

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО «Онкодиагностика АТЛАС»
В.А. Милейко
«Онкодиагностика АТЛАС» 2022 г.
Москва

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

медицинского изделия для диагностики in vitro

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования
(Соло-тест Атлас)
по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018»



ООО «Онкодиагностика АТЛАС»,
121069, Москва, ул. Малая Никитская д.31,
стр.1, эт.1, пом.4

IVD

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОПИСАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одновременного выявления клинически значимых мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA методом высокопроизводительного секвенирования. Перечень генов и клинически значимых мутаций приведен в таблице 1.

Таблица 1
Список клинически значимых мутаций

Ген	Мутации	Примеры лекарственных препаратов, на эффективность которых влияют мутации*	Обоснование*
BRAF	V600	Вемурафениб, Дабрафениб	Инструкция ГРЛС, PMID 27283860, PMID 25265494, Клинические рекомендации МЗ РФ ¹
EGFR	L858R, Ex19del, L861Q, G719X, S768I, Ex20ins, T790M	Эрлотиниб, Гефитиниб, Афатиниб, Осимертиниб	Инструкция ГРЛС, PMID 28184913, Клинические рекомендации МЗ РФ ²
KRAS	G12, G13, A59, Q61, K117, A146	Цетуксимаб, Панитумумаб	Инструкция ГРЛС, PMID 24024839, Клинические рекомендации МЗ РФ ³
NRAS	G12, G13, A59, Q61, A146	Цетуксимаб, Панитумумаб	Инструкция ГРЛС, PMID:24024839, Клинические рекомендации МЗ РФ ⁴
KIT	D816V	Иматиниб, Сунитиниб, Регорафениб	Инструкция ГРЛС, PMID 17046465, PMID 25641662, Клинические рекомендации МЗ РФ ⁵
PDGFRA	D842V	Иматиниб, Сунитиниб, Регорафениб	Инструкция ГРЛС, PMID 12949711, Клинические рекомендации МЗ РФ ⁶

* - справочная информация. Назначение приведенных лекарственных препаратов осуществляется исключительно лечащим врачом.

Производителем (изготовителем) медицинского изделия является Общество с ограниченной ответственностью «Онкодиагностика АТЛАС» (ООО «Онкодиагностика АТЛАС»), 121069, г. Москва, ул. Малая Никитская, дом 31, стр. 1, эт.1, пом.4.

Набор предназначен для использования совместно с медицинским изделием «Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения: MiSeq, MiSeqDx» (ПУ № РЗН2014/1568 от 29.04.2014).

Показанием к применению набора является необходимость определения клинически значимых мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA.

Противопоказания - отсутствуют.

¹ <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/999>

² <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/900>

³ <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/255>

⁴ <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/255>

⁵ <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/822>

⁶ <http://cr.rosminzdrav.ru/#!/schema/822>

Область применения набора - клиническая лабораторная диагностика, лабораторная генетика.

Потенциальными потребителями набора являются лаборатории молекулярной диагностики или патоморфологические лаборатории, выполняющие анализ предиктивных генетических биомаркеров при онкологических заболеваниях. Набор предназначен для использования только квалифицированным медицинским персоналом.

Тип анализируемого образца - пробы ДНК, выделенные из опухолевой ткани пациента, фиксированной в формалине и заключенной в парафин (FFPE-блоки).

Функциональное назначение теста, выполняемого с помощью набора реагентов, состоит в одновременном выявлении клинически значимых мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA. Клиническая значимость мутаций определяется в соответствии с клиническими рекомендациями, инструкциями к лекарственным препаратам и данными научных исследований (см. Табл.1).

ВАЖНО! Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики in vitro – набор реагентов предназначен для выявления генетических подтипов злокачественных новообразований, несущих мутации в онкогенах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA, а именно меланомы, колоректального рака, рака легкого, гастроинтестинальных стромальных опухолей.

Перечень рисков, идентифицированных в процессе анализа риска, и описание способов их управления.

1) В процессе анализа рисков набора определены требования безопасности: установлен класс потенциального риска применения медицинского изделия, а также перечень стандартов и требований, соблюдение которых обеспечивает безопасность при работе с набором. Выявлены вероятные неблагоприятные события и специфические воздействия на организм человека, которые могут произойти при работе с набором. Проведен анализ возможных интерферирующих веществ, способных повлиять на результат анализа, проводимых с помощью набора. По результатам проведенной проверки было показано, что нижеперечисленные вещества, в указанных концентрациях, не оказывают интерферирующего влияния на результат анализа:

Парафиновый воск (в ксилоле) - $2 \cdot 10^{-4}$ мкл / 200 мкл раствора ДНК, полученного с помощью набора «ДНК-Ткань-Ф»

Ксилол - $2 \cdot 10^{-4}$ мкл / 200 мкл раствора ДНК, полученного с помощью набора «ДНК-Ткань-Ф»

Этиловый спирт (95%) - $1,35 \cdot 10^{-4}$ мкл / 200 мкл раствора ДНК, полученного с помощью набора «ДНК-Ткань-Ф»

Протеиназа К - 200 мкг/мкл

Гемоглобин – 2 г/л

Проведение исследований образцов с заметным присутствием некротических тканей следует исключить

Остаточные риски влияния интерферирующих веществ исключаются за счет определения минимальной глубины покрытия в качестве внутреннего контроля. Средняя глубина покрытия отражает сколько раз «прочитывается» каждый нуклеотид целевой последовательности и составляет 250х, не менее. Показатели средней глубины прочтения анализируемых образцов можно проверить программе Local Run Manager (см. п. 6.1.6).

2) Дополнительно, чтобы оценить влияние экзогенного влияния, была выполнена двухэтапная проверка кросс-реактивности разработанной панели праймеров для оценки

возможного влияния контаминации образца сторонними источниками ДНК, по результатам которой было установлено следующее:

1. При проверке разработанной панели праймеров на комплементарность последовательностям бактерий и вирусов человека с использованием базы данных NCBI (The National Center for Biotechnology Information) было установлено, что последовательности используемых праймеров не встречаются в микробных геномах, а значит, не могут амплифицировать постороннюю ДНК.

2. При проверке на образцах ДНК кишечной палочки (Genomic DNA of *Escherichia coli* O157 (EDL 933), Sigma-Aldrich) в качестве исследуемой пробы с помощью набора Соло-тест ABC в соответствии с инструкцией было показано отсутствие библиотеки ДНК на этапе подготовки библиотек, подтвержденное спектрофотометрическим измерением продуктов реакции, указывает на отсутствие неспецифической амплификации.

Принцип метода.

Метод основан на высокопроизводительном секвенировании (определении последовательности ДНК) участков генома человека. ДНК, выделенная из биоматериала пациента, используется для наработки целевых последовательностей в виде продуктов мультиплексной ПЦР. Далее, к продуктам ПЦР присоединяют (лигируют) олигонуклеотидные адаптеры и вводят уникальные индексные последовательности для определения индивидуальных образцов в данных секвенирования при одновременном анализе методом секвенирования на генетическом анализаторе MiSeq. Полученные результаты секвенирования в виде списка генетических вариантов, отличающихся от референсной (нормальной) последовательности генома человека, сравнивают с перечнем известных патогенных мутаций: при обнаружении мутаций из списка результат тестирования считают положительным, то есть пациент является носителем мутации. Набор реагентов позволяет анализировать последовательности генов BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA для определения клинически значимых мутаций согласно Табл.1.

Принцип действия набора

Набор предназначен для приготовления библиотек целевых фрагментов ДНК. Процесс состоит из 3 этапов и секвенирования с использованием прибора MiSeq, описанных ниже.

Принцип работы набора проиллюстрирован на рисунке 1:

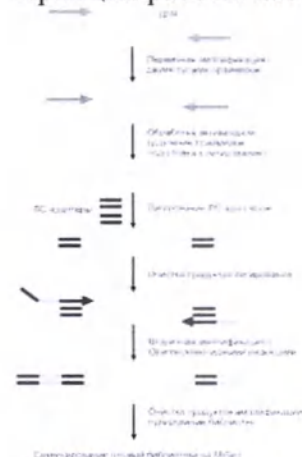


Рис. 1 Принцип работы набора

Первый этап: ДНК, выделенная из биоматериала пациента, используется для наработки целевых фрагментов в виде продуктов мультиплексной ПЦР.

Второй этап: Удаление праймеров с концевых участков ПЦР продуктов и лигирование к ним олигонуклеотидных адаптеров, необходимых для последующего секвенирования библиотек. Очистка библиотек на магнитных частицах.

Третий этап: Амплификация и очистка библиотек. На данном этапе проводится индексирование библиотек. Для каждого образца ДНК используется собственная

уникальная комбинация олигинуклеотидных индексов, которая позволяет атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования.

Следует отметить, что на данном этапе может проводиться процедура нормализации библиотек, предназначенная для повышения равномерности покрытия при одновременном секвенировании нескольких образцов. Задача нормализации - за счет секвенирования эквимольной смеси образцов получить равномерное распределение прочтений между всеми образцами. Нормализация включает две процедуры: в ходе первого этапа измеряется концентрация ДНК каждого образца, а затем с помощью разведения образцы приводятся к одной молярной концентрации - производится «выравнивание» концентраций, и они смешиваются в равных объемах. Таким образом, в секвенатор MiSeq попадает приблизительно одинаковое количество молекул каждой ДНК-библиотеки, что обеспечивает равномерность покрытия при секвенировании. Нормализация не является обязательной и используется в случаях, если набор реагентов не обеспечивает необходимой равномерности распределения прочтений для достижения минимального необходимого покрытия.

Однако разработанный Набор был оптимизирован для получения концентраций ДНК-библиотек пропорционально входящему количеству ДНК образца. Этого удалось достичь благодаря оптимальному составу компонентов ПЦР-смесей и минимальному количеству циклов амплификации при подготовке библиотек. В ходе доклинических испытаний было показано, что если в исследуемых образцах концентрация ДНК, измеренная с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000, приведена к 5 нг/мкл, то концентрации готовых ДНК-библиотек отличаются незначительно. При этом покрытие каждого образца превышает минимальное рекомендованное (250х) и равномерно распределено между образцами. Таким образом, процедура нормализации не является необходимой для Набора, что было также подтверждено в ходе клинических испытаний. Для обеспечения необходимой равномерности распределения прочтений между образцами достаточно смешивать библиотеки для разных образцов в равных объемах. Исключение стадии нормализации из протокола приготовления библиотек упрощает и ускоряет процедуру анализа, а также исключает влияние погрешности измерительного прибора при нормализации.

Четвертый этап: Секвенирование. На данном этапе происходит секвенирование полученных библиотек на приборе MiSeq. Анализ полученных на секвенаторе данных осуществляется с помощью встроенного пайплайна Local Run Manager (версия 2.0. и выше) (специализированное программное обеспечение, встроенное в MiSeq).

В Наборе имеются четыре комплекта, необходимые для реализации каждого описанного этапа.

Описание основных функциональных элементов

Комплект для целевого обогащения ДНК

Комплект для целевого обогащения ДНК необходим для обогащения фрагментами ДНК, содержащими исследуемые мутации. Для осуществления первого этапа - постановки первичной амплификации (мультиплексной ПЦР) - используется смесь реагентов для амплификации («ПЦР-смесь 1») и набор праймеров, состоящий из двух отдельных пулов (в пробирках «Раствор праймеров 1» и «Раствор праймеров 2»). Реакция амплификации выполняется отдельно для каждого пула праймеров. Остальные компоненты для проведения ПЦР-реакции входят в состав «ПЦР-смеси 1». Кроме того, в Комплект входят положительный и отрицательный контрольные образцы (пробирки «ПКО» и «ОКО»), охарактеризованные по искомым мутациям. Отрицательный контрольный образец не содержит искомым мутаций и позволяет контролировать отсутствие ложноположительных результатов. Положительный контрольный образец содержит одну обозначенную контрольную мутацию и позволяет контролировать правильность

проведения подготовки библиотек и их секвенирования. Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК приводится в таблице 2

Таблица 2

Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК

Раствор праймеров 1	Необходим наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые мутации, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)
Раствор праймеров 2	Необходим наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые мутации, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)
ПЦР-смесь 1	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения первичной амплификации ДНК (мультиплексной ПЦР)
ПКО	Водный раствор ДНК человека, содержащий мутацию L858R в гене EGFR. Он позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования
ОКО	Водный раствор ДНК человека, не содержащий мутаций не содержащий мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA. Он позволяет контролировать отсутствие ложноположительных результатов

Комплект для приготовления библиотек

Комплект для приготовления библиотек необходим для приготовления библиотек из полученных с помощью Комплекта для целевого обогащения ДНК продуктов ПЦР.

По завершении ПЦР-реакции продукты амплификации, полученные с использованием двух пулов праймеров для одного исходного образца ДНК объединяются. На следующем этапе происходит удаление праймеров с концов полученных продуктов ПЦР и подготовка концевых участков к лигированию с помощью «Активатора». Далее проводится лигирование универсальных адаптеров (пробирка «ЛС адаптеры») к продуктам амплификации с помощью «раствора Л» и «ДНК-лигазы». После этого проводится очистка полученных фрагментов ДНК с помощью «Магнитных частиц» и с использованием «Реагента Е». На следующем этапе проводится вторичная амплификация для введения олигонуклеотидных индексов, комбинация которых уникальна для каждого исходного образца ДНК (пробирки «Олигонуклеотидные индексы», «ПЦР-смесь 2»). Введение таких индексов позволяет проводить одновременное секвенирование множества образцов за один запуск прибора. Далее проводится очистка полученного продукта ПЦР на Магнитных частицах с использованием «Магнитных частиц», «Реагента В» и «ТЕ буфера». Далее необходимо измерить концентрацию получившихся библиотек, довести их концентрацию до 4000 пмоль/л, и смешать в равных объемах. Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек приводится в таблице 3.

Таблица 3

Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек

Активатор	Обеспечивает удаление праймеров с концов продуктов первичной амплификации и подготовку концевых участков фрагментов к последующему лигированию.
Раствор Л	Обеспечивает работу ДНК-лигазы (содержит необходимые для ее работы компоненты), необходим для лигирования ЛС адаптеров
ДНК-лигаза	Лигирует («пришивает») ЛС адаптеры к наработанным в результате первичной амплификации фрагментам ДНК
ЛС адаптеры	Короткие двуцепочечные олигонуклеотиды, необходимые для проведения вторичной амплификации (являются местом отжига для Олигонуклеотидных индексов), а также для проведения секвенирования
Магнитные частицы	Необходимы для очистки целевых фрагментов ДНК (от ЛС адаптеров, Олигонуклеотидных индексов)
Реагент В	Необходим для очистки целевых фрагментов ДНК от нелигированных ЛС адаптеров
Реагент Е	Необходим для очистки целевых фрагментов ДНК от свободных Олигонуклеотидных индексов
ТЕ буфер	Необходим для элюции фрагментов ДНК после очистки на Магнитных частицах от свободных Олигонуклеотидных индексов
ПЦР-смесь 2	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения вторичной амплификации ДНК
Олигонуклеотидные индексы	Необходимы для создания уникальной маркировки фрагментов одного образца и позволяют атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования

Комплект для подготовки образца к секвенированию

Комплект для подготовки образца к секвенированию используется для подготовки полученной смеси библиотек с концентрацией 4000 пмоль/л к секвенированию. Проводится щелочная денатурация двуцепочечных молекул ДНК с использованием «раствора НТ1». Денатурированная библиотека помещается в предназначенный для этого резервуар «Картриджа», после чего Картридж помещается в прибор MiSeq. Описание компонентов Комплекта для подготовки образца к секвенированию приводится в таблице 4.

Таблица 4

Описание компонентов Комплекта для подготовки образца к секвенированию

Раствор НТ1	Буферный солевой раствор, необходимый для гибридизации фрагментов ДНК на поверхности проточной кюветы для последующего секвенирования
Картридж	Флакон, содержащий все необходимые для секвенирования растворы, за исключением раствора PR2

Комплект для секвенирования

Комплект для секвенирования необходим для проведения процесса секвенирования. Он содержит «Раствор PR2» и «Проточную кювету», которые требуются для запуска

прибора MiSeq. Описание компонентов Комплекта для секвенирования приводится в таблице 5.

Таблица 5

Описание компонентов Комплекта для секвенирования

Раствор PR2	Буферный солевой раствор, необходимый для проведения секвенирования
Проточная кювета	Необходима для проведения секвенирования. На стеклянной поверхности кюветы происходит реакция, необходимая для прочтения нуклеотидной последовательности прибором MiSeq

Научная обоснованность определяемых мутаций.

Выбор генов диктовался обширными научными публикациями, базами данных, клиническими рекомендациями и инструкциями к противоопухолевым лекарственным препаратам (Вемурафениб, Дабрафениб, Эрлотиниб, Гефитиниб, Афатиниб, Осимертиниб, Цетуксимаб, Панитумумаб, Иматиниб, Сунитиниб, Регорафениб). Следует отметить, что определение мутаций предписано Клиническими рекомендациями, утвержденными Министерством здравоохранения РФ, для следующих генов:

1. BRAF «Меланома кожи и слизистых оболочек» (МКБ 10:C43, C51, C60.9, C63.2, C69.0, C00–C26, C30–C32, C52, C53, C77, C78, C79, D03.0–D03.9, D22, Q82.5, Год утверждения (частота пересмотра):2020., ID:KP73/1);
2. EGFR «Злокачественное новообразование бронхов и легких» (МКБ 10:C34, Год утверждения (частота пересмотра):2020, ID:KP30/1);
3. KRAS/NRAS «Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела» (МКБ 10:C18, C19, Год утверждения (частота пересмотра):2020, ID:KP396/2);
4. KIT/PDGFR «Гастроинтестинальные стромальные опухоли» (МКБ 10:C15–C20, C48, Год утверждения (частота пересмотра):2020, ID:KP 551/1).

Таким образом, данные аналиты (гены) имеют доказанную клиническую и научную обоснованность.

Ограничения по использованию проб исследуемого материала.

Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки. Анализируемая ДНК должна храниться и транспортироваться при температуре от 2 °С до 8 °С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°C.

Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей A260/280 нм, должна составлять не менее 1.6 – 1.8.

Концентрация ДНК, достаточная для проведения анализа, должна составлять 5 нг/мкл.

Проведение исследований образцов с заметным присутствием некротических тканей следует исключить.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора и комплект поставки

В комплект поставки входят:

- Набор реагентов
- Руководство пользователя
- Паспорт.

Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по ссылке <https://cdn.oncoatlas.ru/instruction-atlas.pdf>

Набор выпускается в четырех вариантах исполнения: «Соло-тест Атлас 48-а», «Соло-тест Атлас 48-б», «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б». Варианты исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б» предназначены для проведения полного цикла исследования по выявлению мутаций.

Варианты исполнения «Соло-тест Атлас 48-а» и «Соло-тест Атлас 48-б» включают только компоненты для целевого обогащения ДНК и приготовления библиотек. Для проведения полного цикла исследования с помощью указанных вариантов исполнения необходимо дополнительно использовать реагенты для постановки реакции секвенирования из наборов вариантов исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» или «Соло-тест Атлас 48С-б» или другие рекомендованные производителем используемого секвенатора.

Вариант исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» включает 4 комплекта реагентов:

Состав Набора «Соло-тест Атлас 48С-а» включает:

1. Комплект для целевого обогащения ДНК

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор праймеров 1	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
Раствор праймеров 2	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
ПЦР-смесь 1	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу
ПКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, содержащий мутацию L858R в гене EGFR
ОКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, не содержащий мутаций в целевых последовательностях генов BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA.

2. Комплект для приготовления библиотек:

Название	Объем	Количество	Описание
Активатор	96 мкл	1 пробирка	Буферный раствор в 50% глицерине, содержащий урацил-ДНК гликозилазу
Раствор Л	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор на основе Tris-HCl
ДНК-лигаза	96 мкл	1 пробирка	Раствор фермента ДНК-лигаза в буферном растворе для хранения
ЛС адаптеры	96 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Магнитные частицы	3840 мкл	1 пробирка	Суспензия магнитных частиц в буферном растворе

Реагент В	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора
Реагент Е	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора в Tris-HCl буфере с низким содержанием ЭДТА
ТЕ буфер	2 × 4500 мкл	2 пробирки	Tris-HCl буфер с низким содержанием ЭДТА
ПЦР-смесь 2	2 × 1152 мкл	2 пробирки	Буферный раствор с нуклеозид-трифосфатами и ДНК-полимеразой

Олигонуклеотидные индексы: Си-1	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-2	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-3	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-4	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-5	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-6	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов

3. Комплект для подготовки образца к секвенированию:

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор NT1	5 мл	1 пробирка	Буферный солевой раствор
Картридж	35 мл	1 шт.	Емкость, содержащая нуклеозид-трифосфаты, олигонуклеотиды и ферменты

4. Комплект для секвенирования:

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор PR2	500 мл	1 бутылка	Буферный солевой раствор, содержащий метилхлоризотиазол инон
Проточная кювета	-	1 шт.	Стеклянная пластина, несущая набор олигонуклеотидов в высоконцентрированном солевом растворе

Состав Набора «Соло-тест Атлас 48С-б» включает:

1. Комплект для целевого обогащения ДНК

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор праймеров 1	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
Раствор праймеров 2	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
ПЦР-смесь 1	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу
ПКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, содержащий мутацию L858R в гене EGFR
ОКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, не содержащий мутаций в целевых последовательностях генов BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA.

2. Комплект для приготовления библиотек:

Название	Объем	Количество	Описание
Активатор	96 мкл	1 пробирка	Буферный раствор в 50% глицерине, содержащий урацил-ДНК гликозилазу
Раствор Л	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор на основе Tris-HCl
ДНК-лигаза	96 мкл	1 пробирка	Раствор фермента ДНК-лигаза в буферном растворе для хранения
ЛС адаптеры	96 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Магнитные частицы	3840 мкл	1 пробирка	Суспензия магнитных частиц в буферном растворе
Реагент В	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора
Реагент Е	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора в Tris-HCl буфере с низким содержанием ЭДТА
ТЕ буфер	2 × 4500 мкл	2 пробирки	Tris-HCl буфер с низким содержанием ЭДТА
ПЦР-смесь 2	2 × 1152 мкл	2 пробирки	Буферный раствор с нуклеозид-трифосфатами и ДНК-полимеразой

Олигонуклеотидные индексы: Си-7	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-8	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-9	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-10	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-11	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-12	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов

3. Комплект для подготовки образца к секвенированию:

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор НТ1	5 мл	1 пробирка	Буферный солевой раствор
Картридж	35 мл	1 шт.	Емкость, содержащая нуклеозид-трифосфаты, олигонуклеотиды и ферменты

4. Комплект для секвенирования:

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор PR2	500 мл	1 бутылка	Буферный солевой раствор, содержащий метилхлоризотиазол инон
Проточная кювета	-	1 шт.	Стеклянная пластина, несущая набор олигонуклеотидов в высоконцентрированном солевом растворе

Состав Набора «Соло-тест Атлас 48-а» включает:

1. Комплект для целевого обогащения ДНК

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор праймеров 1	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
Раствор праймеров 2	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
ПЦР-смесь 1	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу
ПКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, содержащий мутацию L858R в гене EGFR
ОКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, не содержащий мутаций в целевых последовательностях генов BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA.

2. Комплект для приготовления библиотек

Название	Объем	Количество	Описание
Активатор	96 мкл	1 пробирка	Буферный раствор в 50% глицерине, содержащий урацил-ДНК гликозилазу
Раствор Л	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор на основе Tris-HCl
ДНК-лигаза	96 мкл	1 пробирка	Раствор фермента ДНК-лигаза в буферном растворе для хранения
ЛС адаптеры	96 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Магнитные частицы	3840 мкл	1 пробирка	Суспензия магнитных частиц в буферном растворе
Реагент В	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора
Реагент Е	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора в Tris-HCl буфере с низким содержанием ЭДТА
ТЕ буфер	2 × 4500 мкл	2 пробирки	Tris-HCl буфер с низким содержанием ЭДТА
ПЦР-смесь 2	2 × 1152 мкл	2 пробирки	Буферный раствор с нуклеозид-трифосфатами и ДНК-полимеразой

Олигонуклеотидные индексы: Си-1	16 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Си-2	16 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Си-3	16 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Си-4	16 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Си-5	16 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Си-6	16 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	12 мкл	1 пробирка	Водный двухпочечных олигонуклеотидов	раствор

Состав Набора «Соло-тест Атлас 48-б» включает:

1. Комплект для целевого обогащения ДНК

Название	Объем	Количество	Описание
Раствор праймеров 1	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
Раствор праймеров 2	240 мкл	1 пробирка	Водный раствор олигонуклеотидов в концентрации 400нМ/л
ПЦР-смесь 1	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу
ПКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, содержащий мутацию L858R в гене EGFR
ОКО	24 мкл	1 пробирка	Водный раствор ДНК человека в концентрации 5 нг/мкл, не содержащий мутаций в целевых последовательностях генов BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA.

2. Комплект для приготовления библиотек:

Название	Объем	Количество	Описание
Активатор	96 мкл	1 пробирка	Буферный раствор в 50% глицерине, содержащий урацил-ДНК гликозилазу
Раствор Л	192 мкл	1 пробирка	Буферный раствор на основе Tris-HCl
ДНК-лигаза	96 мкл	1 пробирка	Раствор фермента ДНК-лигаза в буферном растворе для хранения
ЛС адаптеры	96 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Магнитные частицы	3840 мкл	1 пробирка	Суспензия магнитных частиц в буферном растворе
Реагент В	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора
Реагент Е	4500 мкл	1 пробирка	Многокомпонентная смесь на основе высококонцентрированного солевого раствора в Tris-HCl буфере с низким содержанием ЭДТА
ТЕ буфер	2 × 4500 мкл	2 пробирки	Tris-HCl буфер с низким содержанием ЭДТА
ПЦР-смесь 2	2 × 1152 мкл	2 пробирки	Буферный раствор с нуклеозид-трифосфатами и ДНК-полимеразой

Олигонуклеотидные индексы: Си-7	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-8	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-9	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-10	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-11	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Си-12	16 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	12 мкл	1 пробирка	Водный раствор двуцепочечных олигонуклеотидов

2.2. Характеристики набора

2.2.1. Аналитическая чувствительность набора (минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа) определяется на положительном контрольном образце и составляет 5 нг/мкл.

2.2.2. Аналитическая специфичность набора определяется на отрицательном контрольном образце. При проведении тестирования неспецифических реакций и неправильного определения генотипа выявлено не было, аналитическая специфичность составляет 100%.

2.2.3. Правильность определения нуклеотидной последовательности набором определяется на контрольном образце предприятия путем сопоставления результатов, полученных с помощью набора, с результатами, полученными с помощью секвенирования по Сэнгеру (секвенирование по Сэнгеру использовалось для определения искомым мутаций в контрольном образце предприятия). Контрольный образец предприятия был проанализирован в 10 повторностях, тестирование проводили дважды в разные дни в независимых лабораториях. Правильность составляет 100%.

2.2.4 Предел обнаружения (LoD) определяется на контрольном образце предприятия, как наименьшая частота мутантных аллелей в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA, и составляет 5 %.

2.2.5 Повторяемость определяется на контрольном образце предприятия, как совпадение результатов по определению заявленных мутаций в условиях повторяемости, и составляет 100%.

2.2.6 Воспроизводимость определяется на контрольном образце предприятия, как совпадение результатов по определению заявленных мутаций в условиях воспроизводимости, и составляет 100%.

2.2.7. Диагностические характеристики:

Клинический материал	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
	(с доверительной вероятностью 95%)	(с доверительной вероятностью 95%)
Ткань опухоли	95,1-100%	99-100%

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Класс потенциального риска применения набора – 26 (ГОСТ 31508 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования», Номенклатурная классификация медицинских изделий, утв. Приказом Минздрава Российской Федерации от 6 июня 2012 года № 4н).

При проведении исследования необходимо строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с биологическим материалом человека, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей в соответствии с ГОСТ Р 52905.

Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности".

3.2 При работе с набором необходимо выполнять следующие требования:

- Выполнять анализ с помощью данного набора допускается лицами, не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским или биологическим образованием, обученных методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности").

- Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к электрическим приборам, используемым в технологии (амплификаторы, центрифуги, термостаты и др.); персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и лигированию следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Работу с анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька (неопудренных).

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

- Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

- Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

- Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями. Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

- Набор предназначен для однократного применения. Применять набор строго по назначению.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Не есть, не пить, не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей и слизистой оболочкой. Не глотать.

3.3 Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки;

- раздражение кожи;

- аллергические реакции.

При попадании компонентов набора на кожу и слизистые оболочки – тщательно вымыть руки. Если раздражение не проходит – обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь прополоскать рот водой, при плохом самочувствии - обратиться за медицинской помощью.

Оценка специфических воздействий набора реагентов на организм человека:

- канцерогенный эффект отсутствует;

- мутагенное воздействие отсутствует;

- репродуктивная токсичность отсутствует.

4. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1. ПЦР-бокс БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" (620.100) (ЗАО "Ламинарные системы", Россия).
2. Генетический секвенатор MiSeq («Illumina Inc.», США).
3. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 (Bio-Rad, США).
4. Магнитный штатив для 96-луночных планшетов DynaMag™-96 Side (Thermo Fisher Scientific Inc., США).
5. Вортекс персональный V-1 plus (Вортекс персональный V-1 plus) (BioSan, Латвия).
6. Система регистрации полимеразной цепной реакции в режиме реального времени StepOne, с принадлежностями (Thermo Fisher Scientific Inc., США).
7. Дозаторы пипеточные со сменными наконечниками с диапазонами измерения от 0,5 до 10 мкл, от 2 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл (Eppendorf, Германия).
8. Салфетки безворсовые Kimwipes (KimTech Science).
9. Пробирки 1,5 мл, типа Эппендорф, DNA LoBind, PCR clean, бесцветные, (Eppendorf, Германия).
10. Штатив для пробирок 0,5 мл «рабочее место» на 200 лунок.
11. Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 5430, с принадлежностями (Thermo Fisher Scientific, Германия).
12. Штатив для стрипов и планшетов, 96 лунок.
13. Штатив «рабочее место» для 96-стрипованных пробирок объемом 0,2 мл.
14. Четырехсторонний штатив для пробирок разного объема (50 мл, 15 мл, 1,5 – 2,0 мл, 0,5 мл).
15. Перчатки нитриловые неопудренные.
16. Спирт этиловый лабораторный, 96%.
17. Холодильная камера, поддерживающая температуру 2-8°C.
18. Морозильная камера, поддерживающая температуру от минус 20 до минус 22°C.
19. Вода деионизованная бидистиллированная.
20. Пластиковый пинцет.
21. Комплект для целевого обогащения ДНК, комплект для приготовления библиотек ДНК (из наборов «Соло-тест Атлас 48-а», «Соло-тест Атлас 48-б», «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б»).
22. Комплект для подготовки к секвенированию, комплект для секвенирования (из наборов «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б»).

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

5.1. Для определения клинических значимых мутаций используются пробы ДНК, выделенные из опухолевой ткани пациента, фиксированной в формалине и заключенной в парафин (FFPE-блоки).

Для парафиновых блоков (FFPE) необходимо соблюдать следующие требования:

Предварительно провести их морфологический анализ. Образцы считаются пригодными для анализа если ткань опухоли занимает не менее 80% площади препарата. В случае невыполнения данного условия рекомендуется подготовить гистологический препарат биоматериала и по результатам гистологического исследования провести разметку препарата с обратной стороны предметного стекла, отметив границы зоны опухоли.

В дальнейшем для выделения ДНК необходимо использовать отмеченную область препарата, содержащую опухолевую ткань. Для проведения исследования рекомендуется использовать фрагмент парафинового блока, соответствующий следующим параметрам: толщина каждого среза от 5 до 6 мкм; суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани и комплексов клеток человека от 2 см². Хранить и

транспортировать материал в парафиновых блоках (FFPE) необходимо при температуре от +5 до +40 °С с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

5.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

Для выделения ДНК из исследуемых образцов использовать наборы для выделения ДНК: «Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016» (№ РЗН 2018/7772 от 30.10.2018).

Получение и транспортировку клинических образцов следует выполнять в соответствии с требованиями и инструкциями соответствующих наборов для выделения ДНК.

Образцы выделенной ДНК должны иметь концентрацию не менее 5 нг/мкл. Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения поглощения света образцом ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Проведение анализа при работе с набором состоит из следующих этапов:

1. Подготовка и проведение целевого обогащения ДНК.
2. Приготовление библиотек ДНК.
3. Подготовка образцов к секвенированию ДНК.
4. Секвенирование.
5. Описание анализа данных
6. Интерпретация результатов.

Варианты исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б» включают компоненты для проведения всех этапов анализа и отличаются только набором олигонуклеотидных индексов. Этапы проведения анализа вариантом исполнения «Соло-тест Атлас 48-а» и «Соло-тест Атлас 48-б» аналогичны этапам проведения анализа вариантами исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б», но не включают этапы подготовки и проведения секвенирования.

ВНИМАНИЕ! Реагенты для экстракции ДНК из биоматериала не входят в состав Набора реагентов.

6.1. Проведение анализа для варианта исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б».

6.1.1. Подготовка и проведение целевого обогащения ДНК

ВНИМАНИЕ! Все манипуляции рекомендуется проводить на льду или в охлажденных штативах.

1. Приготовить анализируемые образцы ДНК: оттаять при комнатной температуре, встряхнуть на вортексе и коротко центрифугировать для осаждения капель с крышки и стенок пробирок. Каждый образец ДНК должен быть разведен до концентрации 5 нг/мкл.
2. Приготовить растворы праймеров 1 и 2: оттаять при комнатной температуре, встряхнуть на вортексе и коротко центрифугировать для осаждения капель с крышки и стенок пробирок.
3. Приготовить 2 раствора для амплификации (по одному для каждого раствора праймеров) на необходимое количество реакций согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 8 реакций
ПЦР-смесь 1	2 мкл	16 мкл

Праймеры (№1 или №2)	5 мкл	40 мкл
Всего	7 мкл	56 мкл

4. Смешать в отдельных пробирках стрипа по 3 мкл образца с каждым раствором для амплификации. Пробирки должны быть совместимы с используемым термоциклером.

ВНИМАНИЕ! Сначала раскапать по индивидуальным пробиркам готовые смеси для амплификации, затем отдельными наконечниками - исследуемые образцы, ПКО и ОКО.

5. Пробирки с образцами и контролями плотно закрыть, перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Поместить в термоциклер.

6. Запрограммировать термоциклер и запустить программу амплификации:

Количество циклов	Шаг	Т°С	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °С	15 мин
17 циклов	Денатурация	99 °С	15 сек
	Отжиг и элонгация	60 °С	4 мин
1 цикл	Хранение	4°С	∞

ВАЖНО! ПЦР продукт может храниться 1 ночь при 4-10°С, при более долгом хранении ПЦР продукт должен храниться при –20°С.

6.1.2. Приготовление библиотек ДНК

ВНИМАНИЕ! Работа проводится в Зоне для работы с продуктами амплификации.

7. Перемешать содержимое каждой пробирки пипетированием и объединить продукты ПЦР каждого образца из обеих пробирок. Полученный объем для каждого образца будет составлять 20 мкл.

8. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл Активатора в каждую пробирку с объединенными продуктами ПЦР.

9. Тщательно перемешать пипетированием, не допуская образования пузырей. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

10. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура, °С	Время	Кол-во циклов
50	10 мин	1
55	10 мин	
60	20 мин	
10	Хранение не более 1 часа	

11. По окончании выполнения программы извлечь пробирки из реакционного модуля прибора.

ВАЖНО! При необходимости, пробирки можно хранить при температуре не выше минус 20°С.

12. Подготовить ЛС адаптеры и Раствор Л согласно расчету:
(без учета потерь при пипетировании ~10%)

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 8 реакций
ЛС адаптеры	2 мкл	16 мкл
Раствор Л	4 мкл	32 мкл
Всего	6 мкл	48 мкл

13. Тщательно перемешать смесь на вортексе после приготовления.
14. Добавить 6 мкл полученной смеси в пробирки к образцам после обработки Активатором. Пипетировать 10 раз.
15. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл ДНК-лигазы в каждую пробирку.
16. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.
17. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
22°C	30 минут
72°C	10 минут
10°C	(хранение до 1 часа)

18. Вынуть пробирки из термоциклера.

Первый этап очистки

19. Приготовить суспензию Магнитных частиц с деионизованной водой в соотношении 22 мкл частиц и 20 мкл воды на одну реакцию.
20. Внести 42 мкл приготовленной суспензии в каждую пробирку с библиотекой, инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
21. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.
22. Перенести супернатант в новую соответствующую пробирку пустого стрипа, не задевая осадок частиц.

ВАЖНО! Супернатант содержит библиотеку.

Второй этап очистки

23. Внести 58 мкл Магнитных частиц в каждую пробирку, содержащую библиотеку.
24. Тщательно перемешать содержимое пипетированием.
25. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
26. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

ВАЖНО! Библиотека содержится на магнитных частицах!

27. Добавить 90 мкл Реагента Е в каждую пробирку и ресуспендировать. Осадить коротковременным центрифугированием.
28. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

29. Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку и четырежды переместить стрип в магнитном штативе относительно рядов, или тщательно перемешать, для промывки магнитных частиц. Инкубировать на магнитном штативе пока смесь в пробирках не станет прозрачной.
30. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирке.
31. Повторить шаги 29-30 для повторной промывки магнитных частиц.
32. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд при комнатной температуре и удалить излишки спирта пипеткой на 10 мкл, не задевая магнитных частиц. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая из магнитного штатива. Важно не пересушить магнитные частицы.
33. После окончания сушки сразу же приступить к следующему этапу.
34. Добавить в каждую пробирку 48 мкл ПЦР-смеси 2.
35. Добавить по 2 мкл одного Индекса Си и одного Индекса Ли. Зафиксировать комбинации номеров индексов, соответствующие каждому образцу (например Си-1 и Ли-1 для образца 1). В одном запуске секвенирования каждому образцу должна соответствовать уникальная (неповторяющаяся) комбинация индексов - это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Индексы из наборов 48-а и 48-б можно комбинировать между собой.
36. Перемешать содержимое на вортексе, чтобы ресуспендировать магнитные частицы и осадить на центрифуге для сбора капель. Установить пробирки в термоциклер.
37. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
1 цикл	98°C	2 минуты
6 циклов	98°C	15 секунд
	64°C	1 минута
Хранение	10°C	~1 час или более

ВАЖНО! Не допускается замораживание библиотек, несущих магнитные частицы, при -20°C. После окончания ПЦР амплификации приступить к очистке библиотек.

38. Тщательно перемешать на вортексе Реагент В перед использованием (Реагент В при -20 °C может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен. Однако, даже в этом случае необходимо довести Реагент В до комнатной температуры и тщательно перемешать). Добавить 85 мкл Реагента В в каждую библиотеку, и тщательно перемешать на вортексе. Коротко осадить на центрифуге, чтобы сбросить капли.
39. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.
40. Поместить стрип, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в

пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая частицы.

41. Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку и не менее двух раз переместить стрип в магнитном штативе относительно рядов или перемешать смесь для промывки магнитных частиц. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

42. Повторить шаг 41 для повторной промывки магнитных частиц.

43. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд и удалить излишки спирта, не задевая магнитных частиц. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая стрип из магнитного штатива. Важно не пересушить магнитные частицы.

44. Удалить стрип с магнитного штатива и добавить в каждую пробирку 35 мкл ТЕ буфера.

45. Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц и осадить на центрифуге для сбора капель.

46. Поместить стрип на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Перенести супернатант с готовыми ДНК библиотеками в новый стрип, не задевая магнитных частиц.

47. Развести библиотеки деионизированной водой, свободной от нуклеаз, до концентрации 4000 пмоль/л (эквивалентно 680 нг/мл) используя 15мкл исходной библиотеки.

48. Смешать в равных объемах библиотеки, планируемые к анализу. В одном анализе (цикле секвенирования) может быть исследовано от 3 до 48 ДНК библиотек, включая контрольные образцы.

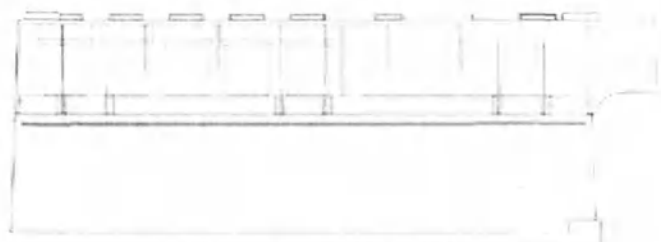
ВАЖНО! Неразведенные библиотеки могут храниться на 4-8°C до 1 месяца. Для более длительного хранения поместить библиотеки на -20°C.

6.1.3 Подготовка образцов к секвенированию

1. Извлечь картридж из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.

2. Поместить картридж с реактивами в водяную баню, содержащую деионизированную воду в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами. Нельзя погружать картридж глубже, чем до линии, указанной на его боковой поверхности (рис.1).

Рис. 2 Линия максимального уровня воды



3. Оставить картридж с реактивами размораживаться в водяной бане комнатной температуры до полного оттаивания на 60 минут.

Подготовка библиотеки

4. Разморозить раствор HT1 при комнатной температуре, тщательно перемешать и оставить охлаждаться во льду.

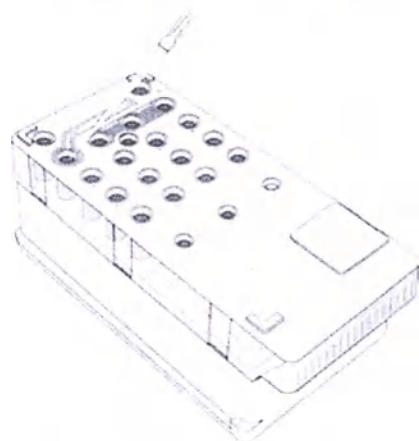
5. Приготовить 1 мл свежего раствора 0,2 М NaOH путем смешивания 800 мкл деионизированной воды и 200 мкл 1,0 М NaOH.

6. Приготовить эквимольную смесь ДНК библиотек (далее «пулированную библиотеку»): разморозить (если была заморожена), тщательно перемешать. В одном анализе (цикле секвенирования) могут быть объединены до 96 ДНК-библиотек (при объединении библиотек, приготовленных несколькими наборами соответствующих вариантов исполнения), включая контрольные образцы.
7. Смешать в чистой пробирке 5 мкл пулированной библиотеки и 5 мкл свежеприготовленного 0,2 М NaOH. Тщательно перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре 5 минут.
8. Добавить к смеси 990 мкл охлажденного раствора NT1. Тщательно перемешать.

Загрузка образца в картридж

9. Вынуть картридж из водяной бани и осторожно постучать им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытереть основание картриджа насухо.
10. Перевернуть картридж с реактивами десять раз для перемешивания растаявших реактивов, а затем внимательно проверить, что все позиции оттаяли, равномерно перемешаны и не содержат осадка.
11. Осторожно постучать картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реактиве.
12. Очистить низковорсной лабораторной салфеткой колпачок из фольги, покрывающий емкость, отмеченную оранжевой окружностью.
13. Проколоть колпачок из фольги чистым наконечником для пипетки на 1 мл.
14. Внести с помощью пипетки 600 мкл подготовленной пулированной библиотеки в резервуар, отмеченный оранжевой окружностью. Не касаться колпачка из фольги (рис.2).

Рис. 3 Загрузка библиотек



6.1.4 Секвенирование

1. Создать новую программу цикла в соответствии с инструкцией к генетическому секвенатору MiSeq, указав соответствующие номера индексов для каждого образца.
2. Надеть новую пару неопудренных перчаток.
3. Пользуясь пластиковыми щипцами, захватить проточную кювету за основание пластмассового кейса и извлечь ее из емкости (рис.3).

Рис. 4 Извлечение проточной кюветы



4. Слегка промыть проточную кювету водой лабораторного класса, до тех пор, пока стеклянная ячейка и пластиковый кейс не будут тщательно отмыты от избытка солей (рис.4). Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе. Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах анализа.

Рис. 5 Промывка проточной кюветы



5. Насухо протереть проточную кювету (рис.5) безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы. Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой.

Рис.6 Отверстия и прокладка проточной кюветы



6. Протереть стекло проточной кюветы спиртовой салфеткой (рис.6). Удостовериться в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки. Не протирать спиртовой салфеткой область прокладки проточной кюветы.

Рис.7 Сушка проточной кюветы

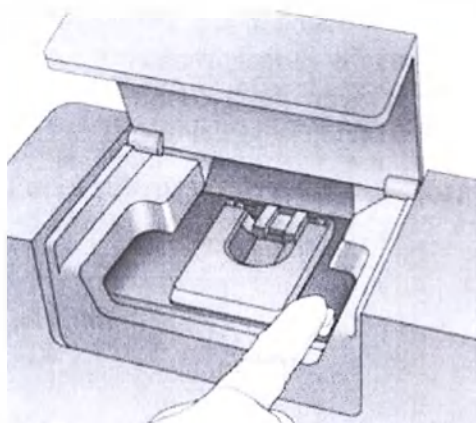


7. Избыток спирта протереть безворсовой салфеткой для очистки оптики.
8. Удостовериться в том, что в отверстиях проточной кюветы нет препятствий и что прокладка плотно прилегает по окружности отверстий кюветы.
9. Если выяснится, что прокладка смещена, осторожно вернуть ее на место и добиться того, чтобы она надежно располагалась вокруг отверстий кюветы.

Загрузка проточной кюветы

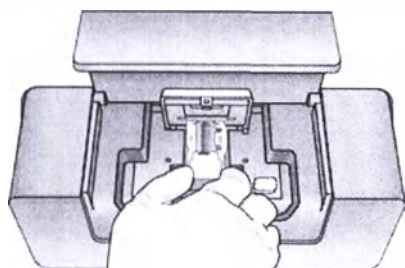
10. Поднять дверцу отсека проточной кюветы и нажать кнопку справа от защелки проточной кюветы. Защелка проточной кюветы откроется (рис.7).

Рис. 8 Открывание защелки проточной кюветы



11. Убедиться в том, что на площадке проточной кюветы отсутствует ворс. Если на площадке есть волокна или иные загрязнения, протереть площадку начисто спиртовой салфеткой или неворсовой тканью, смоченной этанолом. Тщательно протереть поверхность площадки проточной кюветы — она должна быть чистой и сухой.
12. Удерживая проточную кювету за края, поставить ее на площадку проточной кюветы (рис.8).

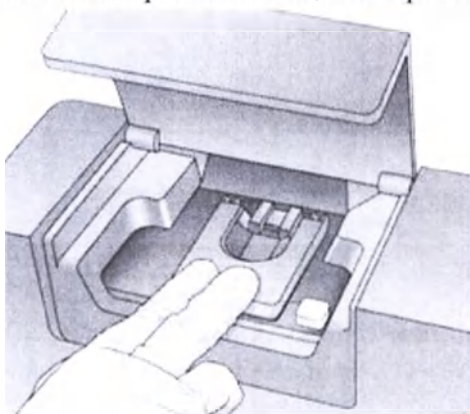
Рис. 9 Установка проточной кюветы на столик



13. Осторожно нажать на защелку проточной кюветы в направлении книзу так, чтобы она защелкнулась над кюветой.

14. Когда защелка проточной кюветы закрывается, два центровочных штырька позиционируют проточную кювету. Если вы услышали щелчок, это означает, что защелка проточной кюветы надежно закреплена (рис.9).

Рис.10 Закрывание защелки проточной кюветы



15. Закрывать дверцу отсека проточной кюветы.

16. Нажать Далее.

Загрузка раствора PR2 и проверка бутылки для сбора отходов

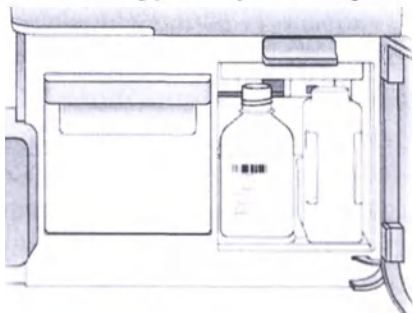
17. Извлечь флакон с раствором PR2 из хранилища с температурой от 2 до 8°C. Перевернуть для перемешивания, а затем снять крышку.

18. Открыть дверцу отсека с реактивами.

19. Поднять сипперную рукоятку до тех пор, пока она не защелкнется.

20. Извлечь промывную бутылку и загрузить бутылку с раствором PR2 (рис.10).

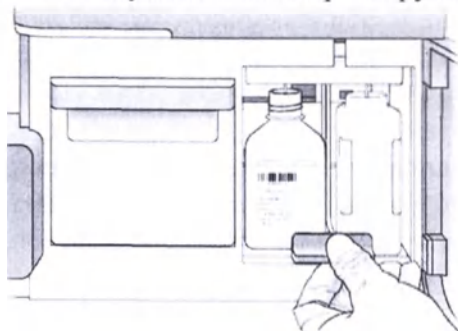
Рис. 11 Загрузка бутылки с раствором PR2



21. Перелить содержимое бутылки для сбора отходов в соответствующий контейнер для отходов.

22. Медленно опустить сипперную рукоятку. Убедиться в том, что сипперные трубки опустились во флакон с раствором PR2 и в бутылки для сбора отходов (рис.11).

Рис.12 Опускание сипперной рукоятки



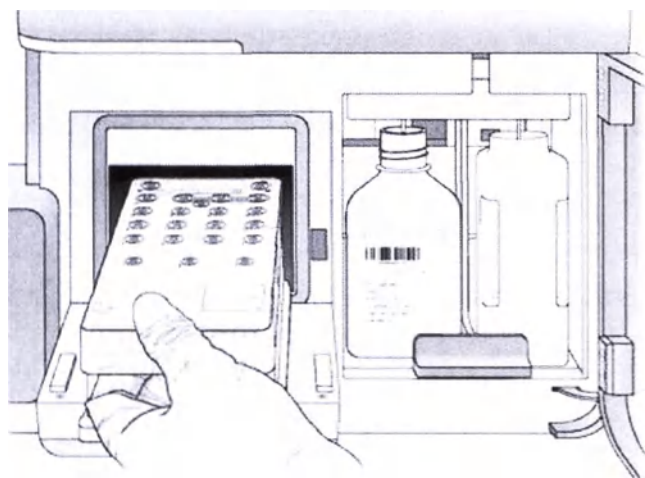
23. Нажать Next (Далее).

Загрузка картриджа с реактивами

24. Открыть дверцу холодильника для реактивов.

25. Придерживая картридж с реактивами за рукоятку, вставить его в холодильник для реактивов до упора (рис.12).

Рис.13 Загрузка картриджа с реактивами



26. Закройте дверцу отсека для охлаждения реактивов.

27. Закройте дверцу отсека с реактивами.

28. Нажмите Next (Далее).

Запуск цикла

29. Загрузив проточную кювету и реактивы, проверить параметры цикла и выполнить предварительную проверку устройства, затем запустить цикл в соответствии с инструкцией на Генетический секвенатор MiSeq.

6.1.5 Описание анализа данных

6.1.5.1 Анализ полученных на секвенаторе данных осуществляется с помощью встроенного пайплайна Local Run Manager (версия 2.0. и выше) - специализированное программное обеспечение, встроенное в секвенатор MiSeq.

6.1.5.2 Для запуска анализа при помощи Local Run Manager на главном окне программы (рис. 14-15) в выпадающем окне "Create run" нужно выбрать "DNA amplicon". Далее необходимо ввести следующие настройки:

1. Название набора для подготовки библиотек секвенирования.
2. Тип чтений: парные или однонаправленное, количество индексов ридов и длину ридов.
3. Программу для получения выравниваний (рекомендуется BWA).
4. Тип мутаций для поиска (рекомендуется "Somatic").
5. Минимальное значение глубины прочтения мутаций для фильтра (рекомендуется значение 20), минимальное значение частоты определяемой мутации (рекомендуемое значение 5%), а также минимальное значение качества найденной мутации (Variant Quality filter, значение по умолчанию равно 30). Такие настройки биоинформатического пайплайна позволяют избежать потенциальные артефакты секвенирования для процедуры идентификации вариантов.
6. Источник эталонной последовательности для человека - в качестве референсной последовательности используется версия сборки генома человека GRCh37/hgl9
7. Заполнить таблицу, в которой указываются названия образцов и их индексы для демultipлексирования.
8. Сохранить настройки.

Далее, после запуска секвенирования Local Run Manager будет ожидать завершения процесса и начнет анализ данных автоматически по завершению работы секвенатора.



Рис. 14. Главное окно Local Run Manager.



Рис. 15. Окно конфигурации запуска в Local Run Manager.

6.1.6 Интерпретация результатов

1. После окончания анализа на Генетическом секвенаторе MiSeq, проведенного с помощью программного обеспечения Local Run Manager (версия 2.0. и выше), результаты будут сохранены в виде файла формата VCF. Для доступа к файлам необходимо открыть папку Alignment на жестком диске MiSeq. Путь к папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Data Intensities\Basecalls\Alignment.

2. Все найденные по результатам анализа мутации сохраняются в формате VCF (рис 16). Файлы в формате VCF сохраняются в папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Data Intensities\Basecalls\Alignment.

#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	8786_S14.bam
chr13	32914437	rs60259550	GT	G	100	PASS	DP=634,Unval=GT:GQ:AD:DP:VF:NL:SS:NC:0:1:100:T:1:63:134:0:470:20:100:0000:0:0000		

Рис. 16 Пример файла VCF

Файл в формате VCF представляет собой таблицу с разделением табуляцией, в котором описывается следующая информация о мутациях в образце (по столбцам):

- Хромосома (CHROM).
- Позиция на хромосоме (POS).
- ID мутации в базах данных (RS ID, COSMIC ID и т.п.). Может не указываться. В таком случае пишется просто точка ('.').
- Референсный аллель (REF).
- Альтернативный аллель (ALT).

Ф. Значение качества найденной мутации (QUAL). В зависимости от программы, выполняющей поиск мутации, значения могут различаться по величине. Может не указываться. В таком случае пишется просто точка (‘.’).

Г. Показатель, прошла ли мутация фильтры программы, выполняющей поиск мутаций (FILTER). Может иметь значение либо “PASS” (мутация удовлетворяет всем фильтрам программы), либо иное значение, которое варьируется в зависимости от программы. Может не указываться. В таком случае пишется просто точка (‘.’).

Н. Аннотация мутации (INFO): описание патогенности в базе данных ClinVar, номера в базах данных мутаций (например, COSMIC ID), тип мутации (somatic, germline, frameshift и т.д.).

И. Описание формата записи характеристик позиции с мутацией (FORMAT): GT - Genotype, генотип, GQ - Genotype Quality, качество предсказания генотипа, AD - Allele Depth, глубина прочтения альтернативного аллеля, DP - Total Depth Used For Variant Calling, глубина прочтения позиции, VF - Variant Frequency, частота вариантного аллеля, NL - Applied BaseCall Noise Level, уровень шума, SB - StrandBias Score, показатель наличия одного и того же варианта в прямой и обратной цепях, NC - Fraction of bases which were uncalled or with basecall quality below the minimum threshold, доля чтений с мутациями в данной конкретной позиции, не попавшими в итоговый результат, например, по причине низкого качества.

Ж. Информация о глубине прочтения позиции с мутацией, аллельной частоте мутации, глубине прочтения альтернативного аллеля.

3. Каждый файл, соответствующий результатам анализа отдельного образца имеет имя следующего вида: “SampleName_S#.vcf”, где SampleName - это название образца, которое было задано при создании протокола анализа, а знак “#” соответствует порядковому номеру образца в протоколе анализа. Без использования специализированного программного обеспечения открыть файлы следует с помощью текстового редактора по умолчанию: например, “Блокнот” (NotePad) или WordPad.

4. Полученные данные должны соответствовать следующим параметрам:

- 1) % считываний, сопоставленных с целевыми регионами - 85%, не менее.
- 2) % мишеней (целей, target) с указанным перекрытием (более 20x) - более 98%.
- 3) коэффициент дублирования - не применим для данного Набора.
- 4) частота вариантных аллелей - не менее 0.05.
- 5) локальная глубина секвенирования (показатель качества) - пороговое значение 20.
- 6) наличие одного и того же варианта в прямой и обратной цепях - значение параметра SB в файле формата VCF не должно превышать “-3.01”
- 7) качество картирования последовательности считываний (MAPQ в файле VCF, в Local Run Manager обозначается как ‘Percent Q30 Bases’ в разделе ‘Base Level Statistics’ – рис. 17) - не менее 30 (Average mapping quality).
- 8) Для проверки показателя средней глубины покрытия в программе Local Run Manager. необходимо перейти в раздел “Samples & Results” проанализированного запуска. Во вкладке “Aggregate Report” в разделе “Coverage Summary” будет указано значение «Amplicon Mean Coverage» - средней глубины прочтения для каждого проанализированного образца в запуске. Средняя глубина прочтения считается достаточной, если она превышает значение 250 чтений.

Sample Information

Sample ID	Total PF Reads	Percent Q30 Bases	Percent On-target Aligned Reads	Autosome Call Rate
8624	454,222	89.11%	91.21%	94.71%

Amplicon Summary

Manifest	Number of Amplicon Regions	Total Length of Target Regions
chr1:115250775-115250775	409	70,021 bp

The number of amplicon regions and total length of target regions are calculated from the manifest file. The manifest file is a text file that contains the coordinates of the target regions and the length of each region.

Read Level Statistics

Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
1	16,109	69.02%
Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
2	16,109	69.02%

Base Level Statistics

Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
1	94.11%	16,109,814	49.46%	0.04%
Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
2	94.11%	16,109,814	49.46%	0.04%

The values for aligned bases and bases aligning to the target regions are calculated from the aligned reads.

Variants Summary

	SNVs	Insertions	Deletions
Total Passing	29	4	3
Percent Found in dbSNP	93.1%	25.00%	100.00%
Ref-Mem Ratio	8.66%		
Ts/Tv Ratio	6.250		

Variants by Sequence Context

	SNVs	Insertions	Deletions
In Genes	29	4	3
In Exons	29	4	3
In Coding Regions	28	3	3
In UTR Regions	1	1	0
In Splice Site Regions	0	0	0

Genes include exons, introns and UTR regions. Exons include coding exons, 5' UTR, 3' UTR, and UTR regions. Intron regions are regions between exons. UTR regions are regions at the beginning and end of a gene. Splice site regions are regions between exons.

Рисунок 17. Local Run Manager, описание параметров анализируемого образца

- Мутации в исследуемых генах считаются обнаруженными, если в файле содержатся записи, позиции которых находятся в пределах координат целевых генов:

Ген	Диапазон координат гена
NRAS	chr 1: 115250775-115259515
KRAS	chr 12: 25378548-25403865
PDGFRA	chr 4: 55152081-55152162
KIT	chr 4: 55524085-55606881
EGFR	chr 7: 55086794-55279321
BRAF	chr 7: 140434279-140624564

Пример интерпретации результатов секвенирования:

Запись в vcf-файле				Интерпретация (соответствие мутации и гену)
хромосома	позиция	реф. аллель	альт. аллель	

chr7	55259515	T	G	мутация L858R в гене EGFR
------	----------	---	---	---------------------------

В противном случае следует считать, что в исследованном образце отсутствуют мутации генов BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA. В то же время могут содержаться другие мутации, соответствующие записям VCF-файла, однако их клиническая значимость не определена в рамках набора Соло-Тест ABC.

6.2. Проведение анализа для варианта исполнения «Соло-тест Атлас 48-а» и «Соло-тест Атлас 48-б».

6.2.1. Подготовка и проведение целевого обогащения ДНК

ВНИМАНИЕ! Все манипуляции рекомендуется проводить на льду или в охлажденных штативах!

1. Приготовить анализируемые образцы ДНК: оттаять при комнатной температуре, встряхнуть на вортексе и коротко центрифугировать для осаждения капель с крышки и стенок пробирок. Каждый образец ДНК должен быть разведен до концентрации 5 нг/мкл.
2. Приготовить растворы праймеров №1 и №2: оттаять при комнатной температуре, встряхнуть на вортексе и коротко центрифугировать для осаждения капель с крышки и стенок пробирок.
3. Приготовить 2 раствора для амплификации (по одному для каждого раствора праймеров) на количество реакций согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 8 реакций
ПЦР-смесь 1	2 мкл	16 мкл
Праймеры (№1 или №2)	5 мкл	40 мкл
Всего	7 мкл	56 мкл

4. Смешать в отдельных пробирках стрипа по 3 мкл образца с каждым раствором для амплификации. Пробирки должны быть совместимы с используемым термоциклером.

ВНИМАНИЕ! Сначала раскапать по индивидуальным пробиркам готовые смеси для амплификации, затем отдельными наконечниками - исследуемые образцы, ПКО и ОКО.

5. Пробирки с образцами и контролями плотно закрыть, перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Поместить в термоциклер.
6. Запрограммировать термоциклер и запустить программу амплификации:

Количество циклов	Шаг	Т°С	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °С	15 мин
17 циклов	Денатурация	99 °С	15 сек
	Отжиг и элонгация	60 °С	4 мин
1 цикл	Хранение	4°С	∞

ВАЖНО! ПЦР продукт может храниться 1 ночь при 4-10°С, при более долгом хранении

ПЦР продукт должен храниться при -20°C .

6.2.2 Приготовление библиотек ДНК

ВНИМАНИЕ! Работа проводится в Зоне для работы с продуктами амплификации.

7. Перемешать содержимое каждой пробирки пипетированием и объединить продукты ПЦР каждого образца из обеих пробирок. Полученный объем для каждого образца будет составлять 20 мкл.

8. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл Активатора в каждую пробирку с объединенными продуктами ПЦР.

9. Тщательно перемешать пипетированием, не допуская образования пузырей. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

10. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура, $^{\circ}\text{C}$	Время	Кол-во циклов
50	10 мин	1
55	10 мин	
60	20 мин	
10	Хранение не более 1 часа	

11. По окончании выполнения программы извлечь пробирки из реакционного модуля прибора.

ВАЖНО! При необходимости, пробирки можно хранить при температуре не выше минус 20°C .

12. Подготовить ЛС адаптеры и Раствор Л согласно расчету:
(без учета потерь при пипетировании $\sim 10\%$)

Компонент	Объем на 1 реакцию	Объем на 8 реакций
ЛС адаптеры	2 мкл	16 мкл
Раствор Л	4 мкл	32 мкл
Всего	6 мкл	48 мкл

13. Тщательно перемешать смесь на вортексе после приготовления.

14. Добавить 6 мкл полученной смеси в пробирки к образцам после обработки Активатором. Пипетировать 10 раз.

15. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл ДНК-лигазы в каждую пробирку.

16. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

17. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
22°C	30 минут
72°C	10 минут
10°C	(хранение до 1 часа)

18. Вынуть пробирки из термоциклера.

Первый этап очистки

19. Приготовить суспензию магнитных частиц в деионизованной водой в соотношении 22 мкл частиц и 20 мкл воды на одну реакцию.
20. Внести 42 мкл приготовленной суспензии в каждую пробирку с библиотекой, инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
21. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.
22. Перенести супернатант в новую соответствующую пробирку пустого стрипа, не задевая осадок частиц.

ВАЖНО! Супернатант содержит библиотеку.

Второй этап очистки

23. Внести 58 мкл Магнитных частиц в каждую пробирку, содержащую библиотеку.
24. Тщательно перемешать содержимое пипетированием.
25. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
26. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

ВАЖНО! Библиотека содержится на магнитных частицах!

27. Добавить 90 мкл Реагента Е в каждую пробирку и ресуспендировать. Осадить коротковременным центрифугированием.
28. Поместить стрип, в котором находится реакционная смесь, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.
29. Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку и четырежды переместить стрип в магнитном штативе относительно рядов, или тщательно перемешать для промывки магнитных частиц. Инкубировать на магнитном штативе пока смесь в пробирках не станет прозрачной.
30. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирке.
31. Повторить шаги 29-30 для повторной промывки магнитных частиц.
32. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд при комнатной температуре и удалить излишки спирта пипеткой на 10 мкл, не задевая магнитных частиц. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая из магнитного штатива. Важно не пересушить магнитные частицы.
33. После окончания сушки сразу же приступить к следующему шагу.
34. Добавить в каждую пробирку 48 мкл ПЦР-смеси 2.
35. Добавить по 2 мкл одного Индекса Си и одного Индекса Ли. Зафиксировать комбинации номеров индексов, соответствующие каждому образцу (например Си-1 и Ли-1 для образца 1). В одном запуске секвенирования каждому образцу должна соответствовать уникальная (неповторяющаяся) комбинация индексов - это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Индексы из наборов 48-а и 48-б можно комбинировать между собой.
36. Перемешать содержимое на вортексе, чтобы ресуспендировать магнитные частицы и осадить на центрифуге для сбора капель. Установить пробирки в термоциклер.

37. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
1 цикл	98°C	2 минуты
6 циклов	98°C	15 секунд
	64°C	1 минута
Хранение	10°C	~1 час или более

ВАЖНО! Не допускается замораживание библиотек, несущих магнитные частицы, при -20°C. После окончания ПЦР амплификации приступите к очистке библиотек.

38. Тщательно перемешать на вортексе Реагент В перед использованием*. Добавить 85 мкл Реагент В в каждую библиотеку, и тщательно перемешать на вортексе. Коротко осадить на центрифуге, чтобы сбросить капли.

39. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

40. Поместить стрип, на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая частицы.

41. Добавить по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку и не менее двух раз переместить стрип в магнитном штативе относительно рядов, или перемешать смесь для промывки магнитных частиц. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

42. Повторить шаг 45 для повторной промывки магнитных частиц.

43. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить на центрифуге, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд и удалить излишки спирта, не задевая магнитных частиц. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая стрип из магнитного штатива. Важно не пересушить магнитные частицы.

44. Удалить стрип с магнитного штатива и добавить в каждую пробирку 35 мкл ТЕ буфера.

45. Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц и осадить на центрифуге для сбора капель.

46. Поместить стрип на магнитный штатив DynaMag™-96 Side Magnet и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Перенести супернатант с готовыми ДНК библиотеками в новый стрип, не задевая магнитных частиц.

47. Развести библиотеки деионизованной водой, свободной от нуклеаз, до концентрации 4000 пмоль/л (эквивалентно 680 нг/мл) используя 15мкл исходной библиотеки.

48. Смешать в равных объемах библиотеки, планируемые к анализу.

49. Перейти к «6.1.3 Подготовка образцов к секвенированию» с использованием комплекта для подготовки образца к секвенированию Набора «Соло-тест Атлас 48С-а» или «Соло-тест Атлас 48С-б» соответственно.

ВАЖНО! Неразведенные библиотеки могут храниться на 4-8°C до 1 месяца. Для более длительного хранения поместите библиотеки на -20°C.

* Реагент В при -20 °C может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен. Однако, даже в этом случае необходимо довести Реагент В до комнатной температуры и тщательно перемешать.

7. УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21. Жидкие отходы (реагенты, реактивы) неиспользованных компонентов Набора уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор (отходы класса А). Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после обработки ДНК и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы) и подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции).

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Наборы реагентов вариантов исполнения «Соло-Тест Атлас 48С-а» и «Соло-Тест Атлас 48С-б» могут транспортироваться при температуре 2-8°C в течение 6 часов. При более длительной транспортировке набор должен быть разукomплектован. Транспортирование производится всеми видами крытого транспорта следующим образом: «Комплект для целевого обогащения ДНК», «Комплект для приготовления библиотек ДНК», «Комплект для подготовки образца к секвенированию» транспортируется при температуре от минус 20 до минус 22 °C (при использовании хладоэлементов (- 20°C)), «Комплект для секвенирования» - при температуре 2-8 °C.

Наборы реагентов вариантов исполнения «Соло-Тест Атлас 48-а», «Соло-Тест Атлас 48-б» транспортируются всеми видами крытого транспорта при температуре от минус 20 до минус 22 °C при использовании хладоэлементов (- 20°C) в течение суток.

После получения «Комплект для целевого обогащения ДНК» должен храниться и эксплуатироваться в зоне «пре-ПЦР» (при температуре минус 20 до минус 22 °C), а «Комплект для приготовления библиотек ДНК» (при температуре минус 20 до минус 22 °C), «Комплект для подготовки образца к секвенированию» (при температуре минус 20 до минус 22 °C), «Комплект для секвенирования» (при температуре 2-8 °C) должны храниться и эксплуатироваться в зоне «пост-ПЦР».

После получения «Комплект для целевого обогащения ДНК», «Комплект для приготовления библиотек ДНК», «Комплект для подготовки образца к секвенированию» должны храниться при температуре от минус 20 до минус 22 °C в течение всего срока годности. «Комплект для секвенирования» должен храниться при температуре 2-8 °C в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

9. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

транспортирования и эксплуатации.

Рекламации по качеству набора по адресу: Общество с Ограниченной Ответственностью «Онкодиагностика АТЛАС» (ООО «Онкодиагностика АТЛАС»), 121069, г. Москва, ул. Малая Никитская, дом 31, стр. 1, эт 1., пом.4, телефон/факс: +7-(495)-374-83-59, e-mail: solo@atlas.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Использовать до
	Температурный диапазон
	Дата изменения



Изготовитель



Обратитесь к инструкции по применению



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
ООО «Онкодиагностика АТЛАС»
В.А. Милейко
« 15 » _____ 2022 г.



РУКОВОДСТВО ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018»

Содержание

Описание и назначение

Состав набора

Принцип действия набора

Характеристики набора

Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы, не включенные в набор

Анализируемые образцы и пробоподготовка

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

Общие правила и рекомендации для работы с набором

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

- I. Проведение целевого обогащения ДНК
- II. Приготовление библиотек ДНК
 1. Удаление праймеров из ПЦР продуктов
 2. Лигирование адаптеров к ампликонам
 3. Первый этап очистки библиотек
 4. Второй этап очистки библиотек
 5. Преамплификация библиотеки
 6. Очистка преамплифицированной библиотеки
 7. Измерение концентрации библиотек и расчет фактора разведения
- III. Настройка параметров запуска
- IV. Подготовка образцов к секвенированию
- V. Секвенирование
- VI. Интерпретация результатов

Описание и назначение

Набор реагентов «Соло-тест Атлас» предназначен для одновременного выявления клинически значимых соматических мутаций в генах, являющихся ключевыми в онкогенезе рака легкого, колоректального рака, меланомы и гастроинтестинальных стромальных опухолей, методом высокопроизводительного секвенирования на медицинском изделии «Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения: MiSeq».

Набор предназначен для выявления следующих мутаций в генах: BRAF (V600), EGFR (L858R, Ex19del, L861Q, G719X, S768I, Ex20ins, T790M), KRAS (G12, G13, A59, Q61, K117, A146), NRAS (G12, G13, A59, Q61, K117, A146), KIT (D816V), PDGFRA (D842V). Помимо этого, таргетная панель покрывает «горячие точки» еще 6 генов: ERBB2 (HER2), PIK3CA, CTNNB1, TP53, PTEN и FOXL2, а также включает фармакогенетические маркеры токсичности химиотерапии: TPMT1, UGT1A1, DPYD.

В состав набора входят положительный и отрицательный контрольные образцы. Их использование рекомендовано в каждом отдельном запуске, так как обеспечивает контроль правильности срабатывания теста (ПКО) и отсутствия контаминации (ОКО).

Допустимо одновременное секвенирование библиотек, полученных набором Соло-тест, и других библиотек при условии совместимости используемых индексов и корректном смешивании библиотек, чтобы на каждую библиотеку Соло-тест приходилось не менее 100 тыс. прочтений.

Состав набора

Набор «Соло-тест Атлас 48» рассчитан на проведение анализа 48 образцов (включая контроли).

Набор выпускается в четырех вариантах исполнения: «Соло-тест Атлас 48-а», «Соло-тест Атлас 48-б», «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б». Варианты исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» и «Соло-тест Атлас 48С-б» предназначены для проведения полного цикла исследования по выявлению мутаций.

Варианты исполнения «Соло-тест Атлас 48-а» и «Соло-тест Атлас 48-б» включают только компоненты для целевого обогащения ДНК и приготовления библиотек. Для проведения полного цикла исследования с помощью указанных вариантов исполнения необходимо дополнительно использовать реагенты для постановки реакции секвенирования из наборов вариантов исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а» или «Соло-тест Атлас 48С-б» или другие рекомендованные производителем используемого секвенатора.

Варианты исполнения «Соло-тест Атлас 48-а» и «Соло-тест Атлас 48-б» отличаются только набором олигонуклеотидных индексов. В одном запуске секвенирования на MiSeq при сочетании наборов с разными индексами («48а» и «48б») может быть объединено 96 уникальных образцов (включая контроли). Для анализа соматических мутаций рекомендовано покрытие не менее 350х на образец.

Положительный контрольный образец (ПКО) и Отрицательный контрольный образец (ОКО) рекомендуется включать в каждую постановку в дополнение к анализируемым образцам. При этом объем этих компонентов в наборе позволяет подготовить по 4 библиотеки каждого контрольного образца.

Набор включает два комплекта: Комплект для целевого обогащения ДНК (его необходимо хранить в пре-ПЦР зоне) и Комплект для приготовления библиотек (его необходимо хранить в пост-ПЦР зоне).

Состав набора представлен в таблице 1.

Таблица 1
Состав набора «Соло-тест Атлас»

Наименование компонента	Цвет вкладыша на крышке	Объем	Хранение
Комплект для целевого обогащения ДНК			
ПЦР-смесь 1	Красный	192 мкл	От -20 до - 22°C
Раствор праймеров 1	Желтый	240 мкл	От -20 до - 22°C
Раствор праймеров 2	Желтый	240 мкл	От -20 до - 22°C
ПКО	Белый	24 мкл	От -20 до - 22°C
ОКО	Черный	24 мкл	От -20 до - 22°C
Комплект для приготовления библиотек ДНК			
Реагент В	Белая круглая этикетка с символом В	4500 мкл	От -20 до - 22°C
Реагент Е	Белая круглая этикетка с символом Е	4500 мкл	От -20 до - 22°C
ТЕ буфер	Белая круглая этикетка с символом ТЕ	2 пробирки × 4500 мкл	От -20 до - 22°C
ПЦР-смесь 2	Черный	2 пробирки × 1152 мкл	От -20 до - 22°C
Активатор	Зеленый	96 мкл	От -20 до - 22°C

Раствор Л	Желтый	192 мкл	От -20 до - 22°C
ДНК-лигаза	Синий	96 мкл	От -20 до - 22°C
ЛС адаптеры	Прозрачный	96 мкл	От -20 до - 22°C
Олигонуклеотидные индексы Си	Зеленый, круглая этикетка с номером индекса	6 пробирок × 16 мкл	От -20 до - 22°C
Олигонуклеотидные Индексы Ли	Фиолетовый, круглая этикетка с номером индекса	8 пробирок × 12 мкл	От -20 до - 22°C
Магнитные частицы	Нет вкладыша	3840 мкл	От +2 до +8°C

Принцип действия набора

Набор предназначен для приготовления ДНК-библиотек. В основе работы набора лежит амплификация целевых участков ДНК методом мультиплексной ПЦР.

Процесс состоит из 3 этапов приготовления библиотеки и четвертого этапа - секвенирования с использованием прибора Illumina MiSeq.

Первый этап:

ДНК, выделенная из биоматериала пациента, используется для наработки целевых фрагментов при помощи мультиплексной ПЦР (Первичная амплификация).

Второй этап:

Удаление праймеров с концевых участков продуктов ПЦР и лигирование к ним олигонуклеотидных адаптеров, необходимых для последующего секвенирования библиотеки. Очистка библиотек на магнитных частицах.

Третий этап:

Вторичная амплификация и очистка библиотек. На данном этапе проводится индексирование библиотек. Для каждого образца ДНК используется собственная уникальная комбинация олигонуклеотидных индексов, которая позволяет соотнести каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования.

Четвертый этап:

Секвенирование. На данном этапе происходит секвенирование полученных библиотек на приборе Illumina MiSeq. Анализ полученных данных осуществляется с помощью встроенного пайплайна Local Run Manager (версия 2.0.0 от 08.01.2018).

Принцип работы набора проиллюстрирован на рисунке:

Первый этап

ДНК

Первичная амплификация с
двумя пулами праймеров

Обработка активатором
(удаление праймеров,
подготовка к лигированию)

Второй этап

ЛС адаптеры

Лигирование ЛС адаптеров

Очистка продуктов лигирования

Вторичная амплификация с
Олигонуклеотидными индексами

Третий этап

Очистка продуктов амплификации,
пулирование библиотек

Четвертый этап

Секвенирование готовой библиотеки на MiSeq

Набор включает следующие комплекты:

- **Комплект для целевого обогащения ДНК**

Комплект для целевого обогащения ДНК необходим для обогащения фрагментами ДНК, содержащими исследуемые мутации. Для осуществления первого этапа - постановки первичной амплификации (мультиплексной ПЦР) - используется смесь реагентов для амплификации («ПЦР-смесь 1») и набор праймеров, состоящий из двух отдельных пулов (в пробирках «Раствор праймеров 1» и «Раствор праймеров 2»). Реакция амплификации выполняется отдельно для каждого пула праймеров. Остальные компоненты для проведения ПЦР-реакции входят в состав «ПЦР-смеси 1». Кроме того, в Комплект входят положительный и отрицательный контрольные образцы (пробирки «ПКО» и «ОКО»), охарактеризованные по искомым мутациям. Отрицательный контрольный образец не содержит искомым мутаций и позволяет контролировать отсутствие ложноположительных результатов. Положительный контрольный образец содержит одну мутацию (L858R в гене EGFR) и позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования. Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК приводится в таблице 2.

Таблица 2

Описание компонентов Комплекта для целевого обогащения ДНК

Название	Описание
Раствор праймеров 1	Необходим для наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые мутации, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)
Раствор праймеров 2	Необходим для наработки целевых фрагментов ДНК, содержащих исследуемые мутации, в ходе первичной амплификации (мультиплексной ПЦР)
ПЦР-смесь 1	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения первичной амплификации ДНК (мультиплексной ПЦР)
ПКО	Водный раствор ДНК человека, содержащей мутацию L858R в гене EGFR. Он позволяет контролировать правильность проведения подготовки библиотек и их секвенирования
ОКО	Водный раствор ДНК человека, не содержащий мутаций BRAF (V600), EGFR (L858R, Ex19del, L861Q, G719X, S768I, Ex20ins, T790M), KRAS (G12, G13, A59, Q61, K117, A146), NRAS (G12, G13, A59, Q61, K117, A146), KIT (D816V) и PDGFRA (D842V). Он позволяет контролировать отсутствие ложноположительных результатов

• Комплект для приготовления библиотек

Комплект для приготовления библиотек необходим для приготовления библиотек из продуктов ПЦР, полученных с помощью Комплекта для целевого обогащения ДНК.

По завершении ПЦР-реакции продукты амплификации, полученные с использованием двух пулов праймеров для одного исходного образца ДНК, объединяются. На следующем этапе происходит удаление праймеров с концов полученных продуктов ПЦР и подготовка к лигированию с помощью «Активатора». Далее проводится лигирование универсальных адаптеров (пробирка «ЛС адаптеры») к продуктам амплификации с помощью «раствора Л» и «ДНК-лигазы». После этого проводится очистка полученных фрагментов ДНК с помощью «Магнитных частиц» и с использованием «Реагента Е». На следующем этапе проводится вторичная амплификация для введения олигонуклеотидных индексов, комбинация которых уникальна для каждого исходного образца ДНК (пробирки «Олигонуклеотидные индексы», «ПЦР-смесь 2»). Введение таких индексов позволяет проводить одновременное секвенирование множества образцов за один запуск прибора. Далее проводится очистка полученного продукта ПЦР с использованием «Магнитных частиц», «Реагента В» и «ТЕ буфера». После очистки необходимо измерить концентрацию получившихся библиотек, довести их молярность до 4000 пмоль/л, и смешать в равных объемах. Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек приводится в таблице 3.

Таблица 3

Описание компонентов Комплекта для приготовления библиотек

Название	Описание
Активатор	Обеспечивает удаление праймеров с концов продуктов первичной амплификации и подготовку концевых участков фрагментов к последующему лигированию.
Раствор Л	Обеспечивает работу ДНК-лигазы (содержит необходимые для ее работы компоненты), необходим для лигирования ЛС адаптеров
ДНК-лигаза	Лигирует («пришивает») ЛС адаптеры к наработанным в результате первичной амплификации фрагментам ДНК
ЛС адаптеры	Короткие двуцепочечные олигонуклеотиды, необходимые для проведения вторичной амплификации (являются местом отжига для Олигонуклеотидных индексов), а также для проведения секвенирования
Магнитные частицы	Необходимы для очистки целевых фрагментов ДНК (от ЛС адаптеров, Олигонуклеотидных индексов)
Реагент В	Необходим для очистки целевых фрагментов ДНК от нелигированных ЛС адаптеров

Реагент E	Необходим для очистки целевых фрагментов ДНК от свободных Олигонуклеотидных индексов
TE буфер	Необходим для элюции фрагментов ДНК после очистки на Магнитных частицах от свободных Олигонуклеотидных индексов
ПЦР-смесь 2	Буферный раствор, содержащий ДНК-полимеразу и другие компоненты, необходимые для проведения вторичной амплификации ДНК
Олигонуклеотидные индексы Си	Необходимы для создания уникальной маркировки фрагментов одного образца и позволяют атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования
Олигонуклеотидные индексы Ли	Необходимы для создания уникальной маркировки фрагментов одного образца и позволяют атрибутировать каждую полученную нуклеотидную последовательность исходному образцу ДНК после секвенирования

Технические и диагностические характеристики набора

Параметры секвенирования: MiSeq Reagent kit v2 300 cycles, до 96 образцов для соматических мутаций (покрытие >350x)

- Чувствительность >95%
- Специфичность >99%
- Равномерность покрытия (% целевых фрагментов, покрытых >20% от среднего покрытия): >80%
- Картирование на целевые участки ДНК: >95%.

Срок годности набора 9 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Рекомендованное оборудование, реагенты и материалы, не включенные в набор

Наименование	Пример модели и производителя
ПЦР-бокс	БАВ-ПЦР-“Ламинар-С”; (620.100) (ЗАО “Ламинарные системы”, Россия)
Термоциклер	Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот C1000 (Bio-Rad, США)
Магнитный штатив	Магнитный штатив 96-луночный DynaMag™-96 Side (Thermo Fisher Scientific Inc., США)

Вортекс	Вортекс персональный V-1 plus (BioSan, Латвия)
Спектрофотометр NanoDrop	NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США)
Дозаторы переменного объема со сменными наконечниками	Дозаторы переменного объема со сменными наконечниками с диапазонами измерения от 0,5 до 10 мкл, от 2 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл, от 20 до 200 мкл и от 100 до 1000 мкл (Eppendorf, Германия)
Салфетки безворсовые	Салфетки безворсовые Kimwipes (KimTech Science)
Центрифуга лабораторная	Центрифуга лабораторная «Eppendorf» Centrifuge 5430, с принадлежностями (Thermo Fisher Scientific, Германия)
Пробирки 1,5 мл или 2 мл	Пробирки 1,5 мл, типа Эппендорф, DNA LoBind, PCR clean, бесцветные (Eppendorf, Германия)
Стрипованные микропробирки	MicroAmp® 8-Tube Strip, 0.2 ml #N8010580
Наконечники для дозаторов с фильтром	Разные модели и производители
Штативы для пробирок	Разные модели и производители
Штатив для стрипов и планшетов	Разные модели и производители
Штативы для пробирок разного объема (50 мл, 15 мл, 1,5 – 2,0 мл, 0,5 мл)	Разные модели и производители
Пробирки типа Falcon 50 мл	Разные модели и производители
Спирт этиловый лабораторный, 96%	Разные модели и производители
Вода деионизованная бидистиллированная	Разные модели и производители
Перчатки резиновые	Разные модели и производители
Холодильная камера, поддерживающая температуру 2-8°C	Разные модели и производители

Морозильная камера, поддерживающая температуру от -20 до - 22°C.	Разные модели и производители
--	-------------------------------

Для экстракции ДНК из исследуемых образцов дополнительно понадобятся:

1. Выделение ДНК из свежего операционного и биопсийного материала осуществляется с помощью набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (РУ №ФСР 2012/14019 от 06.09.2013), «Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по ТУ 21.20.23-232-17253567-2018» (РУ №РЗН 2019/9331 от 02.12.2019)
2. Выделение ДНК из парафиновых блоков (FFPE) – с помощью набора реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей «ДНК-Ткань-Ф» (№ РЗН 2018/7772 от 30.10.2018)

Для секвенирования библиотек дополнительно понадобятся:

1. Генетический секвенатор MiSeq («Illumina Inc.», США)
2. MiSeq Reagent kit v2 (300 cycles) (для наборов Соло-тест Атлас 48-а и Соло-тест Атлас 48-б)
3. Раствор 1,0 М NaOH

Анализируемые образцы и пробоподготовка

Для работы с набором необходимо использовать образцы ДНК, выделенные из свежесобранного операционного или биопсийного материала пациента, либо фиксированного в формалине и заключенного в парафин (FFPE-блоки).

Для свежего биопсийного и операционного материала следует соблюдать следующие требования: время до анализа не должно превышать двух часов с момента взятия материала.

Для длительного хранения следует применять формалиновую фиксацию материала с последующим заключением образцов в формалин (FFPE-блоки).

Для парафиновых блоков (FFPE) необходимо соблюдать следующие требования: предварительно провести их морфологический анализ. Образцы считаются пригодными для анализа если ткань опухоли занимает не менее 80% площади препарата. В случае невыполнения данного условия рекомендуется подготовить гистологический препарат биоматериала и по результатам гистологического исследования провести разметку препарата с обратной стороны предметного стекла, отметив границы зоны опухоли. В дальнейшем, для выделения ДНК необходимо использовать отмеченную область препарата, содержащую опухолевую ткань. Для проведения исследования рекомендуется использовать фрагмент парафинового блока, соответствующий следующим параметрам: толщина каждого среза от 5 до 6 мкм; суммарная площадь фрагментов фиксированной ткани и комплексов клеток человека от 2 см². Хранить и транспортировать материал в парафиновых блоках (FFPE) необходимо при температуре от +5 до +40 °С с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

Выделение ДНК из образцов свежего операционного и биопсийного материала осуществляется с помощью набора "АмплиПрайм ДНК-сорб-В" (РУ №ФСР 2012/14019 от 06.09.2013), "Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала НК-сорбент для диагностики in vitro по ТУ 21.23.-232-17253567-2018" (РУ №РЗН 2019/9331 от 02.12.2019), из парафиновых блоков (FFPE) - с помощью набора "ДНК-Ткань-Ф" (№ РЗН 2018/7772 от 30.10.2018).

Набор рекомендован для работы с образцами ДНК с концентрацией не менее 5 нг/мкл. Минимальная валидированная концентрация ДНК – 2 нг/мкл.

Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения поглощения света образцом ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8.

Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки. Анализируемая ДНК должна храниться и транспортироваться при температуре от 2°C до 8°C и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°C.

Общие правила и рекомендации для работы с набором

- Все манипуляции рекомендуется проводить на льду или в охлажденных штативах.
- Протокол описан для работы с индивидуальными пробирками, но позволяет работать как с образцами в формате 96-луночной планшеты, так и в формате 8-луночных стрипов.
- При работе с набором используйте пластик, рекомендованный производителем вашего ПЦР амплификатора. Не допускайте испарения реакций.
- На протяжении всего протокола необходимо использовать наконечники для дозаторов с фильтром, которые необходимо менять для каждого образца и каждого компонента.
- Делайте общие ПЦР смеси для создания максимально одинаковых условий ПЦР для разных образцов. При расчете финальных объемов общих смесей, закладывайте запас в 10% на ошибки работы дозаторов.
- Вязкие жидкости отбирайте медленно. Тщательно перемешивайте растворы, компонентами которых являются данные реактивы. ПЦР-смесь 1, ПЦР-смесь 2, Активатор и ДНК-лигазу можно перемешивать только кратковременным вортиксованием или пипетированием.
- Избегайте кросс-контаминации при работе с Олигонуклеотидными индексами: чаще меняйте перчатки и открывайте пробирки с индексами по очереди.
- Если в пробирке с Раствором Л и с ПЦР-смесью 2 виден осадок, растворите его вортиксованием или пипетированием, чтобы осадок полностью растворился.
- За 30 минут до начала работы с Реагентом В и Реагентом Е поместите их на комнатную температуру, тщательно перемешайте реактивы после разморозки.
- Реагент В при -20°C может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен. В любом случае, после достижения Реагентом В комнатной температуры необходимо тщательно перемешать Реагент В. Отбирайте этот реагент дозатором медленно и осторожно.
- За 30 минут до начала работы с Магнитными частицами поместите их на комнатную температуру и тщательно вортиксуруйте, чтобы перемешать частицы. Отбирайте этот реагент дозатором медленно и осторожно.

- Для приготовления 70% этилового спирта смешайте 96% этиловый спирт с водой в расчете 270 мкл спирта на 100 мкл воды на один образец. Используйте только свежеприготовленный 70% спирт!

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

При получении набора:

1. Снять внешнюю упаковку (пленку)
2. Комплект для целевого обогащения ДНК перенести и хранить в пре-ПЦР зоне в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C
3. Комплект для приготовления библиотек перенести и хранить в пост-ПЦР зоне
4. «Магнитные частицы» убрать в холодильную камеру, хранить при температуре +2 +8°C.
5. Комплект для приготовления библиотек (без «Магнитных частиц») хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C.

Для наборов «Соло-тест 48С-а» и «Соло-тест 48С-б»:

6. Комплект для подготовки образца к секвенированию хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C
7. Комплект для секвенирования хранить в холодильной камере при температуре +2 +8°C

I. Проведение целевого обогащения ДНК

ВНИМАНИЕ! Работа проводится в Пре-ПЦР зоне

Потребуется:

- ПЦР-смесь 1
- Раствор праймеров №1
- Раствор праймеров №2
- ОКО
- ПКО
- Анализируемые образцы ДНК (5 нг/мкл)

В каждую постановку в дополнение к образцам рекомендуется ставить ОКО и ПКО.

1. Приготовить 2 раствора для амплификации (по одному для каждого раствора праймеров) на необходимое количество реакций согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию
ПЦР-смесь 1	2 мкл
Раствор праймеров (№1 или №2)	5 мкл
Всего	7 мкл

2. Смешать в отдельных пробирках по 3 мкл образца с 7 мкл каждого раствора для амплификации. Общий объем каждой реакционной смеси составит 10 мкл. Пробирки должны быть совместимы с используемым термоциклером.

ВНИМАНИЕ! Сначала раскапать по индивидуальным пробиркам готовые растворы для амплификации, затем отдельными наконечниками - исследуемые образцы, ПКО и ОКО.

3. Пробирки с образцами и контролями плотно закрыть, перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Поместить в термоциклер.

4. Запрограммировать термоциклер и запустить программу амплификации:

Количество циклов	Шаг	Т°С	Время
1 цикл	Активация ферментов	95 °С	15 мин
17 циклов	Денатурация	99 °С	15 сек
	Отжиг и элонгация	60 °С	4 мин
1 цикл	Хранение	4°С	∞

ВАЖНО! ПЦР продукт может храниться 1 ночь при 4-10°С, при более долгом хранении ПЦР продукт должен храниться при –20°С.

II. Приготовление библиотек ДНК

ВНИМАНИЕ! Далее работа проводится в Пост-ПЦР зоне

1. Удаление праймеров из ПЦР продуктов

Потребуется:

- ПЦР продукт
- Активатор

1. Для каждого образца объединить продукты ПЦР из обеих пробирок (с Праймерами №1 и №2). Полученный объем для каждого образца будет составлять 20 мкл.

2. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл Активатора в каждую пробирку с объединенными продуктами ПЦР. Тщательно перемешать пипетированием, не допуская образования пузырей. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышек пробирок кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

3. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура, °C	Время	Кол-во циклов
50	10 мин	1
55	10 мин	
60	20 мин	
10	Хранение не более 1 часа	

ВАЖНО! При необходимости пробирки можно хранить при температуре не выше -20°C.

2. Лигирование адаптеров к ампликонам

Потребуется:

- ПЦР продукт, обработанный Активатором
- Раствор Л
- ЛС адаптеры
- ДНК-лигаза

4. Подготовить ЛС адаптеры и Раствор Л согласно расчету:

Компонент	Объем на 1 реакцию
ЛС адаптеры	2 мкл
Раствор Л	4 мкл
Всего	6 мкл

5. Тщательно перемешать смесь на вортексе после приготовления.

6. Добавить по 6 мкл полученной смеси в пробирки к образцам после обработки Активатором. Тщательно перемешать пипетированием. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

7. Добавить индивидуальным наконечником по 2 мкл ДНК-лигазы в каждую пробирку, перемешать пипетированием. Общий объем смеси составит 30 мкл. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек. Установить пробирки в термоциклер.

8. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Температура	Время
22°C	30 минут
72°C	10 минут
10°C	(хранение до 1 часа)

ВАЖНО! При необходимости пробирки можно хранить при температуре не выше -20°C.

ВНИМАНИЕ! Если планируете перейти к Первому этапу очистки библиотек, поместите магнитные частицы на комнатную температуру и тщательно провortexируйте, чтобы перемешать частицы.

3. Первый этап очистки библиотек

Потребуется:

- Полученная библиотека
- Магнитные частицы
- Деионизированная вода

ВАЖНО! За 30 минут до начала работы с Магнитными частицами поместите их на комнатную температуру и тщательно vortexируйте, чтобы перемешать частицы.

ВНИМАНИЕ! Поместите Реагент Е на комнатную температуру, он понадобится на Втором этапе очистки библиотек п.17.

9. Смешать суспензию Магнитных частиц с деионизованной водой согласно таблице:

Компонент	Объем на 1 реакцию
Магнитные частицы	22 мкл
Деионизированная вода	20 мкл
Всего	42 мкл

10. Внести 42 мкл приготовленной суспензии в каждую пробирку с библиотекой, перемешать пипетированием, инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

11. Поместить пробирку, в которой находится реакционная смесь, на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.

12. Перенести супернатант в новую чистую пробирку, не задевая осадок частиц.

ВАЖНО! Супернатант содержит библиотеку.

4. Второй этап очистки библиотек

Потребуется:

- Полученная библиотека
- Магнитные частицы
- Реагент Е
- Свежеприготовленный 70% этанол

ВНИМАНИЕ! Поместите ПЦР-смесь 2 на комнатную температуру, она понадобится на этапе Преамплификации библиотек п.23.

13. Внести 58 мкл Магнитных частиц (неразведенных!) в каждую пробирку с супернатантом, содержащую библиотеку, тщательно перемешать пипетированием.

14. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.

15. Поместить пробирку, в которой находится реакционная смесь, на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной.

16. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц. Выждать 10 секунд, отобрать и удалить остатки супернатанта пипеткой на 10 мкл. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить п. 15-16.

ВАЖНО! Библиотека содержится на магнитных частицах!

17. Снять пробирки с магнитного штатива. Добавить 90 мкл Реагента Е в каждую пробирку, перемешать пипетированием. Пробирки плотно закрыть, осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

18. Поместить пробирку, в которой находится реакционная смесь, на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

19. Добавить к Магнитным частицам по 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола в каждую пробирку и подождать 30 секунд, не снимая пробирку с магнитного штатива.

20. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц в пробирке. В случае, если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и вернуться к п.18.

21. Повторить шаги 19-20 для повторной промывки магнитных частиц.

22. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить капли кратковременным центрифугированием, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд при комнатной температуре и удалить излишки спирта пипеткой на 10 мкл, не задевая магнитных частиц. Просушить магнитные

частицы на воздухе, не вынимая из магнитного штатива, пока остатки спирта не испарятся.

ВАЖНО! Не пересушить магнитные частицы. Если частицы пересушены, на них заметны потрескивания.

После окончания сушки сразу же приступить к следующему этапу.

5. Преамплификация библиотеки

Потребуется:

- Полученная библиотека на магнитных частицах
- ПЦР-смесь 2
- Олигонуклеотидные индексы Си
- Олигонуклеотидные индексы Ли

ВНИМАНИЕ! Поместите Реагент В и ТЕ буфер на комнатную температуру, он понадобится на этапе Очистки преамплифицированной библиотеки п.28.

23. Добавить в каждую пробирку по 48 мкл ПЦР-смеси 2.

24. Добавить по 2 мкл одного Олигонуклеотидного индекса Си и одного Олигонуклеотидного индекса Ли. В одном запуске секвенирования каждому образцу должна соответствовать уникальная (неповторяющаяся) комбинация Олигонуклеотидных индексов — это необходимо для идентификации образцов в результатах секвенирования. Индексы из наборов 48-а и 48-б можно комбинировать между собой.

25. Зафиксировать комбинации номеров индексов, соответствующие каждому образцу в таблице (см. Приложение или скачать с <https://oncoatlas.ru/solo-atlas>).

26. Перемешать содержимое на вортексе, чтобы ресуспендировать магнитные частицы и осадить на центрифуге для сбора капель. Установить пробирки в термоциклер.

27. Запрограммировать термоциклер и запустить выполнение программы:

Стадия	Температура	Время
1 цикл	98°C	2 минуты
6 циклов	98°C	15 секунд
	64°C	1 минута
Хранение	10°C	~1 час или более

ВАЖНО! Не допускается замораживание смеси библиотек с магнитными частицами при -20°C. После окончания ПЦР амплификации приступить к следующему этапу.

6. Очистка преамплифицированной библиотеки

Потребуется:

- Полученная библиотека на магнитных частицах
- Реагент В
- Свежеприготовленный 70% этанол
- ТЕ буфер

28. Тщательно перемешать на вортексе Реагент В перед использованием (Реагент В при -20°C может оставаться в жидком состоянии, либо может быть частично заморожен, однако, даже в этом случае необходимо довести Реагент В до комнатной температуры и тщательно перемешать). Добавить 85 мкл Реагента В в каждую библиотеку и тщательно перемешать на вортексе. Коротко осадить центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1–3 сек., чтобы сбросить капли.

29. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

30. Поместить пробирку на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 5 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в пробирках не станет прозрачной. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая частицы. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

31. Добавить к Магнитным частицам 150 мкл свежеприготовленного 70% этанола и подождать 30 секунд, не снимая пробирку с магнитного штатива. Осторожно отобрать и удалить супернатант, не задевая магнитных частиц.

32. Повторить шаг 31 для повторной промывки магнитных частиц.

33. Убедиться в том, что капли спирта полностью удалены из пробирок. При необходимости осадить кратковременным центрифугированием, поместить на магнитный штатив, инкубировать 30 секунд и удалить излишки спирта, не задевая магнитных частиц. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку, повторить инкубацию и отобрать спирт заново. Просушить магнитные частицы на воздухе в течение 5 минут, не вынимая пробирку из магнитного штатива.

ВАЖНО! Не пересушить магнитные частицы. Если частицы пересушены, на них заметны потрескивания.

34. Удалить пробирку с магнитного штатива и добавить в каждую пробирку 35 мкл ТЕ буфера.

35. Тщательно перемешать содержимое на вортексе для ресуспендирования магнитных частиц и осадить на центрифуге для сбора капель.

36. Поместить пробирку на магнитный штатив и инкубировать на нем в течение 3 минут при комнатной температуре, либо пока смесь в ячейках не станет прозрачной. Перенести супернатант с готовыми ДНК библиотеками в новую пробирку, не задевая магнитных частиц. В случае если частицы были задеты и попали в наконечник дозатора, вернуть объем в пробирку и повторить этот шаг.

7. Измерение концентрации библиотек и расчет фактора разведения

Дополнительная нормализация может не проводиться при условии использования одинаковой концентрации ДНК образцов при приготовлении библиотек. Однако,

рекомендуется перед разведением измерить концентрацию полученных библиотек на флуориметре Qubit 3.0 с использованием набора Qubit®dsDNA HS Assay Kit.

37. Развести библиотеки деионизированной водой или TE буфером, свободной от нуклеаз, до концентрации 4 нмоль/л (эквивалентно 0,618 нг/мкл), используя 5 мкл исходной библиотеки. Рекомендуется использовать пробирки DNA LoBind.

38. Если полученная концентрация библиотеки данного образца ниже требуемой (4 нмоль/л), образец признается непригодным для секвенирования.

39. Смешать по 5 мкл каждой библиотеки, планируемой к секвенированию, в один пул.

ВАЖНО! Неразведенные библиотеки хранить в морозильной камере при температуре от -20 до -22°C.

Полученные библиотеки готовы к секвенированию на MiSeq.

III. Настройка параметров запуска

1. Запуск секвенатора и анализ полученных на секвенаторе данных осуществляется с помощью встроенного пайплайна Local Run Manager (версия 2.0. и выше) - специализированного программного обеспечения, встроенного в секвенатор MiSeq.

2. Скачайте файл `template_atlas.tsv` (<https://oncoatlas.ru/solo-atlas>) и поместите его в папку Local Run Manager/templates. Запустите программу Local Run Manager. Зайдите в раздел Menu, пункт TOOLS и выберите раздел Library Prep Kit (рис. 1).

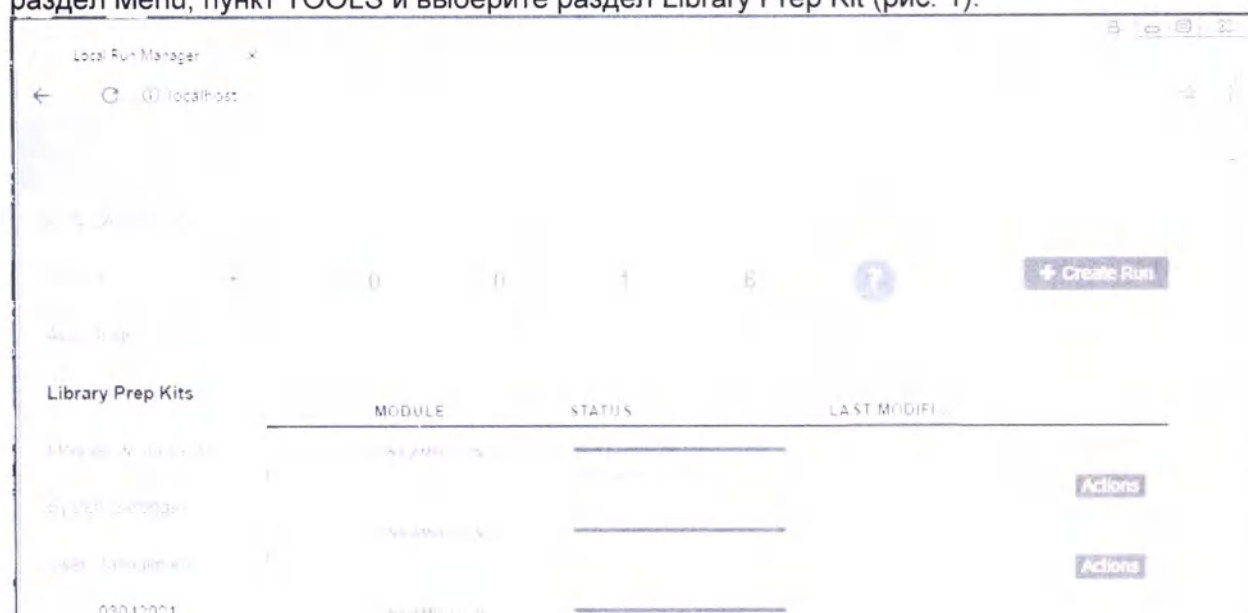


Рис. 1 Окно главного меню в Local Run Manager.

3. Открыв раздел Add Library Prep Kit, найдите файл `template_atlas.tsv`, откройте его. Теперь `template` файл успешно загружен (Рис. 2).

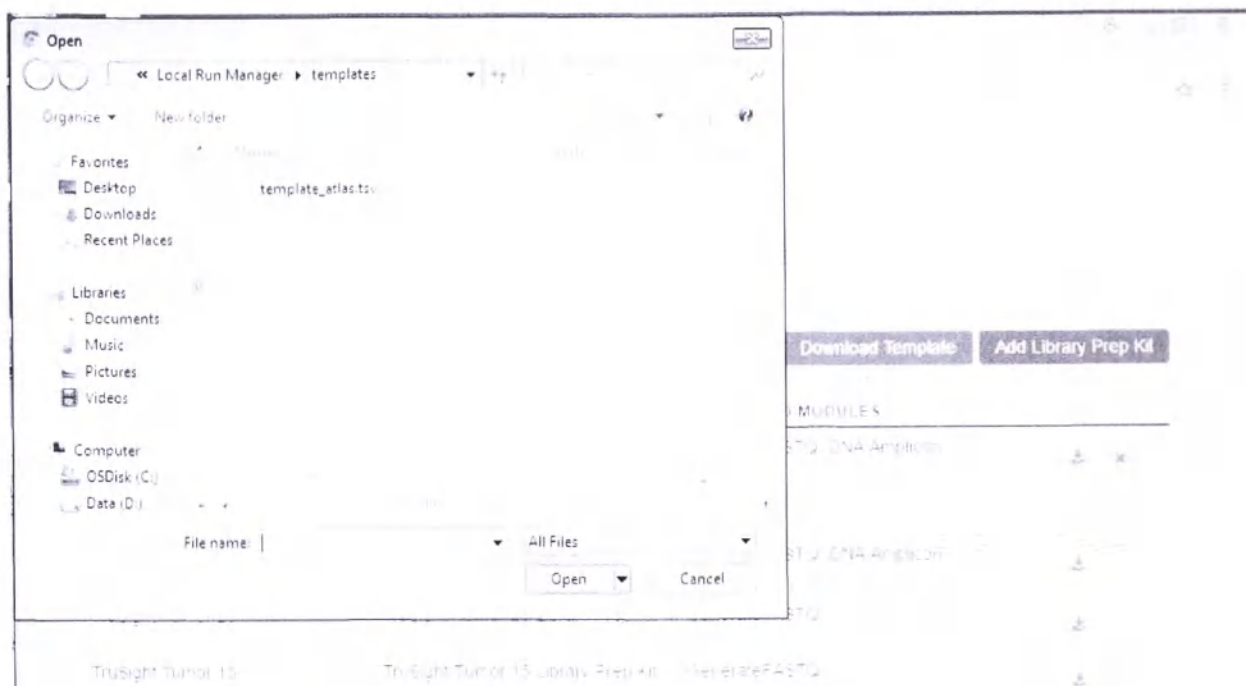


Рис. 2 Окно Library Prep Kit в Local Run Manager.

4. Подобным образом в MENU в разделе Modules & Manifests добавьте манифест файл Manifest_Atlas (<https://oncoatlas.ru/solo-atlas>).
5. Создайте новый запуск (Run), нажав кнопку Create Run и выбрав вариант DNA Amplicon (Рис. 3).



Рис. 3 Главное окно Local Run Manager.

6. В поле Run Name задайте имя вашего запуска. В поле Library Prep Kit выберите вариант SolotestATLAS, после чего ряд настроек автоматически заполнится (рис. 4).

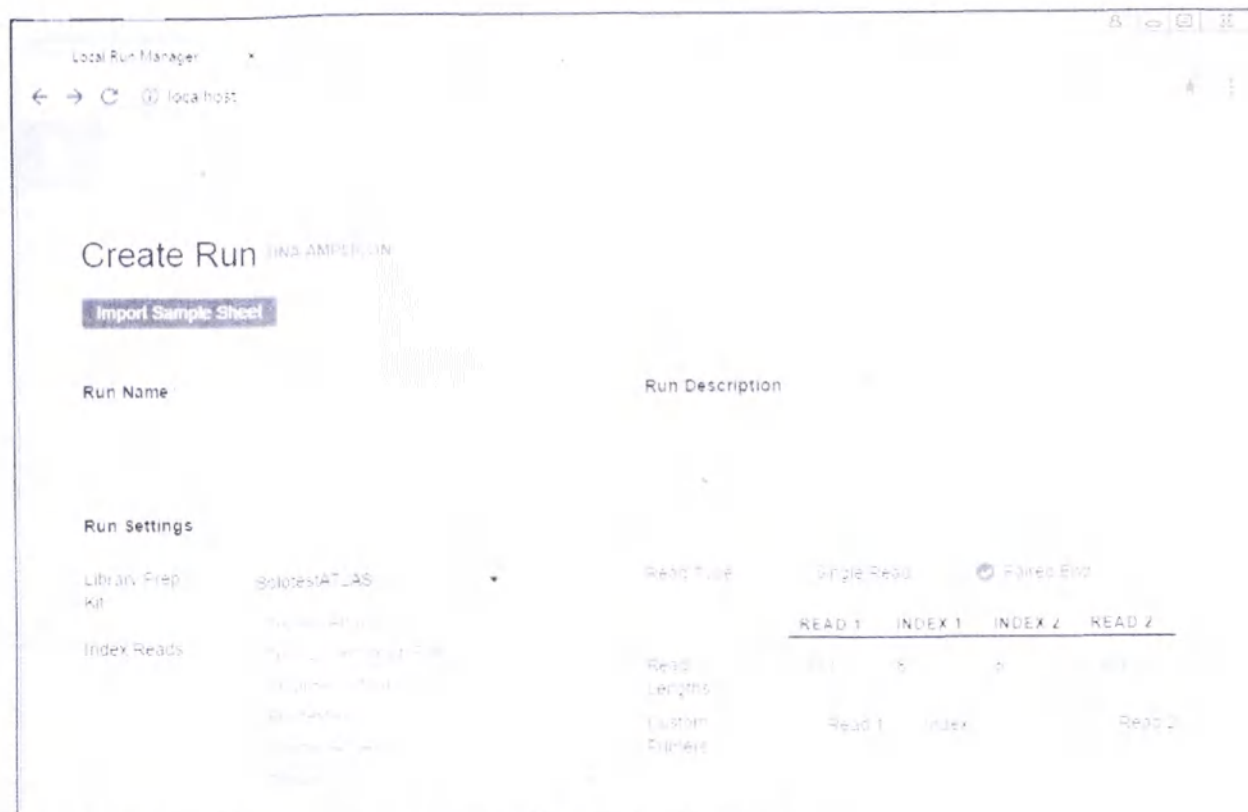


Рис. 4. Окно конфигурации запуска в Local Run Manager.

7. Далее необходимо ввести следующие настройки запуска (рис. 5):

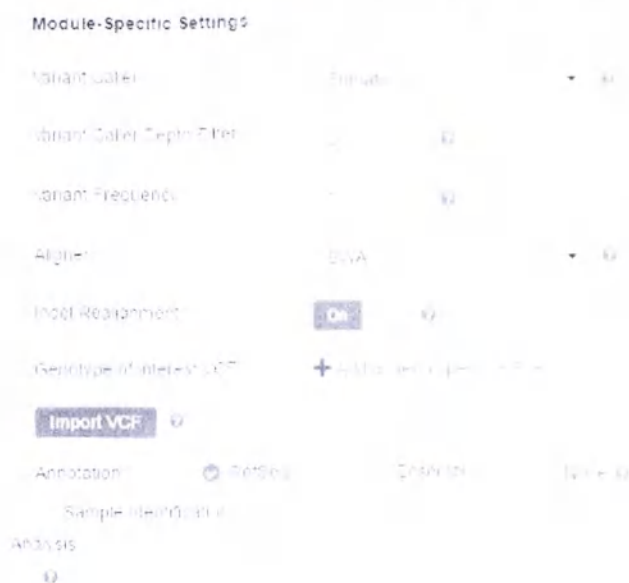


Рис. 5. Окно конфигурации запуска в Local Run Manager.

8. Ниже необходимо заполнить информацию об образцах. Для этого в таблице указать название образца (Sample ID), использованную для каждого образца комбинацию индексов, выбрать манифест файл (Manifest – Manifest_Atlas.txt), а также указать источник эталонной последовательности для человека (Genome - в качестве референсной последовательности используется версия сборки генома человека GRCh37/hg19) (Рис. 6):



Рис. 6. Окно конфигурации запуска в Local Run Manager.

9. Сохранить настройки. Далее, после запуска секвенирования Local Run Manager будет ожидать завершения процесса и начнет анализ данных автоматически по завершению работы секвенатора (Рис. 7)



Рис. 7. Главное окно Local Run Manager.

IV. Подготовка образцов к секвенированию

1. Извлечь картридж из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
2. Поместить картридж с реактивами в водяную баню, содержащую воду в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реактивами. Нельзя погружать картридж глубже линии, указанной на его боковой поверхности (рис.8).



Рис. 8 Линия максимального уровня воды

3. Оставить картридж с реактивами размораживаться в водяной бане комнатной температуры до полного оттаивания на 60 минут.
4. Разморозить раствор HT1 при комнатной температуре, тщательно перемешать и оставить во льду.
5. Приступить к подготовке библиотеки: приготовить 1 мл свежего раствора 0,2 M NaOH путем смешивания 800 мкл деионизованной воды и 200 мкл 1 M NaOH.
6. Приготовить эквимольную смесь ДНК библиотек (далее «пулированную библиотеку»): разморозить (если была заморожена), тщательно перемешать. В одном

анализе (цикле секвенирования) могут быть объединены 96 ДНК-библиотек (при объединении библиотек, приготовленных несколькими наборами соответствующих вариантов исполнения), включая контрольные образцы.

7. Смешать в чистой пробирке 5 мкл пулированной библиотеки и 5 мкл свежеприготовленного 0,2 М NaOH. Тщательно перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре 5 минут.
8. Добавить к смеси 990 мкл охлажденного раствора HT1. Тщательно перемешать. Теперь концентрация пулированной библиотеки составляет 20 пМ.
9. Выбрать конечную концентрацию библиотеки для внесения в картридж (стандартно 12 пМ, но может быть скорректировано в зависимости от прибора). Развести библиотеки до выбранной концентрации, используя объемы реагентов, приведенные в таблице, тщательно перемешать и сбросить капли кратким центрифугированием.

Конечная концентрация	8 пМ	10 пМ	12 пМ	15 пМ
20 пМ библиотека	240 мкл	300 мкл	360 мкл	450 мкл
Охлажденный HT1	360 мкл	300 мкл	240 мкл	150 мкл

10. Загрузить образцы в картридж. Для этого вынуть картридж из водяной бани и осторожно постучать им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытереть основание картриджа насухо.
11. Перевернуть картридж с реактивами десять раз для перемешивания растаявших реактивов, а затем внимательно проверить, что все позиции оттаяли, равномерно перемешаны и не содержат осадка.
12. Осторожно постучать картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реактивах.
13. Очистить безворсовой салфеткой колпачок из фольги, покрывающий емкость, отмеченную оранжевой окружностью.
14. Проколоть колпачок из фольги чистым наконечником для пипетки на 1 мл.
15. Внести с помощью дозатора 600 мкл подготовленной пулированной библиотеки в резервуар, отмеченный оранжевой окружностью. Не касаться колпачка из фольги (рис.9).

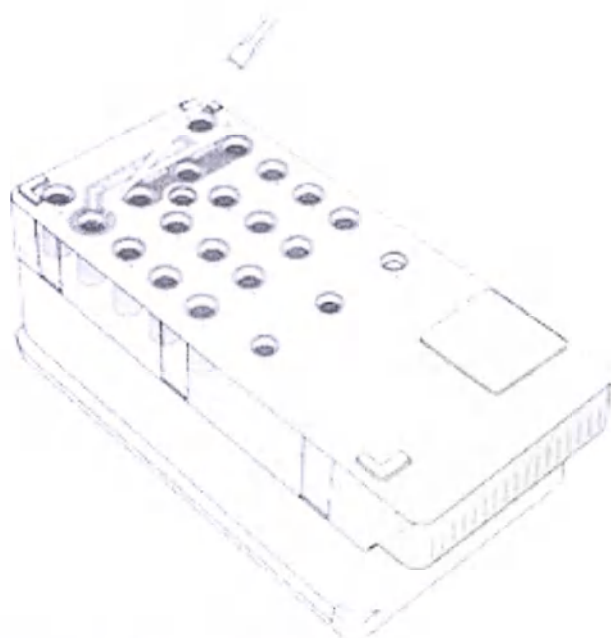


Рис. 9 Загрузка библиотек

V. Секвенирование

1. Открыть программу MiSeq Control Software, перейти в раздел секвенирование, затем в окно Local Run Manager, выбрать там созданный ранее запуск. Убедиться в соответствии заданных ранее условий запуска параметрам, представленным на экране (парные чтения длиной 151+151, двойное чтение индексов).
2. Надеть новую пару неопудренных перчаток.
3. Пользуясь пластиковыми щипцами, захватить проточную кювету за основание пластмассового кейса и извлечь ее из емкости (рис. 10).



Рис. 10 Извлечение проточной кюветы

4. Тщательно промыть проточную кювету деионизированной водой до тех пор, пока стеклянная ячейка и пластиковый кейс не будут тщательно отмыты от избытка солей (рис. 11). Излишек солей может сказаться при размещении проточной кюветы в приборе.

Если соли высохнут на участке визуализации, это может также сказаться на результатах анализа.



Рис. 11 Промывка проточной кюветы

5. Насухо протереть проточную кювету (рис.11) безворсовой салфеткой для очистки оптики, соблюдая осторожность при работе вокруг черной прокладки проточной кюветы. Область прокладки и прилегающую стеклянную поверхность нужно осторожно промокнуть салфеткой.



Рис.12 Отверстия и прокладка проточной кюветы

6. Протереть стекло проточной кюветы спиртовой салфеткой (рис.13). Удостовериться в том, что на стекле нет потеков, отпечатков пальцев или волокон от салфетки. Не протирать спиртовой салфеткой область прокладки проточной кюветы.



Рис.13 Сушка проточной кюветы

7. Избыток спирта протереть безворсовой салфеткой.
8. Удостовериться в том, что в отверстиях проточной кюветы нет препятствий и что прокладка плотно прилегает по окружности отверстий кюветы.
9. Если выяснится, что прокладка смещена, осторожно вернуть ее на место и добиться того, чтобы она надежно располагалась вокруг отверстий кюветы.

Загрузка проточной кюветы

10. Поднять дверцу отсека проточной кюветы и нажать кнопку справа от защелки проточной кюветы. Защелка проточной кюветы откроется (рис. 14).

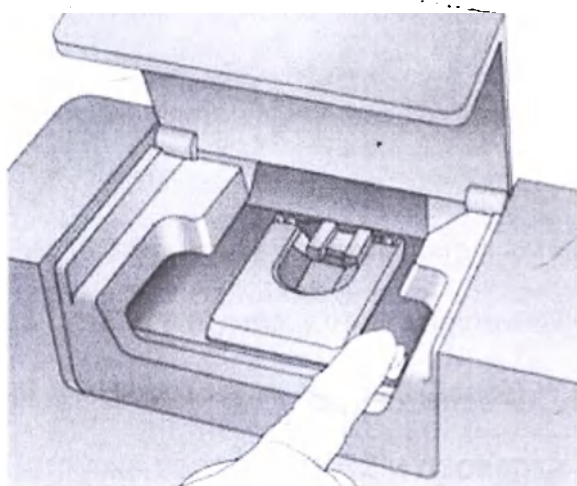


Рис. 14 Открывание защелки проточной кюветы

11. Убедиться в том, что на площадке проточной кюветы отсутствует ворс. Если на площадке есть волокна или иные загрязнения, протереть площадку начисто спиртовой салфеткой или неворсовой тканью, смоченной этанолом. Тщательно протереть поверхность площадки проточной кюветы — она должна быть чистой и сухой.
12. Удерживая проточную кювету за края, поставить ее на площадку проточной кюветы (рис. 15).

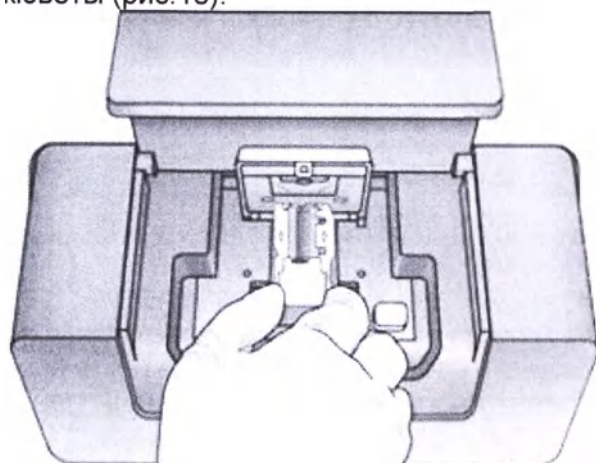


Рис. 15 Установка проточной кюветы на столик

13. Осторожно нажать на защелку проточной кюветы в направлении книзу так, чтобы она защелкнулась над кюветой.

14. Когда защелка проточной кюветы закрывается, два центровочных штырька позиционируют проточную кювету. Если вы услышали щелчок, это означает, что защелка проточной кюветы надежно закреплена (рис. 16).

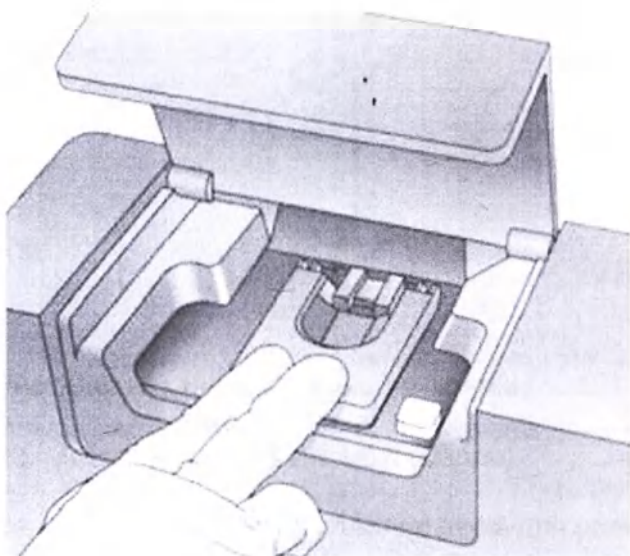


Рис. 16 Закрывание защелки проточной кюветы

15. Закрывать дверцу отсека проточной кюветы.
16. Нажать на экране Next (Далее).

Загрузка раствора PR2 и проверка бутылки для сбора отходов

17. Извлечь флакон с раствором PR2 из хранилища с температурой от +2 до +8°C. Перевернуть для перемешивания, а затем снять крышку.
18. Открыть дверцу отсека с реактивами.
19. Поднять сипперную рукоятку.
20. Извлечь промывную бутылку и загрузить бутылку с раствором PR2 (рис. 17).

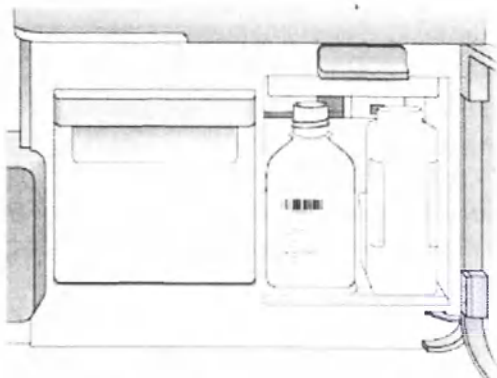


Рис. 17 Загрузка бутылки с раствором PR2

21. Перелить содержимое бутылки для сбора отходов в соответствующий контейнер для отходов.

22. Медленно опустить сипперную рукоятку вниз до конца. Убедиться в том, что сипперные трубки опустились во флакон с раствором PR2 и в бутылки для сбора отходов (рис.18).

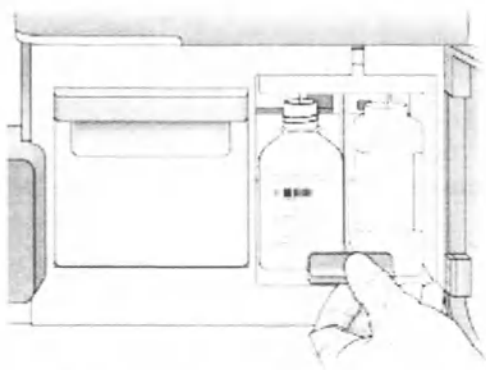


Рис.18 Опускание сипперной рукоятки

23. Нажать на экране Next (Далее).
24. Открыть дверцу холодильника для реактивов. Извлечь промывочный картридж.
25. Придерживая картридж с реактивами за рукоятку, вставить его в холодильник для реактивов до упора (рис.19).

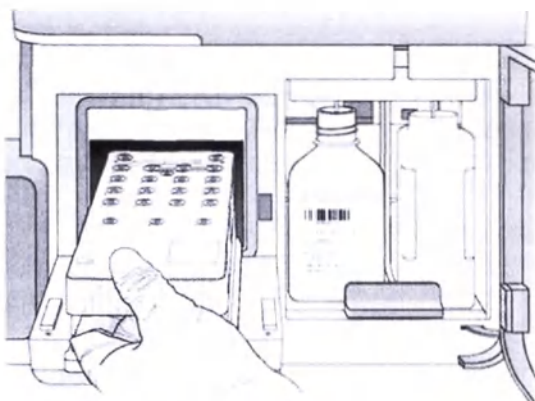


Рис.19 Загрузка картриджа с реактивами

26. Закрывать дверцу отсека для охлаждения реактивов (слева).
27. Закрывать дверцу отсека с реактивами (справа).
28. Нажать на экране Next (Далее).
29. После загрузки проточной кюветы и реактивов, выполнить предварительную проверку устройства, затем запустить секвенатор MiSeq.

VI. Интерпретация результатов

1. После окончания анализа на Генетическом секвенаторе MiSeq, проведенного с помощью программного обеспечения Local Run Manager (версия 2.0. и выше), результаты будут сохранены в виде файлов формата VCF. Для доступа к файлам необходимо открыть папку Alignment на жестком диске MiSeq. Путь к папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Data Intensities\Basecalls\Alignment.

2. Все найденные по результатам анализа мутации сохраняются в формате VCF (рис 20). Файлы в формате VCF сохраняются в папке: D:\Illumina\MiSeqAnalysis\Data Intensities\Basecalls\Alignment.

CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO	FORMAT	Sample
chr1	100000000		A	G	100	PASS	DP=100	GT	AA

Рис. 20 Пример файла VCF.

Файл в формате VCF представляет собой таблицу с разделением табуляцией, в котором описывается следующая информация о мутациях в образце (по столбцам):

- A. Хромосома (CHROM).
 - B. Позиция на хромосоме (POS).
 - C. ID мутации в базах данных (RS ID, COSMIC ID и т.п.). Может не указываться. В таком случае пишется просто точка ('.').
 - D. Референсный аллель (REF).
 - E. Альтернативный аллель (ALT).
 - F. Значение качества найденной мутации (QUAL). В зависимости от программы, выполняющей поиск мутации, значения могут различаться по величине. Может не указываться. В таком случае пишется просто точка ('.').
 - G. Показатель, прошла ли мутация фильтры программы, выполняющей поиск мутаций (FILTER). Может иметь значение либо "PASS" (мутация удовлетворяет всем фильтрам программы), либо иное значение, которое варьируется в зависимости от программы. Может не указываться. В таком случае пишется просто точка ('.').
 - H. Аннотация мутации (INFO): описание патогенности в базе данных ClinVar, номера в базах данных мутаций (например, COSMIC ID), тип мутации (somatic, germline, frameshift и т.д.).
 - I. Описание формата записи характеристик позиции с мутацией (FORMAT): GT - Genotype, генотип, GQ - Genotype Quality, качество предсказания генотипа, AD - Allele Depth, глубина прочтения альтернативного аллеля, DP - Total Depth Used For Variant Calling, глубина прочтения позиции, VF - Variant Frequency, частота вариантного аллеля, NL - Applied BaseCall Noise Level, уровень шума, SB - StrandBias Score, показатель наличия одного и того же варианта в прямой и обратной цепях, NC - Fraction of bases which were uncalled or with basecall quality below the minimum threshold, доля чтений с мутациями в данной конкретной позиции, не попавшими в итоговый результат, например, по причине низкого качества.
 - J. Информация о глубине прочтения позиции с мутацией, аллельной частоте мутации, глубине прочтения альтернативного аллеля.
3. Каждый файл, соответствующий результатам анализа отдельного образца, имеет имя следующего вида: "SampleName_S#.vcf", где SampleName - это название образца, которое было задано при создании протокола анализа, а знак "#" соответствует порядковому номеру образца в протоколе анализа. Без использования специализированного программного обеспечения открыть файлы следует с помощью текстового редактора по умолчанию: например, "Блокнот" (NotePad) или WordPad.
4. Полученные данные должны соответствовать следующим параметрам:

- 1) % считываний, сопоставленных с целевыми регионами - 85%, не менее.
- 2) % мишеней (целей, target) с указанным перекрытием (более 20x) - более 98%.
- 3) коэффициент дублирования - не применим для данного Набора.
- 4) частота вариантных аллелей - не менее 0.05.
- 5) локальная глубина секвенирования (показатель качества) - пороговое значение 20.
- 6) наличие одного и того же варианта в прямой и обратной цепях - значение параметра SB в файле формата VCF не должно превышать "-3.01"
- 7) качество картирования последовательности считываний (MAPQ в файле VCF, в Local Run Manager обозначается как 'Percent Q30 Bases' в разделе 'Base Level Statistics') - не менее 30 (Average mapping quality).
- 8) Для проверки показателя средней глубины покрытия в программе Local Run Manager, необходимо перейти в раздел "Samples & Results" проанализированного запуска. Во вкладке "Aggregate Report" в разделе "Coverage Summary" будет указано значение «Amplicon Mean Coverage» - средней глубины прочтения для каждого проанализированного образца в запуске. Средняя глубина прочтения считается достаточной, если она превышает значение 350 чтений.

Sample Information

Sample ID	Total PF Reads	Percent Q30 Bases	Percent On-target Aligned Reads	Autosomal Q30 Rate
3634	434,221	89.72%	92.22%	93.67%

Amplicon Summary

Manifest	Number of Amplicon Regions	Total Length of Target Regions
manifest1	409	36,321 bp

The number of amplicon regions and total length (bp) include the expected on-target regions that are included in the read and base level statistics.

Read Level Statistics

Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
1	167,099	69.32%
Read	Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads
2	166,777	68.82%

Base Level Statistics

Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
1	94.27%	19,019,814	49.20%	0.03%
Read	Percent Q30 Bases	Total Aligned Bases	Percent Aligned Bases	Percent Mismatches
2	85.16%	17,413,147	47.62%	0.52%

The values for aligned bases were determined by summing the number of bases.

Variants Summary

	SNVs	Insertions	Deletions
Total Passing	29	4	5
Percent PASS in dbSNP	79.31%	25.00%	100.00%
Recall Ratio	5.667	-	-
TS:TI Ratio	4.250	-	-

Variants by Sequence Context

	SNVs	Insertions	Deletions
n Genes	29	4	5
n Exons	19	0	1
n Coding Regions	18	0	1
n UTR Regions	1	0	0
n Splice Site Regions	0	0	0

Genes include exons, introns and UTR regions. Exons include coding and UTR regions. UTR regions include 5' UTR regions, 3' UTR regions, and splice sites. Insertions and deletions are annotated as splice acceptor, splice donor, and splice site mutations.

Рисунок 21. Local Run Manager, описание параметров анализируемого образца

- Мутации в исследуемых генах считаются обнаруженными, если в файле содержатся записи, позиции которых находятся в пределах координат целевых генов:

Ген	Диапазон координат гена
NRAS	chr 1: 115250775-115259515
KRAS	chr 12: 25378548-25403865
PDGFRA	chr 4: 55152081-55152162
KIT	chr 4: 55524085-55606881
EGFR	chr 7: 55086794-55279321
BRAF	chr 7: 140434279-140624564

Пример интерпретации результатов секвенирования:

Запись в vcf-файле				Интерпретация (соответствие мутации и гену)
хромосома	позиция	реф. аллель	альт. аллель	
chr7	55259515	T	G	мутация L858R в гене EGFR

В противном случае следует считать, что в исследованном образце отсутствуют мутации генов BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA. В то же время могут содержаться другие мутации, соответствующие записям VCF-файла, однако их клиническая значимость не определена в рамках набора Соло-тест Атлас.

Для автоматического анализа данных можно воспользоваться ПО Соло-репорт. Для получения доступа к ПО, а также для помощи в анализе данных вы можете связаться с нами, написав на solo-test@oncoatlas.ru.

Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по QR-коду:



Производитель:
ООО «Онкодиагностика Атлас»

Юридический адрес:
Российская Федерация, г. Москва, ул. Малая Никитская д. 31/1, эт.1, пом. 4

e-mail: solo-test@oncoatlas.ru
oncoatlas.ru/atlas

Приложение 1.

Таблица соответствия комбинаций индексов исследуемым образцам.

«Соло-тест Атлас 48-а»				«Соло-тест Атлас 48-б»			
№ образца	Название образца	Индекс Си	Индекс Ли	№ образца	Название образца	Индекс Си	Индекс Ли
1		Си-1	Ли-1	1		Си-7	Ли-1
2		Си-1	Ли-2	2		Си-7	Ли-2
3		Си-1	Ли-3	3		Си-7	Ли-3
4		Си-1	Ли-4	4		Си-7	Ли-4
5		Си-1	Ли-5	5		Си-7	Ли-5
6		Си-1	Ли-6	6		Си-7	Ли-6
7		Си-1	Ли-7	7		Си-7	Ли-7
8		Си-1	Ли-8	8		Си-7	Ли-8
9		Си-2	Ли-1	9		Си-8	Ли-1
10		Си-2	Ли-2	10		Си-8	Ли-2
11		Си-2	Ли-3	11		Си-8	Ли-3
12		Си-2	Ли-4	12		Си-8	Ли-4
13		Си-2	Ли-5	13		Си-8	Ли-5
14		Си-2	Ли-6	14		Си-8	Ли-6
15		Си-2	Ли-7	15		Си-8	Ли-7
16		Си-2	Ли-8	16		Си-8	Ли-8
17		Си-3	Ли-1	17		Си-9	Ли-1
18		Си-3	Ли-2	18		Си-9	Ли-2
19		Си-3	Ли-3	19		Си-9	Ли-3
20		Си-3	Ли-4	20		Си-9	Ли-4
21		Си-3	Ли-5	21		Си-9	Ли-5
22		Си-3	Ли-6	22		Си-9	Ли-6
23		Си-3	Ли-7	23		Си-9	Ли-7
24		Си-3	Ли-8	24		Си-9	Ли-8
25		Си-4	Ли-1	25		Си-10	Ли-1
26		Си-4	Ли-2	26		Си-10	Ли-2
27		Си-4	Ли-3	27		Си-10	Ли-3
28		Си-4	Ли-4	28		Си-10	Ли-4
29		Си-4	Ли-5	29		Си-10	Ли-5
30		Си-4	Ли-6	30		Си-10	Ли-6
31		Си-4	Ли-7	31		Си-10	Ли-7
32		Си-4	Ли-8	32		Си-10	Ли-8
33		Си-5	Ли-1	33		Си-11	Ли-1
34		Си-5	Ли-2	34		Си-11	Ли-2
35		Си-5	Ли-3	35		Си-11	Ли-3
36		Си-5	Ли-4	36		Си-11	Ли-4
37		Си-5	Ли-5	37		Си-11	Ли-5
38		Си-5	Ли-6	38		Си-11	Ли-6
39		Си-5	Ли-7	39		Си-11	Ли-7
40		Си-5	Ли-8	40		Си-11	Ли-8
41		Си-6	Ли-1	41		Си-12	Ли-1
42		Си-6	Ли-2	42		Си-12	Ли-2
43		Си-6	Ли-3	43		Си-12	Ли-3
44		Си-6	Ли-4	44		Си-12	Ли-4
45		Си-6	Ли-5	45		Си-12	Ли-5
46		Си-6	Ли-6	46		Си-12	Ли-6
47		Си-6	Ли-7	47		Си-12	Ли-7
48		Си-6	Ли-8	48		Си-12	Ли-8

ОГРН 1115076059401
Москва
Общество с ограниченной ответственностью
"Центральный институт
гигиены и санитарии"
34

ПАСПОРТ № 1

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018»

Вариант исполнения «Соло-тест Атлас 48С-б»	Номер серии 2WS205	Дата изготовления 28.02.2022
		Срок годности 28.11.2022

Упаковка и маркировка набора:

Упаковка и маркировка указанной серии соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

Комплектность поставки:

- Набор реагентов «Соло-тест Атлас 48С-б»
- Руководство пользователя
- Паспорт.

Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по ссылке <https://cdn.oncoatlas.ru/instruction-atlas.pdf>

Состав набора и внешний вид:

Комплект для целевого обогащения ДНК:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор праймеров 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор праймеров 2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПЦР-смесь 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ОКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Комплект для приготовления библиотек:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Активатор	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор Л	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ДНК-лигаза	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ЛС адаптеры	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Магнитные частицы	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость с осадком коричневого или черного цвета	Соответствует.
Реагент В	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Реагент Е	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ТЕ буфер	2 пробирки Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПЦР-смесь 2	2 пробирки	Соответствует.

	Прозрачная бесцветная жидкость	
Олигонуклеотидные индексы : Си-7	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-8	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-9	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-10	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-11	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-12	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Комплект для подготовки образца к секвенированию:

Название	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор НТ1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость.	Соответствует.
Картридж	1 шт. Контейнер с раствором, окрашенным в фиолетовый цвет	Соответствует.

Комплект для секвенирования:

Название	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор PR2	1 бутыл. Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Проточная кювета	1 флакон с кюветой, погруженной в бесцветную прозрачную жидкость	Соответствует.

Функциональные характеристики набора:

Показатель	Норма	Результаты
Аналитическая чувствительность:		
ПКО*(5 нг/мкл)	Детекция специфической нуклеотидной последовательности в гене EGFR	Соответствует.
Аналитическая специфичность:		
ОКО**	Отсутствие детекции специфической (мутантной)	Соответствует.

	нуклеотидной последовательности в целевых генах.	
Правильность определения:		
КОП***	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью набора с результатами, полученными с помощью секвенирования по Сенгеру.	Соответствует.

*ПКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №ПКО2.

**ОКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №ОКО2.

***КОП – контрольный образец предприятия (препарат мутантной ДНК человека, приготовленный в соответствии с СОП № 2).

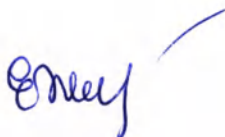
Условия транспортировки и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48С-б» может транспортироваться при температуре 2-8°C в течение 6 часов. При более длительной транспортировке набор должен быть разукomплектован. Транспортирование производится всеми видами крытого транспорта следующим образом: «Комплект для целевого обогащения ДНК», «Комплект для приготовления библиотек ДНК», «Комплект для подготовки образца к секвенированию» транспортируется при температуре от минус 22 до минус 20°C (при использовании хладоэлементов (- 20°C)), «Комплект для секвенирования» - при температуре 2-8 °C. Хранение. После получения комплекты набора варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48С-б» должны храниться в разных рабочих зонах лаборатории: «Комплект для целевого обогащения ДНК» должен храниться в зоне «пре-ПЦР» (при температуре от минус 22 до минус 20°C), а «Комплект для приготовления библиотек ДНК» (при температуре от минус 22 до минус 20°C), «Комплект для подготовки образца к секвенированию» (при температуре от минус 22 до минус 20°C), «Комплект для секвенирования» (при температуре 2-8 °C) должны храниться в зоне «пост-ПЦР». Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Заключение:

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018», вариант исполнения «Соло-Тест Атлас 48С-б», годен для использования и соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

Руководитель
производственного отдела



Е.Е. Желонкина



ПАСПОРТ №2

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018»

Вариант исполнения «Соло-тест Атлас 48-а»	Номер серии 2WS205	Дата изготовления 28.02.2022
		Срок годности 28.11.2022

Упаковка и маркировка набора:

Упаковка и маркировка указанной серии соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

Комплектность поставки:

- Набор реагентов «Соло-тест Атлас48-а»
- Руководство пользователя
- Паспорт.

Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по ссылке <https://cdn.oncoatlas.ru/instruction-atlas.pdf>

Состав набора и внешний вид:

Комплект для целевого обогащения ДНК:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор праймеров 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор праймеров 2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПЦР-смесь 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ОКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Комплект для приготовления библиотек:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Активатор	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор Л	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ДНК-лигаза	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ЛС адаптеры	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Магнитные частицы	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость с осадком коричневого или черного цвета	Соответствует.
Реагент В	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Реагент Е	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ТЕ буфер	2 пробирки Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПЦР-смесь 2	2 пробирки	Соответствует.

	Прозрачная бесцветная жидкость	
Олигонуклеотидные индексы: Си-1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-3	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-4	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-5	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-6	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Функциональные характеристики набора:

Показатель	Норма	Результаты
Аналитическая чувствительность:		
ПКО*(5 нг/мкл)	Детекция специфической нуклеотидной последовательности в гене EGFR	Соответствует.
Аналитическая специфичность:		
ОКО**	Отсутствие детекции специфической (мутантной) нуклеотидной последовательности в целевых генах.	Соответствует.
Правильность определения:		
КОП***	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью набора с результатами, полученными с помощью секвенирования по Сэнгеру.	Соответствует.

*ПКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг), приготовленный в соответствии с СОП №ПКО2.

**ОКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг), приготовленный в соответствии с СОП №ОКО2.

***КОП – контрольный образец предприятия (препарат мутантной ДНК человека, приготовленный в соответствии с СОП № 2).

Условия транспортировки и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48-а» может транспортироваться всеми видами крытого транспорта следующим образом при температуре от минус 22 до минус 20 °С при использовании хладоэлементов (- 20°С) в течение суток.

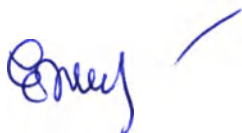
Хранение. После получения комплекты набора варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48-а» должны храниться при температуре от минус 22 до минус 20 °С.

Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Заключение:

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018», вариант исполнения «Соло-Тест Атлас 48-а», годен для использования и соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

Руководитель
производственного отдела



Е.Е. Желонкина

Всего листов 3



ПАСПОРТ №3

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018»

Вариант исполнения «Соло-тест Атлас 48-б»	Номер серии 2WS205	Дата изготовления 28.02.2022
		Срок годности 28.11.2022

Упаковка и маркировка набора:

Упаковка и маркировка указанной серии соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

Комплектность поставки:

- Набор реагентов «Соло-тест Атлас 48-б»
- Руководство пользователя
- Паспорт.

Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по ссылке <https://cdn.oncoatlas.ru/instruction-atlas.pdf>

Состав набора и внешний вид:

Комплект для целевого обогащения ДНК:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор праймеров 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор праймеров 2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПЦР-смесь 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ОКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Комплект для приготовления библиотек:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Активатор	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор Л	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ДНК-лигаза	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ЛС адаптеры	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Магнитные частицы	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость с осадком коричневого или черного цвета	Соответствует.
Реагент В	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Реагент Е	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ТЕ буфер	2 пробирки Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПЦР-смесь 2	2 пробирки	Соответствует.

	Прозрачная бесцветная жидкость	
Олигонуклеотидные индексы : Си-7	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-8	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-9	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-10	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-11	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-12	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Функциональные характеристики набора:

Показатель	Норма	Результаты
Аналитическая чувствительность:		
ПКО*(5 нг/мкл)	Детекция специфической нуклеотидной последовательности в гене EGFR	Соответствует.
Аналитическая специфичность:		
ОКО**	Отсутствие детекции специфической (мутантной) нуклеотидной последовательности в целевых генах.	Соответствует.
Правильность определения:		
КОП***	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью набора с результатами, полученными с помощью секвенирования по Сенгеру.	Соответствует.

*ПКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №ПКО2.

**ОКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №ОКО2.

***КОП – контрольный образец предприятия (препарат мутантной ДНК человека, приготовленный в соответствии с СОП № 2).

Условия транспортировки и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48-б» может транспортироваться всеми видами крытого транспорта следующим образом при температуре от минус 22 до минус 20 °С при использовании хладоэлементов (- 20°С) в течение суток.

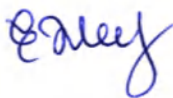
Хранение. После получения комплекты набора варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48-б» должны храниться при температуре от минус 22 до минус 20 °С.

Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Заключение:

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018», вариант исполнения «Соло-Тест Атлас 48-б», годен для использования и соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

Руководитель
производственного отдела



Е.Е. Желонкина

Лист № 3



ПАСПОРТ № 4

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018»

Вариант исполнения «Соло-тест Атлас 48С-а»	Номер серии 2WS205	Дата изготовления 28.02.2022
		Срок годности 28.11.2022

Упаковка и маркировка набора:

Упаковка и маркировка указанной серии соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

Комплектность поставки:

- Набор реагентов «Соло-тест Атлас 48С-а»
- Руководство пользователя
- Паспорт.

Полная инструкция по применению предоставляется на бумажном носителе отдельно от медицинского изделия (по запросу пользователя), а также в форме электронного документа, размещенного в сети Интернет по ссылке <https://cdn.oncoatlas.ru/instruction-atlas.pdf>

Состав набора и внешний вид:

Комплект для целевого обогащения ДНК:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор праймеров 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор праймеров 2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПЦР-смесь 1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ПКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ОКО	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Комплект для приготовления библиотек:

Компонент	Характеристика и норма	Результаты контроля
Активатор	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Раствор Л	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ДНК-лигаза	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ЛС адаптеры	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Магнитные частицы	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость с осадком коричневого или черного цвета	Соответствует.
Реагент В	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Реагент Е	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
ТЕ буфер	2 пробирки Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

ПЦР-смесь 2	2 пробирки Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-3	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-4	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-5	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Си-6	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-2	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-3	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-4	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-5	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-6	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-7	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Олигонуклеотидные индексы: Ли-8	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.

Комплект для подготовки образца к секвенированию:

Название	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор НТ1	1 пробирка Прозрачная бесцветная жидкость.	Соответствует.
Картридж	1 шт. Контейнер с раствором, окрашенным в фиолетовый цвет	Соответствует.

Комплект для секвенирования:

Название	Характеристика и норма	Результаты контроля
Раствор PR2	1 бутыль. Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует.
Проточная кювета	1 флакон с кюветой, погруженной в бесцветную прозрачную жидкость	Соответствует.

Функциональные характеристики набора:

Показатель	Норма	Результаты
Аналитическая чувствительность:		
ПКО*(5 нг/мкл)	Детекция специфической нуклеотидной последовательности в гене EGFR	Соответствует.
Аналитическая специфичность:		

ОКО**	Отсутствие детекции специфической (мутантной) нуклеотидной последовательности в целевых генах.	Соответствует.
Правильность определения:		
КОП***	Совпадение результатов секвенирования, полученных с помощью набора с результатами, полученными с помощью секвенирования по Сенгеру.	Соответствует.

*ПКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №ПКО2.

**ОКО – препарат геномной ДНК человека (5 нг/мкл), приготовленный в соответствии с СОП №ОКО2.

***КОП – контрольный образец предприятия (препарат мутантной ДНК человека, приготовленный в соответствии с СОП № 2).

Условия транспортировки и хранения:

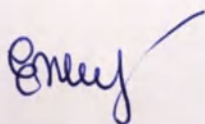
Транспортирование. Набор реагентов варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48С-а» может транспортироваться при температуре 2-8°C в течение 6 часов. При более длительной транспортировке набор должен быть разукomплектован. Транспортирование производится всеми видами крытого транспорта следующим образом: «Комплект для целевого обогащения ДНК», «Комплект для приготовления библиотек ДНК», «Комплект для подготовки образца к секвенированию» транспортируется при температуре от минус 22 до минус 20°C (при использовании хладоэлементов (- 20°C)), «Комплект для секвенирования» - при температуре 2-8 °C.

Хранение. После получения комплекты набора варианта исполнения «Соло-Тест Атлас 48С-а» должны храниться в разных рабочих зонах лаборатории: «Комплект для целевого обогащения ДНК» должен храниться в зоне «пре-ПЦР» (при температуре от минус 22 до минус 20°C), а «Комплект для приготовления библиотек ДНК» (при температуре от минус 22 до минус 20°C), «Комплект для подготовки образца к секвенированию» (при температуре от минус 22 до минус 20°C), «Комплект для секвенирования» (при температуре 2-8 °C) должны храниться в зоне «пост-ПЦР». Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Заключение:

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA, ассоциированных с чувствительностью к противоопухолевой лекарственной терапии, методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018», вариант исполнения «Соло-Тест Атлас 48С-а», годен для использования и соответствует требованиям ТУ 21.20.23-002-91709359-2018.

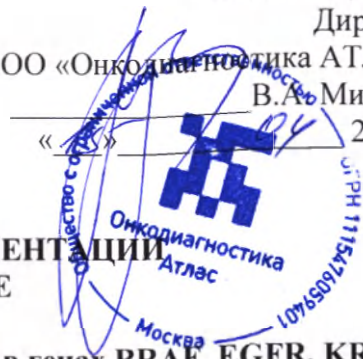
Руководитель
производственного отдела



Е.Е. Желонкина



«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор
 ООО «Онкодиагностика АТЛАС»
 В.А. Милейко
 « 2022 г.



СВЕДЕНИЯ О НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

«Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018»

1. НАИМЕНОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ.

- «Набор реагентов для одновременного выявления мутаций в генах BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, KIT, PDGFRA в образцах опухолей методом высокопроизводительного секвенирования (Соло-тест Атлас) по ТУ 21.20.23-002-91709359-2018».
- Производитель: Общество с Ограниченной Ответственностью «Онкодиагностика АТЛАС» (ООО «Онкодиагностика АТЛАС»), 121069, Москва, ул. Малая Никитская д.31, стр.1, эт.1, пом.4, телефон/факс: +7-(495)-374-83-59, e-mail: solo@atlas.ru.
- Разработчик: Общество с Ограниченной Ответственностью «Онкодиагностика АТЛАС» (ООО «Онкодиагностика АТЛАС»), 121069, Москва, ул. Малая Никитская д.31, стр.1, эт.1, пом.4, телефон/факс: +7-(495)-374-83-59, e-mail: solo@atlas.ru.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ СТАНДАРТОВ ПРИМЕНЕНИЕ КОТОРЫХ ОБЕСПЕЧИВАЕТ БЕЗОПАСНОСТЬ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ И КАЧЕСТВО МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ.

Приказ МЗ РФ №4н от 06.06.2012	Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий
Приказ МЗ РФ № 11н от 19.01.2017	Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинского изделия
ГОСТ 2.114-2016	Единая система конструкторской документации. Технические условия.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации
ГОСТ 31508-2012	Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные

	требования.
ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003)	Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
ГОСТ 3885-73	Реактивы и особо чистые вещества. Правила приемки, отбор проб, фасовка и маркировка.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики invitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики invitro.
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
ГОСТ 17.2.3.02-2014	Правила установления допускаемых выбросов загрязняющих веществ промышленными предприятиями
ГОСТ 17.2.3.01-1986	Охрана природы. Атмосфера. Правила контроля качества воздуха населенных пунктов
ГН 2.1.6.1338-03	ПДК загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест
ГН 2.2.5.1313-03	ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны
СанПиН 2.1.3684-21	Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности
ГОСТ 12303-80	Картон коробочный.
СП 2.2.3670-20	«Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда».
ГОСТ 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции

3. ИНЫЕ СВЕДЕНИЯ

1. Классификационные сведения о медицинском изделии в соответствии с Приказом Минздрава от 6 июня 2012 г. N 4н (в ред. Приказа Минздрава России от 25.09.2014 N 557н):

а) Класс потенциально риска применения – 2б.

2. Код ОКПД 2 в соответствии с Общероссийским классификатором продукции по видам экономической деятельности ОК 034–2014 (ОКПД 2), утв. Приказом Росстандарта от 31.01.2014 №14-ст. – 21.20.23.110 (а именно «Реагенты диагностические»).

3. Вид согласно номенклатурной классификации – 323770.

