

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

State of California
County of LOS ANGELES

Subscribed and sworn to (or affirmed) before me on this 14
day of January, 2025, by NICOLE TERMAN

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

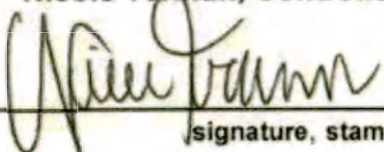


Signature



APPROVED BY
Entrogen, Inc.

Nicole Terman, Controller


signature, stamp

01/10/2025

date



Для диагностики in vitro

REF

MGMTX-RT44

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для in vitro диагностики для обнаружения метилирования гена MGMT методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (MGMT Methylation Detection Kit), 60 реакций

Версия 1.6

Содержание

1. НАИМЕНОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	4
2. НАЗНАЧЕНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	4
3. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	4
4. ПРОИЗВОДИТЕЛЬ И ЕГО УПОЛНОМОЧЕННЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ	5
5. ОБРАЩЕНИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	6
6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
7. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	9
8. ОПИСАНИЕ НАБОРА	10
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	14
10. АНАЛИЗ ДАННЫХ	26
11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	29
12. СОСТАВ КОМПОНЕНТОВ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	32
13. СИМВОЛЫ НА МАРКИРОВКЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	36
14. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНИМЫХ СТАНДАРТОВ	37
15. ПЕРЕЧЕНЬ МАТЕРИАЛОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С УКАЗАНИЕМ СВЕДЕНИЙ ОБ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ	37
16. СВЕДЕНИЯ О ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕСЯ В МЕДИЦИНСКОМ ИЗДЕЛИИ	37
17. ОПИСАНИЕ МЕТОДА СТЕРИЛИЗАЦИИ, СВЕДЕНИЯ О МЕТОДАХ ВАЛИДАЦИИ В ОТНОШЕНИИ ПРОЦЕССА СТЕРИЛИЗАЦИИ	38
18. ПОРЯДОК И УСЛОВИЯ УТИЛИЗАЦИИ ИЛИ УНИЧТОЖЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	38
19. БИОЛОГИЧЕСКИЙ РЕФЕРЕНТНЫЙ ИНТЕРВАЛ	38
20. ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВАХ ИЛИ ОГРАНИЧЕНИЯХ, СВЯЗАННЫХ С РАБОТОЙ, КОТОРЫЕ МОГУТ ПОВЛИЯТЬ НА РЕЗУЛЬТАТ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
21. СВЕДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ, ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ В ОТНОШЕНИИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА, СОДЕРЖАЩЕГОСЯ В ИЗДЕЛИИ	40
22. СВЕДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И МЕРЫ, ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ В СЛУЧАЕ СБОЯ ИЛИ ОТКЛОНЕНИЙ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ИЗДЕЛИЯ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ПО ВНЕШНИМ ПРИЗНАКАМ	40
23. СВЕДЕНИЯ О БЕЗОПАСНОСТИ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ И ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ, В ТОМ ЧИСЛЕ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВ ИЛИ ВХОДЯЩИХ В НЕГО КОМПОНЕНТОВ	40

24. СВЕДЕНИЯ О ПОЖАРНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ.....	40
25. СВЕДЕНИЯ О ВЗРЫВОБЕЗОПАСНОСТИ.....	40
26. СВЕДЕНИЯ О РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ.....	40
27. КРАТНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	41
28. ИНФОРМАЦИЯ О НАДЛЕЖАЩЕЙ ОБРАБОТКЕ ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ЕГО ПОВТОРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ, ВКЛЮЧАЯ ОЧИСТКУ, ДЕЗИНФЕКЦИЮ, УПАКОВКУ И ПРИ НЕОБХОДИМОСТИ МЕТОД ПОВТОРНОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ.....	41
29. ИНФОРМАЦИЯ, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ПРАВИЛЬНОСТИ УСТАНОВКИ ИЗДЕЛИЯ И ЕГО ГОТОВНОСТИ К БЕЗОПАСНОЙ РАБОТЕ ПО НАЗНАЧЕНИЮ	41
30. ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ.....	43
31. УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ.....	41
32. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ И ПРАВИЛА ПРИЕМА РЕКЛАМАЦИЙ.....	46
33. СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА.....	46

1. НАИМЕНОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для *in vitro* диагностики для обнаружения метилирования гена MGMT методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (MGMT Methylation Detection Kit), 60 реакций, в составе:

1. Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X), 1300 мкл, 2 пробирки.
2. Смесь праймеров/зондов для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix, 1200 мкл, 1 пробирка.
3. MGMT Стандарт 1 - MGMT Standard 1, 75 мкл, 1 пробирка.
4. MGMT Стандарт 2 - MGMT Standard 2, 75 мкл, 1 пробирка.
5. MGMT Стандарт 3 - MGMT Standard 3, 130 мкл, 1 пробирка.
6. MGMT Стандарт 7 - MGMT Standard 7, 75 мкл, 1 пробирка.
7. Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent, 500 мкл, 1 пробирка.
8. РНК-носитель – Carrier RNA, не менее 310 мкг, 1 пробирка.
9. Раствор бисульфита – Bisulfite Solution, 1,5 мл, 3 пробирки.
10. Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer, 1,9 мл, 1 пробирка.
11. Вода без РНКаз – RNase-Free Water, 1,9 мл, 1 пробирка.
12. Спиновые колонки для ДНК – DNA Spin Columns, 50 шт.
13. Пробирки для сбора – Collection Tubes (50 EA), 50 шт.
14. Связывающий буфер – Binding Buffer, 31 мл, 1 флакон.
15. Промывочный буфер (концентрат) – Wash Buffer, 13 мл, 2 флакона.
16. Буфер для десульфирования (концентрат) – Desulfonation Buffer, 3 мл, 1 флакон.
17. Буфер для элюирования – Elution Buffer, 1 мл, 1 пробирка.

Примечание: далее по тексту: Набор; Набор MGMTX-RT44; Изделие; Медицинское изделие.

2. НАЗНАЧЕНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Изделие предназначено для качественного обнаружения метилирования промотора O[6]-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) в геномной ДНК опухолей мультиформной глиобластомы (GBM) человека, выделенной из образцов опухоли пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, в *in vitro* диагностике.

3. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

1. Набор реагентов для *in vitro* диагностики для обнаружения метилирования гена MGMT методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (MGMT Methylation Detection Kit), 60 реакций.
2. Инструкция пользователя по применению медицинского изделия -1 шт.

3. Инструкция по применению медицинского изделия (доступна с помощью QR-кода, размещенного на маркировке; может поставляться по запросу потребителя) - 1 шт.

4. ПРОИЗВОДИТЕЛЬ И ЕГО УПОЛНОМОЧЕННЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ

Таблица 1. Сведения о разработчике:

Производитель изделия	EntroGen, Inc. ЭнтроГен, Инк.
Адрес производителя	20950 Warner Center Ln., Suite B & D, Woodland Hills, California, 91367, United States/ 20950 Ворнер центр Лн., офисы Б и Д, Вудлэнд Хиллс, Калифорния, 91367, США
Номера телефонов	1 818 716 1070
Адрес электронной почты	info@entrogen.com

Таблица 2. Сведения о производителе:

Производитель изделия	EntroGen, Inc. ЭнтроГен, Инк.
Адрес производителя	20950 Warner Center Ln., Suite B & D, Woodland Hills, California, 91367, United States/ 20950 Ворнер центр Лн., офисы Б и Д, Вудлэнд Хиллс, Калифорния, 91367, США
Номера телефонов	1 818 716 1070
Адрес электронной почты	info@entrogen.com

Таблица 3. Сведения об уполномоченном представителе:

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

Адрес электронной почты	otk@biovitrum.ru
-------------------------	------------------

Таблица 4. Адрес места производства:

Организационно-правовая форма и полное наименование юридического лица, адрес	EntroGen, Inc. ЭнтроГен, Инк. 20950 Warner Center Ln., Suite B & D, Woodland Hills, California, 91367, United States/ 20950 Ворнер центр Лн., офисы Б и Д, Вудлэнд Хиллс, Калифорния, 91367, США
--	--

5. ОБРАЩЕНИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

Срок годности изделия: 9 месяцев.

Гарантийный срок хранения равен сроку годности.



Набор поставляется в двух коробках с разными температурными диапазонами хранения.



Коробка меньшего размера (реагенты ПЦР) поставляется с хладоэлементами (транспортные контейнеры с пенопластовым покрытием, содержащие пакеты замороженного геля, сухой лед и датчик температурного воздействия). Допустимые сроки транспортирования набора составляют 96 часов. Не допускать воздействия солнечного света; Не допускать воздействия влаги; Хрупкое, обращаться осторожно.

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

- Храните все неоткрытые компоненты в оригинальной упаковке.
- Смеси Праймеров/Зондов стоит всегда защищать от воздействия света для предотвращения фотообесцвечивания флуоресцентных красителей.
- Перед открытием центрифугируйте пробирки.
- Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована.



Остальные реагенты (реагенты для конверсии бисульфитом) транспортируются и поставляются при комнатной температуре (15–25°C) в коробке большего размера. Допустимые сроки транспортирования набора составляют 96 часов. Не допускать воздействия солнечного света; Не допускать воздействия влаги; Хрупкое, обращаться

осторожно.

По прибытии, Спиновые колонки для ДНК – *DNA Spin Columns*, Защитный буфер для ДНК – *DNA Protect Buffer* и Буфер для десульфирования (концентрат) – *Desulfonation Buffer* следует хранить при температуре 2–8°C. Все остальные буферы, включая Раствор бисульфита – *Bisulfite Solution*, следует хранить при комнатной температуре.

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

Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X); Смесь праймеров/зондов для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix; MGMT Стандарт 1 - MGMT Standard 1; MGMT Стандарт 2 - MGMT Standard 2; MGMT Стандарт 3 - MGMT Standard 3; MGMT Стандарт 7 - MGMT Standard 7; Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent после вскрытия рекомендуется хранить — в холодильнике (от 2° до 8 °C) до 4 недель или в замороженном виде (от -25° до -15 °C) с максимум четырьмя (4) циклами замораживания-оттаивания.

РНК-носитель – Carrier RNA следует хранить при комнатной температуре. С момента ресуспендирования РНК-носителя в воде без РНКаз следует хранить в заморозке при температуре от -25°C до -15°C. Можно приготовить аликвоты в требуемом объеме и хранить в аналогичных условиях от -25°C до -15°C. Избегайте повторных разморожек и заморожек реагента (допустимо не более 4 раз).

Таблица 22: условия хранения для каждого реагента набора:

Наименование реагента	Температура хранения
Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X)	От -25°C до -15°C
Смесь праймеров для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 1 - MGMT Standard 1	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 2 - MGMT Standard 2	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 3 - MGMT Standard 3	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 7 - MGMT Standard 7	От -25°C до -15°C
Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent	От -25°C до -15°C
Раствор бисульфита – Bisulfite Solution	От +15 до +25°C
РНК-носитель – Carrier RNA	Лиофилизированный от +15 до +25°C; Ресуспендированный от -25°C до -15°C
Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer	От +2 до +8°C
Вода без РНКаз – RNase-Free Water	От +15 до +25°C
Спиновые колонки для ДНК – DNA Spin Columns	От +2 до +8°C
Пробирки для сбора – Collection Tubes (50 EA)	От +15 до +25°C

Связывающий буфер – Binding Buffer	От +15 до +25°C
Промывочный буфер (концентрат) – Wash Buffer	От +15 до +25°C
Буфер для десульфирования (концентрат) – Desulfonation Buffer	От +2 до +8°C
Буфер для элюирования – Elution Buffer	От +15 до +25°C

- Храните все неоткрытые компоненты в оригинальной упаковке.
- Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована.

Хранение и обращение с компонентами этого набора в условиях, отличных от описанных выше, может повлиять на производительность этого анализа и отрицательно повлиять на результаты.

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ПЦР-амплификация чрезвычайно чувствительна к перекрестной контаминации. Очень важно выполнять этапы, предшествующие амплификации (т.е. выделение РНК, подготовка к реакции ПЦР) в отдельных помещениях, в идеале - в отдельных комнатах с изолированными системами вентиляции. Особенно важно, чтобы подготовка реакции ПЦР проводилась в помещении с положительным давлением воздуха (или в вытяжном шкафу с ламинарным потоком).

При обращении с реагентами ДНК и ПЦР необходимы дополнительные меры предосторожности, чтобы избежать контаминации между образцами/реагентами:

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

Информация по безопасности

При работе с химическими веществами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к паспортам безопасности материалов (MSDS). Их можно найти на <http://entrogen.com/pi-download>. Введите MGMTX-RT44 в поиск Каталожный номер (Catalog Number) для загрузки MSDS.

ОСТОРОЖНО



НЕ добавляйте отбеливающие или кислотные растворы непосредственно в раствор бисульфита или в отходы, содержащие Связывающий буфер.

Буфер для связывания содержит соль гуанидина, которая в сочетании с отбеливателем может образовывать высокореактивные соединения. Если жидкость, содержащая этот буфер, пролилась, очистите ее подходящим лабораторным моющим средством и водой.

7. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Все рекомендуемые расходные материалы, реагенты и оборудование, предусмотренные для использования в комбинации с заявленным медицинским изделием, должны быть зарегистрированы в РФ в установленном порядке, как медицинские изделия.

Реагенты

Необходимые, но не предоставляемые, реагенты: реагенты для выделения геномной ДНК из образцов опухоли. Геномная ДНК из фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: "Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" (РЗН 2021/15704).

Для данного анализа требуется использование воды без нуклеаз (вода для ПЦР).

Для данного анализа требуется использование 96-100% абсолютного этанола.

Оборудование

❖ Таблица 6: Приборы для проведения ПЦР-РВ:

Наименование	Номер РУ
Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени	ФСЗ 2009/03609 от 06.06.2016 (бессрочно)

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот
1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

ФСЗ 2008/03399 от
21.06.2016 (бессрочно)

- ❖ Вортекс
- ❖ Настольная центрифуга для микроцентрифужных пробирок объемом 0.2 мл и 2.0 мл
- ❖ Центрифуга для 96-луночных ПЦР плашек
- ❖ Прибор Qubit и реагенты к нему (или аналог)

Вспомогательные материалы

- ❖ Одноразовые неопудренные перчатки
- ❖ Регулируемые пипетки
- ❖ Стерильные наконечники пипеток с фильтром
- ❖ Вортекс
- ❖ Настольная центрифуга для 0,2 мл и 2 мл микроцентрифужных пробирок
- ❖ ПЦР плашки на 96 лунок
- ❖ Оптическая герметичная пленка для ПЦР плашек
- ❖ 0.2 мл и 2.0 мл микроцентрифужные пробирки
- ❖ Центрифуга для ПЦР плашек на 96 лунок
- ❖ Прибор для оценки концентрации
- ❖ 1.5 мл микроцентрифужные пробирки
- ❖ Лед/Охлаждающий блок
- ❖ Реагенты для деконтаминации поверхностей
 - ❖ 70% этанол
 - ❖ 20% хлорный отбеливатель (или аналог).

8. ОПИСАНИЕ НАБОРА

Введение

Мультиформная глиобластома (GBM) представляет собой самую смертоносную форму опухоли головного мозга у людей, при этом современные методы лечения обычно обеспечивают незначительное улучшение общей выживаемости. Недавние успехи в понимании молекулярных подтипов привели к идентификации ряда биомаркеров для более точной классификации GBM, включая модификацию гистонов, подавление транскрипционных генов и метилирование ДНК.

Метилирование промотора MGMT обнаружено примерно в 50% впервые диагностированных GBM. Метилирование промотора MGMT заставляет замолчать ген MGMT, который кодирует белок O[6]-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, имеющий решающее значение для стабильности генома, который препятствует репарации ДНК, повышая чувствительность к алкилирующему агенту, такому как темозоломид (TMZ).

Два участка в гене MGMT, DMR1 и DMR2, содержат 97 CpG динуклеотидов, ответственных за GBM, опосредованную метилированием промотора MGMT. DMR1 находится внутри промотора гена MGMT, тогда как DMR2 находится в экзоне 1 сразу после сайта начала транскрипции гена MGMT. Когда DMR1 метилирован, DMR2 всегда метилирован, что делает DMR2 «критической областью для тестирования метилирования». Более того, независимо от лечения, было обнаружено, что метилирование промотора MGMT является положительным прогностическим маркером у пациентов с глиобластомой.

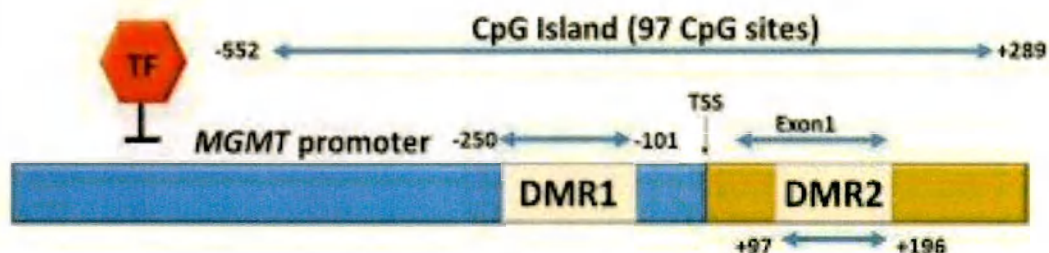


Рисунок 1: Схематическое расположение промотора MGMT, CpG островков, DMR1 и DMR2.

Статус метилирования можно определить после обработки ДНК бисульфитом. В процессе обработки бисульфитом происходит дезаминирование неметилированных остатков цитозина до урацила, который затем читается как тимин во время ПЦР в реальном времени. Метилированные цитозины не изменяются. На изображении ниже показаны изменения в неметилированных цитозинах во время конверсии бисульфитом и последующем проведении ПЦР в реальном времени.

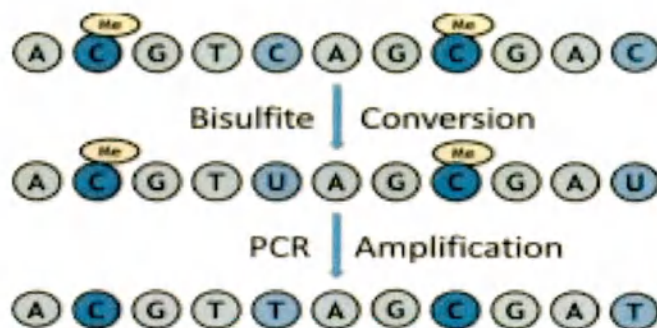


Рисунок 2: Воздействие бисульфитом с последующей ПЦР амплификацией.

Принцип анализа

Набор для обнаружения метилирования MGMT представляет собой качественный анализ ПЦР в реальном времени, предназначенный для различения метилированных и неметилированных цитозинов в участке DMR2 гена MGMT, выровненном по Hg38: chr10: 129,467,243 - 129,467,365 и покрывающем CpG сайты 75-86.

Для анализа используются специфические праймеры для амплификации только метилированных сайтов CpG MGMT в области DMR2 в образцах ДНК, обработанных бисульфитом. Они также амплифицируют внутренний контрольный ген (актин В), в отношении которого рассчитывается степень метилирования промотора MGMT. Обнаружение этих амплифицированных областей обеспечивается специфическими флуоресцентными гидролизуемыми пробками, комплементарными метилированному

участку DMR2 гена MGMT (помеченному флуорофором FAM) и внутреннему контрольному гену (помеченному флуорофором VIC).

Набор MGMTX-RT44 обеспечивает полный комплект для воздействия бисульфитом и обнаружения метилирования MGMT. MGMTX RT44 включает реагенты для обработки бисульфитом с оптимизированной смесью бисульфитов, защитный буфер ДНК с индикатором pH, а также специальные условия реакции и программу циклов для эффективного преобразования неметилованных цитозинов в урацилы при минимизации фрагментации ДНК.

Процедура проверки содержит несколько простых шагов:

1. Выделение ДНК из опухолевых биопсий, заключенных в парафин фрагментов (FFPE) опухолей.
2. Бисульфитная конверсия образцов (например, выделенная ДНК, метилированные и неметилованные контроли) с использованием реагентов, приложенных в наборе MGMTX-RT44.
 - a. Обработка ДНК раствором бисульфита.
 - b. Связывание полученной оцДНК с мембраной спиновой колонки для ДНК с последующими этапами промывки.
 - c. Стадия десульфирования на колонке.
 - d. Промывка ДНК на колонке для удаления реагента десульфирования и остановки дальнейшего повреждения ДНК.
 - e. Элюция ДНК для последующего анализа ПЦР в реальном времени.
3. Амплификация обработанной ДНК с использованием реагентов, приложенных в наборе для определения метилирования MGMT.
4. Анализ и интерпретация данных с помощью ПО прибора для ПЦР-РВ.

Ограничения анализа

- Успешное обнаружение метилирования промотора зависит от качества образца и количества доступной амплифицируемой ДНК. Образцы с избыточной или недостаточной концентрацией необходимо анализировать повторно.
- Использование спектрофотометра для количественного определения образца может привести к завышению концентрации. Рекомендации по вводу в этом анализе основаны на флуориметрическом анализе. Эффективность этого анализа не была установлена с помощью спектрофотометрического количественного определения.
- Этот набор предназначен для использования только с FFPE тканями. Неизвестно, подходят ли другие типы образцов для тестирования с помощью этого набора.
- Эффективность этого анализа не была установлена в присутствии редких полиморфизмов.
- FFPE фиксация может привести к чрезмерному фрагментированию образцов. Чрезмерная фрагментация может привести к сбою анализа. В результате данные по некоторым образцам могут не подлежать отчетности.
- Остатки реагентов для выделения в образце могут повлиять на эффективность амплификации.
- Этот набор предназначен для использования персоналом лаборатории, обученным

методам молекулярной биологии.

- Для достижения оптимальных результатов требуется соблюдение этого протокола. Отклонения от протокола могут привести к потере производительности.
- Для этого анализа необходима бисульфитная конверсия для количественного определения неизвестного процента метилирования образца.
- Этот анализ не рассчитывает эффективность преобразования бисульфитом. Эффективность воздействия бисульфита напрямую влияет на эффективность анализа.
- Этот анализ был разработан для оптимальной работы при LLOQ (более низком уровне количественной оценки). Неизвестные образцы с высоким уровнем метилирования промотора могут иметь более высокие стандартные отклонения при количественной оценке метилирования.
- Не поддерживается удаление стандартов из любого проверочного запуска.
- Комбинация реагентов из разных партий наборов не оценивалась. Тактико-технические характеристики данной модификации не установлены.
- Стандартная кривая за пределами допустимого диапазона (см. Раздел «Интерпретация результатов») приведет к ненадежной количественной оценке.
- Точность %СОК (процент содержания опухолевых клеток), заданная %ММGMT, зависит от воспроизводимости начального %СОК.

Функциональное назначение медицинского изделия

Используется в качестве вспомогательного средства для диагностики *in vitro* онкологических (злокачественных) новообразований.

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

Обнаружение метилирования промотора гена MGMT в геномной ДНК, полученной из парафиновых блоков с фиксированными в них образцами мультиформной глиобластомы.

В соответствии с Клиническими рекомендациями 2020 при выявлении Опухолей центральной нервной системы (ID:578), а именно анапластической астроцитоме и глиобластоме рекомендовано определение метилирования гена MGMT в биопсийном (операционном) материале для уточнения диагноза (благоприятный прогноз при наличии метилирования).

Тип анализируемого образца

Образцы клеток человека, содержащие смесь мутантной ДНК и ДНК дикого типа.

Предназначение изделия с указанием пользователя

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

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Применение изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов.

Показания

Изделие предназначено для качественного обнаружения метилирования промотора O[6]-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) в геномной ДНК опухолей мультиформной глиобластомы (GBM) человека, выделенной из образцов опухоли пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, в *in vitro* диагностике.

Противопоказания

При использовании Набора квалифицированным медицинским персоналом в рамках, установленного производителем, назначения и в строгом соответствии с эксплуатационной документацией, противопоказаний не имеет.

Область применения

Клиническая лабораторная диагностика (*in vitro*).

Информация о потенциальных потребителях

Изделие предназначено для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике (*in vitro*) квалифицированным персоналом со средним и высшим медицинским образованием, дополнительно прошедшим специальное обучение для работы изделием.

Информация для пользователей

При соблюдении требований инструкции возникновение нежелательных событий маловероятно.

Для соблюдения требований безопасности необходим инструктаж персонала и выполнение соответствующих обязательных инструкций по технике безопасности и технологических процессов.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Процедура проверки содержит несколько простых шагов:

1. Выделение ДНК из опухолевых биопсий, заключенных в парафин фрагментов (FFPE) опухолей.
2. Бисульфитная конверсия образцов (например, выделенная ДНК, метилированные и неметилированные контроли) с использованием реагентов, приложенных в наборе MGMTX-RT44.
 - a. Обработка ДНК раствором бисульфита.
 - b. Связывание полученной оцДНК с мембраной спиновой колонки для ДНК с последующими этапами промывки.
 - c. Стадия десульфирования на колонке.
 - d. Промывка ДНК на колонке для удаления реагента десульфирования и остановки дальнейшего повреждения ДНК.

- е. Элюция ДНК для последующего анализа ПЦР в реальном времени.
- 3. Амплификация обработанной ДНК с использованием реагентов, приложенных в наборе для определения метилирования MGMT.
- 4. Анализ и интерпретация данных с помощью ПО прибора для ПЦР-РВ.

Выделение ДНК и количественная оценка

Существует несколько методов выделения ДНК. Геномная ДНК из фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: "Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" (P3H 2021/15704).

Достаточное количество ДНК может быть выделено из фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков. После выделения ДНК, необходимо измерить концентрацию с помощью флуорометрического анализа (например, Qubit).

Каждая лаборатория должна оценить оптимальную исходную концентрацию ДНК, сопоставив концентрацию ДНК с определенным оптимальным диапазоном числа копий в разделе 7.2 для внутреннего контроля бета актина (ACTB).

Протокол воздействия бисульфита позволяет преобразовать бисульфитом ДНК в количестве от 1 нг до 2 мкг в объеме до 20 мкл (высокая концентрация) или от 1 до 500 нг в максимальном объеме 40 мкл (низкая концентрация). Конверсия образцов ДНК с высокой или низкой концентрацией отличается только схемой проведения бисульфитных реакций (см. Таблицу 7). Все остальные шаги протокола такие же.

Прежде, чем начать:

- Необязательные метилированные и неметилированные контроли должны быть обработаны бисульфитом вместе с образцами, которые необходимо проанализировать.
- Удаление стандартов MGMT из этого анализа не является поддерживаемой модификацией.
- Разведения стандартов 4-6 должны быть произведены пользователем перед каждым запуском. Разведенные стандарты нестабильны при длительном хранении.

Конверсия бисульфитом

Подготовка реагентов для конверсии бисульфитом

Промывочный буфер

Добавьте 30 мл этанола (96–100%)* к 13 мл концентрата промывочного буфера и храните при комнатной температуре (15–25°C). Перед началом процедуры переверните флакон несколько раз.

РНК-носитель

Добавьте 310 мкл воды без РНКаз к лиофилизированному РНК-носителю, перемешайте и быстро открутите, аликвотируйте в необходимые объемы для хранения (при температуре от -25°C до -15°C). Конечная концентрация равна 1 мкг/мкл. РНК-носитель будет добавляться в Связывающий буфер непосредственно перед каждым использованием. Использование РНК-носителя усиливает связывание ДНК в малой концентрации (<100 нг на колонку) с мембраной колонки, тем самым повышая выход ДНК. РНК-носитель рекомендуется использовать с потенциально фрагментированной ДНК, такой как полученной из FFPE блоков.

Буфер для десульфирования

Добавьте 27 мл этанола (96–100%)* в буфер для десульфирования и храните при 2–8°C. Перед началом процедуры переверните флакон несколько раз и обязательно закройте флакон сразу после использования. После некоторого времени хранения в смеси буфера для десульфирования и этанола могут образоваться белые осадки. Эти осадки не повлияют на работу буфера для десульфирования. Однако избегайте переноса осадков на спиновую колонку для ДНК.

*Не используйте денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон.

Подготовка реакции конверсии бисульфитом

Прежде, чем начать:

- Обработку бисульфитом необходимо проводить при комнатной температуре (15–25°C).
- Доведите образцы, спиновые колонки и буферы до комнатной температуры.
- Убедитесь, что реагенты из набора были приготовлены, как описано в разделе «Подготовка реагентов для конверсии бисульфитом».

Подготовка бисульфитных реакций

1. Разморозьте ДНК для использования в бисульфитных реакциях. Убедитесь, что раствор бисульфита полностью растворился. Если раствор бисульфита содержит осадки, нагрейте до 60°C и встряхивайте, пока все осадки снова не растворятся.
2. Приготовьте индивидуальные реакционные смеси бисульфитов в соответствии с таблицей 7.
3. Добавьте каждый компонент в указанном порядке в пробирку для ПЦР на 200 мкл.

Таблица 7: Каждая реакция объемом 140 мкл содержит следующие компоненты:

Реагент	Образцы с высокой концентрацией (100нг-2мкг) Объем на реакцию (мкл)	Образцы с низкой концентрацией (100нг-500нг) Объем на реакцию (мкл)
Вода без РНКаз – RNase-Free Water	Переменный*	Переменный†
Раствор бисульфита –	85	85

Bisulfite Solution		
Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer	35	15
ДНК	До 20 мкл	До 40 мкл
Общий объем	140	140

*В каждую реакцию можно добавить до 20 мкл образца вместо объема воды.

† В каждую реакцию можно добавить до 40 мкл образца вместо объема воды.

4. Закройте пробирку для ПЦР и тщательно перемешайте на вортексе.

5. Кратковременно отцентрифугируйте, чтобы сбросить капли с боковых стенок.

Примечание: Цвет защитного буфера для ДНК должен измениться с зеленого на синий после добавления к смеси ДНК и раствора бисульфита, что указывает на достаточное перемешивание и правильный pH для реакции конверсии бисульфитом.

Настройки программы термоциклера

При использовании термоциклера, который не позволяет вам вводить нужный реакционный объем (140 мкл), установите прибор на самый большой доступный объем, не разделяйте реакцию на несколько лунок.

Поместите плашку в термоциклер и задайте следующую программу:

Таблица 8: Условия термоциклера для конверсии бисульфитом

Этап	Температура	Время
Денатурация	95°C	5 мин
Инкубация	60°C	10 мин*
Денатурация	95°C	5 мин
Инкубация	60°C	10 мин*
Удержание	20°C	Не определено†

* В некоторых случаях может потребоваться увеличить время цикла при 60°C до 20 минут для достижения полной конверсии бисульфитной ДНК.

† Конвертированную ДНК можно оставить в приборе на ночь без потери качества.

Точка остановки: преобразованную ДНК можно оставить в термоциклере на ночь без потери производительности.

Очистка ДНК, преобразованной бисульфитом

Прежде, чем начать:

Опционально: прежде, чем начать обработку бисульфитом образцов в количестве менее 100 нг, подготовьте свежий раствор РНК-носителя в Связывающем буфере, как указано в таблице ниже. Указанные объемы включают в себя 10% избыток, чтобы скорректировать вариативность пипетирования. Конечная концентрация РНК-носителя в Связывающем буфере равна 10 мкг/мл.

Таблица 9: приготовление раствора РНК-носителя в Связывающем буфере:

Число образцов	Объем связывающего буфера	Объем растворенного РНК-носителя (мкл)
1	350 мкл	3,5
5	1.75 мл	17,5
10	3,5 мл	35
15	5,25 мл	52,5
25	8,75 мл	87,5
50	17,5 мл	175

1. Кратковременно центрифугируйте пробирки для ПЦР и перенесите содержимое завершенной бисульфитной реакции в новые микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл.

Примечание: Перенос осадков в раствор не повлияет на производительность или выход реакции.

2. Добавьте 310 мкл связывающего буфера в каждый образец.

Примечание: Добавление РНК-носителя рекомендовано при низких концентрациях ДНК (<100 нг) и образцах FFPE. Нет необходимости добавлять РНК-носитель в Связывающий буфер при очистке геномной ДНК с концентрацией >100 нг.

3. Перемешайте на вортексе и центрифугируйте 5 секунд при комнатной температуре.
4. Добавьте 250 мкл этанола (96–100%) в каждый образец.
5. Перемешайте импульсным встряхиванием в течение 15 секунд и кратковременно центрифугируйте, чтобы сбросить капли с крышки.
6. Промаркируйте и поместите необходимое количество спиновых колонок для ДНК и пробирок для сбора в подходящую стойку.
7. Перенесите всю смесь из каждой пробирки с шага 5 в соответствующую спиную колонку для ДНК.
8. Центрифугируйте спиную колонку на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не потребуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонки в пробирки для сбора обратно.
9. Добавьте 500 мкл промывочного буфера в каждую спин-колонку и

центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не потребуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонки в пробирки для сбора обратно.

10. Добавьте 500 мкл буфера для десульфирования в каждую спин-колонку, закройте крышку и инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (15–25°C). Будьте осторожны, чтобы не перенести осадок из буфера для десульфирования в спин-колонки.

Осторожно: Буфер для десульфирования может разрушать ДНК, не инкубируйте дольше 15 минут.

Важно: Бутылка с буфером для десульфирования должна быть закрыта сразу после использования, чтобы избежать подкисления углекислым газом в воздухе.

11. Центрифугируйте спиновые колонки на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не потребуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонки в пробирки для сбора обратно.

12. Добавьте 500 мкл промывочного буфера в каждую спин-колонку и центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не потребуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонки в пробирки для сбора обратно.

13. Повторите шаг 12 еще раз.

14. Добавьте 250 мкл этанола (96–100%) в каждую спин-колонку и центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 мин.

15. Поместите спин-колонки в новые пробирки для сбора на 2 мл и центрифугируйте спин-колонки на максимальной скорости в течение 1 мин, чтобы удалить остаточную жидкость.

Дополнительно: Поместите спиновые колонки с открытыми крышками в новую микроцентрифужную пробирку на 1.5 мл и инкубируйте колонки в течение 5 минут при 60°C в нагревательном блоке. Этот шаг обеспечивает испарение любой оставшейся жидкости.

16. Поместите спиновые колонки в новые микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл.

17. Добавьте 15 мкл элюирующего буфера непосредственно в центр каждой мембраны спин-колонки и осторожно закройте крышки.

18. Инкубируйте спин-колонки при комнатной температуре в течение 1 мин.

19. Центрифугируйте в течение 1 мин при 15 000 x g (12 000 об/мин) для элюирования ДНК.

Примечание: Не элюируйте менее 10 мкл элюирующего буфера, так как мембрана спин-колонки не будет достаточно гидратирована.

Точка останова: Рекомендуется хранить очищенную ДНК при 2–8°C до 24 часов. При хранении очищенной ДНК более 24 часов мы рекомендуем хранить при –20°C.

Подготовка реагентов для ПЦР-РВ и Настройка

Разморозьте смесь праймеров/проб, стандарты 1, 2, 3 и 7, а также 2X Реакционную смесь для обнаружения мутации на льду.

Примечание: Рекомендуется хранить реагенты, плашки, стандарты, контроли и образцы на льду.

1. Доведите Разбавитель контрольных стандартов (CSD) до комнатной температуры. Последовательно разбавьте стандарт 3 в CSD, чтобы получить стандарты 4, 5 и 6, используя приведенную ниже таблицу. Тщательно перемешайте каждую серийно разбавленную стандартную пробирку на вортексе и выполняйте быстро открутите для сброса капель с крышки перед каждым переносом.

- а. Тщательное перемешивание перед каждым разбавлением важно для приготовления точных стандартов.
- б. Всегда готовьте свежие стандартные разведения.

Осторожно: Тщательно приготовьте стандартные разведения. Стандарты используются при анализе данных для экстраполяции количества копий проанализированных образцов. Плохая подготовка стандартов может привести к невозможности использования данных.

Таблица 10: Серийные разведения для приготовления стандартов 4, 5 и 6

Стандарт для подготовки	Стандарт для использования	Объем стандарта (мкл)	Разбавитель контрольных стандартов (мкл)
Стандарт 4	Стандарт 3	10	30
Стандарт 5	Стандарт 4	10	30
Стандарт 6	Стандарт 5	10	25

2. Реакционные ПЦР смеси имеют общий объем 20 мкл/лунка. Каждую реакцию проводят в трех повторах. Реакционные смеси для нескольких образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избытком, чтобы избежать ошибок пипетирования.

3. Каждая реакционная смесь объемом 20 мкл содержит следующие компоненты:

Таблица 11: Компоненты и объемы

Компоненты	Объем
Реакционный микс для обнаружения мутаций (2X)	10 мкл

MGMT Смесь праймеров для обнаружения	6 мкл
Образец ДНК, обработанный бисульфитом	4 мкл

4. Приготовьте мастер микс как показано в таблице ниже:

Таблица 12: Приготовление мастер микса

Реагент	Объем на реакцию (мкл)	Объем для нескольких образцов (n) в трех повторях, с 5% избытком (мкл)
Реакционный микс для обнаружения мутаций	10	$3 * (8+n) * 10 * 1.05$
Смесь праймеров/зондов	6	$3 * (8+n) * 6 * 1.05$

5. Распределите по 16 мкл мастер микса на лунку.

6. Добавьте 4 мкл стандартов, КБМ или образца ДНК в соответствии с рекомендуемым макетом плашки, приведенной ниже (STD=стандарт, S=образец, NTC= контроль без матрицы, КБМ). Перемешайте пипетированием несколько раз.

7. Заклейте плашку оптической герметичной пленкой.

8. Кратковременно центрифугируйте плашку, чтобы сбросить капли с боковых стенок. Убедитесь в отсутствии на дне лунок пузырьков воздуха.

9. Поместите плашку в термоциклер и запустите следующую программу (условия циклирования для всех приборов):

Таблица 13: условия циклирования для всех приборов:

Температура	Время	Циклы
95°C	10 мин	X1
95°C	15 сек	X40
56 °C	15 сек	
72°C	30 сек	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Стандарт 1	Образец 1	Образец 9	Образец 17								
B	Стандарт 2	Образец 2	Образец 10	Образец 18								
C	Стандарт 3	Образец 3	Образец 11	Образец 19								
D	Стандарт 4	Образец 4	Образец 12	Образец 20								
E	Стандарт 5	Образец 5	Образец 13	Образец 21								
F	Стандарт 6	Образец 6	Образец 14	Образец 22								
G	Стандарт 7	Образец 7	Образец 15	Образец 23								
H	КБМ	Образец 8	Образец 16	Образец 24								

Рисунок 3: Рекомендуемый макет плашки для одного эксперимента, анализирующего 24 образца с неизвестным статусом.

НАСТРОЙКА ПРИБОРА

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Версия ПО SDS Software 2.0 и выше)

1. Выберите Файл (File)>Новый эксперимент (New Experiment)>Расширенные настройки (Advanced Setup).
2. Во вкладке Расширенные настройки (Advanced Setup):
 - a. Перейдите в Свойства эксперимента (Experimental Properties):
 - i. Введите имя эксперимента в соответствующем поле
 - ii. Выберите Количественная оценка-Стандартная кривая (Quantitation-Standard Curve)
 - iii. Выберите Реагенты Taqman® (Taqman® Reagents)
 - iv. Выберите Быстрый (Fast) для скорости нагрева (ramp speed). Нет разницы в производительности между стандартным и быстрым режимами.
 - b. Перейдите в Настройка плашки (Plate Setup):
 - i. В разделе Определить мишени (Define Targets) создайте мишени

FAM и VIC. Выберите Гаситель (Quencher) NFQ-MGB для обеих мишеней. (Необязательно: назначьте имена целей MGMT и ACTB для FAM и VIC соответственно).

II. В разделе Определить образцы (Define Samples) укажите названия стандартов, образцов и контролей.

iii. На вкладке Назначить мишени и образцы (Assign Targets and Samples) назначьте мишени FAM и VIC для всех лунок с образцами. Введите наименования образцов для соответствующих лунок.

iv. Выберите Отсутствует (NONE) для пассивного референсного красителя (passive reference dye).

Примечание: Он автоматически устанавливается для ROX. Если пассивный эталонный краситель не установлен как Отсутствует (NONE), графики амплификации не будут видны во время анализа.

c. Перейдите в Метод анализа (Run Method):

i. Установите объем реакции на 20 мкл.

ii. Введите условия циклирования из таблицы ниже.

d. Выберите Начать запуск (Start Run) для начала анализа.

Таблица 14: Протокол QuantStudio

Температура (°C)	Время	Циклы	Сбор данных
95	10 мин	1	
95	15 сек	40	
56	15 сек		
72	30 сек		FAM/VIC

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96 (Версия ПО 3.1 и выше)

1. В Мастере настройки (Startup Wizard) выберите Создать новый эксперимент (Create New Experiment) и убедитесь, что CFX96 выбран в всплывающем списке. Нажмите ОК.
2. Во вкладке Протокол (Protocol) окна Настройка эксперимента (Experiment Setup) выберите Создать новый (Create New) и введите следующее:

Таблица 15: Протокол CFX96

Этап	Температура	Время	Сбор данных
1	95°C	10 мин	
2	95°C	15 сек	
3	56°C	15 сек	
4	72°C	30 сек	Все каналы
	+ Чтение плашки		
5	Начать с шага 2 еще 39 раз		
	КОНЕЦ		

3. Измените Объем образца (Sample Volume) на 20 мкл.
4. Когда закончите, нажмите ОК, чтобы сохранить шаблон протокола. Запишите расположение сохраненного файла-шаблона для использования в последующих запусках. Нажмите Далее (Next) для перехода в окна Настройка плашки (Plate setup).
5. Во вкладке Плашка (Plate) нажмите Создать новый (Create New) для создания макета плашки.
6. Нажмите на кнопку Выбрать флуорофоры (Select Fluorophores) и проверьте галочки в клетках рядом с FAM и VIC. Остальные флуорофоры должны остаться не выбранными. Нажмите ОК.

- а. Стандарты 1 и 2 не нуждаются в АСТВ (VIC).
7. Задайте Стандарт, КБМ и Неизвестный на разметке плашки, изменит Тип образца (Sample type).
8. Введите наименования образцов в поле Наименование образца (Sample Name). После завершения нажмите Enter для записи введенного имени. Повторите шаг для каждого образца.
9. Создайте сетки повторов для стандартов и образцов: выделите лунки с повторами и введите номер повтора, начиная с 2 и окне Повтор № (Replicate #). Убедитесь, что установлена галочка Загрузить (Load).
10. Нажмите на Настройки (Settings) и выберите используемый типа плашки (например, BR White или BR Clear).
11. После завершения, нажмите ОК для сохранения макета плашки.
12. Нажмите Далее (Next), затем Начать анализ (Start Run).

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени (Версия ПО 1.5 и выше)

1. В разделе Навигатор (Navigator), нажмите Новый (New) для начала нового эксперимента на LightCycler® 480.
2. Выберите Двухцветный гидролизующий зонд/UPL зонд (Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe) для Формата обнаружения (Detection Format).
3. Нажмите Настроить (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
4. Измените объем реакционной смеси на 20 мкл.
5. Введите следующие программные и температурные цели:

Programs		
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Program	1	None
Cycling	40	Quantification

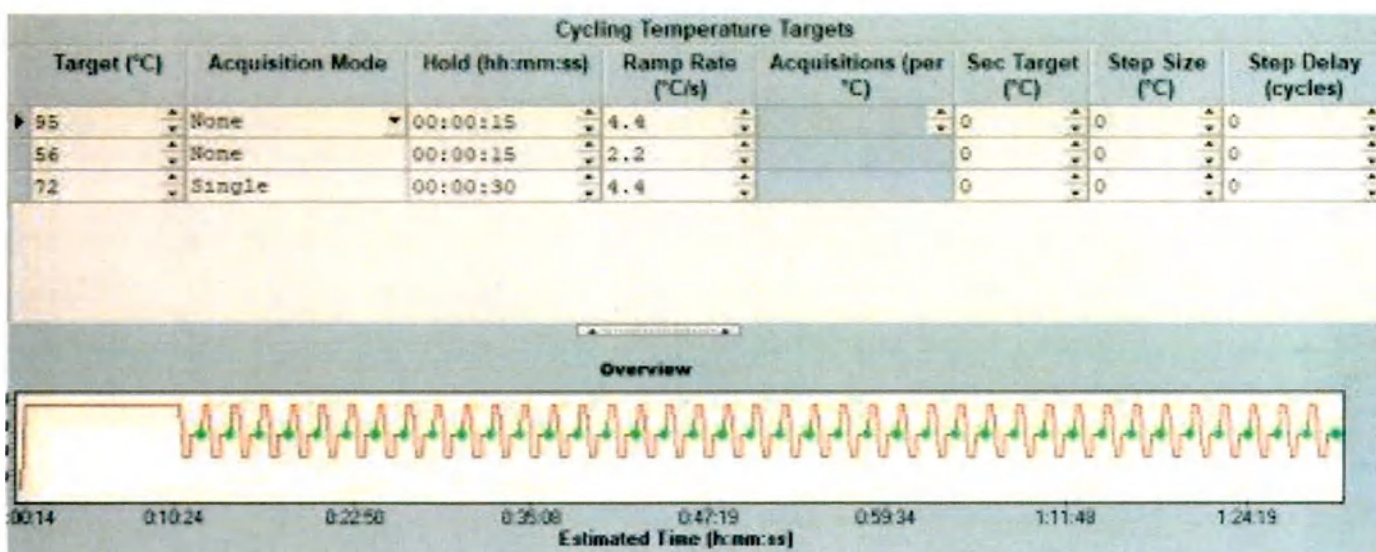
6. Настройте Температурные цели программы на основе таблицы ниже:

Программа

Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.4	0	0	0	0

7. Настройте Температурные цели циклирования на основе таблицы ниже:

Циклирование



9. Нажмите Начать анализ (Start Run).

10. АНАЛИЗ ДАННЫХ

Важно: Для настройки пороговых значений может потребоваться корректировка в зависимости от чувствительности обнаружения флуоресценции каждого термоциклера. Используйте перечисленные ниже настройки в качестве отправной точки.

Пошаговая настройка анализа

Прежде, чем начать:

1. Число копий в стандартах 1-7 можно запросить у поставщика.

Важно: СА сообщает стандартное количество копий в копиях/мкл. Умножьте каждое значение, указанное в СА, на объем, добавленный в реакцию ПЦР (4 мкл), и введите это значение в прибор для ПЦР в реальном времени.

- Стандарты 1-6 необходимы для экстраполяции количества копий на образцы с неизвестным статусом.
- Стандарт 7 можно отнести к отрицательному контролю.
- АКТВ служит внутренним контролем, чтобы гарантировать, что в реакции достаточно амплифицируемой ДНК для интерпретации результатов. См. Минимальное количество копий для АКТВ в таблице анализа в разделе 7.2. АКТВ не включен в первые два стандарта, потому что он является контролем для LLOQ (нижний предел количественной оценки).
- Троекратные повторы стандартов необходимы для получения точного количества копий и для расчета процента метилирования образцов с неизвестным статусом.
- Задайте Задачи (Tasks) для Стандартов:
 - MGMT Стандарты 1-6: "S"
 - MGMT Стандарт 7: "U"
 - АКТВ Стандарты 1-2: "U"

- d. АСТВ Стандарты 3-6: "S"
- e. АСТВ Стандарт 7: "U"
- 7. Значения Ct повторов могут отличаться друг от друга не более чем на 0.5, чтобы считаться достоверными.
 - a. Из стандартной кривой можно удалить до двух точек данных.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Версия ПО SDS Software 2.0 и выше)

1. Откройте ПО Applied Biosystems® 7500/7500 Fast.
2. Щелкните папку Открыть (Open).
3. Импортируйте файл с данными формата .eds.
4. Перейдите в Настройки (Setup), затем Настройка плашки (Plate Setup).
5. Выберите Задать Мишени и Образцы (Assign Targets and Samples).
6. Задайте Задачу (Task) "S" для всех Стандартов как описано в 6 шаге раздела "Прежде, чем начать" выше.
7. Добавьте число копий каждого Стандарта из лота, используемого на основе сертификата анализа, в столбце «Количество» для FAM и VIC, соответственно.
 - a. Примечание: Не выбирайте Определить и Настроить стандарты (Define and Set Up standards), для этого требуется фактор разбавления, в котором нет необходимости, поскольку включенные стандарты определяются через соответствующее число копий.

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора для ПЦР в реальном времени, используя следующие критерии:

- Ручное пороговое значение (см. таблицу ниже)
- Предложенные ручные исходные данные для обоих детекторов: 3-20.

Таблица 17: пороговые значения:

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение VIC
ABI 7500/7500FAST	200,000	10,000

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96 (Версия ПО 3.1 и выше)

1. Откройте ПО Bio-Rad CFX Manager.
2. Выберите Настройки (Settings) в верхнем меню.
3. Наведите указатель мыши на Настройка плашки (Plate Setup) в раскрывающемся меню.
 - a. Выберите Просмотр/Редактирование плашки (View/Edit Plate).
4. Выделите лунки с повторами Стандарта 1.
5. Выберите FAM в раскрывающемся меню под Концентрация (Concentration) и добавьте число копий стандарта из СА.
6. Повторите для Стандартов 2-6.
7. Выберите лунки с повторами Стандарта 3.

8. Выберите VIC в раскрывающемся меню под Концентрация (Concentration) и добавьте число копий стандарта из СА.
9. Повторите для Стандартов 4-6.
10. Стандарт 7 можно задать как неизвестный.

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора для ПЦР в реальном времени, используя следующие критерии:

- Режим определения Ct: Одно пороговое значение (Single Threshold) (см. таблицу ниже)
- Настройки исходных данных: Подбор исходных данных кривой с вычитанием (Baseline Subtracted Curve Fit)
- Предложенные ручные исходные данные для обоих детекторов: 2-20

Таблица 18: пороговые значения:

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение HEX (VIC)
Bio-Rad CFX96	1,000	50

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени (Версия ПО 1.5 и выше)

1. Откройте ПО LightCycler® 480.
2. Нажмите на значок навигатора.
3. Импортируйте файл с данными в формате .ixo.
4. Добавьте подмножество макета плашки в Редакторе подмножеств (Subset Editor).
5. Выберите Редактор образца (Sample Editor).
 - a. Выберите Abs Quant.
 - b. Назовите образцы в соответствии с макетом плашки.
 - c. Введите число копий стандарта из СА.
 - i. Чтобы добавить VIC Стандарты 3-6 Выберите Filter Combination: 533-580 и добавьте число копий.
 - ii. Чтобы добавить FAM Стандарты 1-6 Выберите Filter Combination: 465-510 и добавьте число копий.
 - d. Обязательно выберите Создать повторы (Make Replicates) для всех повторов, включая повторы стандартов.
 - e. Для продолжения выберите все образцы в подмножестве, созданном на шаге 4, и обе комбинации фильтров.
6. Выберите Анализ (Analysis) в главном меню слева. В окне Создать новый анализ (Create New Analysis):
 - a. Выберите Abs Quant/Fit Points.
 - b. Во всплывающей форме Создать новый анализ (Create new analysis):
 - i. Выберите Подмножество (Subset), созданное на шаге 4.
 - ii. Выберите программу Циклирование (Cycling).
 - iii. Установите флажок (OK).
7. Выберите вкладку Cycle Range.
8. Выберите детектор VIC, нажав на кнопку Filter Comb HEX/Yellow555 (533-580).

- a. Первый цикл: 10
- b. Последний цикл: 40

9. Выберите вкладку Noise Band.

10. Поставьте галочку рядом с Noiseband (Auto) и выберите NoiseBand (STD Mult) в всплывающем меню. В окне STD multiplier введите значение чуть выше фонового шума.

Прибор	FAM STD Mult	VIC STD Mult
LightCycler® 480	100	45

11. Выберите вкладку Анализ (Analysis).

12. Выберите "2" для Fit Points.

13. Выберите Стандарты 3-6.

14. Нажмите Рассчитать (Calculate).

15. Экспортируйте результаты, щелкнув правой кнопкой мыши таблицу результатов со значениями Ct (Cp).

- a. Повторите описанные выше шаги для стандартов 1-6 для детектора FAM, щелкнув Filter Comb FAM (465-510).

16. Экспортируйте файл и сохраните настройки анализа.

Дополнительно: Сохраните эти настройки как шаблон, поставив галочку рядом с Применить шаблон. Сохраните шаблон в папке шаблонов. Для будущих запусков просто выберите применить шаблон.

11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ручной анализ данных – Специфичный прибору

Примечание: Стандарт 7 содержит синтетические последовательности ДНК, соответствующие неметилованному промотору MGMT. В нем не должно появляться сигналов VIC или FAM.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Версия ПО SDS Software 2.0 и выше)

1. Программное обеспечение ABI автоматически рассчитает количество копий для ACTB (VIC) и MGMT (FAM) каждого образца с неизвестным статусом.
 - a. В разделе Анализ (Analysis)>Стандартная кривая (Standard Curve) убедитесь, что соблюдаются следующие параметры:
 - i. $R^2 \geq 0.95$ для MGMT (FAM) и ACTB (VIC) одновременно
 - ii. ACTB (VIC):
 1. Эффективность (Efficiency) %: 80-110%
 2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.92
 - iii. MGMT (FAM):

1. Эффективность (Efficiency) %: 85- 110%
2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.74
- iv. Альтернативные показатели контроля качества как для ACTB (VIC), так и для MGMT (FAM):
 1. Значения Ct повторов одного образца должны находиться в пределах 0,5 Ct друг от друга.

Примечание: При расчете процента эффективности для учета ошибок пипетирования на стандартной кривой можно пропустить до двух точек данных.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96 (Версия ПО 3.1 и выше)

1. Программное обеспечение Bio-Rad CFX96 автоматически рассчитает количество копий для ACTB (HEX) и MGMT (FAM) каждого образца с неизвестным статусом. Значения можно найти в таблице результатов на вкладке Количественные данные (Quantification Data).
 - a. На вкладке Количественная оценка (Quantification) в квадранте со стандартной кривой убедитесь, что соблюдаются следующие параметры:
 - i. $R^2 \geq 0.95$ для MGMT (FAM) и ACTB (HEX) одновременно
 - ii. ACTB (HEX):
 1. Эффективность (Efficiency) %: 80-110%
 2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.92
 - iii. MGMT (FAM):
 1. Эффективность (Efficiency) %: 85- 110%
 2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.74

Примечание: При расчете процента эффективности для учета ошибок пипетирования на стандартной кривой можно пропустить до двух точек данных.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени (Версия ПО 1.5 и выше)

1. Программное обеспечение Roche LightCycler® 480 автоматически рассчитает количество копий для ACTB (VIC) и MGMT (FAM) каждого образца с неизвестным статусом. Значения можно найти в разделе анализа запуска.
 - a. $R^2 \geq 0.95$ для MGMT (FAM) и ACTB (VIC) одновременно
 - b. В окне Анализ (Analysis) выберите вкладку Анализ (Analysis).
 - i. Выберите Filter Comb 533-580 VIC.
 - ii. Убедитесь, что настройки VIC верны.
 - iii. Выберите Стандарты 3-6 и просмотрите параметры запуска слева от квадранта стандартной кривой и убедитесь, что соблюдаются следующие параметры:
 1. ACTB (VIC):
 - a. Эффективность (Efficiency) %: 80-110%
 - b. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.92

2. Повторите эти шаги для канала FAM для стандартов 1-6. MGMT (FAM):
 - a. Эффективность (Efficiency) %: 85- 110%
 - b. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.74

Расчет процента метилирования промотора MGMT для всех приборов.

Полученное при расчете значение процента метилирования определяет статус образца:

- Если значение выше или равно 3.125 – образец считается метилированным по промотору MGMT
- Если значение ниже 3.125 – образец считается неметилированным по промотору MGMT

Ниже представлена инструкция по расчету значения:

1. Для каждого образца сначала проанализируйте канал АСТВ (VIC), следуя приведенным ниже рекомендациям:

Таблица 19: рекомендации:

АСТВ (VIC)	Интерпретация
# копий АСТВ <200	Недостаточная начальная концентрация. Требуется повторный запуск.
# копий АСТВ >9500	Избыточная начальная концентрация. Требуется повторный запуск.
200 ≤ число общих копий АСТВ ≤ 9500	Продолжите расчет % метилированного промотора MGMT с коэффициентом пересчета, назначенным для каждого лота.

2. Используйте следующее уравнение для расчета процента метилированных промоторов MGMT в образце. Лот-специфичный коэффициент конверсии (CF, conversion factor) указан в Сертификате анализа набора. Для ДНК, выделенной из микро- или макродиссекций, процент содержания опухолевых клеток будет близок к 1,0 для расчета:

$$\left(\frac{\text{FAM (MGMT) copy number}}{\text{VIC (ACTB) copy number}} \div \% \text{ Tumor Cell Content} \right) \times 100 \times CF = \% \text{ methylated MGMT promoter}$$

Примечание: % Опухолевых клеток в приведенном выше уравнении необходимо выразить десятичным числом (50% -> 0.5).

12. СОСТАВ КОМПОНЕНТОВ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Внешний вид и габаритные размеры

Таблица 20: внешний вид и габаритные размеры:

Наименование	Параметр					
	Количество пробирок/флаконов	Объем/масса реагента*	Вместимость пробирки/флакона*	Материал пробирки/флакона	Цвет реагента и пробирки/флакона	Высота пробирки/флакона*
Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X), 1300 мкл, 2 пробирки	2	1300 мкл	Не менее 2 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с фиолетовой крышкой	46 мм
Смесь праймеров/зондов для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix, 1200 мкл, 1 пробирка	1	1200 мкл	Не менее 2 мл	Полипропилен	Жидкость от бесцветного до светлорозового цвета в коричневой пробирке с коричневой крышкой	46 мм
MGMT Стандарт 1 - MGMT Standard 1, 75 мкл, 1 пробирка [§]	1	75 мкл	Не менее 0,5 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с красной крышкой	46 мм
MGMT Стандарт 2 - MGMT Standard 2, 75 мкл, 1 пробирка [§]	1	75 мкл	Не менее 0,5 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с красной крышкой	46 мм
MGMT Стандарт 7 - MGMT Standard 7, 75 мкл, 1 пробирка [§]	1	75 мкл	Не менее 0,5 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с красной крышкой	46 мм
MGMT Стандарт 3 - MGMT Standard 3, 130 мкл, 1 пробирка [§]	1	130 мкл	Не менее 0,5 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с красной крышкой	46 мм
Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent, 500 мкл, 1 пробирка	1	500 мкл	Не менее 2 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с красной крышкой	46 мм

РНК-носитель – Carrier RNA, не менее 310 мкг, 1 пробирка**	1	310 мкг	Не менее 2 мл	Полипропилен	Лиофилизат белого цвета в прозрачной пробирке с красной крышкой	46 мм
Раствор бисульфита – Bisulfite Solution, 1,5 мл, 3 пробирки	3	1,5 мл	Не менее 2 мл	Полипропилен	Жидкость от бесцветного до бледно-желтого цвета в прозрачной пробирке с желтой крышкой	46 мм
Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer, 1,9 мл, 1 пробирка.†	1	1,9 мл	Не менее 2 мл	Полипропилен	Жидкость желтого цвета в прозрачной пробирке с синей крышкой	46 мм
Вода без РНКаз – RNase-Free Water, 1,9 мл, 1 пробирка	1	1,9 мл	Не менее 2 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с прозрачной крышкой	46 мм
Спиновые колонки для ДНК – DNA Spin Columns	50	-	1000 мкл	Полипропилен	Прозрачная пробирка со съемной колонкой розового цвета с крышкой и бумажным фильтром	45 мм
Пробирки для сбора – Collection Tubes (50 EA)	50	-	2200 мкл	Полипропилен	Прозрачная пробирка	39 мм
Связывающий буфер – Binding Buffer, 31 мл, 1 флакон***	1	31 мл	Не более 100 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в полупрозрачном флаконе с полупрозрачной крышкой	84 мм
Промывочный буфер (концентрат) – Wash Buffer, 13 мл, 2 флакона	2	13 мл	Не более 100 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в полупрозрачном флаконе с полупрозрачной крышкой	84 мм
Буфер для десульфирования (концентрат) – Desulfonation Buffer, 3 мл, 1 флакон	1	3 мл	Не более 50 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в полупрозрачном флаконе с полупрозрачной крышкой	61 мм
Буфер для элюирования – Elution Buffer, 1 мл, 1 пробирка	1	1мл	Не менее 2 мл	Полипропилен	Бесцветная жидкость в прозрачной пробирке с прозрачной крышкой	46 мм

*допустимое отклонение составляет $\pm 10\%$, если не указано иное.

§ Стандарты MGMT содержат смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют гену внутреннего контроля и/или метилированному промотору MGMT в различных концентрациях. Не смешивайте пробирки со стандартами между собой.

**Поставляется в лиофилизированном виде. Лиофилизированный РНК-носитель может храниться при комнатной температуре до года.

†Защитный буфер для ДНК стабилен при 2-8 °С до истечения указанного срока годности, и изменение цвета в течение этого времени не влияет на производительность.

***Содержит соль гуанидина. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель. См. «Информация по безопасности».

Состав реагентов набора

Таблица 21: состав реагентов набора:

Наименование	Состав
Смесь праймеров/зондов для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix, 1200 мкл, 1 пробирка	-Зонды (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные зонды) -Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) -Вода* - IDTE (1X TE раствор рН 8): трис гидрохлорид и ЭДТА
Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X), 1300 мкл, 2 пробирки	ДНК-полимераза дНТФ (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты): - дАТФ (дезоксиаденозинатрифосфат) - дГТФ (дезоксигуанозинатрифосфат) - дЦТФ (дезоксцитидинтрифосфат) - дТТФ (дезокситимидинтрифосфат) ПЦР-буфер (коммерчески доступный буфер): -глицерол -вода*
Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent, 500 мкл, 1 пробирка	- Смесь синтетических специфических последовательностей олигонуклеотидов - Вода*
MGMT Стандарт 1 - MGMT Standard 1, 75 мкл, 1 пробирка. MGMT Стандарт 2 - MGMT Standard 2, 75 мкл, 1 пробирка. MGMT Стандарт 3 - MGMT Standard 3, 130 мкл, 1 пробирка. MGMT Стандарт 7 - MGMT Standard 7, 75 мкл, 1 пробирка.	- Смесь синтетических специфических последовательностей олигонуклеотидов - Вода*

РНК-носитель – Carrier RNA, не менее 310 мкг, 1 пробирка	Рибонуклеиновая кислота лиофилизированная
Раствор бисульфита – Bisulfite Solution, 1,5 мл, 3 пробирки	-Гидросульфит аммония
Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer, 1,9 мл, 1 пробирка	-Тетрагидрофурфуриловый спирт -Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота)
Вода без РНКаз – RNase-Free Water, 1,9 мл, 1 пробирка	- Вода*
Спиновые колонки для ДНК – DNA Spin Columns, 50 шт	-Пластик (полипропилен) -Фильтровальная бумага
Пробирки для сбора – Collection Tubes (50 EA)	-Пластик (полипропилен)
Связывающий буфер – Binding Buffer, 31 мл, 1 флакон	Тиоцианат гуанидина
Промывочный буфер (концентрат) – Wash Buffer, 13 мл, 2 флакона	-Хлорид натрия -МОПС, (3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота) -Изопропиловый спирт
Буфер для десульфирования (концентрат) – Desulfonation Buffer, 3 мл, 1 флакон	-Гидроксид натрия
Буфер для элюирования – Elution Buffer, 1 мл, 1 пробирка	-Трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид -ЭДТА

*Дистиллированная вода без ДНК, ДНКаз или РНКаз.

12.2. Характеристики аналитической и клинической эффективности

В ходе клинико-лабораторных испытаний были оценены следующие характеристики аналитической и клинической эффективности испытуемого медицинского изделия:

1. Предел холостой пробы (LoB) при запуске амплификатора «CFX96» на материале без наличия ДНК (вода свободная от нуклеаз) для оценки уровня фонового шума/сигнала при отсутствии образца не было получено значений C_t ни для одного из 10 повторов ни для одного из каналов. Фонового сигнала для воды свободной от нуклеаз не зафиксировано.

2. Предел обнаружения (аналитическая чувствительность, LoD).

В качестве материала для оценки LoD (предела обнаружения (ПО) /аналитической чувствительности) использовали мутантные синтетические контроли, предоставленные производителем. Тестировали образцы в концентрации ПО (3,125% метилирования промотора гена MGMT), -20% ПО (2,5 % метилирования промотора гена MGMT) и +60% ПО (5% метилирования промотора гена MGMT). Для всех протестированных образцов в концентрации ПО и выше (3,125 и 5%) получены положительные результаты тестирования, образцы в ходе тестирования дали сигналы, при расчете метилирования которых, их можно было интерпретировать как метилированные.

Предел обнаружения (аналитическая чувствительность (LoD)) подтвержден результатами клинично-лабораторных испытаний с использованием стандартных образцов (СО). Для 20 повторов тестирования СО с метилированием промотора гена MGMT равному 3,125% и 3 повторов тестирования СО с метилированием промотора гена MGMT равному 5% протестированных лотами А и В испытуемого изделия были получены ожидаемые сигналы и образцы интерпретировались как метилированные.

3. Повторяемость и воспроизводимость оценивались путем проведения анализа метилированного СО (материал, предоставленный производителем, образец с 5% метилирования), а также на отрицательном образце от лаборатории (биологический образец без метилирования).

В испытании участвует 5% метилированный СО (как положительный образец) и биологический образец без метилирования (как отрицательный образец).

Постановки образцов проводили по схеме:

- в первый день постановки проводили с использованием 1-го лота (А) испытуемого МИ (повторяемость) в 10 повторах,
- во второй день второй оператор проводил постановки с использованием 2-го лота (упаковкой второго лота В-1 в 10 повторах и упаковкой В-2 еще в 10 повторах) испытуемого МИ (воспроизводимость).

Анализ проводили на амплификаторе нуклеиновых кислот «CFX96».

Все полученные результаты испытаний соответствовали ожидаемым:

- мутантный синтетический СО был интерпретирован как положительный/метилированный;
- отрицательный/не метилированный образец был интерпретирован в ходе RT-ПЦР как отрицательный/ не метилированный по каналу детекции спецификации (FAM), и давал значения C_t по каналу VIC (канал детекции внутреннего контроля) в пределах, указанных в инструкции, что говорит о достаточном количестве молекул ДНК в образце.

4. Эквивалентность амплификаторов оценивалась согласно методике, описанной в Программе КИ. В ходе проведения постановок были получены одинаковые результаты тестирования для положительных/метилированных и отрицательных/не метилированных образцов на всех амплификаторах, заявленных как совместимые с испытуемым набором реагентов. Вывод – испытуемое изделие верно определяет статус (метилирован образец или нет) испытуемых образцов на каждом заявленном

амплификаторе методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (FFPE).

Испытания проводились на амплификаторах:

- Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (РЗН 2019/8446),
- Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени (ФСЗ 2009/03609),
- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96 (ФСЗ 2008/03399).

5. Точность (сравнение с референтной методикой) оценивалась посредством сравнения результатов обнаружения метилирования промотора гена MGMT в образцах от пациентов с мультиформной глиобластомой, выделенных из FFPE блоков и протестированных испытываемым набором реагентов с результатами, полученными секвенированием по Сэнгеру.

Полученные в ходе исследования генотипы образцов, протестированных испытываемым изделием и секвенированием по Сэнгеру, были идентичны

Диагностические характеристики, рассчитанные по результатам КЛИ:

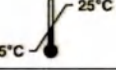
- Чувствительность – 100%, 25/25 с ДИ, % (86,68; 100);
- Специфичность – 100%, 25/25 с ДИ, % (86,68; 100).

Таким образом, можно судить об эффективности испытываемого МИ и его безопасности при применении по назначению.

13. СИМВОЛЫ НА МАРКИРОВКЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Маркировка может содержать следующие символы:

Таблица 22. Символы на маркировке, которые может содержать медицинское изделие:

Символ	Значение
	Номер по каталогу
	Температурный диапазон
	Температурный диапазон
	Осторожно (Подробные условия хранения указаны в инструкции по применению)
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде

	Не допускать воздействия солнечного света
	Беречь от влаги
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Знак соответствия применимым требованиям к продукции, продаваемой на территории Великобритании
	Знак CE
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии
	Использовать до
	Изготовитель
	Уполномоченный представитель в Европейском Сообществе

14. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНИМЫХ СТАНДАРТОВ

- 1) ISO 13485:2016 (ГОСТ ISO 13485-2017) Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования.
- 2) ISO 14971:2019 (ГОСТ ISO 14971-2021) Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
- 3) ISO 23640:2011 (ГОСТ Р ИСО 23640-2015) Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro/
- 4) ISO 15223-1:2021 (ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023) Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования.
- 5) ISO 18113-1:2022 (ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024) Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
- 6) ISO 18113-2:2022 (ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024) Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования.

7) ГОСТ Р ЕН 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.

**15. ПЕРЕЧЕНЬ МАТЕРИАЛОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С
УКАЗАНИЕМ СВЕДЕНИЙ ОБ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**

Неприменимо. Изделие не содержит материалов животного происхождения.

**16. СВЕДЕНИЯ О ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ ДЛЯ
МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕСЯ В МЕДИЦИНСКОМ
ИЗДЕЛИИ**

Неприменимо. В состав Набора не входят лекарственные препараты и фармацевтические субстанции.

**17. ОПИСАНИЕ МЕТОДА СТЕРИЛИЗАЦИИ, СВЕДЕНИЯ О МЕТОДАХ
ВАЛИДАЦИИ В ОТНОШЕНИИ ПРОЦЕССА СТЕРИЛИЗАЦИИ**

Неприменимо. Изделие поставляется нестерильным и не подлежит стерилизации перед применением.

**18. ПОРЯДОК И УСЛОВИЯ УТИЛИЗАЦИИ ИЛИ УНИЧТОЖЕНИЯ
МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ**

Набор следует утилизировать как потенциально опасные отходы в соответствии с требованиями законодательства об охране окружающей среды или иного законодательства соответствующей страны. Для обеспечения соответствия рекомендуется обратиться в местные государственные организации и/или аккредитованные компании по утилизации отходов для получения информации.

При обращении на территории Российской Федерации:

Использованные и неиспользованные наборы реагентов, а также расходные материалы и образцы опухолевой ткани утилизируются как отходы класса Б (эпидемически опасные), в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

После истечения срока годности картонная коробка и инструкция по применению утилизируются как отходы класса А (эпидемически безопасные), в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

19. БИОЛОГИЧЕСКИЙ РЕФЕРЕНТНЫЙ ИНТЕРВАЛ

Неприменимо.

20. ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВАХ ИЛИ ОГРАНИЧЕНИЯХ, СВЯЗАННЫХ С РАБОТОЙ, КОТОРЫЕ МОГУТ ПОВЛИЯТЬ НА РЕЗУЛЬТАТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интерференция в ПЦР (*во всем многообразии вариантов этого метода, а также те, в основе которых лежат методы амплификации НК, например, NGS*) рассматривается в настоящее время как актуальная проблема [7]. Соответственно, проверка интерференции на этапе внедрения в практику диагностических наборов реагентов считается необходимой.

В большом количестве оригинальных и обзорных статей приведены данные о повреждении ДНК в FFPE как на этапах приготовления образцов тканей для исследования, так и при выделении НК, что предопределяет результат ПЦР [8].

Многие авторы рассматривают стадию выделения ДНК из FFPE как один из критических этапов [9].

Использование разных коммерческих наборов реагентов для выделения ДНК, специально предназначенных для FFPE, как правило, обеспечивает получение препаратов ДНК достаточного качества и сопоставимых по данному параметру между собой [10].

Присутствие возможных ингибиторов ПЦР может быть обнаружено спектрофотометрическим методом [11][12].

Резюме: ввиду того, что невозможно проверить влияние всех интерферирующих веществ, включая специфические для данной конкретной реакции, была проведена валидация совместного использования методик выделения ДНК и амплификации при применении медицинского изделия (при условии подтверждения заявленных характеристик аналитической и клинической эффективности) без отдельного исследования влияния отдельных интерферентов.

Геномная ДНК из фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей для использования с данным изделием, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения:

«Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit» (ПУ № РЗН 2021/15704)». Данный набор использовался для получения ДНК клинических образцов в ходе проведения испытаний, которые прошли успешно. Таким образом была проведена совместная валидация методик, а значит можно учитывать и характеристики набора для выделения при оценке интерферентов.

Выдержка из документации к Набору QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit» (ПУ № РЗН 2021/15704): потенциально интерферирующие вещества могут происходить из различных источников, например, естественные метаболиты, специфичные для типа ткани и органа, метаболиты, вырабатываемые во время патологических состояний, вещества, вводимые во время лечения пациента, или вещества, употребляемые пациентом. Широкий спектр потенциально интерферирующих веществ и разнообразие последующих диагностических наборов и методов не дают возможности надежно и достоверно установить воздействие интерферирующих веществ исключительно на выделение ДНК без исследования влияния на конкретную дальнейшую реакцию. Пользователям рекомендуется провести контроль возможных интерферентов для конкретной ткани с использованием реагентов, специфичных для дальнейшего диагностического применения.

**21. СВЕДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ, ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ
В ОТНОШЕНИИ ПОТЕНЦИАЛЬНО ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА,
СОДЕРЖАЩЕГОСЯ В ИЗДЕЛИИ**

Неприменимо. Изделие не содержит потенциально инфицированный материал.

**22. СВЕДЕНИЯ И МЕРАХ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И МЕРЫ,
ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ В СЛУЧАЕ СБОЯ ИЛИ ОТКЛОНЕНИЙ В
ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ИЗДЕЛИЯ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ПО ВНЕШНИМ
ПРИЗНАКАМ**

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

**23. СВЕДЕНИЯ О БЕЗОПАСНОСТИ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ И
ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ, В ТОМ ЧИСЛЕ ПРЕДЕЛЬНО
ДОПУСТИМЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВ ИЛИ ВХОДЯЩИХ В НЕГО
КОМПОНЕНТОВ**

Неприменимо. Набор не содержит загрязняющих веществ.

24. СВЕДЕНИЯ О ПОЖАРНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Неприменимо. Набор не является пожароопасным.

25. СВЕДЕНИЯ О ВЗРЫВОБЕЗОПАСНОСТИ

Неприменимо. Набор не является взрывоопасным.

26. СВЕДЕНИЯ О РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Неприменимо. Набор не содержит источников излучения.

27. КРАТНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор для многократного применения.

Изделие не требует технического обслуживания.

28. ИНФОРМАЦИЯ О НАДЛЕЖАЩЕЙ ОБРАБОТКЕ ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ЕГО ПОВТОРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ, ВКЛЮЧАЯ ОЧИСТКУ, ДЕЗИНФЕКЦИЮ, УПАКОВКУ И ПРИ НЕОБХОДИМОСТИ МЕТОД ПОВТОРНОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Неприменимо. Набор не требует обработки при повторном использовании.

29. ИНФОРМАЦИЯ, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ПРАВИЛЬНОСТИ УСТАНОВКИ ИЗДЕЛИЯ И ЕГО ГОТОВНОСТИ К БЕЗОПАСНОЙ РАБОТЕ ПО НАЗНАЧЕНИЮ

Неприменимо. Изделие не требует установки.

30. ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

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

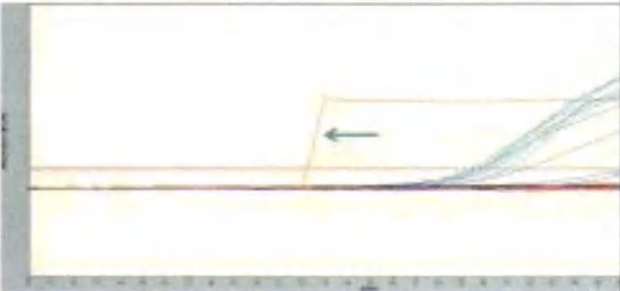
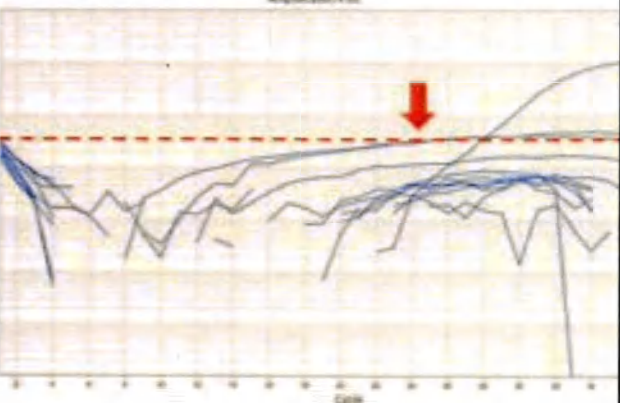
В связи с тем, что использование изделия не происходит под непосредственным наблюдением производителя, пользователь обязан руководствоваться законами и действующими положениями по вопросам гигиены и безопасности при использовании изделия по назначению, под собственную ответственность. Производитель не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

31. УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Таблица 23: устранение неисправностей:

Проблема:	Решение:
Небольшой выход ДНК на стадии очистки или его отсутствие.	· Промывочный буфер или буфер для десульфирования приготовлены неправильно. Убедитесь, что концентраты промывочного буфера и буфера для десульфирования были разбавлены 96-100% этанолом. · Промывочный буфер и буфер для десульфирования используются в неправильном порядке. · Образец не полностью прошел через мембрану. Центрифугируйте в течение 1 мин на полной скорости или до тех пор, пока весь образец не пройдет через мембрану. · Буфер для связывания содержит осадки. Проверьте наличие осадка. Растворить при нагревании (максимум 70°C, осторожно помешивая).

Низкая конверсия	• Бисульфитные компоненты реакции добавлены в неправильном порядке. • Используются неправильные условия термоциклирования. • Низкое качество ДНК (например, контаминация белками). • Количество использованной ДНК вне рекомендуемого диапазона. • Не добавлен Защитный буфер для ДНК. • Бисульфитный раствор содержит осадки. • Недостаточное время для воздействия бисульфитом на ДНК. Увеличьте шаг термоциклирования при 60°C с 10 до 20 минут.
Число копий АСТВ в образцах меньше 200.	• Бисульфит обрабатывает больше ДНК в образцах, с недостаточной начальной концентрацией, если начальная концентрация находится в пределах рекомендованного производителем диапазона. Возможно, потребуется уменьшить объем элюента. • Убедитесь, что начальная концентрация для конверсии бисульфитом не превышает рекомендаций. Слишком много ДНК забивает спин-колонки и приводит к низкому выходу преобразованной ДНК. Повторите конверсию бисульфитом с меньшим количеством ДНК. • Убедитесь, что добавляемое число копий стандартов соответствует 4 мкл. Сертификат анализа (СА) указывает количество копий в копиях/мкл.
Сигналы мишени и/или внутреннего контроля являются отрицательными у Стандартов 3-6. Сигнал мишени отрицательный для Стандарта 1 и/или 2.	• Реагенты могут деградировать. Во избежание последующих сбоев в работе реагента необходимо выполнять инструкции по хранению и обращению, которые содержатся в разделе 2.2 настоящей инструкции. • Может указывать на загрязнение нуклеазами. Следуйте передовой лабораторной практике и рекомендациям в разделе 2.5.

Аномальный пик на графике амплификации образца . 	· Аномальная линия пика может быть результатом пузырьков в лунке, содержащей образец. Центрифугировать плашку перед повторным запуском образца. · Аномальный пик может быть ошибкой детекции флуоресценции прибором. Провести повторный анализ другой плашки, чтобы убедиться в отсутствии воспроизводимости. Если пик воспроизводится, необходимо связаться с производителем прибора.
Сигнал в контроле без матрицы или Стандарте 7.	· Указывает на контаминацию геномной ДНК. Оценить лабораторную процедуру. Предложения по сведению к минимуму загрязнения рабочей поверхности см. в разделе 2.5 настоящей инструкции. · Если присутствуют целевой сигнал и/или сигнал внутреннего контроля, результаты могут дать ложноположительный или неточный результат, требуется повторный запуск
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ. 	· Обеспечить установку ручных пороговых значений, предложенных в настоящей инструкции. · Убедиться в том, что сигнал не является истинной амплификацией путем проверки сигнала на многокомпонентном графике (приборы Life Technologies). Если сигнал горизонтальный, то это не истинная амплификация. · Если сигнал на многокомпонентном графике является линейным и сигнал пересекает пороговое значение, необходимо отрегулировать базовый конечный цикл. Установить начальный цикл на 3 и остановить: самый ранний цикл VIC Ct (если сигнал по-прежнему пересекает пороговое значение, увеличивать число циклов с шагом 3 до тех пор, пока сигнал не перестанет пересекать пороговое значение).

Образец без метилированных промоторов имеет значение Ct сигнала-мишени, которое рассчитывает % метилирования промотора MGMT.

Указывает на контаминацию положительным образцом или стандартом meMGMT, если сигнал внутреннего контроля находится в пределах допустимого диапазона. Повторите анализ с новым неметилированным образцом.

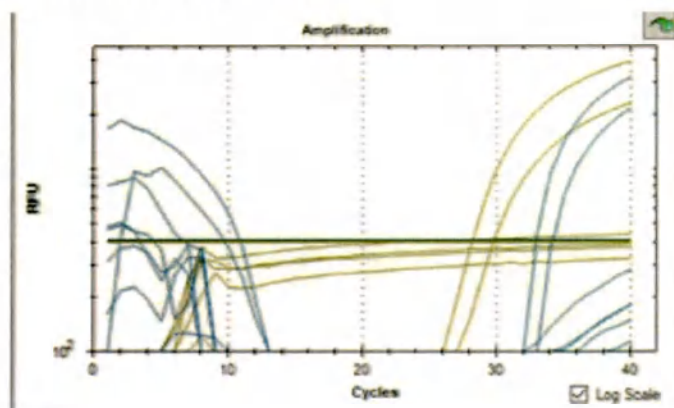
• Также возможно, что неметилированный образец не является неметилированным образцом.

Некоторые коммерчески производимые неметилированные контроли могут быть метилированы <5%, см. Протокол производителя для подтверждения.

Также возможно, что неметилированный образец не является неметилированным образцом.

Некоторые коммерчески производимые неметилированные контроли могут быть метилированы <5%, см. Протокол производителя для подтверждения.

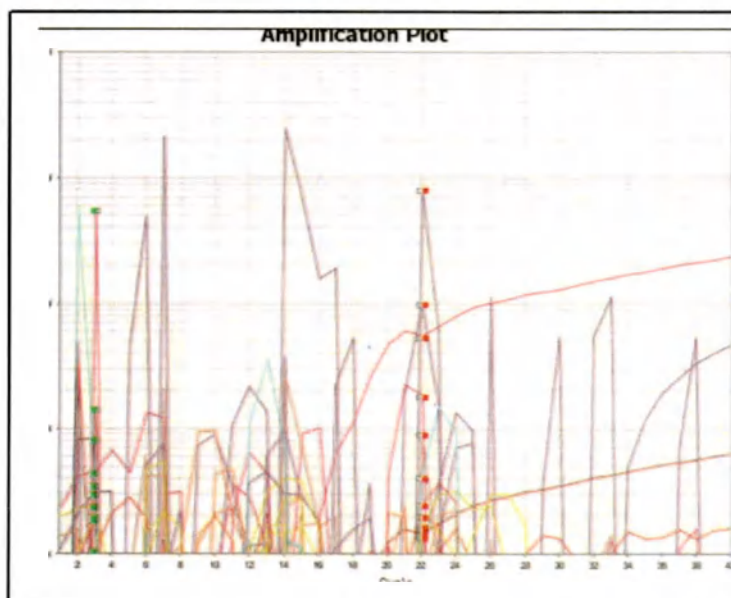
Необычные кривые.



• Может указывать на плохое смешивание реагентов в конечной смеси. Убедитесь, что все реакции хорошо перемешаны и наконечник не содержит жидкости при перемешивании пипетированием.

• Может указывать на несовместимое использование расходных материалов, могут потребоваться другие плашки. Для получения дополнительной информации обратитесь к поставщику.

• Может указывать на то, что реакция проходит не на дне лунок. Такое возможно при пропуске шага центрифугирования ПЦР плашки перед постановкой в прибор.



· Указывает, что ROX был выбран в качестве пассивного референса по умолчанию. Установите для пассивного референса значение Отсутствует (NONE) для просмотра данных.

32. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ И ПРАВИЛА ПРИЕМА РЕКЛАМАЦИЙ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие технических характеристик изделия всем требованиям применимых национальных и международных стандартов в течение всего гарантийного срока при соблюдении потребителем условий эксплуатации, транспортирования и хранения.

По всем вопросам, связанным с обращением медицинского изделия на территории РФ, необходимо обратиться к уполномоченному представителю производителя:

Общество с ограниченной ответственностью «БиоВитрум»

ООО «БиоВитрум»

199106, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О. дом 68 лит.А

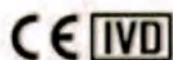
Тел.: +7 (812) 305-06-06

e-mail: otk@biovitrum.ru

33. СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014 Oct;23(10):1985-96. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275. Epub 2014 Jul 22.
2. Hegi M E, Diserens A C, Gorlia T, et al. "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma". *NEJM*. 2005 March 10; 352(10): 997-1003.
3. Zou P, Xu H, Chen P, Yan Q, Zhao L, et al. "IDH1/IDH2 Mutations Define the Prognosis and Molecular Profiles of Patients with Gliomas: A Meta-Analysis". 2013; *PLoS ONE* 8(7): e68782. doi:10.1371/journal.pone.0068782

4. Clark K, Voronovich Z, and Horbinski C. "How molecular testing can help (and hurt) in the workup of gliomas". *Am J Clin Pathol*. 2013 March; 139(3): 275-288.
5. Shen D, Liu T, Lin Q, Lu x, Wang Q, Lin F and Mao W. "MGMT Promoter Methylation Correlates with an Overall Survival Benefit in Chinese High-Grade Glioblastoma Patients Treated with Radiotherapy and Alkylating Agent-Based Chemotherapy: A Single-Institution Study". 2014 September; *PLoS ONE* 9(9): e107558. doi.org/10.1371/journal.pone.0107558
6. Alireza Mansouri, Laureen D Hachem, Sheila Mansouri, Farshad Nassiri, Normand J Laperriere, Daniel Xia, Neal I Lindeman, Patrick Y Wen, Arnab Chakravarti, Minesh P Mehta, Monika E Hegi, Roger Stupp, Kenneth D Aldape, Gelareh Zadeh, MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges, *Neuro-Oncology*, Volume 21, Issue 2, February 2019, Pages 167–178, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy132>



Для диагностики in vitro

REF

MGMTX-RT44

ИНСТРУКЦИЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для in vitro диагностики для обнаружения метилирования гена MGMT методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (MGMT Methylation Detection Kit), 60 реакций

Версия 1.6

Наименование

Набор реагентов для in vitro диагностики для обнаружения метилирования гена MGMT методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (MGMT Methylation Detection Kit), 60 реакций, в составе:

1. Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X), 1300 мкл, 2 пробирки.
2. Смесь праймеров/зондов для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix, 1200 мкл, 1 пробирка.
3. MGMT Стандарт 1 - MGMT Standard 1, 75 мкл, 1 пробирка.
4. MGMT Стандарт 2 - MGMT Standard 2, 75 мкл, 1 пробирка.
5. MGMT Стандарт 3 - MGMT Standard 3, 130 мкл, 1 пробирка.
6. MGMT Стандарт 7 - MGMT Standard 7, 75 мкл, 1 пробирка.
7. Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent, 500 мкл, 1 пробирка.
8. РНК-носитель – Carrier RNA, не менее 310 мкг, 1 пробирка.
9. Раствор бисульфита – Bisulfite Solution, 1,5 мл, 3 пробирки.
10. Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer, 1,9 мл, 1 пробирка.
11. Вода без РНКаз – RNase-Free Water, 1,9 мл, 1 пробирка.
12. Спиновые колонки для ДНК – DNA Spin Columns, 50 шт.
13. Пробирки для сбора – Collection Tubes (50 EA), 50 шт.
14. Связывающий буфер – Binding Buffer, 31 мл, 1 флакон.
15. Промывочный буфер (концентрат) – Wash Buffer, 13 мл, 2 флакона.
16. Буфер для десульфирования (концентрат) – Desulfonation Buffer, 3 мл, 1 флакон.
17. Буфер для элюирования – Elution Buffer, 1 мл, 1 пробирка.

Комплект поставки:

1. Набор реагентов для in vitro диагностики для обнаружения метилирования гена MGMT методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (MGMT Methylation Detection Kit), 60 реакций.
2. Инструкция пользователя по применению медицинского изделия - 1 шт.
3. Инструкция по применению медицинского изделия (доступна с помощью QR-кода, размещенного на маркировке; может поставляться по запросу потребителя) - 1 шт.

Назначение

Изделие предназначено для качественного обнаружения метилирования промотора O[6]-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) в геномной ДНК опухолей мультиформной глиобластомы (GBM) человека, выделенной из образцов опухоли пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, в in vitro диагностике.

Срок годности и условия хранения и транспортирования

Срок годности изделия: 9 месяцев.

Гарантийный срок хранения равен сроку годности.



Набор поставляется в двух коробках с разными температурными диапазонами хранения.



Коробка меньшего размера (реагенты ПЦР) поставляется с холодоэлементами (транспортные контейнеры с пенопластовым покрытием, содержащие пакеты замороженного геля, сухой лед и датчик температурного воздействия). Допустимые сроки транспортирования набора составляют 96 часов. Не допускать воздействия солнечного света; Не допускать воздействия влаги; Хрупкое, обращаться осторожно.

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

- Храните все неоткрытые компоненты в оригинальной упаковке.
- Смеси Праймеров/Зондов стоит всегда защищать от воздействия света для предотвращения фотообесцвечивания флуоресцентных красителей.
- Перед открытием центрифугируйте пробирки.

Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована.



Остальные реагенты (реагенты для конверсии бисульфитом) транспортируются и поставляются при комнатной температуре (15–25°C) в коробке большего размера. Допустимые сроки транспортирования набора составляют 96 часов. Не допускать воздействия солнечного света; Не допускать воздействия влаги; Хрупкое, обращаться осторожно.

По прибытии, *Спиновые колонки для ДНК – DNA Spin Columns*, *Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer* и *Буфер для десульфирования (концентрат) – Desulfonation Buffer* следует хранить при температуре 2–8°C. Все остальные буферы, включая *Раствор бисульфита – Bisulfite Solution*, следует хранить при комнатной температуре.

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

Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) – Mutation Detection Reaction Mix (2X); Смесь праймеров/зондов для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix; MGMT Стандарт 1 – MGMT Standard 1; MGMT Стандарт 2 – MGMT Standard 2; MGMT Стандарт 3 – MGMT Standard 3; MGMT Стандарт 7 – MGMT Standard 7; Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent после вскрытия рекомендуется хранить — в холодильнике (от 2° до 8 °C) до 4 недель или в замороженном виде (от -25° до -15 °C) с максимум четырьмя (4) циклами замораживания-оттаивания.

РНК-носитель – Carrier RNA следует хранить при комнатной температуре. С момента ресуспендирования РНК-носителя в воде без РНКаз следует хранить в заморозке при температуре от -25°C до -15°C. Можно приготовить аликвоты в требуемом объеме и хранить в аналогичных условиях от -25°C до -15°C. Избегайте повторных разморожек и заморожек реагента (допустимо не более 4 раз).

Таблица 22: условия хранения для каждого реагента набора:

Наименование реагента	Температура хранения
Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X)	От -25°C до -15°C
Смесь праймеров для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 1 - MGMT Standard 1	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 2 - MGMT Standard 2	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 3 - MGMT Standard 3	От -25°C до -15°C
MGMT Стандарт 7 - MGMT Standard 7	От -25°C до -15°C
Контрольный стандартный разбавитель – Control Standard Diluent	От -25°C до -15°C
Раствор бисульфита – Bisulfite Solution	От +15 до +25°C
РНК-носитель – Carrier RNA	Лиофилизированный от +15 до +25°C; Ресуспендированный от -25°C до -15°C
Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer	От +2 до +8°C
Вода без РНКаз – RNase-Free Water	От +15 до +25°C
Спиновые колонки для ДНК – DNA Spin Columns	От +2 до +8°C
Пробирки для сбора – Collection Tubes (50 EA)	От +15 до +25°C

Связывающий буфер – Binding Buffer	От +15 до +25°C
Промывочный буфер (концентрат) – Wash Buffer	От +15 до +25°C
Буфер для десульфирования (концентрат) – Desulfonation Buffer	От +2 до +8°C
Буфер для элюирования – Elution Buffer	От +15 до +25°C

- Храните все неоткрытые компоненты в оригинальной упаковке.
- Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована.

Хранение и обращение с компонентами этого набора в условиях, отличных от описанных выше, может повлиять на производительность этого анализа и отрицательно повлиять на результаты.

Предупреждения и меры предосторожности

ПЦР-амплификация чрезвычайно чувствительна к перекрестной контаминации. Очень важно выполнять этапы, предшествующие амплификации (т.е. выделение РНК, подготовка к реакции ПЦР) в отдельных помещениях, в идеале - в отдельных комнатах с изолированными системами вентиляции. Особенно важно, чтобы подготовка реакции ПЦР проводилась в помещении с положительным давлением воздуха (или в вытяжном шкафу с ламинарным потоком).

При обращении с реагентами ДНК и ПЦР необходимы дополнительные меры предосторожности, чтобы избежать контаминации я между образцами/реагентами:

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

Информация по безопасности

При работе с химическими веществами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к паспортам безопасности материалов (MSDS). Их можно найти на <http://entrogen.com/pi-download>. Введите MGMTX-RT44 в поиск номер по каталогу (Catalog Number) для загрузки MSDS.

ОСТОРОЖНО 	НЕ добавляйте отбеливающие или кислотные растворы непосредственно в раствор бисульфита или в отходы, содержащие Связывающий буфер.
---	---

Буфер для связывания содержит соль гуанидина, которая в сочетании с отбеливателем может образовывать высокореактивные соединения. Если жидкость, содержащая этот буфер, пролилась, очистите ее подходящим лабораторным моющим средством и водой.

Необходимое оборудование и материалы

Все рекомендуемые расходные материалы, реагенты и оборудование, предусмотренные для использования в комбинации с заявленным медицинским изделием, должны быть зарегистрированы в РФ в установленном порядке, как медицинские изделия.

Реагенты

Необходимые, но не предоставляемые реагенты: реагенты для выделения геномной ДНК из образцов опухоли. Геномная ДНК из фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: "Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" (P3H 2021/15704).

Для данного анализа требуется использование воды без нуклеаз (вода для ПЦР).

Для данного анализа требуется использование 96-100% абсолютного этанола.

Рекомендуемые, но не предоставляемые реагенты: рекомендуется включать положительный и отрицательный эталонный контроль с известным % метилированного промотора MGMT в каждый запуск.

Оборудование

❖ Таблица 2: Приборы для проведения ПЦР-РВ:

Наименование	Номер РУ
Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени	ФСЗ 2009/03609 от 06.06.2016 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

- ❖ Вортекс
- ❖ Настольная центрифуга для микроцентрифужных пробирок объемом 0.2 мл и 2.0 мл
- ❖ Центрифуга для 96-луночных ПЦР плашек
- ❖ Прибор Qubit и реагенты к нему (или аналог)

Вспомогательные материалы

- ❖ Одноразовые неопудренные перчатки
- ❖ Регулируемые пипетки
- ❖ Стерильные наконечники пипеток с фильтром
- ❖ Вортекс
- ❖ Настольная центрифуга для 0,2 мл и 2 мл микроцентрифужных пробирок
- ❖ ПЦР плашки на 96 лунок
- ❖ Оптическая герметичная пленка для ПЦР плашек
- ❖ 0.2 мл и 2.0 мл микроцентрифужные пробирки
- ❖ Центрифуга для ПЦР плашек на 96 лунок
- ❖ Прибор для оценки концентрации
- ❖ 1.5 мл микроцентрифужные пробирки
- ❖ Лед/Охлаждающий блок
- ❖ Реагенты для деkontаминации поверхностей
 - ❖ 70% этанол
 - ❖ 20% хлорный отбеливатель (или аналог)

Описание целевого анализа

Два участка в гене MGMT, DMR1 и DMR2, содержат 97 CpG динуклеотидов, ответственных за GBM, опосредованную метилированием промотора MGMT. DMR1 находится внутри промотора гена MGMT, тогда как DMR2 находится в экзоне 1 сразу после сайта начала транскрипции гена MGMT. Когда DMR1 метилирован, DMR2 всегда метилирован, что делает DMR2 «критической областью для тестирования метилирования»

Ограничения анализа

- ❖ Успешное обнаружение метилирования промотора зависит от качества образца и количества доступной амплифицируемой ДНК. Образцы с избыточной или недостаточной концентрацией необходимо анализировать повторно.
- ❖ Использование спектрофотометра для количественного определения образца может привести

- к завышению концентрации. Рекомендации по вводу в этом анализе основаны на флуорометрическом анализе. Эффективность этого анализа не была установлена с помощью спектрофотометрического количественного определения.
- ❖ Этот набор предназначен для использования только с фиксированными в формалине и залитыми в парафин (FFPE) тканями. Неизвестно, подходят ли другие типы образцов для тестирования с помощью этого набора.
- ❖ Эффективность этого анализа не была установлена в присутствии редких полиморфизмов.
- ❖ FFPE фиксация может привести к чрезмерному фрагментированию образцов. Чрезмерная фрагментация может привести к сбою анализа. В результате данные по некоторым образцам могут не подлежать отчетности.
- ❖ Остатки реагентов для выделения в образце могут повлиять на эффективность амплификации.
- ❖ Этот набор предназначен для использования персоналом лаборатории, обученным методам молекулярной биологии.
- ❖ Для достижения оптимальных результатов требуется соблюдение этого протокола. Отклонения от протокола могут привести к потере производительности.
- ❖ Для этого анализа необходима бисульфитная конверсия для количественного определения неизвестного процента метилирования образца.
- ❖ Этот анализ не рассчитывает эффективность преобразования бисульфитом. Эффективность воздействия бисульфита напрямую влияет на эффективность анализа.
- ❖ Этот анализ был разработан для оптимальной работы при LLOQ (более низком уровне количественной оценки). Неизвестные образцы с высоким уровнем метилирования промотора могут иметь более высокие стандартные отклонения при количественной оценке метилирования.
- ❖ Не поддерживается удаление стандартов из любого проверочного запуска.
- ❖ Комбинация реагентов из разных партий наборов не оценивалась. Тактико-технические характеристики данной модификации не установлены.
- ❖ Стандартная кривая за пределами допустимого диапазона приведет к ненадежной количественной оценке.
- ❖ Точность %СОК (процент содержания опухолевых клеток), заданная %mMGMT, зависит от воспроизводимости начального %СОК.

Проведение анализа

Процедура проверки содержит несколько простых шагов:

1. Выделение ДНК из опухолевых биопсий, заключенных в парафин фрагментов (FFPE) опухолей.
2. Бисульфитная конверсия образцов (например, выделенная ДНК, метилированные и неметилированные контроли) с использованием реагентов, приложенных в наборе MGMTX-RT44.
 - a. Обработка ДНК раствором бисульфита.
 - b. Связывание полученной оцДНК с мембраной спиновой колонки для ДНК с последующими этапами промывки.
 - c. Стадия десульфирования на колонке.
 - d. Промывка ДНК на колонке для удаления реагента десульфирования и остановки дальнейшего повреждения ДНК.
 - e. Элюция ДНК для последующего анализа ПЦР в реальном времени.
3. Амплификация обработанной ДНК с использованием реагентов, приложенных в наборе для определения метилирования MGMT.
4. Анализ и интерпретация данных с помощью ПО прибора для ПЦР-РВ.

Выделение ДНК и количественная оценка

Геномная ДНК фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: "Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" (P3H 2021/15704).

Достаточное количество ДНК может быть выделено из фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков. После выделения ДНК, необходимо измерить концентрацию с помощью флуорометрического анализа (например, Qubit).

Каждая лаборатория должна оценить оптимальную исходную концентрацию ДНК, сопоставив концентрацию ДНК с определенным оптимальным диапазоном числа копий в разделе 7.2 для

внутреннего контроля бета актина (ACTB).

Протокол воздействия бисульфита позволяет преобразовать бисульфитом ДНК в количестве от 1 нг до 2 мкг в объеме до 20 мкл (высокая концентрация) или от 1 до 500 нг в максимальном объеме 40 мкл (низкая концентрация). Конверсия образцов ДНК с высокой или низкой концентрацией отличается только схемой проведения бисульфитных реакций (см. Таблицу 3). Все остальные шаги протокола такие же.

Прежде, чем начать:

- Необязательные метилированные и неметилированные контроли должны быть обработаны бисульфитом вместе с образцами, которые необходимо проанализировать.
- Удаление стандартов MGMT из этого анализа не является поддерживаемой модификацией.
- Разведения стандартов 4-6 должны быть произведены пользователем перед каждым запуском. Разведенные стандарты нестабильны при длительном хранении.

Конверсия бисульфитом

Подготовка реагентов для конверсии бисульфитом

Промывочный буфер

Добавьте 30 мл этанола (96–100%)* к 13 мл концентрата промывочного буфера и храните при комнатной температуре (15–25°C). Перед началом процедуры переверните флакон несколько раз.

РНК-носитель

Добавьте 310 мкл воды без РНКаз к лиофилизированному РНК-носителю, перемешайте и быстро открутите, аликвотируйте в необходимые объемы для хранения (при температуре от -25°C до -15°C). Конечная концентрация равна 1 мкг/мкл. РНК-носитель будет добавляться в Связывающий буфер непосредственно перед каждым использованием. Использование РНК-носителя усиливает связывание ДНК в малой концентрации (<100 нг на колонку) с мембраной колонки, тем самым повышая выход ДНК. РНК-носитель рекомендуется использовать с потенциально фрагментированной ДНК, такой как полученной из FFPE блоков.

Буфер для десульфирования

Добавьте 27 мл этанола (96–100%)* в буфер для десульфирования и храните при 2–8°C. Перед началом процедуры переверните флакон несколько раз и обязательно закройте флакон сразу после использования. После некоторого времени хранения в смеси буфера для десульфирования и этанола могут образоваться белые осадки. Эти осадки не повлияют на работу буфера для десульфирования. Однако избегайте переноса осадков на спиную колонку для ДНК.

*Не используйте денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон.

Подготовка реакции конверсии бисульфитом

Прежде, чем начать:

- Обработку бисульфитом необходимо проводить при комнатной температуре (15–25°C).
- Доведите образцы, спинные колонки и буферы до комнатной температуры.
- Убедитесь, что реагенты из набора были приготовлены, как описано в разделе «Подготовка реагентов для конверсии бисульфитом».

Подготовка бисульфитных реакций

1. Разморозьте ДНК для использования в бисульфитных реакциях. Убедитесь, что раствор бисульфита полностью растворился. Если раствор бисульфита содержит осадки, нагрейте до 60°C и встряхивайте, пока все осадки снова не растворятся.
2. Приготовьте индивидуальные реакционные смеси бисульфитов в соответствии с таблицей 3.
3. Добавьте каждый компонент в указанном порядке в пробирку для ПЦР на 200 мкл.

Таблица 3: Каждая реакция объемом 140 мкл содержит следующие компоненты:

Реагент	Образцы с высокой концентрацией (100нг-2мкг) Объем на реакцию (мкл)	Образцы с низкой концентрацией (100нг-500нг) Объем на реакцию (мкл)
Вода без РНКаз – RNase-Free Water	Переменный*	Переменный†
Раствор бисульфита – Bisulfite Solution	85	85
Защитный буфер для ДНК – DNA Protect Buffer	35	15

ДНК	До 20 мкл	До 40 мкл
Общий объем	140	140

*В каждую реакцию можно добавить до 20 мкл образца вместо объема воды.

† В каждую реакцию можно добавить до 40 мкл образца вместо объема воды.

4. Закройте пробирку для ПЦР и тщательно перемешайте на вортексе.

5. Кратковременно отцентрифугируйте, чтобы сбросить капли с боковых стенок.

Примечание: Цвет защитного буфера для ДНК должен измениться с зеленого на синий после добавления к смеси ДНК и раствора бисульфита, что указывает на достаточное перемешивание и правильный pH для реакции конверсии бисульфитом.

Настройки программы термоциклера

При использовании термоциклера, который не позволяет вам вводить нужный реакционный объем (140 мкл), установите прибор на самый большой доступный объем, не разделяйте реакцию на несколько лунок.

Поместите плашку в термоциклер и задайте следующую программу:

Таблица 4: Условия термоциклера для конверсии бисульфитом

Этап	Температура	Время
Денатурация	95°C	5 мин
Инкубация	60°C	10 мин*
Денатурация	95°C	5 мин
Инкубация	60°C	10 мин*
Удержание	20°C	Неопределено†

* В некоторых случаях может потребоваться увеличить время цикла при 60°C до 20 минут для достижения полной конверсии бисульфитной ДНК.

† Конвертированную ДНК можно оставить в приборе на ночь без потери качества.

Точка остановки: преобразованную ДНК можно оставить в термоциклере на ночь без потери производительности.

Очистка ДНК, преобразованной бисульфитом

Прежде, чем начать:

Опционально: прежде, чем начать обработку бисульфитом образцов в количестве менее 100 нг, подготовьте свежий раствор РНК-носителя в Связывающем буфере, как указано в таблице ниже. Указанные объемы включают в себя 10% избыток, чтобы скорректировать вариативность пипетирования. Конечная концентрация РНК-носителя в Связывающем буфере равна 10 мкг/мл.

Таблица 5: приготовление раствора РНК-носителя в Связывающем буфере:

Число образцов	Объем связывающего буфера	Объем растворенного РНК-носителя (мкл)
1	350 мкл	3,5
5	1,75 мл	17,5
10	3,5 мл	35
15	5,25 мл	52,5
25	8,75 мл	87,5
50	17,5 мл	175

1. Кратковременно центрифугируйте пробирки для ПЦР и перенесите содержимое завершённой бисульфитной реакции в новые микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл.

Примечание: Перенос осадков в раствор не повлияет на производительность или выход реакции.

2. Добавьте 310 мкл связывающего буфера в каждый образец.

Примечание: Добавление РНК-носителя рекомендовано при низких концентрациях ДНК (<100 нг) и образцах FFPE. Нет необходимости добавлять РНК-носитель в Связывающий буфер при очистке геномной

ДНК с концентрацией >100 нг.

3. Перемешайте на вортексе и центрифугируйте 5 секунд при комнатной температуре.
4. Добавьте 250 мкл этанола (96–100%) в каждый образец.
5. Перемешайте импульсным встряхиванием в течение 15 секунд и кратковременно центрифугируйте, чтобы сбросить капли с крышки.
6. Промаркируйте и поместите необходимое количество спиновых колонок для ДНК и пробирок для сбора в подходящую стойку.
7. Перенесите всю смесь из каждой пробирки с шага 5 в соответствующую спиную колонку для ДНК.
8. Центрифугируйте спиную колонку на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не требуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонку в пробирки для сбора обратно.
9. Добавьте 500 мкл промывочного буфера в каждую спин-колонку и центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не требуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонку в пробирки для сбора обратно.
10. Добавьте 500 мкл буфера для десульфирования в каждую спин-колонку, закройте крышку и инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре (15–25°C). Будьте осторожны, чтобы не перенести осадок из буфера для десульфирования в спин-колонку.

Осторожно: Буфер для десульфирования может разрушать ДНК, не инкубируйте дольше 15 минут.

Важно: Бутылка с буфером для десульфирования должна быть закрыта сразу после использования, чтобы избежать подкисления углекислым газом в воздухе.

11. Центрифугируйте спиную колонку на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не требуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонку в пробирки для сбора обратно.
12. Добавьте 500 мкл промывочного буфера в каждую спин-колонку и центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 мин. Отфильтрованная жидкость является дальше не требуется и ее можно отобрать с помощью пипетки, вынув спин-колонку, затем поместите спин-колонку в пробирки для сбора обратно.
13. Повторите шаг 12 еще раз.
14. Добавьте 250 мкл этанола (96–100%) в каждую спин-колонку и центрифугируйте на максимальной скорости в течение 1 мин.
15. Поместите спин-колонки в новые пробирки для сбора на 2 мл и центрифугируйте спин-колонки на максимальной скорости в течение 1 мин, чтобы удалить остаточную жидкость.

Дополнительно: Поместите спиновые колонки с открытыми крышками в новую микроцентрифужную пробирку на 1.5 мл и инкубируйте колонки в течение 5 минут при 60°C в нагревательном блоке. Этот шаг обеспечивает испарение любой оставшейся жидкости.

16. Поместите спиновые колонки в новые микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл.
17. Добавьте 15 мкл элюирующего буфера непосредственно в центр каждой мембраны спин-колонки и осторожно закройте крышки.
18. Инкубируйте спин-колонки при комнатной температуре в течение 1 мин.
19. Центрифугируйте в течение 1 мин при 15 000 x g (12 000 об/мин) для элюирования ДНК.

Примечание: Не элюируйте менее 10 мкл элюирующего буфера, так как мембрана спин-колонки не будет достаточно гидратирована.

Точка останова: Рекомендуется хранить очищенную ДНК при 2–8°C до 24 часов. При хранении очищенной ДНК более 24 часов мы рекомендуем хранить при –20°C.

Подготовка реагентов для ПЦР-РВ и Настройка

Разморозьте смесь праймеров/зондов, стандарты 1, 2, 3 и 7, а также 2X Реакционную смесь для обнаружения мутации на льду.

Примечание: Рекомендуется хранить реагенты, плашки, стандарты, контроли и образцы на льду.

1. Доведите Разбавитель контрольных стандартов (CSD) до комнатной температуры. Последовательно разбавьте стандарт 3 в CSD, чтобы получить стандарты 4, 5 и 6, используя приведенную ниже таблицу. Тщательно перемешайте каждую серийно разбавленную стандартную пробирку на вортексе и выполняйте быстро открутите для сброса капель с крышки перед каждым переносом.

а. Тщательное перемешивание перед каждым разбавлением важно для приготовления точных стандартов.

б. Всегда готовьте свежие стандартные разведения.

Осторожно: Тщательно приготовьте стандартные разведения. Стандарты используются при анализе данных для экстраполяции количества копий проанализированных образцов. Плохая подготовка стандартов может привести к невозможности использования данных.

Таблица 6: Серийные разведения

Стандарт для подготовки	Стандарт для использования	Объем стандарта (мкл)	Разбавитель контрольных стандартов (мкл)
Стандарт 4	Стандарт 3	10	30
Стандарт 5	Стандарт 4	10	30
Стандарт 6	Стандарт 5	10	25

2. Реакционные ПЦР смеси имеют общий объем 20 мкл/лунка. Каждую реакцию проводят в трех повторах. Реакционные смеси для нескольких образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избытком, чтобы избежать ошибок пипетирования.

3. Каждая реакционная смесь объемом 20 мкл содержит следующие компоненты:

Таблица 7: Компоненты и объемы

Компоненты	Объем
Реакционный микс для обнаружения мутации (2X) - Mutation Detection Reaction Mix (2X)	10 мкл
Смесь праймеров/зондов для обнаружения MGMT – MGMT Detection Primer Mix	6 мкл
Образец ДНК, обработанный бисульфитом	4 мкл

4. Приготовьте мастер микс как показано в таблице ниже:

Таблица 8: Приготовление мастер микса

Реагент	Объем на реакцию (мкл)	Объем для нескольких образцов (n) в трех повторах, с 5% избытком (мкл)
Реакционный микс для обнаружения мутаций	10	$3 * (8+n) * 10 * 1.05$
Смесь праймеров/зондов	6	$3 * (8+n) * 6 * 1.05$

5. Распределите по 16 мкл мастер микса на лунку.

6. Добавьте 4 мкл стандартов, КБМ или образца ДНК в соответствии с рекомендуемым макетом плашки, приведенной ниже (STD=стандарт, S=образец, NTC= контроль без матрицы, КБМ). Перемешайте пипетированием несколько раз.

7. Заклейте плашку оптической герметичной пленкой.

8. Кратковременно центрифугируйте плашку, чтобы сбросить капли с боковых стенок. Убедитесь в отсутствии на дне лунок пузырьков воздуха.

9. Поместите плашку в термоциклер и запустите следующую программу (условия циклирования для всех приборов):

Таблица 9: условия циклирования для всех приборов:

Температура	Время	Циклы
95°C	10 мин	X1
95°C	15 сек	X40
56 °C	15 сек	

72°C	30 сек	
------	--------	--

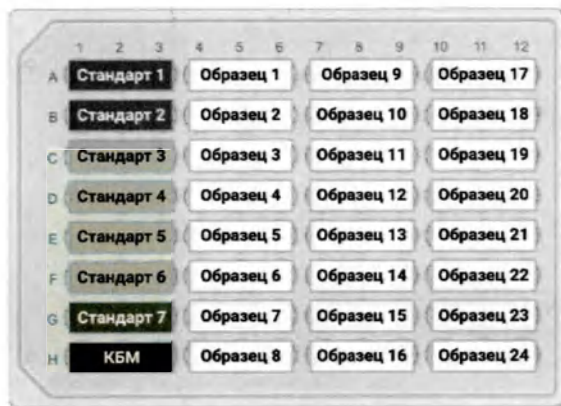


Рисунок 1: Рекомендуемый макет плашки для одного эксперимента, анализирующего 24 образца с неизвестным статусом.

Настройка прибора

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Версия ПО SDS Software 2.0 и выше)

1. Выберите Файл (File)>Новый эксперимент (New Experiment)>Расширенные настройки (Advanced Setup).
 2. Во вкладке Расширенные настройки (Advanced Setup):
 - a. Перейдите в Свойства эксперимента (Experimental Properties):
 - i. Введите имя эксперимента в соответствующем поле
 - ii. Выберите Количественная оценка-Стандартная кривая (Quantitation-Standard Curve)
 - iii. Выберите Реагенты Taqman® (Taqman® Reagents)
 - iv. Выберите Быстрый (Fast) для скорости нагрева (ramp speed). Нет разницы в производительности между стандартным и быстрым режимами.
 - b. Перейдите в Настройка плашки (Plate Setup):
 - i. В разделе Определить мишени (Define Targets) создайте мишени FAM и VIC. Выберите Гаситель (Quencher) NFQ-MGB для обеих мишеней. (Необязательно: назначьте имена целей MGMT и ACTB для FAM и VIC соответственно).
 - ii. В разделе Определить образцы (Define Samples) укажите названия стандартов, образцов и контролей.
 - iii. На вкладке Назначить мишени и образцы (Assign Targets and Samples) назначьте мишени FAM и VIC для всех лунок с образцами. Введите наименования образцов для соответствующих лунок.
 - iv. Выберите Отсутствует (NONE) для пассивного референсного красителя (passive reference dye).
- Примечание:** Он автоматически устанавливается для ROX. Если пассивный эталонный краситель не установлен как Отсутствует (NONE), графики амплификации не будут видны во время анализа.
- c. Перейдите в Метод анализа (Run Method):
 - i. Установите объем реакции на 20 мкл.
 - ii. Введите условия циклирования из таблицы ниже.
 - d. Выберите Начать запуск (Start Run) для начала анализа.

Таблица 10: Протокол QuantStudio

Температура (°C)	Время	Циклы	Сбор данных
95	10 мин	1	
95	15 сек	40	
56	15 сек		

72	30 сек		FAM/VIC
----	--------	--	---------

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96 (Версия ПО 3.1 и выше)

1. В Мастере настройки (Startup Wizard) выберите Создать новый эксперимент (Create New Experiment) и убедитесь, что CFX96 выбран в всплывающем списке. Нажмите OK.
2. Во вкладке Протокол (Protocol) окна Настройка эксперимента (Experiment Setup) выберите Создать новый (Create New) и введите следующее:

Таблица 11: Протокол CFX96

Протокол от Асс			
Этап	Температура	Время	Сбор данных
1	95°C	10 мин	
2	95°C	15 сек	
3	56°C	15 сек	
4	72°C	30 сек	Все каналы
	+ Чтение плашки		
5	Начать с шага 2 еще 39 раз		
	КОНЕЦ		

3. Измените Объем образца (Sample Volume) на 20 мкл.
4. Когда закончите, нажмите OK, чтобы сохранить шаблон протокола. Запишите расположение сохраненного файла-шаблона для использования в последующих запусках. Нажмите Далее (Next) для перехода в окна Настройка плашки (Plate setup).
5. Во вкладке Плашка (Plate) нажмите Создать новый (Create New) для создания макета плашки.
6. Нажмите на кнопку Выбрать флуорофоры (Select Fluorophores) и проверьте галочки в клетках рядом с FAM и VIC. Остальные флуорофоры должны остаться не выбранными. Нажмите OK.
 - а. Стандарты 1 и 2 не нуждаются в АСТВ (VIC).
7. Задайте Стандарт, КБМ и Неизвестный на разметке плашки, изменит Тип образца (Sample type).
8. Введите наименования образцов в поле Наименование образца (Sample Name). После завершения нажмите Enter для записи введенного имени. Повторите шаг для каждого образца.
9. Создайте сетки повторов для стандартов и образцов: выделите лунки с повторами и введите номер повтора, начиная с 2 и окне Повтор № (Replicate #). Убедитесь, что установлена галочка Загрузить (Load).
10. Нажмите на Настройки (Settings) и выберите используемый типа плашки (например, BR White или BR Clear).
11. После завершения, нажмите OK для сохранения макета плашки.
12. Нажмите Далее (Next), затем Начать анализ (Start Run).

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени (Версия ПО 1.5 и выше)

1. В разделе Навигатор (Navigator), нажмите Новый (New) для начала нового эксперимента на LightCycler® 480.
2. Выберите Двухцветный гидролизующий зонд/UPL зонд (Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe) для Формата обнаружения (Detection Format).
3. Нажмите Настроить (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
4. Измените объем реакционной смеси на 20 мкл.
5. Введите следующие программные и температурные цели:

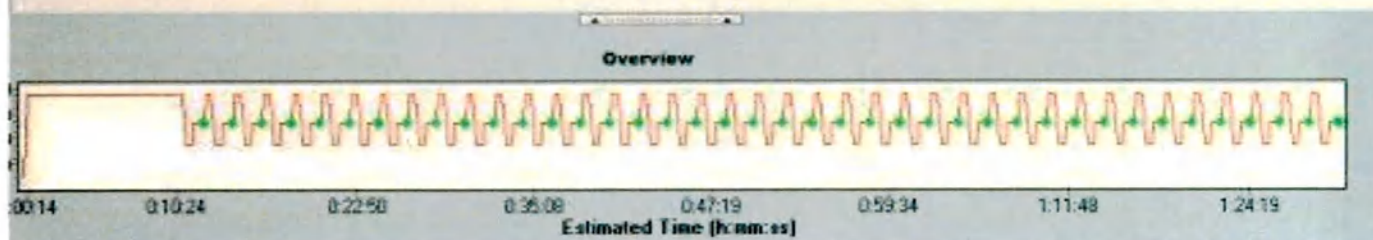
Programs		
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Program	1	None
Cycling	40	Quantification

6. Настройте Температурные цели программы на основе таблицы ниже:
Программа

Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.4	0	0	0	0

7. Настройте Температурные цели циклирования на основе таблицы ниже:
Циклирование

Cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:15	4.4	0	0	0	0
56	None	00:00:15	2.2	0	0	0	0
72	Single	00:00:30	4.4	0	0	0	0



9. Нажмите Начать анализ (Start Run).

Анализ данных

Важно: Для настройки пороговых значений может потребоваться корректировка в зависимости от чувствительности обнаружения флуоресценции каждого термоциклера. Используйте перечисленные ниже настройки в качестве отправной точки.

Пошаговая настройка анализа

Прежде, чем начать:

1. Число копий в стандартах 1-7 можно найти на сайте www.entrogen.com/pi-download. Введите номер лота набора, использованный в анализируемом запуске, в строке поиска под «Загрузить сертификат анализа», чтобы загрузить CA (сертификат анализа, Certificate of Analysis).

Важно: CA сообщает стандартное количество копий в копиях/мкл. Умножьте каждое значение, указанное в CA, на объем, добавленный в реакцию ПЦР (4 мкл), и введите это значение в прибор для ПЦР в реальном времени.

- Стандарты 1-6 необходимы для экстраполяции количества копий на образцы с неизвестным статусом.
- Стандарт 7 можно отнести к отрицательному контролю.
- АСТВ служит внутренним контролем, чтобы гарантировать, что в реакции достаточно амплифицируемой ДНК для интерпретации результатов. См. Минимальное количество копий для АСТВ в таблице анализа в разделе 7.2. АСТВ не включен в первые два стандарта, потому что он является контролем для LLOQ (нижний предел количественной оценки).
- Троекратные повторы стандартов необходимы для получения точного количества копий и для расчета процента метилирования образцов с неизвестным статусом.
- Задайте Задачи (Tasks) для Стандартов:
 - MGMT Стандарты 1-6: "S"
 - MGMT Стандарт 7: "U"
 - АСТВ Стандарты 1-2: "U"
 - АСТВ Стандарты 3-6: "S"
 - АСТВ Стандарт 7: "U"
- Значения Ct повторов могут отличаться друг от друга не более чем на 0.5, чтобы считаться достоверными.

а. Из стандартной кривой можно удалить до двух точек данных.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Версия ПО SDS Software 2.0 и выше)

1. Откройте ПО Applied Biosystems® 7500/7500 Fast.
2. Щелкните папку Открыть (Open).
3. Импортируйте файл с данными формата .eds.
4. Перейдите в Настройки (Setup), затем Настройка плашки (Plate Setup).
5. Выберите Задать Мишени и Образцы (Assign Targets and Samples).
6. Задайте Задачу (Task) "S" для всех Стандартов как описано в 6 шаге раздела "Прежде, чем начать" выше.
7. Добавьте число копий каждого Стандарта из лота, используемого на основе сертификата анализа, в столбце «Количество» для FAM и VIC, соответственно.
 - а. **Примечание:** Не выбирайте Определить и Настроить стандарты (Define and Set Up standards), для этого требуется фактор разбавления, в котором нет необходимости, поскольку включенные стандарты определяются через соответствующее число копий.

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора для ПЦР в реальном времени, используя следующие критерии:

- Ручное пороговое значение (см. таблицу ниже)
- Предложенные ручные исходные данные для обоих детекторов: 3-20.

Таблица 13: пороговые значения

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение VIC
ABI 7500/7500FAST	200,000	10,000

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96 (Версия ПО 3.1 и выше)

1. Откройте ПО Bio-Rad CFX Manager.
2. Выберите Настройки (Settings) в верхнем меню.
3. Наведите указатель мыши на Настройка плашки (Plate Setup) в раскрывающемся меню.
 - а. Выберите Просмотр/Редактирование плашки (View/Edit Plate).
4. Выделите лунки с повторами Стандарта 1.
5. Выберите FAM в раскрывающемся меню под Концентрация (Concentration) и добавьте число копий стандарта из СА.
6. Повторите для Стандартов 2-6.
7. Выберите лунки с повторами Стандарта 3.
8. Выберите VIC в раскрывающемся меню под Концентрация (Concentration) и добавьте число копий стандарта из СА.
9. Повторите для Стандартов 4-6.
10. Стандарт 7 можно задать как неизвестный.

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора для ПЦР в реальном времени, используя следующие критерии:

- Режим определения Ct: Одно пороговое значение (Single Threshold) (см. таблицу ниже)
- Настройки исходных данных: Подбор исходных данных кривой с вычитанием (Baseline Subtracted Curve Fit)
- Предложенные ручные исходные данные для обоих детекторов: 2-20

Таблица 14: пороговые значения

Прибор	Пороговое значение FAM	Пороговое значение HEX (VIC)
Bio-Rad CFX96	1,000	50

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени (Версия ПО 1.5 и выше)

1. Откройте ПО LightCycler® 480.
2. Нажмите на значок навигатора.
3. Импортируйте файл с данными в формате .ixo.
4. Добавьте подмножество макета плашки в Редакторе подмножества (Subset Editor).
5. Выберите Редактор образца (Sample Editor).

- a. Выберите Abs Quant.
- b. Назовите образцы в соответствии с макетом плашки.
- c. Введите число копий стандарта из СА.
 - i. Чтобы добавить VIC Стандарты 3-6 Выберите Filter Combination: 533-580 и добавьте число копий.
 - ii. Чтобы добавить FAM Стандарты 1-6 Выберите Filter Combination: 465-510 и добавьте число копий.
- d. Обязательно выберите Создать повторы (Make Replicates) для всех повторов, включая повторы стандартов.
- e. Для продолжения выберите все образцы в подмножестве, созданном на шаге 4, и обе комбинации фильтров.
6. Выберите Анализ (Analysis) в главном меню слева. В окне Создать новый анализ (Create New Analysis):
 - a. Выберите Abs Quant/Fit Points.
 - b. Во всплывающей форме Создать новый анализ (Create new analysis):
 - i. Выберите Подмножество (Subset), созданное на шаге 4.
 - ii. Выберите программу Циклирование (Cycling).
 - iii. Установите флажок (OK).
7. Выберите вкладку Cycle Range.
8. Выберите детектор VIC, нажав на кнопку Filter Comb HEX/Yellow555 (533-580).
 - a. Первый цикл: 10
 - b. Последний цикл: 40
9. Выберите вкладку Noise Band.
10. Поставьте галочку рядом с Noiseband (Auto) и выберите NoiseBand (STD Mult) в всплывающем меню. В окне STD multiplier введите значение чуть выше фонового шума.

Прибор	FAM STD Mult	VIC STD Mult
LightCycler® 480	100	45

11. Выберите вкладку Анализ (Analysis).
12. Выберите "2" для Fit Points.
13. Выберите Стандарты 3-6.
14. Нажмите Рассчитать (Calculate).
15. Экспортируйте результаты, щелкнув правой кнопкой мыши таблицу результатов со значениями Ct (Cp).
 - a. Повторите описанные выше шаги для стандартов 1-6 для детектора FAM, щелкнув Filter Comb FAM (465-510).
16. Экспортируйте файл и сохраните настройки анализа.

Дополнительно: Сохраните эти настройки как шаблон, поставив галочку рядом с Применить шаблон. Сохраните шаблон в папке шаблонов. Для будущих запусков просто выберите применить шаблон.

Интерпретация результатов

Ручной анализ данных – Специфичный прибору

Примечание: Стандарт 7 содержит синтетические последовательности ДНК, соответствующие неметилированному промотору MGMT. В нем не должно появляться сигналов VIC или FAM.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Версия ПО SDS Software 2.0 и выше)

1. Программное обеспечение ABI автоматически рассчитает количество копий для ACTB (VIC) и MGMT (FAM) каждого образца с неизвестным статусом.
 - a. В разделе Анализ (Analysis) > Стандартная кривая (Standard Curve) убедитесь, что соблюдаются следующие параметры:
 - i. $R^2 \geq 0.95$ для MGMT (FAM) и ACTB (VIC) одновременно
 - ii. ACTB (VIC):
 1. Эффективность (Efficiency) %: 80-110%
 2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.92
 - iii. MGMT (FAM):
 1. Эффективность (Efficiency) %: 85- 110%

2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.74

iv. Альтернативные показатели контроля качества как для ACTB (VIC), так и для MGMT (FAM):

1. Значения Ct повторов одного образца должны находиться в пределах 0,5 Ct друг от друга.

Примечание: При расчете процента эффективности для учета ошибок пипетирования на стандартной кривой можно пропустить до двух точек данных.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96 (Версия ПО 3.1 и выше)

1. Программное обеспечение Bio-Rad CFX96 автоматически рассчитывает количество копий для ACTB (HEX) и MGMT (FAM) каждого образца с неизвестным статусом. Значения можно найти в таблице результатов на вкладке Количественные данные (Quantification Data).

a. На вкладке Количественная оценка (Quantification) в квадранте со стандартной кривой убедитесь, что соблюдаются следующие параметры:

i. $R^2 \geq 0.95$ для MGMT (FAM) и ACTB (HEX) одновременно

ii. ACTB (HEX):

1. Эффективность (Efficiency) %: 80-110%

2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.92

iii. MGMT (FAM):

1. Эффективность (Efficiency) %: 85- 110%

2. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.74

Примечание: При расчете процента эффективности для учета ошибок пипетирования на стандартной кривой можно пропустить до двух точек данных.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени (Версия ПО 1.5 и выше)

1. Программное обеспечение Roche LightCycler® 480 автоматически рассчитывает количество копий для ACTB (VIC) и MGMT (FAM) каждого образца с неизвестным статусом. Значения можно найти в разделе анализа запуска.

a. $R^2 \geq 0.95$ для MGMT (FAM) и ACTB (VIC) одновременно

b. В окне Анализ (Analysis) выберите вкладку Анализ (Analysis).

i. Выберите Filter Comb 533-580 VIC.

ii. Убедитесь, что настройки VIC верны.

iii. Выберите Стандарты 3-6 и просмотрите параметры запуска слева от квадранта стандартной кривой и убедитесь, что соблюдаются следующие параметры:

1. ACTB (VIC):

a. Эффективность (Efficiency) %: 80-110%

b. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.92

2. Повторите эти шаги для канала FAM для стандартов 1-6. MGMT (FAM):

a. Эффективность (Efficiency) %: 85- 110%

b. Наклон (Slope): от -3.1 до -3.74

Расчет процента метилирования промотора MGMT для всех приборов.

Полученное при расчете значение процента метилирования определяет статус образца:

- Если значение выше или равно 3.125 – образец считается метилированным по промотору MGMT
- Если значение ниже 3.125 – образец считается неметилированным по промотору MGMT

Ниже представлена инструкция по расчету значения:

1. Для каждого образца сначала проанализируйте канал ACTB (VIC), следуя приведенным ниже рекомендациям:

Таблица 15: рекомендации:

ACTB (VIC)	Интерпретация
# копий ACTB <200	Недостаточная начальная концентрация. Требуется повторный запуск.
# копий ACTB >9500	Избыточная начальная концентрация. Требуется повторный запуск.
$200 \leq \# \text{ общих копий ACTB} \leq 9500$	Продолжите расчет % метилированного промотора MGMT с коэффициентом пересчета, назначенным для каждого лота.

2. Используйте следующее уравнение для расчета процента метилированных промоторов MGMT в образце. Лот-специфичный коэффициент конверсии (CF, conversion factor) указан в Сертификате анализа набора. Для ДНК, выделенной из микро- или макродиссекций, процент содержания опухолевых клеток будет близок к 1,0 для расчета:

$$\left(\frac{FAM (MGMT) \text{ copy number}}{VIC (ACTB) \text{ copy number}} \div \% \text{ Tumor Cell Content} \right) \times 100 \times CF = \% \text{ methylated MGMT promoter}$$

Примечание: % Опухолевых клеток в приведенном выше уравнении необходимо выразить десятичным числом (50% -> 0.5).

Используемые символы

Таблица 16: Символы на маркировке, которые может содержать медицинское изделие:

Символ	Значение	Символ	Значение
	Номер по каталогу		Знак соответствия применимым требованиям к продукции, продаваемой на территории Великобритании
	Температурный диапазон		Знак CE
	Температурный диапазон		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Осторожно (Подробные условия хранения указаны в инструкции по применению)		Код партии
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде		Использовать до
	Не допускать воздействия солнечного света		Изготовитель
	Не допускать воздействия влаги		Уполномоченный представитель в Европейском Сообществе
	Хрупкое, обращаться осторожно		

Примечание* На русскоязычной маркировке медицинского изделия размещен специальный QR-код, при наведении на который откроется инструкция по применению данного набора в электронном формате.

Утилизация

Изделие следует утилизировать как потенциально опасные отходы в соответствии с требованиями законодательства об охране окружающей среды или иного законодательства соответствующей страны. Для обеспечения соответствия рекомендуется обратиться в местные государственные организации и/или аккредитованные компании по утилизации отходов для получения информации.

Сведения о производителе и его уполномоченном представителе

Производитель: EntroGen, Inc. ЭнтроГен, Инк.

Адрес производителя : 20950 Warner Center Ln., Suite B & D, Woodland Hills, California, 91367, United States/
20950 Ворнер центр Лн., офисы Б и Д, Вудлэнд Хиллс, Калифорния, 91367, США

Номер телефона: 1 818 716 1070.

Адрес электронной почты info@entrogen.com

Уполномоченный представитель: Общество с ограниченной ответственностью "БиоВитрум"

Адрес представителя: Российская Федерация, 199106, Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 68, лит. А

Номера телефонов: 7 (812) 305 06 06

Адрес электронной почты: otk@biovitrum.ru

Адрес места производства: EntroGen, Inc. ЭнтроГен, Инк. 20950 Warner Center Ln., Suite B & D, Woodland Hills, California, 91367, United States/ 20950 Ворнер центр Лн., офисы Б и Д, Вудлэнд Хиллс, Калифорния, 91367, США

Гарантийные обязательства и правила приема рекламаций

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие технических характеристик изделия всем требованиям применимых национальных и международных стандартов в течение всего гарантийного срока при соблюдении потребителем условий эксплуатации, транспортирования и хранения.

По всем вопросам, связанным с обращением медицинского изделия на территории РФ, необходимо обратиться к уполномоченному представителю производителя:

Общество с ограниченной ответственностью «БиоВитрум»

ООО «БиоВитрум»

199106, г. Санкт-Петербург, Большой пр. В.О. дом 68 лит.А

Тел.: +7 (812) 305-06-06

e-mail: otk@biovitrum.ru

[Перевод с английского языка на русский язык]

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

Штат Калифорния
Округ ЛОС-АНДЖЕЛЕС

Подписано под присягой (или подтверждено) в моем присутствии сегодня, 14 января 2025 г.
НИКОЛЬ ТЕРМАН, подтвердившей мне на основе достаточных доказательств, что она является лицом, явившимся ко мне.

[Штамп:
СЮЗАННА ГУРОГЛЯН
Лицензия № 2440785
Нотариус штата Калифорния
Округ Лос-Анджелес
Моя лицензия действительна до 07 марта 2027 г.
NSP1]

(Печать)

Подпись /подпись/

[На бланке компании «Энтроген, Инк.»]

УТВЕРЖДЕНО

«Энтроген, Инк.»

Николь Терман, Контролирующее лицо

/подпись/

подпись, штамп

10 января 2025 г.

дата

[Печать компании «Энтроген, Инк.»]

[Далее следует текст документа «Инструкция по применению медицинского изделия „Набор реагентов для in vitro диагностики для обнаружения метилирования гена MGMT методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин (MGMT Methylation Detection Kit), 60 реакций“

Версия 1.6», представленный на русском языке.]

Перевела Францева Елена Геннадьевна



Российская Федерация

Двенадцатого февраля две тысячи двадцать пятого года

Я, Король Виктория Алексеевна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Францевой Елены Геннадьевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: №08/82-н/77-2025- 5-312

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

ГЕРБОВАЯ ПЕЧАТЬ
НОТАРИУСА

ПОДПИСЬ

В.А. Король

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 69 лист(-а,-ов)

ПОДПИСЬ

В.А. Король

ГЕРБОВАЯ ПЕЧАТЬ
НОТАРИУСА

Российская Федерация
Город Москва

Двенадцатого февраля две тысячи двадцать пятого года

Я, Король Виктория Алексеевна, нотариус города Москвы, свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: № 08/82-В/77-2425-5-313
Уплачено за совершение нотариального действия 7000 руб.

В.А. Король



Всего прошнуровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 70 лист(-а, -ов)

д

