УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

_____ Корниенко А.А.

«18» октября 2024 г.

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени **"Real-time-PCR-IDH2-3R"** по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

Содержание 1
Введение 3
1 Назначение набора 3
2 Характеристика набора 4
2.1 Варианты исполнения 4
2.2 Комплектность 4
2.3 Состав набора реагентов 4
2.4 Число анализируемых проб 5
2.5 Принцип действия набора 5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора 7
3.1 Предел обнаружения 7
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ 7
3.3 Характеристики аналитической эффективности 7
3.4 Диагностическая специфичность 8
3.5 Диагностическая чувствительность 8
3.6 Ограничения при применении 8
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа 8
4 Риски, связанные с применением набора реагентов 8
5 Меры предосторожности 9
6 Оборудование и материалы 10
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов 10
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов 11
7 Анализируемые пробы 12
8 Подготовка компонентов для анализа 12
8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой 12
8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений 13
9 Проведение анализа 14
9.1 Постановка контрольной ПЦР 14
9.2 Программирование и запуск термоциклера 15
9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР 16
9.4 Постановка контрольной ПЦР и аллель-специфичных ПЦР на мутации гена *IDH2* 17
9.5 Программирование и запуск термоциклера 19

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU : REF 22502

10 Анализ результатов 19
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР 19
10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *IDH2* 21
11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации 21
11.1 Условия хранения 21
11.2 Условия транспортирования 22
11.3 Условия эксплуатации 22
11.4 Условия утилизации 22
12 Гарантийные обязательства 23
12.1 Гарантии производителя 23
12.2 Рекламации 23
13 Маркировка 24
Библиография 25
Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков 26
Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel» 27

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Введение

Ген *IDH2* кодирует фермент изоцитратдегидрогеназу (изоформу 2). Фермент IDH2 катализирует обратимое окислительное декарбоксилирование изоцитрата с образованием альфа-кетоглутарата. IDH2 участвует в метаболизме глутамина, липогенезе, в регуляции клеточного окислительно-восстановительного статуса.

Соматические гетерозиготные мутации в гене *IDH2* приводят к аминокислотной замене в активном центре фермента в кодонах 140 и 172 (R140Q и R172K), в результате чего изменяется сайт связывания фермента и происходит накопление онкогенного метаболита 2-гидроксиглутарата [1].

Наличие мутации в гене *IDH2* – прогностический маркер у пациентов с глиомой, связанный с благоприятным прогнозом. Глиомы – это собирательный термин, который объединяет все диффузные опухоли, возникающие из глиальных клеток или клеток-предшественников в центральной нервной системе [2].

В соответствии с клиническими рекомендациями «Первичные опухоли центральной нервной системы» пациентам с астроцитомами и глиобластомами рекомендовано определение мутаций в гене *IDH2* в биопсийном (операционном) материале для уточнения прогноза [3].

Показания и противопоказания к применению

Показания: набор реагентов рекомендуется к применению у пациентов с астроцитомами и глиобластомами для сопутствующей диагностики для уточнения прогноза. Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения соматических мутаций R140Q и R172K гена *IDH2* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика у пациентов с астроцитомами и глиобластомами для уточнения прогноза.

Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (12)";
2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)".

2.2 Комплектность

В комплект поставки входят: набор реагентов (таблица 1), инструкция по применению, паспорт качества.

2.3 Состав набора реагентов

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакций	на 36 реакций
1	Зеленый	Контрольная ПЦР-смесь	740 мкл	2*1100 мкл
2	Жёлтый	ПЦР-смесь R140Q	280 мкл	840 мкл
3	Жёлтый	ПЦР-смесь R172K	280 мкл	840 мкл
4	Синий	Taq ДНК-полимераза	30 мкл	80 мкл
5	Красный	ПКО	90 мкл	270 мкл
6	Белый	ОКО	1,4 мл	4,5 мл
7	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
8	Бесцветный	UDG	9 мкл	27 мкл

Контрольная ПЦР-смесь – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации константного фрагмента гена *IDH2*.

ПЦР-смесь R140Q – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента гена *IDH2* с мутацией R140Q.

ПЦР-смесь R172K – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента гена *IDH2* с мутацией R172K.

Taq ДНК-полимераза – фермент Taq ДНК-полимераза.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПКО – положительный контрольный образец, содержащий смесь ДНК с фрагментами гена *IDH2* с мутациями R140Q, R172K и ДНК человека без мутаций гена *IDH2*.

ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

10х UDG буфер – десятикратный буфер для UDG (урацил-ДНК-гликозилазы).

UDG – фермент урацил-ДНК-гликозилаза.

Набор реагентов не содержит опасных химических веществ, не содержит биологических материалов человеческого и животного происхождения.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.4 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в дублях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 14 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в дублях).

2.5 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

Набор содержит три смеси для ПЦР (таблица 1): контрольная ПЦР-смесь и две ПЦР-смеси для амплификации фрагментов гена *IDH2* с мутациями R140Q и R172K. ПЦР-смеси содержат все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

Для контроля работы набора в его состав входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит смесь ДНК ампликонов с фрагментами гена *IDH2* с мутациями R140Q, R172K и ДНК человека без мутаций в 140-м и 172-м кодонах гена *IDH2*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Анализ на наличие мутации в гене *IDH2* состоит из двух этапов:

1) проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР;
2) ПЦР на наличие мутаций в гене *IDH2*.

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки пригодности и выбора подходящего разведения образцов ДНК. Мишенью для контрольной ПЦР является константный участок ДНК гена *IDH2*. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM. Контрольная ПЦР-смесь также содержит реагенты для ПЦР внутреннего контроля (ВК). Мишенью ПЦР ВК является синтетическая последовательность, не имеющая гомологии с геномом человека. Продукты ПЦР ВК детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Амплификация ВК служит контролем правильности постановки и отсутствия ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Пригодность образца ДНК оценивают по величине Ct, соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором кривая флуоресценции пересекает заданный пороговый уровень. Значения Ct разведений клинических образцов ДНК сравнивают с Ct ПКО. Для последующих аллель-специфичных ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину Ct относительно Ct ПКО.

На втором этапе выбранные разведения образцов ДНК анализируют одновременно ещё раз в контрольной ПЦР и в двух аллель-специфичных ПЦР на соответствующие мутации. В каждой из аллель-специфичных ПЦР происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *IDH2*, содержащего мутацию, за счёт использования праймера, который комплементарен последовательности ДНК с соответствующей мутацией. Продукты ПЦР гена *IDH2* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

В аллель-специфичной реакции величина Ct для образцов ДНК, содержащих ген *IDH2* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина Ct, для образцов ДНК, содержащих ген *IDH2* с соответствующей мутацией. Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значениями Ct в аллель-специфичной ПЦР на соответствующую мутацию и в контрольной ПЦР.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией R140Q гена *IDH2* на фоне ДНК гена *IDH2* без мутаций, 5% ДНК с мутацией R172K гена *IDH2* на фоне ДНК гена *IDH2* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 40 мкл с концентрацией 0,4 нг/мкл (120 копий гена *IDH2* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутаций R140Q и R172K в гене *IDH2* на фоне ДНК гена *IDH2* без мутаций, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *IDH2* без мутаций R140Q и R172K.

Аналитическая специфичность целевых участков гена *IDH2* подтверждена *in silico* с помощью ресурса BLAST *(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)*.

Различное содержание парафина на срезе (от 61% до 87%) не влияет на результаты определения мутаций гена *IDH2*. Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций гена *IDH2*.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций R140Q и R172K гена *IDH2*. Значение повторяемости результатов при определении мутаций R140Q и R172K гена *IDH2* составило 100% (интервал 90,26-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций R140Q и R172K гена *IDH2*. Значение воспроизводимости результатов при определении

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU REF 22502

мутаций R140Q и R172K гена *IDH2* составило 100% (интервал 90,26-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций R140Q и R172K гена *IDH2* в клинических испытаниях на выборке из 55 образцов, из них 30 отрицательных образцов, составила 100% (интервал 88,43-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций R140Q и R172K гена *IDH2* в клинических испытаниях на выборке из 55 образцов, из них 25 положительных образцов, составила 100% (интервал 86,28-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *IDH2* оценивается по значению Ct в контрольной ПЦР. Если в этой реакции величина Ct образца превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, и результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *IDH2* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

1. Деградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация фермента Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2. Недостаточное количество клеток опухолевой ткани на срезе из-за несоблюдения рекомендаций по выделению ДНК из парафиновых блоков (возможный вред: ложноотрицательный результат).
3. Появление неспецифичных продуктов амплификации из-за пропуска этапа обработки образцов ДНК урацил-ДНК-гликозилазой, снижение специфичности анализа (возможный вред: ложноотрицательный результат).
4. Некорректная интерпретация результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).
5. Тестирование образцов ДНК без дублей, образец ДНК не добавлен в ПЦР-смесь из-за ошибки (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат).
6. Смещение сигналов флуоресценции из-за использования неверного значения для порогового уровня флуоресценции при анализе данных ПЦР (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
7. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой, входящую в состав набора реагентов.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
15. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Амплификатор планшетного типа с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени: термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (РУ №ФСЗ 2008/01792, «Био-Рад Лабораториез, Инк.», США).

Бокс для ПЦР, например, бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» по ТУ 9443-004-51495026-2004 (РУ № ФСР 2010/07114, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Вортекс, например, вортекс персональный V-1 plus (РУ № ФСЗ 2011/09797, ООО «Биосан», Латвия).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Дозаторы переменного объема, например, дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (РУ № ФСР 2009/05681, АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия).

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат твердотельный, например, термостат типа «Драй-блок» TDB-120, вариант исполнения: I. Термостат TDB-120 с крышкой и термоблоком А-53 (РУ № РЗН 2018/7729, ООО «Биосан», Латвия).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°С до 8°С) и морозильной камерами (от минус 18°С до минус 25°С) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга, например, центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (РУ № ФСЗ 2008/01792, ООО «Биосан», Латвия).

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия).

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки, зарегистрированный в РФ, например, «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017 (РУ № РЗН 2019/9172, ООО «Номотек», Россия).

Наконечники универсальные, например, наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем. 3. Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объёмом от 0,1 мкл до 1000 мкл (РУ № ФСЗ 2012/12077, «Эксиджен, Инк.», США).

Перчатки медицинские, например, перчатки медицинские диагностические (смотровые) и хирургические одноразовые "Benovy" стерильные и нестерильные. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные смотровые, цвета: бирюзовый, синий, белый, голубой, сиреневый, зеленый, размеры: XS, S, M, L, XL (вид 185830) (РУ № ФСЗ 2012/12488, «ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия).

Пробирки, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. 13. Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU REF 22502

от 0,6 мл до 2,0 мл или 17. плашки для ПЦР на 96 лунок (РУ № ФСЗ 2012/11892, «Эксиджен, Инк.», США).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. Вариант исполнения 23. Штатив для пробирок, 80 ячеек (РУ № ФСЗ 2009/05024, «Эксиджен, Инк.», США).

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из фиксированной формалином и заключенной в парафин (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) опухолевой ткани.

Для выделения ДНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемый набор: «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020. Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков приведены в приложении А.

ВНИМАНИЕ! Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Выделенные образцы ДНК хранить с соблюдением условий согласно требованиям инструкции используемого набора для выделения ДНК и с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

8 Подготовка компонентов для анализа

8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой

Обработка образцов ДНК, выделенных из FFPE опухолевой ткани, урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) улучшает специфичность анализа на наличие соматических мутаций.

8.1.1 Разморозить 10x UDG буфер и образцы ДНК, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.1.2 Приготовить UDG-смесь: добавить в пробирку объёмом 1,5 мл реагенты (ОКО, 10x UDG буфер и UDG) и перемешать на вортексе 1 раз в течение 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз). Количество реагентов в расчёте на один образец приведено в таблице 2, для обработки N образцов указанное количество необходимо умножить на (N+1).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 2. Состав UDG-смеси

Реагент	Количество на 1 образец ДНК
ОКО	4 мкл
10х UDG буфер	5 мкл
UDG	1 мкл

8.1.3 Добавить в пробирки объёмом 1,5 мл по 10 мкл UDG-смеси, по 40 мкл образцов ДНК и перемешать на вортексе 1 раз в течение 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз). Центрифугировать в течение 3 секунд на микроцентрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.1.4 Поместить пробирки в термостат и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°С. После этого прогреть в течение 5 минут при температуре 95°С, чтобы инактивировать UDG и центрифугировать в течение 3 секунд. ДНК, обработанную UDG, хранить не более суток при температуре 4°С или в течение 6 месяцев при температуре минус 20°С.

8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений

Необходимая степень разведения образцов ДНК зависит от количества ткани, взятой для выделения ДНК и от концентрации ингибирующих примесей. При использовании рекомендаций по выделению ДНК (Приложение А) для большинства образцов достаточно разведение в 5-20 раз, поэтому сначала рекомендуется тестировать все образцы в разведениях 1/5 и 1/20.

8.2.1 Приготовить две микропробирки объёмом 1,5 мл для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1/5» и «1/20» соответственно.

8.2.2 В каждую пробирку добавить ОКО и образец ДНК согласно таблице 3.

Таблица 3. Разведение образцов ДНК

Разведение	Количество ДНК	Количество ОКО
1/5	30 мкл	120 мкл
1/20	10 мкл	190 мкл

8.2.3 Перемешать на вортексе в течение 2-3 сек, центрифугировать в течение 5-10 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Разведенную ДНК хранить не более суток при температуре 4°С или не более 6 месяцев при температуре минус 20°С.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU REF 22502

9 Проведение анализа

9.1 Постановка контрольной ПЦР

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях указанное количество необходимо умножить на (4N + 5).

Таблица 4. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №5, красная крышка) и ОКО (пробирка №6, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) или при 37°С, убедиться, что раствор полностью растаял. Содержимое пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки.

9.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 9.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси, добавить Taq ДНК-полимеразу и тщательно перемешать на вортексе 1 раз в течение 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз). Центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

9.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать крышки пробирок!

Пример расположения шести клинических образцов ДНК и контрольных образцов в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведён на рисунке 1.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Разведение	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
1:5	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
1:20	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		
	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК в двух разведениях в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и разведение (1:5; 1:20).

9.1.5 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой и закрыть крышки.

9.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

– по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;

– по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;

– по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

9.1.7 Закрыть крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.2 Программирование и запуск термоциклера

9.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 5.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU REF 22502

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	5 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	40 сек	
40	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	1 мин	Да

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагментов гена *IDH2*.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР

9.3.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин Ct использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 100.

9.3.2 Проверить значения Ct по каналам FAM для ПКО и ОКО (таблица 7, допустимые значения Ct в контрольной ПЦР). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *IDH2* только в том случае, если величины Ct для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

– для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Ct_{ROX} меньше или равно QC_{ROX};

– для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение Ct_{FAM} либо Ct_{FAM} больше $Ct_{ПКО}+6$ ($Ct_{ПКО}$ – это Ct ПКО в контрольной ПЦР);

– для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Ct_{ROX} меньше или равно QC_{ROX};

– для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно $QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Значения QC_{ROX} и QC_{FAM} указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте. Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

9.3.3 Сравнить значения Ct по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов (Ct_C) и Ct ПКО ($Ct_{ПКО}$). Для проведения аллель-специфичной ПЦР выбрать разведение образца, имеющее значение Ct_C, наиболее близкое к $Ct_{ПКО}$. Если в канале FAM значение Ct_C больше $Ct_{ПКО}+3$, то нужно сравнить значение Ct по каналу ROX со значением QC_{ROX}, указанным на упаковке и в паспорте набора. Рекомендации по анализу данных приведены в таблице 6.

Таблица 6. Анализ данных контрольной ПЦР.

Ct_{FAM}	Ct_{ROX}	Интерпретация результатов
$Ct_C < Ct_{ПКО}-3$	Не задано	Необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Ct на 1 цикл, и повторить анализ.
$Ct_{ПКО}-3 \le Ct_C \le Ct_{ПКО}+3$	Не задано	Концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *IDH2*.
$Ct_C > Ct_{ПКО}+3$	$Ct_{ROX} > QC_{ROX}$ или Ct_{ROX} не определено	В образце ДНК много ингибиторов. Нужно развести образец ДНК и повторить постановку контрольной ПЦР. Если по-прежнему $Ct_C > Ct_{ПКО}+3$, то нужно заново выделить ДНК.
	$Ct \le QC_{ROX}$	Концентрация ДНК не достаточна для анализа. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

9.4 Постановка контрольной ПЦР и аллель-специфичных ПЦР на мутации гена *IDH2*

9.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ОКО и ПКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на (2N + 5).

9.4.2 Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПЦР-смесь R140Q (пробирка №2, жёлтая крышка), ПЦР-смесь R172K (пробирка №3, жёлтая крышка), ПКО и ОКО. Убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU REF 22502

9.4.3 Промаркировать три чистые пробирки объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 контрольную ПЦР-смесь, в пробирку №2 – ПЦР-смесь R140Q, в пробирку №3 – ПЦР-смесь R172K. Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу. Перемешать на вортексе 1 раз в течение 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз) и центрифугировать 5 сек в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходных ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы немедленно поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

9.4.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 2.

ПЦР-смесь	**Клинические образцы ДНК**						**Образцы из набора**	
	ДНК1	**ДНК2**	**ДНК3**	**ДНК4**	**ДНК5**	**ДНК6**	**ОКО**	**ПКО**
Контрольная	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
R140Q	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
R172K	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 2. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны ПЦР-смеси, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

9.4.5 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.4.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

– по 5 мкл разведённых клинических образцов ДНК, используя оптимальные разведения, определённые на этапе контрольной ПЦР;

– по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;

– по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9.4.7 Закрыть крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.4.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.4.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.5 Программирование и запуск термоциклера

9.5.1 Программирование и запуск прибора проводить в соответствии с руководством по эксплуатации, п. 9.2.2-9.2.4 и таблицей 5.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для получения величин Ct использовать логарифмическую шкалу графика флуоресценции и выставить пороговый уровень 100 как описано в разделе 9.3.1.

10.1.2 Проверить значения Ct по каналам ROX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *IDH2* только в том случае, если величины Ct для ОКО и ПКО имеют допустимые значения (таблица 7):

– для ОКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Ct_{ROX} меньше или равно QC_{ROX};

– для ОКО в контрольной и в аллель-специфичных ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение Ct_{FAM} либо Ct_{FAM} больше $Ct_{ПКО}+6$ ($Ct_{ПКО}$ – значение Ct ПКО в ПЦР с этой же смесью);

– для ПКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Ct_{ROX} меньше или равно QC_{ROX};

– для ПКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно значению QC_{FAM} для контрольной ПЦР;

– для ПКО в аллель-специфичных ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяются значения $Ct_{ПКО}$ меньше или равные значениям QC_{FAM} для этих ПЦР-смесей.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 7. Допустимые значения Ct для контрольных образцов

ПЦР	Допустимое значение Ct для образца	
	ОКО	ПКО
Контрольная ПЦР	$Ct_{ROX} \leq QC_{ROX}$[1] Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}$[2]+6	$Ct_{ROX} \leq QC_{ROX}$[1] $Ct_{FAM} \leq QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$[1]
ПЦР со смесью R140Q	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}$[2]+6	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$[1]
ПЦР со смесью R172K	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}$[2]+6	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$[1]

[1] Значение QC_{ROX} и значения QC_{FAM} для контрольной ПЦР и для аллель-специфичных ПЦР указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

[2] $Ct_{ПКО}$ – значение Ct ПКО в этой же постановке ПЦР.

10.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 8.

Таблица 8. Другие значения Ct для контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	Значение Ct	Возможные проблемы
Контрольная ПЦР		
ОКО	$Ct_{ROX} > QC_{ROX}$	Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
	$Ct_{FAM} \leq Ct_{ПКО}+6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{ROX} > QC_{ROX}$	Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
	$Ct_{FAM} > QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.
ПЦР на мутации R140Q и R172K		
ОКО	$Ct_{FAM} \leq Ct_{ПКО}+6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{FAM} > QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} > QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

10.1.5 Для каждого клинического образца в контрольной ПЦР должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяться значение Ct (Ct_C).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10.1.6 Если значение Ct_C определяется в диапазоне $Ct_{ПКО}-3 \le Ct_C \le Ct_{ПКО}+3$, то концентрация ДНК достаточна для анализа на наличие мутаций гена *IDH2*.

10.1.7 Если значение Ct_C меньше $Ct_{ПКО}-3$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Ct на 1 цикл, и повторить анализ.

10.1.8 Если значение Ct_C больше $Ct_{ПКО}+3$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *IDH2*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *IDH2*

10.2.1 Для каждого клинического образца для каждой мутации рассчитать значения $\Delta Ct = Ct_{AS} - Ct_C$, где Ct_{AS} – Ct образца в аллель-специфичной ПЦР, соответствующей мутации, Ct_C – Ct образца в контрольной ПЦР. Рекомендации по расчёту ΔCt в программе «MS Office Excel» приведены в приложении Б.

10.2.2 Сравнить полученные значения ΔCt клинического образца ДНК со значениями точек отсечения (ТО) для каждой мутации. Значения ТО для каждой мутации указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

10.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *IDH2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению ТО для этой мутации.

10.2.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *IDH2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше ТО, или если в аллель-специфичной ПЦР значения Ct_{AS} образца не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше ТО, а для другого – значение Ct_{AS} не определено.

10.2.5 Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно ТО, а для другого ΔCt больше ТО, то результат считают сомнительным и анализ повторяют. Если в повторном анализе получают сомнительный результат, то проводят макродиссекцию участков опухоли из срезов FFPE опухолевой ткани так, чтобы содержание опухолевых клеток было не менее 50%, выделяют ДНК и повторяют анализ.

11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

11.1 Условия хранения

11.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С в течение всего срока годности в холодильниках, которые обеспечивают регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°С – не более 30 минут.

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

11.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°С до 25°С).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

11.4 Условия утилизации

11.4.1 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21.

11.4.2 При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

12 Гарантийные обязательства

12.1 Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

12.2 Рекламации

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

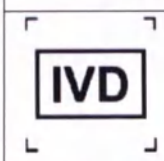
Рекламации следует направлять в письменном виде производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес:	630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон:	+7 (383) 209-32-40
Электронная почта:	info@biolinklab.ru
Веб-сайт:	biolinklab.ru

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Изготовитель

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Библиография

1. IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future. / Turkalp, Zorbey et al. // JAMA neurology – 2014. - Vol. 71 (10). - P 1319-25. - DOI:10.1001/jamaneurol.2014.1205
2. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. / Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. // N Engl J Med. – 2009. - Vol. 360(8). – P 765-773. - DOI10.1056/NEJMoa0808710
3. Клинические рекомендации. Первичные опухоли центральной нервной системы. / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», «Ассоциация нейрохирургов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клиническойонкологии» // Год утверждения (частота пересмотра): 2020. – 72 с. Одобрено на заседании научно-практического совета Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков

Для выделения ДНК из FFPE блоков излишки парафина обрезать скальпелем и приготовить серийные срезы толщиной 5 микрон с площадью ткани на срезе 25-80 мм^2. Если поверхность блока была длительное время экспонирована на воздухе, то первые 2-3 среза отбросить, а последующие пять использовать для выделения ДНК.

Первый или последний рабочие срезы серии окрасить гематоксилин-эозином, после чего патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток. Если на срезе менее 30% опухолевых клеток, то провести макродиссекцию. Рабочие срезы поместить в пробирку объёмом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного на территории РФ.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». На рисунке Б1 приведён пример расчёта ΔCt для мутаций R140Q и R172K.

В столбце «Target» ввести «Контроль» в ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, ввести названия ПЦР-смесей в ячейки, соответствующие ПЦР с этими смесями (рисунок Б1, элемент 1). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец «Ct_C», где Ct_C – Ct образца в контрольной ПЦР (рисунок Б1, элемент 4). Значения Ct в контрольной ПЦР скопировать в столбце «Cq» (рисунок Б1, элемент 3) и вставить в столбец «Ct_C» (рисунок Б1, элемент 4), таким образом, чтобы значения Cq и Ct_C для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец «ΔCt». Используя функцию вычитания, для каждого образца для каждой мутации рассчитать разницу $\Delta Ct = Cq - Ct_C$ (рисунок Б1, элемент 5), что соответствует $\Delta Ct = Ct_{AS} - Ct_C$.

Добавить столбец «ТО», внести значения ТО для каждой мутации, указанные на упаковке набора и в паспорте (рисунок Б1, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значениями ТО для каждой мутации и записать результат (рисунок Б1, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *IDH2*), если для обоих дублей значения ΔCt меньше или равны значению ТО для этой мутации.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *IDH2* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей значения ΔCt больше ТО или значения Ct_{AS} не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше ТО, а для другого – значение Ct_{AS} не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно ТО, а для другого ΔCt больше ТО, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1 Target	Content	2 Sample	3 Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	4 CtC	5 ΔCt	6 TO	7 Результат
Контроль	Unkn-01	ДНК1	12,4	12,4	0,1				
Контроль	Unkn-01	ДНК1	12,3	12,4	0,1				
Контроль	Unkn-06	ДНК2	15,5	15,6	0,2				
Контроль	Unkn-06	ДНК2	15,8	15,6	0,2				
Контроль	Unkn-07	ДНК3	16,4	16,3	0,1				
Контроль	Unkn-07	ДНК3	16,2	16,3	0,1				
Контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,0	0,0				
Контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,0	0,0				
Контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	16,2	16,1	0,0		ΔCtR140Q	TOR140Q	
Контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	16,1	16,1					
R140Q	Unkn-02	ДНК1	24,4	24,3	0,2	12,4	12,0	6,0	отрицательный
R140Q	Unkn-02	ДНК1	24,1	24,3	0,2	12,3	11,8	6,0	отрицательный
R140Q	Unkn-13	ДНК2	26,8	26,6	0,2	15,5	11,3	6,0	отрицательный
R140Q	Unkn-13	ДНК2	26,5	26,6	0,2	15,8	10,7	6,0	отрицательный
R140Q	Unkn-14	ДНК3	17,6	17,6	0,1	16,4	1,2	6,0	положительный
R140Q	Unkn-14	ДНК3	17,7	17,6	0,1	16,2	1,6	6,0	положительный
R140Q	NTC-02	ОКО	nd	29,3	0,0				
R140Q	NTC-02	ОКО	nd	0,0	0,0				
R140Q	Pos Ctrl-02	ПКО	20,5	20,6	0,0		ΔCtR172K	TOR172K	
R140Q	Pos Ctrl-02	ПКО	20,6	20,6	0,				
R172K	Unkn-03	ДНК1	nd	0,0	0,0	12,4	#ЗНАЧ!	8,2	отрицательный
R172K	Unkn-03	ДНК1	nd	0,0	0,0	12,3	#ЗНАЧ!	8,2	отрицательный
R172K	Unkn-20	ДНК2	21,9	21,8	0,1	15,5	6,4	8,2	положительный
R172K	Unkn-20	ДНК2	21,7	21,8	0,1	15,8	5,9	8,2	положительный
R172K	Unkn-21	ДНК3	30,0	32,8	3,9	16,4	13,7	8,2	отрицательный
R172K	Unkn-21	ДНК3	35,5	32,8	3,9	16,2	19,3	8,2	отрицательный
R172K	NTC-03	ОКО	nd	0,0	0,0				
R172K	NTC-03	ОКО	nd	0,0	0,0				
R172K	Pos Ctrl-03	ПКО	22,8	22,7	0,2				
R172K	Pos Ctrl-03	ПКО	22,6	22,7	0,2				

Рисунок Б1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

1 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, с ПЦР-смесью R140Q и с ПЦР-смесью R172K.

2 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

3 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct образцов в контрольной ПЦР.

4 – столбец CtC, в который вставлены значения Ct из столбца «Cq».

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Cq - Ct_C$.

6 – значения ТО для мутаций R140Q и R172K (указаны на упаковке набора и в паспорте).

7 – результат анализа на наличие мутаций в гене *IDH2*.

Cq Mean – среднее значение Cq для образца, Cq Std. Dev – среднеквадратическое отклонение значения Cq для образца. Значения Cq Mean и Cq Std. Dev не используются при расчётах. nd – значение не определено, #ЗНАЧ! – ошибка в значении.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В приведённом на рисунке Б1 примере ТО $_{R140Q}$ = 6,0, ТО $_{R172K}$ = 8,2.

Образец ДНК1 учитывается как отрицательный, то есть не содержащий мутаций R140Q и R172K в гене *IDH2* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью R140Q значения ΔCt составляют 12,0 и 11,8 (больше TO_{R140Q} = 6,0), а в аллель-специфичной ПЦР со смесью R172K значения Ct_{AS} образца не определены.

Образец ДНК2 учитывается как положительный, содержащий мутацию R172K в гене *IDH2*, так как в ПЦР со смесью R172K значения ΔCt составляют 6,4 и 5,9, для обоих дублей меньше значения TO_{R172K} = 8,2.

Образец ДНК3 учитывается как положительный, содержащий мутацию R140Q в гене *IDH2*, так как в ПЦР со смесью R140Q значения ΔCt составляют 1,2 и 1,6, для обоих дублей меньше значения TO_{R140Q} = 6,0.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU : REF 22502

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью
_____ 21 _____лист
Директор ООО «БИОЛИНК»
_____ / Корниенко А. А. /
«_18_» ___10___ 2024 г.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-005/1 от 26.07.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (12)"

Номер серии	**260724**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 19.4$	$QC_{ROX} = 21.4$
Дата изготовления	**26.07.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 24.5$	$TO_{R140Q} = 7.6$
Срок годности	**до 07.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 25.6$	$TO_{R172K} = 8.3$

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **26.07.2024**

Начальник ОБТК: _____ /Кондратьева О.А./

подпись

БИОЛИНК
ОТДЕЛ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
Г.НОВОСИБИРСК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-005/2 от 26.07.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)"

Номер серии	**260724**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 19.4$	$QC_{ROX} = 21.4$
Дата изготовления	**26.07.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 24.5$	$TO_{R140Q} = 7.6$
Срок годности	**до 07.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 25.6$	$TO_{R172K} = 8.3$

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	2	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **26.07.2024**

Начальник ОБТК: _____ /Кондратьева О.А./
подпись

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-006 от 29.07.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)"

Номер серии	**290724**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 19.4$	$QC_{ROX} = 21.4$
Дата изготовления	**29.07.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R132H)} = 24.5$	$TO_{R140Q} = 7.6$
Срок годности	**до 07.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R132C)} = 25.6$	$TO_{R172K} = 8.3$

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	2	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **29.07.2024**

Начальник ОБТК: _____ / Кондратьева О.А./
подпись

ООО «БИОЛИНК» ОТДЕЛ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ г.НОВОСИБИРСК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-007 от 09.08.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (12)"

Номер серии	**090824**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 17.1$	$QC_{ROX} = 20.5$
Дата изготовления	**09.08.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 22.3$	$TO_{R140Q} = 7.0$
Срок годности	**до 08.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 22.4$	$TO_{R172K} = 8.0$

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **09.08.2024**

Начальник ОБТК: _____/Кондратьева О.А./
подпись

ООО «ВЕКТОР-БЕСТ» ОТДЕЛ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ г.НОВОСИБИРСК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-008 от 09.08.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)"

Номер серии	**090824**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 17.1$	$QC_{ROX} = 20.5$
Дата изготовления	**09.08.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 22.3$	$TO_{R140Q} = 7.0$
Срок годности	**до 08.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 22.4$	$TO_{R172K} = 8.0$

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	2	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **09.08.2024**

Начальник ОБТК: _____ / Кондратьева О.А./

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-009 от 12.08.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (12)"

Номер серии	**120824**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 17.1$	$QC_{ROX} = 20.5$
Дата изготовления	**12.08.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 22.3$	$TO_{R140Q} = 7.0$
Срок годности	**до 08.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 22.4$	$TO_{R172K} = 8.0$

Результат контроля

5. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
6. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

7. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \leq QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \leq QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **12.08.2024**

Начальник ОБТК: _____ /Кондратьева О.А./
подпись

ООО «ВЕКТОР-БЕСТ» ОТДЕЛ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ г.НОВОСИБИРСК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-010 от 12.08.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)"

Номер серии	**120824**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 17.1$	$QC_{ROX} = 20.5$
Дата изготовления	**12.08.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 22.3$	$TO_{R140Q} = 7.0$
Срок годности	**до 08.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 22.4$	$TO_{R172K} = 8.0$

Результат контроля

9. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
10. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	2	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

11. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

12. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 25°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **12.08.2024**

Начальник ОБТК: _____ / Кондратьева О.А./
подпись

ООО БИОСИНТЕЗ
ОТДЕЛ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
г. НОВОСИБИРСК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-011 от 03.10.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59 .52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)"

Номер серии	**031024**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 16.6$	$QC_{ROX} = 18.2$
Дата изготовления	**03.10.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 20.6$	$TO_{R140Q} = 5.5$
Срок годности	**до 10.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 23.0$	$TO_{R172K} = 8.7$

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	2	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **03.10.2024**

Начальник ОБТК: _____ /Кондратьева О.А./

«БИОЛИНК»
ОТДЕЛ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
г.НОВОСИБИРСК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО «БИОЛИНК»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №I-012 от 04.10.2024

Набор реагентов для выявления мутаций гена *IDH2*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-IDH2-3R" по ТУ 20.59.52-012-57201404-2022,

вариант исполнения – Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-IDH2-3R (36)"

Номер серии	**041024**	$QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)} = 16.6$	$QC_{ROX} = 18.2$
Дата изготовления	**04.10.2024**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)} = 20.6$	$TO_{R140Q} = 5.5$
Срок годности	**до 10.2025**	$QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)} = 23.0$	$TO_{R172K} = 8.7$

Результат контроля

5. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.
6. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	2	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R140Q	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
ПЦР-смесь R172K	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	соответствует
Taq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует

7. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	соответствует
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$	$Ct_{ROX} \le QC_{ROX}$, Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует
ПЦР со смесью R140Q ПЦР со смесью R172K	$Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R140Q)}$ $Ct_{FAM} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ R172K)}$	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	соответствует

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 25°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 20.59.52-012-57201404-2022.

Дата выдачи паспорта: **04.10.2024**

Начальник ОБТК: _____ / Кондратьева О.А./
подпись

«БИОЛИНК» ОТДЕЛ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ г. НОВОСИБИРСК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU