <i>График амплификации</i> <i>Cycle</i> <i>Цикл</i>	· Обеспечить установку ручных пороговых значений, предложенных в настоящей инструкции. · Убедиться в том, что сигнал не является истинной амплификацией путем проверки сигнала на многокомпонентном графике (приборы Life Technologies). Если сигнал горизонтальный, то это не истинная амплификация. Если сигнал на многокомпонентном графике является линейным и сигнал пересекает пороговое значение, необходимо отрегулировать базовый конечный цикл. Установить начальный цикл на 3 и остановить: самый ранний цикл VIC St (если сигнал по-прежнему пересекает пороговое значение, увеличивать число циклов с шагом 3 до тех пор, пока сигнал не перестанет пересекать пороговое значение).
Умножитель STD установлен на высоком уровне кривой амплификации на приборе LC480/cobas Z480 (см. ниже)	· Проверить наличие любого аномального фоновых шума (например, градиент во флуоресценции) в течение первых 10 циклов. При возникновении какого-либо аномального шума необходимо исключить аномальный шум, настроив первый цикл для диапазона цикла после цикла, в ходе которого наблюдается аномальный шум.

 <i>STD Mult too high</i> <i>Слишком высокий STD Mult</i> <i>STD Mult set appropriately</i> <i>STD Mult установлен соответствующим образом</i> <i>Cycle</i> <i>Цикл</i>	При отсутствии аномального фонового шума, настройка множителя STD может быть несоответствующей для прибора и должна быть подвергнута повторной оценке с использованием стандартных образцов и ранее испытанного материала.
Образец дикого типа имеет значение C_t целевого сигнала, которое попадает в параметры для статуса положительной мутации.	- Если сигнал внутреннего контроля находится в пределах диапазона, тогда образец дикого типа загрязнен положительным образцом или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа. - Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.

20. Рекомендации в отношении процедур контроля качества

Компоненты настоящего изделия производятся в соответствии со стандартом cGMP (текущая надлежащая производственная практика). Для обеспечения наивысшего качества продукции cGMP требует обширной валидации и документирования производственных процедур.

Каждая серия испытана на приборах ABI 7500 и (или) ABI QuantStudio 5 в режиме реального времени с использованием версии 2.0.6 программного обеспечения 7500 и версии 1.4.3 программного обеспечения для проектирования и анализа QuantStudio 5. Сертификат анализа для каждой реакции и серий смесей праймеров/проб предоставляется по запросу.

21. Информация о прослеживаемости значений, заданных для калибраторов или контрольных материалов, которая обеспечивается посредством доступных референтных методик измерения и эталонов

Неприменимо.

22. Биологический референтный интервал

Неприменимо.

23. Информация об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования

Неприменимо.

24. Утилизация

Уничтожать неиспользованные при исследованиях изделия и другие реактивы следует как эпидемиологически опасные отходы в соответствии с принятыми локальными правилами по обращению и утилизации медицинских отходов.

Дезинфекцию оборудования и помещений также проводить в соответствии с локальными требованиями.

Общий порядок действий:

- 1) Изделия, пришедшие в негодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.
 - 2) Изделия, пришедшие в негодность, с истекшим сроком годности, являющиеся подделками или незаконными копиями изделий, а также изделия, обнаруженные и конфискованные таможенными органами, подлежат уничтожению или утилизации.
 - 3) Уничтожение изделий осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию. Уничтожать изделия необходимо на специально оборудованных площадках или полигонах, а также в помещениях в соответствии с локальными требованиями и с соблюдением требований по охране окружающей среды.
 - 4) Изготовитель, поставщики, продавцы, импортеры могут уничтожать изделия, потерявшие потребительские свойства или с истекшим сроком годности, при использовании методов, согласованных с территориальными органами, ответственными за санитарно-эпидемиологическое благополучие населения.
 - 5) Изделия во внешней упаковке с предупредительными знаками об опасности следует уничтожать с соблюдением соответствующих мер безопасности и дезактивации.
 - 6) Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются раздавливанием внутренней упаковки и разведением водой в соотношении 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственного или бытового мусора.
- Твердые компоненты подлежат дроблению, разведению водой в соотношении 1:100, сливом раствора в промышленную канализацию и вывозом остатков упаковок как производственного или бытового мусора. Компоненты изделий, нерастворимые в воде, уничтожают путем сжигания.

- 7) Изделия, содержащие потенциально опасные материалы, перед уничтожением должны быть обеззаражены в соответствии с действующим локальным законодательством.
- 8) Технические приспособления, принадлежности, входящие в комплектацию изделия, подлежат механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора или сжиганию.
- 9) Персонал, осуществляющий уничтожение изделий, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

25. Информация о необходимости направления сообщения производителю или его уполномоченному представителю о нежелательных событиях, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента)

По всем вопросам, касающимся эксплуатации, качества изделия и др., на территории Российской Федерации следует обращаться:

ООО «БиоВитрум»

199106, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Большой проспект В.О., дом 68, лит. А.

Телефон: +7 (812) 305 0606

Email: cert@biovitrum.ru.

26. Дополнительная информация

Сведения, находящиеся в данной инструкции, основаны на данных, имеющихся на момент разработки последней редакции. Пользователь обязан убедиться в полноте и соответствии информации для использования изделия по назначению.

В связи с тем, что использование изделия не происходит под непосредственным наблюдением производителя, пользователь обязан руководствоваться законами и действующими положениями по вопросам гигиены и безопасности при использовании изделия по назначению, под собственную ответственность. Производитель не несет ответственности за использование изделия не по назначению.

Руководство пользователя (краткая инструкция)

Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена BRAF методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов фиксированных в формалине и залитых в парафин, 64 реакции

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени	ФСЗ 2009/03609 от 06.06.2016 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

Содержание

1. Реагенты и приборы	3
1.1 Содержимое упаковки	3
1.2 Обращение и хранение	3
1.3 Предостережения и меры предосторожности	4
2. Необходимое оборудование и материалы	6
2.1 Реагенты	6
2.2 Оборудование и вспомогательные материалы	6
3. Описание набора	7
3.1 Информация о настоящем анализе	7
4. Проведение анализа	8
4.1. Выделение ДНК	8
4.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)	8
4.3. Настройки прибора	10
5. Анализ данных	15
5.1. Настройки прибора для анализа	15
5.2 Интерпретация результатов	16
6. Приложения	19
6.1. Устранение неисправностей	19

1. Реагенты и приборы

1.1 Содержимое упаковки

Данный набор содержит следующие компоненты в объеме, достаточном для проведения 52 реакций на основе смеси праймеров/проб, включая все контрольные пробы и образцы:

Наименование	Количество пробирок (шт)	Объем пробирки (мкл)
Реакционная смесь для выявления мутации (2X)	4	1300
Смесь праймеров [†] для выявления BRAF V600ET	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600K	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600R	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600D	1	400
Смесь праймеров для выявления BRAF V600M	1	400
Смесь положительных контролей BRAF V600E/K/R/D/M [§]	1	100
Краткая инструкция (при необходимости) – 1 шт.*		

§ Смесь положительных контролей содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором в фоновой геномной ДНК дикого типа (ДНК WT), и внутренним контролем. Отношение мутантных молекул и молекул дикого типа равно примерно 1:1

† В каждой пробирке содержится особая смесь праймеров для амплификации конкретных мутаций. Содержимое этих пробирок не следует смешивать.

* Полная инструкция по применению изделия размещена на сайте <https://biovitrum.ru/directions/oncodiagnostics.html>

1.2 Обращение и хранение

Набор поставляется с хладоэлементами. Содержимое партии после получения следует хранить в низкотемпературном холодильнике с неоммерзающим испарителем при температуре от -25 °C до -15 °C.

- Все невскрытые компоненты следует хранить в оригинальных упаковках.
- Смеси праймеров/проб следует защищать от воздействия света во избежание фото-обесцвечивания флуоресцентных красителей. Постановку анализа следует проводить, выключив свет в вытяжном шкафу, т.к. пробы могут подвергаться фото-обесцвечиванию прямым воздействием света в момент аликвотирования в реакционную плашку.
- Перед открытием необходимо центрифугировать пробирки.
- Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована. Для пробирок без даты истечения срока годности необходимо использовать дату истечения срока годности, указанную на этикетке коробки.

Краткое описание условий хранения и обращения, необходимых для обеспечения оптимальной стабильности набора:

Реакционный мастер-микс: хранить при температуре от -25°C до -15°C. За один раз рекомендуется размораживать одну пробирку и хранить ее при температуре от 4°C до 8°C не более 60 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность фермента. Если ожидается, что одна пробирка реагента будет расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки.

Смесь праймеров /проб: хранить при температуре от 4°C до 8°C. После размораживания смесь остается стабильной в течение 3 недель. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования.

Смесь положительных контролей: хранить при температуре от 4°C до 8°C в течение 3 недель после первой разморозки. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 3 недель, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования. Следует избегать повторных циклов замораживания-размораживания (не более 3).

Хранение и обращение с компонентами данного изделия в условиях, отличных от вышеописанных, могут повлиять на эффективность данного анализа и отрицательно повлиять на результаты.

Транспортировка изделия осуществляется всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

При транспортировке, осуществлении погрузки и выгрузки изделия должны быть приняты меры, предохраняющие тару от механических повреждений, воздействия атмосферных осадков, горючих материалов и кислот.

При соблюдении условий хранения, эксплуатации и транспортировки, изделие остается стабильным до истечения срока годности, указанного на внешней этикетке.

1.3 Предостережения и меры предосторожности

ПЦР амплификация отличается высокой чувствительностью к перекрестной контаминации. Очень важно проводить этапы, предшествующие амплификации (т.е. выделение ДНК, приготовление ПЦР реакции), в отдельных местах, в идеале в отдельных помещениях с изолированными системами вентиляции. Особенно важно, чтобы подготовка ПЦР реакции осуществлялась в помещении с положительным давлением воздуха (или в ламинарном шкафу).

Во избежание контаминации между образцами/реагентами при работе с ДНК и реагентами для ПЦР необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности:

- Протирать рабочую зону, пипеточные дозаторы и оборудование, предназначенное для использования вблизи рабочей зоны, дезинфицирующим средством для очистки поверхностей (20%-отбеливатель или аналог), с тем чтобы устранить ДНК и ДНКазы, с последующим использованием 70 % этилового спирта.
- Перед применением каждую пробирку следует перемешать на вортексе.
- Центрифугировать все пробирки перед открытием.
- После перемешивания/смешивания на вортексе каждую микроцентрифужную пробирку открывать осторожно, при этом следует избегать касания внутренней части крышки.
- Во избежание перекрестной контаминации для всех этапов пипетирования следует использовать аэрозоль-устойчивые (с фильтром) наконечники.

- Между всеми переносами жидкостей необходимо менять наконечники пипеток.
- При работе с ДНК/реагентами всегда следует надевать перчатки и менять перчатки между этапами, предшествующими амплификации, и пост-амплификации.
- Перемещение пробирок, штативов, пипеток и другого используемого оборудования должно идти в направлении от пре-амплификации до пост-амплификации, и никогда наоборот.

2. Необходимое оборудование и материалы

2.1 Реагенты

Геномная ДНК из замороженных или зафиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: "Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" (РЗН 2021/15704).

Для проведения данного анализа также требуется вода без нуклеаз активности (вода для ПЦР), которая не входит в комплектацию набора.

70 % этанол; 20 % хлорсодержащий отбеливатель (или эквивалент).

2.2 Оборудование и вспомогательные материалы

Оборудование, необходимое для выполнения анализа:

- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени
- Одноразовые неопудренные перчатки
- Пипетки переменного объема
- Стерильные наконечники пипеток с фильтром (без ДНКаз/РНКаз)
- Вортекс
- Микроцентрифуга для микроцентрифужных пробирок 0,2 мл и 2,0 мл
- 96-луночные ПЦР плашки (совместимость плашек см. в руководстве к прибору для ПЦР)
- Оптическая герметизирующая пленка для ПЦР плашек
- Микроцентрифужные пробирки 0,2 мл (дополнительно) и 2,0 мл
- 70 % этанол
- 20 % хлорсодержащий отбеливатель (или эквивалент)

3. Описание набора

3.1 Информация о настоящем анализе

Набор предназначен для выявления соматических мутаций V600E, V600K, V600D, V600R, V600M в 600 кодоне гена BRAF в геномной ДНК человека при меланоме кожи для отбора больных на терапию низкомолекулярными ингибиторами BRAF-киназы.

Таблица 1. Перечень мутаций в гене BRAF, определяемых настоящим набором.

Ген	Экзон	Аминокислотная замена	Нуклеотидная замена	Идентификатор Cosmic	Обнаружено праймером №
BRAF	15	Комплекс V600E/V600E	c.1799T>A/ c.1799_1800delTGinsAA	476/ 475	V600E
		V600K	c.1798_1799GT>AA	473	V600K
		V600R	c.1798_1799GT>AG	474	V600R
		V600D	c.1799_1800TG>AT	477	V600D
		V600M	c.1798G>A	1130	V600M

Данный набор не определяет какие-либо другие мутации в гене BRAF, которые не указаны в перечне выше.

4. Проведение анализа

4.1. Выделение ДНК

Геномная ДНК из замороженных или зафиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit” (РЗН 2021/15704).

Проведите процедуру выделения геномной ДНК в соответствии с протоколом производителя. Достаточное количество ДНК может быть выделено из зафиксированных формалином и залитых в парафин блоков (FFPE) или свежих замороженных срезов (около 2–10 мкг). После выделения ДНК следует измерить концентрацию с помощью спектрофотометрического или флуоресцентного анализа (например, на приборах Nanodrop, УФ-спектрофотометр, Qubit) и довести концентрацию ДНК до 10 нг/мкл. Если концентрация ниже 10 нг/мкл, то её компенсируют объемом воды во время постановки реакции.

Для анализа требуется примерно 100 нг ДНК, 20 нг образца на реакцию. Однако качество ДНК, выделенной из FFPE блоков, может варьироваться из-за фрагментации. Таким образом, концентрация ДНК не отражает количество амплифицируемой ДНК, доступной для анализа. Для определения оптимального количества ДНК для проведения какого-либо анализа методом ПЦР-РВ рекомендуется использовать набор анализа внутреннего контроля качества компании «ЭнтроГен» (кат. № IQCA-RT50).

4.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)

Разморозить необходимые пробирки смеси праймеров/проб, смеси положительных контролей и 2X реакционной смеси для запуска.

В каждой реакционной пробирке 2X мастер-микса в наборе содержится достаточное количество реагентов для выполнения 16 реакций (включая контроли) с допустимым избытком 5 % на смесь праймеров (всего 80 реакций).

Перемешать каждую пробирку на вортексе и центрифугировать в течение 10 секунд при комнатной температуре на 2000об/мин..

Общий объем реакционных смесей для ПЦР составляет 30 мкл/реакция. Предварительно стоит подготовить мастер микс для всех испытываемых образцов (в том числе для контрольных образцов) с 5-10% избытком объема, чтобы компенсировать потери пипетирования.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Компоненты	Объем
2X Реакционная смесь для ПЦР	15 мкл
Смесь праймеров	6 мкл
Образец ДНК	20 нг
Сверхчистая вода	довести до 30 мкл

Каждый образец анализируется в 5 реакциях (по 1 на каждую мутацию). Максимальное количество неизвестных образцов, которые могут быть проанализированы с помощью одного запуска, варьируется в зависимости от используемого прибора.

Прибор	Вместимость ротора	Количество образцов на анализ
Applied Biosystems (за исключением StepOne)	96 лунок	17
StepOne, Applied Biosystems	48 лунок	7
RotorGene	100 лунок	18
LightCycler 480. Roche	96 лунок	17

1. Подготовить мастер-микс для каждого образца в соответствии с таблицей ниже:

Реагенты	Конечная концентрация	Объем для каждого образца (с допустимым избытком 5 %)
Реакционная смесь для определения мутации 2X	1X	78,75 мкл
Смесь положительных контролей*, вода или ДНК	20 нг	5,25 мкл
Вода без нуклеаз		42 мкл

*5,5 мкл положительного контроля (ПК) на мастер-микс с допустимым избытком эквивалентно 1 мкл ПК на реакцию.

2. Перемешать каждую пробирку на вортексе и центрифугировать в течение 10 секунд при комнатной температуре.
3. Распределить по 24 мкл мастер-микса на лунку, как показано на рисунке 1.
4. Добавить по 6 мкл каждой смеси праймеров для определения мутации (V600E, V600K, V600R, V600D или V600M) в соответствии с рисунком 1.
5. Перемешать смесь пипетированием несколько раз.
6. Заклеить плашку оптической герметичной пленкой (плашки ABI/«Рош») или закрыть крышками (для пробирок Rotor-Gene).
7. (Дополнительно, но рекомендуется для приборов ABI и «Рош») Центрифугировать плашку в течение 1 минуты на скорости 1500 об./мин..

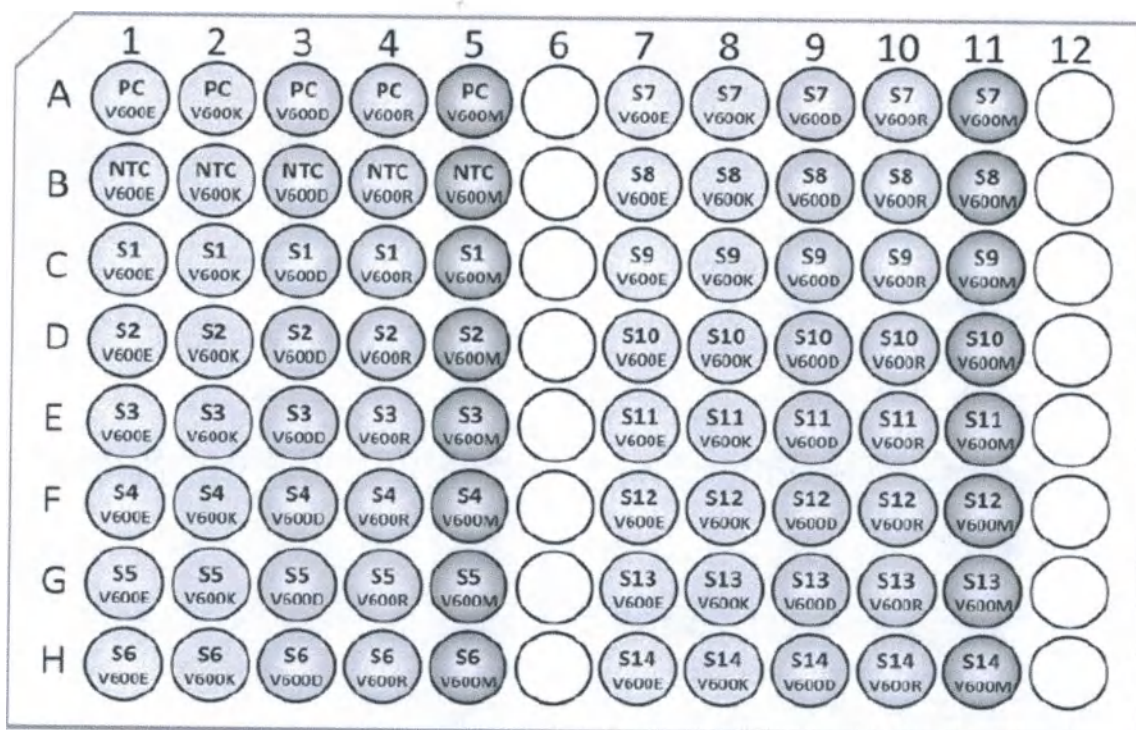


Рисунок 1. Предложенный макет плашки для одного эксперимента при анализе 14 образцов. ПК: смесь положительного контроля; КБМ: контроль без матрицы (вода); S1-14: неизвестные образцы.

4.3. Настройки прибора

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

1. В «Мастере запуска» (Startup Wizard) выбрать «Создать новый эксперимент» (Create New Experiment) и убедиться, что в раскрывающемся списке выбрано CFX96. Нажать ОК.
2. Во вкладке «Протокол» (Protocol) окна «Установка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры цикла.

Этап	Температура	Время
1	95 °C	10 мин
2	95 °C	15 сек.
3	58 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
4	Повторить с шага 2 еще 39 раз	
	ЗАВЕРШЕНИЕ	

3. Изменить объем образца на 30 мкл.

4. После завершения нажать «ОК», чтобы сохранить шаблон протокола. Обратить внимание на расположение сохраняемого файла шаблона, чтобы использовать его для последующих анализов. Нажать «Дальше» (Next), чтобы перейти к окну «Установка плашки» (Plate Setup).
5. Во вкладке «Плашка» (Plate) нажать «Создать новый» (Create New), чтобы создать макет плашки.
6. Нажать на кнопку «Выбрать флуорофоры» (Select Fluorophores) и отметить поля рядом с FAM и VIC. Все другие поля должны остаться не отмеченными. Нажать ОК.
7. Выберите строку A1-A5 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на Положительный контроль (Positive Control).
8. Выберите строку B1-B5 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на КБМ (контроль без матрицы).
9. Выбрать оставшиеся лунки (C1-H5; A-H 7-11) на макете плашки и изменить «Тип образца» (Sample Type) на «Неизвестные» (Unknown).
10. Выделите каждую строку отдельно (начиная с C1-C5) и введите название образца в поле Наименование образца (Sample Name). Когда закончите, нажмите Enter на клавиатуре, чтобы записать название образца. Выполните этот шаг для каждого образца.
11. Нажать на «Настройки» (Settings) и выбрать тип используемой плашки (например, BR Белая (White) или BR Прозрачная (Clear)).
12. После этого нажать кнопку ОК, чтобы сохранить макет плашки.
13. Нажать «Дальше» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

1. Запустить программу SDS, затем перейти к «Файл» (File) > «Новый эксперимент» (New Experiment) > «Установка эксперимента» (Experiment Setup).
2. Введите имя эксперимента, затем выберите систему QuantStudio 5™. Выберите тип блока (96-луночный блок 0,2 мл).
3. Выберите Количественное определение (Quantitation) > - Сравнительный CT (ΔΔCT) (Comparative CT (ΔΔCT)) для типа эксперимента.
4. Выберите TaqMan® для химического анализа и выберите «Быстрый» (Fast) для режима анализа.
5. Перейти к разделу «Метод» (Method) и в поле «Характеристики плашки» (Plate Attributes) убедиться в том, что Пассивный референсный краситель (Passive Reference Dye) установлен на «ОТСУТСТВУЕТ» (NONE). Перейти к вводу следующих параметров:

Объем 30 мкл крышка 105°

Температура	Время	Циклы	Сбор данных
95 °C	10 мин	X1	Отсутствует
95 °C	15 сек.	X40	Отсутствует
60 °C	30 сек.		Вкл.

6. Перейти к разделу «Плашка» (Plate) и в поле «Характеристики плашки» (Plate Attributes) убедиться в том, что Пассивный референсный краситель (Passive Reference Dye) установлен на «ОТСУТСТВУЕТ» (NONE).
7. Перейти к вкладке «Расширенная настройка» (Advanced Setup). В поле «Мишени» (Targets) необходимо изменить название Цели 1 на FAM и убедиться в том, что детектором является FAM. Установить гаситель люминисценции на «Отсутствует» (None) или NFQ-MGB.
8. Нажать кнопку «Добавить» (Add), чтобы добавить второй детектор и назвать его IC. Изменить репортер для этого детектора на VIC и установить гаситель люминисценции на «Отсутствует» (None) или NFQ-MGB.
9. В поле «Образцы» (Samples) необходимо добавить ПК для смеси положительного контроля, КБМ для контроля без матрицы (вода), а также наименования образцов.
10. «Назначить мишени и образцы» (Assign Targets and Samples) в разметку плашки, как рекомендовано выше. Оба детектора должны быть добавлены в каждую лунку, содержащую образец, реакцию ПК или КБМ.
11. Убедиться в том, что объем реакционной смеси установлен на 30 мкл, а «Сбор данных» (Data Collection) включен на этапе при температуре 60 °C.
12. Поставить реакционную плашку в прибор, нажать «ЗАПУСТИТЬ АНАЛИЗ» (START RUN).

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

1. Выбрать «Файл» (File) > «Новый» (New), в диалоговом окне нажать вкладку «Расширенные» (Advanced), выбрать «Двухэтапный» (Two Step) и нажать «Новый» (New).
2. Выбрать 72-луночный ротор, отметить поле «Предохранительное кольцо присоединено» (Locking Ring Attached) и нажать «Далее» (Next), затем Мастер пропуска (Skip Wizard).
3. Перейти к «Вид» (View) > «Настройки анализа» (Run Settings), ввести 30 мкл для объема реакционной смеси и нажать «ОК».
4. Перейти к Вид (View)> Редактор профиля (Profile Editor). В поле должно быть указано два цикла; «Инкубация» (Hold) и «Циклирования» (Cycling).
5. Ввести следующие параметры этапа, нажав на каждый этап на панели справа:

Этап	Температура	Время	Сбор данных
Инкубация	95 °C	10 минут	Не производится
Установленный этап	95 °C	15 секунд	Не производится

Установленный этап 40 циклов	60 °C	30 секунд	Запрашиваемые каналы: зеленый (Green) и желтый (Yellow)
---------------------------------	-------	-----------	--

- Нажмите ОК. Также, вы можете сохранить такой шаблон для дальнейших запусков, нажав на кнопку «Сохранить как» вверху диалогового окна.
- Перейти к «Вид» (View) > «Оптимизация уровня сигнала» (Gain Optimization), из раскрывающегося списка «Настройки каналов» (Channel Settings) выбрать «Все каналы» (All Channels) и задайте калибровку перед первым измерением (Perform Optimization Before 1st Acquisition). Примечание: Этот этап нужно выполнять только один раз при использовании новой партии реагентов. После определения Оптимизации уровня сигнала (Gain Optimization) используйте те же настройки для будущих запусков с реагентами с тем же номером партии.
- Загрузить стрипы пробирок в ротор.
- Перейти к «Анализ» (Run) > «Запустить анализ» (Start Run), затем нажать кнопку «Запустить» (Start), чтобы начать анализ.

Примечание: диалоговое окно «Редактировать образцы» (Edit Samples) открывается сразу после запуска анализа. Информацию об образцах можно вводить во время работы прибора или после завершения анализа.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени

- В «Навигации» (Navigator) необходимо нажать «Новый» (New), чтобы запустить новый эксперимент LightCycler® 480.
- Выбрать «Двухцветная гидролизующая проба / UPL проба» (Dual Color Hydrolysis Probe / UPL Probe) для «Формата обнаружения» (Detection Format).
- Нажать «Настроить» (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
- Изменить объем реакционной смеси на 30 мкл.
- Добавьте следующие целевые значения программы и температуры:

Наименование программы	Циклы	Режим анализа
Денатурация	1	Нет
Циклирование	40	Количественная оценка

Для этапа Денатурации:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Удержание (чч:мм:сс)
95	Нет	00:10:00

Для этапа Циклирования:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Удержание (чч:мм:сс)	Скорость линейного изменения (°C/сек.)
95	Нет	00:00:15	4.4
60	Однократное	00:00:30	2.2

6. Перейти к «Редактору образца» (Sample Editor) и выбрать «Относительный количественный анализ» (Rel Quant) в качестве «Рабочего процесса» (Workflow), затем назначить образцы для плашки.
7. Выбрать кнопку «Эксперимент» (Experiment) и нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы сохранить файл и начать анализ.

5. Анализ данных

Важно: для пороговых значений может потребоваться корректировка с учетом чувствительности флуоресцентной детекции каждого термоциклера. В качестве исходной точки необходимо использовать перечисленные ниже параметры.

5.1. Настройки прибора для анализа

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Manual threshold (Ручное пороговое значение): (см. Пороговое значение ниже)
- Baseline (Исходные данные): Auto Calculated (Рассчитано автоматически)

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение VIC
CFX	135	220

Примечание: пороговые значения, возможно, потребуется скорректировать с учетом различий в оптике и аппаратном обеспечении прибора Термоциклера для амплификатора нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Ручное пороговое значение (см. Пороговое значение ниже)
- Исходный уровень:

FAM: 3-22

VIC 3-15

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение VIC
QuantStudio 5™	50 000	25 000

Примечание: пороговые значения, возможно, потребуется скорректировать с учетом различий в оптике и аппаратном обеспечении прибора ABI.

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Динамическое изменение кривизны: вкл.
- Поправка наклона: вкл.
- Удаление выбросов: 5 %
- Пороговое значение зеленого канала: 0,02
- Пороговое значение желтого канала: 0,04

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- Выбрать «Абсолютная количественная оценка/Базовые точки» (Abs Quant/Fit Points)
- Полоса шумов (STD Mult): VIC [60], FAM [30]

5.2 Интерпретация результатов

Для анализа полученных результатов для каждого образца используйте таблицу и **Рисунок 2** ниже.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени:

VIC Ct	FAM Ct	Результат
$0 < Ct < 26$	$Ct > 37,5$;	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$0 < Ct < 26$	$Ct \leq 37,5$; $Ct = 0$	Повторный анализ с меньшей концентрацией ДНК.
$26 \leq Ct \leq 31$	$Ct > 37,5$; $Ct = 0$	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$26 \leq Ct \leq 31$	$Ct \leq 37,5$	Положительный тест на мутацию.
$Ct > 31$; $Ct = 0^{\dagger}$	$Ct > 37,5$; $Ct = 0$	Повторный анализ с большей концентрацией ДНК.
$Ct > 31$;	$Ct \leq 37,5$	Положительный тест на мутацию.

Все прочие приборы:

VIC Ct	FAM Ct	Результат
$0 < Ct < 26$	$Ct > 37,0$	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$0 < Ct < 26$	$36,5 \leq Ct \leq 37$; $Ct = 0$	Повторный анализ с меньшей концентрацией ДНК.
$0 < Ct < 26$	$0 < Ct < 36,5$	Положительный тест на мутацию.
$26 < Ct < 31$	$37,0 < Ct$; $Ct = 0$	Отсутствие мутации. Повторный анализ не требуется.
$26 \leq Ct \leq 31$	$Ct \leq 37,0$	Положительный тест на мутацию.
$Ct > 31$; $Ct = 0^{\dagger}$	$37,0 < Ct$; $Ct = 0$	Повторный анализ с большей концентрацией ДНК.
$Ct > 31$; $Ct = 0^{\dagger}$	$Ct \leq 37,0$	Положительный тест на мутацию.

‡ Значения C_t для канала VIC у одного образца для всех 5 реакций должны отличаться не более, чем $\pm 2,5 C_t$. Если различие значений C_t канала VIC $> 2,5 C_t$, то образец необходимо повторно исследовать с большим или меньшим количеством ДНК в зависимости от того, является ли предположительная проблема плохого качества образца или ПЦР ингибиторов.

Гомология последовательностей между мутантными вариантами V600E приводит к сигналам перекрестной реактивности. Для определения статуса мутации образцов необходимо использовать нижеприведенные графики амплификации. Из-за ингибирующего эффекта меланина в образцах, сигнал от реакций, которые появляется после цикла 34, считается поздними значениями C_t . Эти поздние значения C_t могут не пересекать шкалу порогового значения или вообще не появляться.

Если имеются явные положительные сигналы, которые не соответствуют вышеописанным профилям, то образец является положительным для мутации, соответствующей реакции с первым/самым ранним значением C_t .

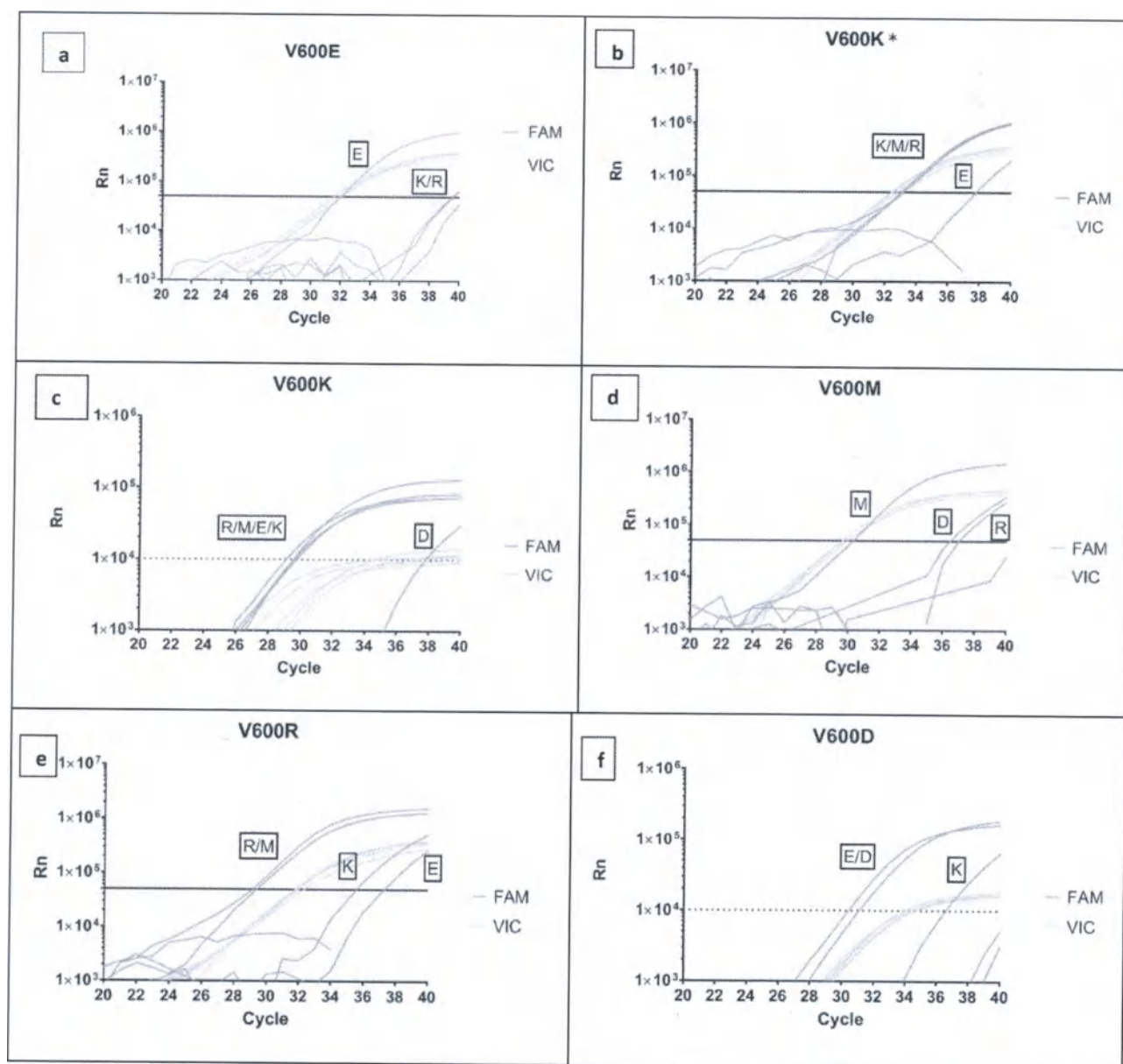


Рисунок 2. Принцип анализа мутаций в 600 кодоне гена BRAF: профили перекрестной реактивности каждой мутации.

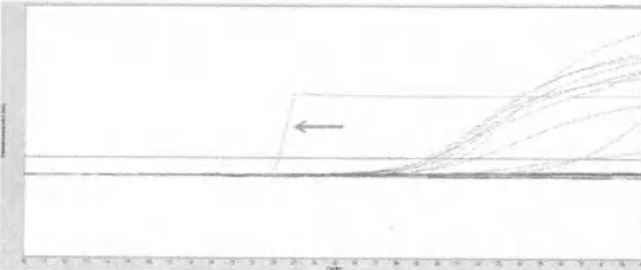
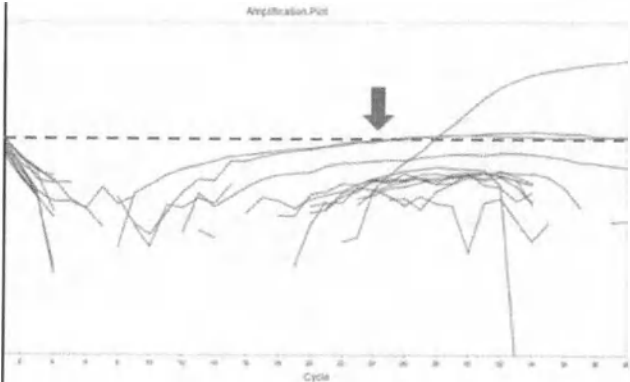
Определение статуса мутации из схем реакций:

1. Необходимо использовать таблицу Ct, приведенную выше, для определения статуса образца на реакцию (положительный, отрицательный, избыточная концентрация, недостаточная концентрация).
2. Из-за гомологии последовательностей в результатах может обнаруживаться перекрестная реактивность. На **Рисунке 2** и ниже описаны возможные варианты подобных результатов и принцип их анализа.
 - a. V600E
 - i. Раннее значение Ct: V600E
 - ii. Поздние значения Ct: V600K/R
 - b. V600K*
 - i. Ранние значения Ct: V600K/M/R (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Позднее значение Ct: V600E
 - c. V600K
 - i. Ранние значения Ct: V600K/M/R/E (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Позднее значение Ct: V600D
 - d. V600M
 - i. Ранние значения Ct: V600M
 - ii. Позднее значение Ct: V600D/R
 - e. V600R
 - i. Ранние значения Ct: V600R/M (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Поздние значения Ct: V600K/E
 - f. V600D
 - i. Раннее значение Ct: V600E/D (в пределах 1,7 Ct друг от друга)
 - ii. Поздние значения Ct: V600K

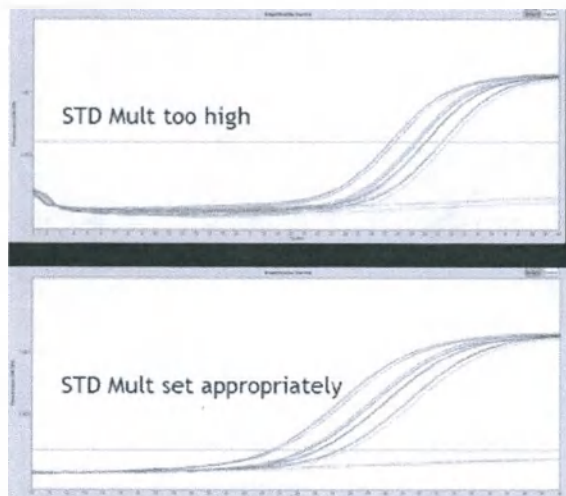
6. Приложения

6.1. Устранение неисправностей

Проблема:	Раствор:
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение Ct выше, чем верхнее пороговое значение Ct, указанное в разделе 8.	· Если положительный целевой сигнал (например, FAM, ROX, Cy5) возникает до порогового значения Ct, значит образец является положительным. См. таблицу Ct в разделе 8. · Если целевой сигнал возникает после порогового значения или не возникает, реакция была недостаточно насыщена (недостаточно ДНК), необходимо провести повторный анализ с большим количеством ДНК. · Если анализ образца, в котором, как известно, имеются ингибиторы ПЦР (например, образцы меланомы имеют меланин, который является ингибитором ПЦР), необходимо провести повторный анализ образца с меньшим количеством ДНК или разбавить образец водой в соотношении 1:5 и повторно провести анализ. · Если увеличение/уменьшение объема ДНК не решает проблему: 1. Повторно выделить ДНК (при возможности). 2. Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. 3. Использовать коммерчески доступный концентратор ДНК.
Целевой и внутренний контрольные сигналы являются отрицательными для положительного контроля (ПК).	· Реагенты могут деградировать. Для получения дополнительной информации необходимо связаться со своим поставщиком. · Во избежание последующих сбоев в работе реагента необходимо выполнять инструкции по хранению и обращению, которые содержатся в разделе 11 настоящей инструкции.
Аномальный пик на графике усиления образца с помощью прибора ABI.	· Аномальная линия пика может быть результатом пузырьков в лунке, содержащей образец. Центрифугировать плашку перед повторным запуском образца. · Аномальный пик может быть ошибкой детекции флуоресценции прибором. Провести повторный анализ другой плашки, чтобы убедиться в отсутствии воспроизводимости. Если пик

 Fluorescence Цикл Флуоресценция Цикл	воспроизводится, необходимо связаться с производителем прибора.
Сигнал в контроле КБМ.	· Указывает на контаминацию геномной ДНК. Оценить лабораторную процедуру. Предложения по сведению к минимуму загрязнения рабочей поверхности см. в разделе 13.10 настоящей инструкции. · Если присутствует только сигнал внутреннего контроля и значение $C_t \geq 36$, результаты можно использовать для определения мутационного статуса образца. · Если присутствует только целевой сигнал, результаты могут дать ложноположительный результат, требуется повторный запуск. · Если присутствуют и целевой сигнал, и сигнал внутреннего контроля, результаты могут дать ложноположительный результат, требуется повторный запуск.
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ при проведении анализа на приборе ABI.  Amplification Plot Цикл График амплификации Цикл	· Обеспечить установку ручных пороговых значений, предложенных в настоящей инструкции. · Убедиться в том, что сигнал не является истинной амплификацией путем проверки сигнала на многокомпонентном графике (приборы Life Technologies). Если сигнал горизонтальный, то это не истинная амплификация. Если сигнал на многокомпонентном графике является линейным и сигнал пересекает пороговое значение, необходимо отрегулировать базовый конечный цикл. Установить начальный цикл на 3 и остановить: самый ранний цикл VIC C_t (если сигнал по-прежнему пересекает пороговое значение, увеличивать число циклов с шагом 3 до тех пор, пока сигнал не перестанет пересекать пороговое значение).

Умножитель STD установлен на высоком уровне кривой амплификации на приборе LC480/cobas Z480 (см. ниже)



STD Mult too high

Слишком высокий STD Mult

STD Mult set appropriately

STD Mult установлен соответствующим образом

Cycle

Цикл

Проверить наличие любого аномального фонового шума (например, градиент во флуоресценции) в течение первых 10 циклов. При возникновении какого-либо аномального шума необходимо исключить аномальный шум, настроив первый цикл для диапазона цикла после цикла, в ходе которого наблюдается аномальный шум.

При отсутствии аномального фонового шума, настройка множителя STD может быть несоответствующей для прибора и должна быть подвергнута повторной оценке с использованием стандартных образцов и ранее испытанного материала.

Образец дикого типа имеет значение C_t целевого сигнала, которое попадает в параметры для статуса положительной мутации.

Если сигнал внутреннего контроля находится в пределах диапазона, тогда образец дикого типа загрязнен положительным образцом или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа.

Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.

[Перевод с английского языка на русский язык]

[Перевод надписей и нотариального заверения на документе «Инструкция по применению медицинского изделия „Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена BRAF методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов фиксированных в формалине и залитых в парафин, 64 реакции“», представленном на русском языке.]

13 декабря 2021 г.

/подпись/

НОТАРИАЛЬНОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ ШТАТА КАЛИФОРНИЯ

§ 1189 ГРАЖДАНСКОГО КОДЕКСА

Нотариус или иное должностное лицо, заполняющее данное удостоверение, подтверждает только личность лица, подписавшего документ, к которому прилагается настоящее удостоверение, и не удостоверяет верность, точность или действительность упомянутого документа.

Штат Калифорния)
Округ Лос-Анджелес)

13 декабря 2021 г. ко мне, _____
Дата

Митре Н. Катц, нотариусу,
Указать имя и должность должностного лица

лично явился _____

Мэтью Минковски,
Имя (имена) подписавшего(-их) лица (лиц)

который подтвердил мне на основании достаточных доказательств, что он является лицом, чья подпись проставлена на указанном документе, а также что он подписал указанный документ в качестве правомочного лица, и что его подпись на указанном документе означает, что указанный документ подписан физическим или юридическим лицом, от имени которого действовало указанное лицо.

[Печать:

Митра Н. Катц
Округ Лос-Анджелес, Калифорния
Нотариус
Лицензия № 2226229

Моя лицензия действительна до
23 декабря 2021 г.

NSP1]

Поставить нотариальную печать

Я удостоверяю под СТРАХОМ НАКАЗАНИЯ ЗА
ЛЖЕСВИДЕТЕЛЬСТВО в соответствии с
законодательством штата Калифорния, что изложенное
выше является точным и верным.

В СВИДЕТЕЛЬСТВО ЧЕГО я ставлю собственноручную
подпись и официальную печать.

Подпись /подпись/
Подпись нотариуса

СВЕДЕНИЯ, УКАЗЫВАЕМЫЕ ПО ВЫБОРУ

Указание данной информации может предотвратить изменение документа или попытки повторного приложения данного бланка к другому документу в мошеннических целях.

Характеристика прилагаемого документа

Название или тип документа: _____ Инструкция по применению
медицинского изделия.

Дата документа: _____, кол-во страниц: _____

Дополнительное(-ые) подписавшее(-ие) лицо(-а): _____

Должностное(-ые) положение(-я), указанное(-ые) подписавшим(-и) лицом(-ами)

Имя подписавшего лица: _____ Имя подписавшего лица: _____

☐ Должностное лицо корпорации — ☐ Должностное лицо корпорации —
должность(-и): _____ должность(-и): _____

☐ Партнер — ☐ с ограниченной ☐ Партнер — ☐ с ограниченной
ответственностью ☐ полный ответственностью ☐ полный

☐ Физическое лицо ☐ Физическое лицо

☐ Доверенное лицо ☐ Доверенное лицо

☐ Доверительный собственник ☐ Доверительный собственник

☐ Законный представитель или арбитражный ☐ Законный представитель или арбитражный
управляющий управляющий

☐ Прочее: _____ ☐ Прочее: _____

Подписавшее лицо представляет интересы: _____ Подписавшее лицо представляет интересы: _____

Текст данного документа перевёл переводчик Рахимкулов Эльдар Серкалиевич. Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является правильным, точным и полным.

Российская Федерация
Город Москва

Семнадцатого февраля две тысячи двадцать второго года

Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Рахимкулова Эльдара Серкалиевича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документа установлена.

Зарегистрировано в Едином государственном реестре нотариусов № 77/2019-н/77-2022-71847

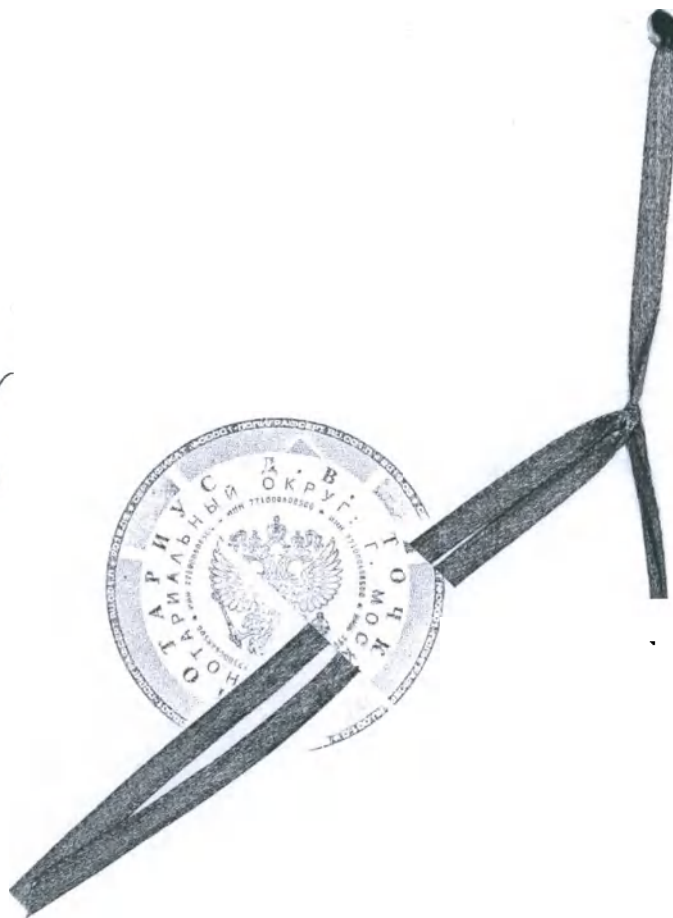
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.



Д.В. Точкин

Всего прошурувано, пронумеровано
и скреплено печатью 59 (пяти) листов

Нотариус



Российская Федерация

Город Москва

Восемнадцатого февраля две тысячи двадцать второго года
Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы,
свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2022-

Уплачено за совершение нотариального действия: 3600 руб.



Д.В. Точкин

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью __60__ лист(а)(ов)

Нотариус

