



## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

### AVT-BREAST

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СХИЛЬНОСТІ  
ДО ОНКОПАТОЛОГІЙ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

IVD



100



**ТОВ «АСТРАВІР ТЕКНОЛОДЖІ»**  
61011, Україна, м. Харків,  
вул. Полтавський шлях 6, оф.25  
+380990325214  
info@astravirtech.com.ua  
www.astravirtech.com.ua

## 1. Призначення

Цей набір призначено для клінічної ПЛР-діагностики мутацій в генах BRCA 1 та BRCA2, що асоційовані із розвитком новоутворень молочної залози. Набір дозволяє проводити *in vitro* детекцію послідовностей, характерних для восьми мутацій

- BRCA 1 185delAG
- BRCA 1 3875delGTCT
- BRCA 1 2080delA
- BRCA 1 3819delGTAAA
- BRCA 1 300T>G
- BRCA 1 4153delA
- BRCA 1 5382insC
- BRCA 2 6174delT

## 2. Принцип аналізу

Виявлення мутацій здійснюється шляхом постановки ПЛР в реальному часі. З цією метою до набору включено термостійку ДНК-полімераза Taq. Валідність отриманих результатів забезпечується мультитаргетністю суміші праймерів, а також наявністю внутрішнього контролю (IC) та позитивного контрольного зразка (PC).

## 3. Специфікації

**Склад:** 100 реакцій / набір

**Чутливість:** 96.0%

**Специфічність:** 99.3%

**Нижня межа аналітичної чутливості:** 10 копій / реакцію

**Час ампліфікації / повного проходження процедури:** 1 год. 15 хв. / 2 год. 25 хв.

## 4. Склад набору

Назва реагенту	Наклейка на пробірці	Об'єм	Примітка
ПЛР Мастер Мікс	4X червона	4x1000 µl	Базовий розчин для проведення ПЛР, містить суміш дНТФ, Mg <sup>2+</sup> і т.д.
Суміш праймерів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	жовта	500 µl	Містить праймери, специфічні до мутацій
Позитивний контрольний зразок (PC)	PC чорна	2x100 µl	Слугує для загального контролю постановки
TE буферний розчин	TE біла	4x1000 µl	Ультра-чистий, вільний від нуклеаз розчин

## 5. Запобіжні заходи

Всі реагенти, що входять до складу набору, призначені для діагностики «in vitro».

Робота повинна проводитися в лабораторії, що виконує молекулярно-біологічні (ПЛР) дослідження клінічного матеріалу на наявність збудників інфекційних хвороб, з дотриманням державних санітарних норм і правил ДСП №9.9.5-080-2002 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю», ДСанПіН 9.9.5-153–2008 «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

При роботі завжди слід виконувати наступні загальні вимоги:

- Розглядати всі досліджувані зразки як інфекційно-небезпечні.
- Прибирати і дезінфікувати розлиті зразки або реактиви, використовуючи відповідні дезінфікуючі засоби.
- Лабораторний процес має проводитись в одному напрямку (виділення → детекція). Аналіз проводиться в окремих приміщеннях (зонах). Роботу слід починати в Зоні Виділення, продовжувати в Зоні Ампліфікації і Детекції. Не повертати зразки, устаткування і реактиви в зону, в якій була проведена попередня стадія процесу.



**УВАГА!** При видаленні відходів після ампліфікації (пробірок, що містять продукти ПЛР) неприпустимо відкривання пробірок і розбризування вмісту, оскільки це може привести до контамінації продуктами ПЛР лабораторної зони, устаткування і реагентів.

- Застосовувати набір суворо за призначенням, згідно цієї інструкції.
- Допускати до роботи з набором тільки спеціально навчений персонал.
- Не використовувати набір після закінчення терміну придатності.
- Використовувати всі необхідні ЗІЗ.
- Уникати контакту реагентів даного набору зі шкірою, очима і слизовими оболонками. При контакті негайно промити уражене місце водою і звернутися за медичною допомогою.

## 6. Матеріали та обладнання, необхідні для використання набору

- RT-термоциклер (планшетний, напр. Bio-Rad CFX-96; роторний, напр. Rotor-Gene 6000; їхні аналоги).
- Центрифуга з прискоренням не менше 13,000 g.
- Вортекс будь-якої моделі.
- ПЛР бокс з УФ-лампюю.

- Рукавички одноразові без тальку (латексні або нітрилові).
- Дозатори на 1-20, 20-200 і 200-1000  $\mu\text{L}$  .
- Стерильні наконечники з фільтрами на 20, 200 і 1000  $\mu\text{L}$ .
- Мікроцентрифужні пробірки 1,5 mL.
- Мікропробірки з прозорими кришками 0,2 mL.
- Транспортне середовище для протекції ДНК/РНК.
- Набір для виділення нуклеїнових кислот (на сорбенті або афінних мембранах).

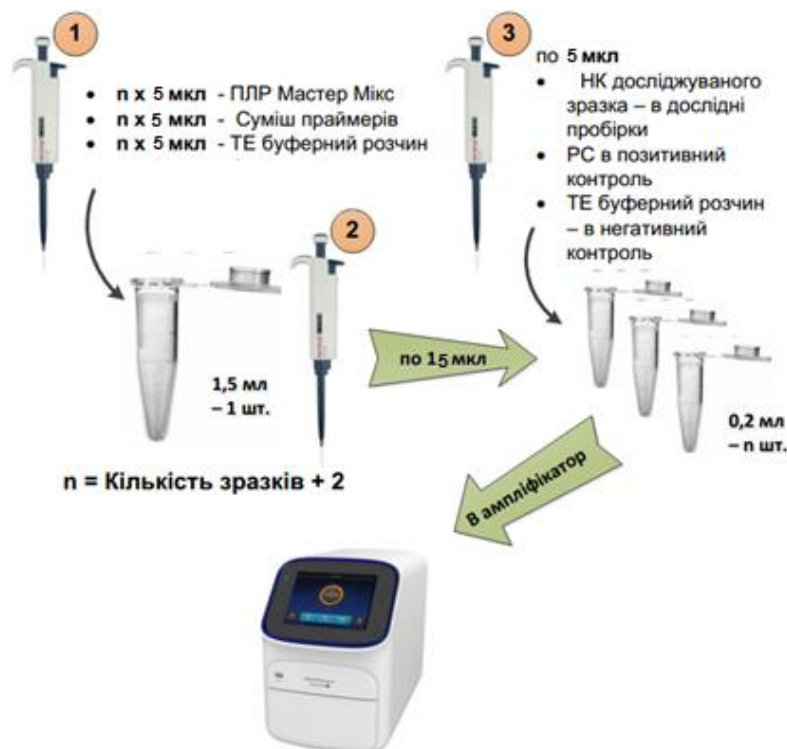
## 7. Вимоги до забору зразків та пробопідготовки

**7.1. Клінічний матеріал.** Отримання зразків з організму пацієнта проводиться згідно Методичних рекомендацій «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції» МОЗ України, (Наказ МОЗ №662 від 30.07.2013, див. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0662282-13/card2#Card>).

Після забору біологічний матеріал має зберігатися за температури, вказаної в Методичних рекомендаціях МОЗ щодо цього типу клінічного матеріалу, у стерильному й ретельно закритому лабораторному посуді. Транспортування клінічного зразка має проводитись у **лізуючому транспортному середовищі**.

**7.2. Екстракція ДНК.** Процедуру лізису біологічного зразка, виділення з нього тотальної ДНК та її очистки проводять за допомогою відповідних комерційних наборів реагентів

## 8. Підготовка до проведення RT-ПЛР.



**УВАГА!** Внесення ТЕ буфера в пробірку з негативним контролем є обов'язковою умовою коректної роботи NC.



**УВАГА!** Реакції рекомендовано проводити в білому непрозорому пластику

**а)** Повільно, за кімнатної температури (18-23° С) розморозити реагенти набору і розчин ДНК з клінічних зразків. Перемішати вміст кожної мікроцентрифужної пробірки на вортексі та відцентрифугувати протягом 2-3 с для усунення крапель і бульбашок.

**б)** Встановити у штативі в попередньо стерилізованому ПЛР боксі порожні пробірки:

- **1 шт.** об'ємом **1.5 mL** – для приготування загального стоку реакційної суміші.
- **$n$**  мікроцентрифужних пробірок об'ємом **0.2 mL** з прозорими кришками – для подальшого завантаження у термоциклер, де  $n$  – кількість лунок, які будуть зайняті в термоциклері, тобто: загальна кількість зразків, а також 2 додаткові пробірки, призначені для негативного контролю (NC) та позитивного контролю (PC).



**УВАГА!** Для завантаження в термоциклер **iCycler iQ5** BioRad рекомендується використовувати мікропробірки з білого непрозорого пластику з прозорими кришками, а для завантаження в інші термоциклери – з прозорого пластику.

**в)** Розрахувати необхідний об'єм реакційної суміші, виходячи з того, що для проведення 1 реакції потрібно взяти **5  $\mu$ L розчину з праймерами, 5  $\mu$ L суміші Мастер Мікс, 5  $\mu$ L TE буферу**, враховуючи загальну кількість клінічних зразків, 1 позитивний контроль (PC) і 1 негативний контроль (NC). Виготовити загальний сток реакційної суміші згідно з цим прописом, ретельно перемішати його на вортексі й відцентрифугувати впродовж **2-3 сек** для усунення крапель і бульбашок.

**г)** Розподілити реакційну суміш порціями по **15  $\mu$ L** по підготовлених раніше пробірках об'ємом **0.2 mL**. Промаркувати, **не затуляючи написом прозорої кришки** (напр. на згинах кришок).

**д)** Внести у пробірки об'ємом **0.2 mL** по **5  $\mu$ L розчину очищеної ДНК** з клінічних зразків після екстракції. В дві окремі пробірки, залишені під контролі постановки, внести **5  $\mu$ L позитивного контрольного зразка (PC)** і **5  $\mu$ L ультрачистого TE буферу** в якості негативного контролю (NC).



**УВАГА!** Робота з ДНК має проводитися швидко для уникнення її деградації.

**е)** Встановити пробірки в лунки термоциклера. Закрити кришку приладу.

## 9. Налаштування термоциклера.

**9.1. Загальний протокол ампліфікації.** При використанні будь-якої моделі термоциклера слід дотримуватися наступного температурного режиму при проведенні зворотної транскрипції / ампліфікації цільових фрагментів кДНК:

**Стадія 1** («гарячий старт» ДНК-полімерази): **95° C** впродовж **12 хв.**

**Стадія 2**(ампліфікація цільової послідовності), **50 циклів:**

Крок 1: **95° C** впродовж **15 сек.**

Крок 2: **60° C** впродовж **15 сек** (*детекція відбувається на цьому етапі*).

Крок 3: **72° C** впродовж **35 сек.**

**Стадія 3** **30° C** впродовж **30 сек**

**Стадія 4** (*плавлення*) **від 30°C до 70°C** з кроком **1°C** та **15 сек**



Детекція флуоресцентного сигналу відбувається за температури **60° C** за трьома каналами, зокрема:

Суміш праймерів	Мутація	Канал FAM	Канал HEX
1	BRCA 1 185delAG	44	52
2	BRCA 1 3875delGTCT	50	57
3	BRCA 1 2080delA	46	52
4	BRCA 1 3819delGTAAA	37	53
5	BRCA 1 300T>G	55	59
6	BRCA 1 4153delA	46	52
7	BRCA 1 5382insC	46	53
8	BRCA 2 6174delT	40	49

В таблиці вказано температури плавлення піків ПЛР продукту, який відповідає мутантному алелю

- за каналом **Cy5** детектується внутрішній контроль.

Детальні інструкції щодо налаштування обладнання від різних виробників під наведений вище протокол описано далі.

## 9.2. Налаштування устаткування Bio-Rad CFX-96.

а) Після увімкнення приладу запустити програму «**CFX Manager**»

б) Натиснути кнопку «**Create a new run**».

в) У вікні, що відкрилося, вибрати вкладку «**Protocol**» і натиснути «**Create new**». Відкриється вікно «**Protocol Editor**», у якому необхідно задати об'єм реакційної суміші (**Sample volume**) як **20 µL** і прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 7.1.



**ПРИМІТКА.** У випадку, якщо обладнання вже використовувалося з цією реагентною системою, слід перейти за директорією **File > Repeat an Experiment** і вибрати файл останньої постановки.

г) Перейти на вкладку «**Plate**» й натиснути кнопку «**Create New**». Відкриється вікно «**Plate Editor**», де необхідно в полі «**Load**» обрати канали детекції флуоресцентного сигналу **FAM**, **HEX** та **Cy5**, а також внести у відповідні лунки номери і/або назви зразків, в т.ч. контрольних.

д) Натиснути кнопку **OK**, зберегти файл і запустити процес ампліфікації.

## 9.3. Налаштування устаткування Corbett Rotor-Gene 6000.

а) У основному меню програми натиснути кнопку «**New**», після чого обрати шаблон «**Advanced**», виділити **Dual Labeled Probe / Hydrolysis Probes (TaqMan)** і натиснути кнопку «**New**».

б) У вікні, що відкрилося, вибрати використовуваний ротор (на 36 / 72 лунки), натиснути кнопку «**Next**».

в) У вікні, що відкрилося, вибрати чи завдати оператора, вказати об'єм реакційної суміші (Sample volume) як **20  $\mu$ L**, натиснути кнопку «**Next**».

г) У вікні, що відкрилося, прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 9.1.

д) У розділі «**Channel Setup**» натиснути кнопку **Gain Optimization**, обрати канали **Green** (відп. FAM), **Yellow** (відп. HEX) та **Red** (відп. Cy5), призначити для них калібрування перед першим вимірюванням (кнопка «**Perform Calibration Before 1st Acquisition /Perform Optimisation Before 1st Acquisition**»). Натиснути кнопку «**Close**», а після цього – кнопку «**Next**».

е) Запустити ампліфікацію кнопкою «**Start run**», зберегти файл експерименту на диску, заповнити таблицю зразків.

#### 9.4. Налаштування устаткування ABI Prism 7500.

а) Відкрити вікно «**Settings**», пов'язати виставлені в приладі зразки із відповідними категоріями в програмному забезпеченні.

б) Виставити канали детекції **FAM**, **HEX** та **Cy5** у полях «**Reporter**», поля «**Quencher**» можна лишити незаповненими або прописати **BHQ**. Поле «**Passive reference**» лишити незаповненим.

в) Відкрити вікно «**Instrument**» і прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 7.1.

г) Зберегти файл на диску й запустити процес ампліфікації.

#### 9.5. Налаштування устаткування BioRad IQ-5.

а) Ввімкнути прилад, запустити програму **iCycler iQ5**.



**УВАГА!** Перед початком роботи прилад має бути прогрітий не менше **15 хв.**

б) Увійти в режим створення нового протоколу ампліфікації за допомогою кнопки «**Create new**» в модулі «**Workshop**».

в) У вікні, що відкрилося, задати параметри ампліфікації.



**УВАГА!** Критичною особливістю роботи цієї реагентної системи з приладом IQ-5 є **подовжений період детекції сигналу** (Стадія 3, Крок 2) під час гібридизації праймерів за температури 58° С. На відміну від інших моделей термоциклерів, на цьому устаткуванні даний етап має тривати не 10 сек, а **25 сек**. У протилежному випадку збір даних не відбудеться.

г) Створити новий планшет зразків («**Plate Setup**»). Задати схему розташування пробірок в планшеті.

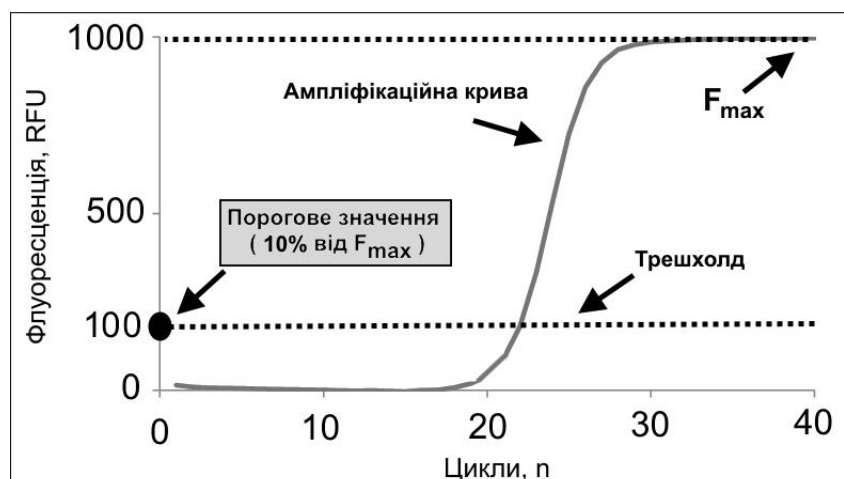
д) У вікні, що відкрилося, всі клінічні зразки позначити як «**Unknown**», для всіх зразків задати вимір флюоресценції по каналах **FAM**, **HEX** та **Cy5**.

е) Задати об'єм реакційної суміші («**Sample Volume**») як **20 мкл**, тип кришок («**Seal Type**»), тип пробірок («**Vessel Type**»). Ампліфікацію необхідно проводити з використанням такого ж типу пластику, в якому проводилося калібрування приладу. Зберегти схему планшета.

є) Запустити термоциклер у роботу за допомогою кнопки «**Run**». У вікні, що відкрилося, зазначити «**Use Persistent Well Factors**», натиснути кнопку «**Begin Run**» і зберегти експеримент.

## 10. Інтерпретація результатів

**10.1. Визначення трешхолда.** Процедура аналізу даних, отриманих за допомогою цієї діагностичної системи, передбачає визначення порогового значення флуоресценції (**threshold**), спираючись на максимальне значення флуоресценції (**F<sub>max</sub>**), яке спостерігається на фазі плато ампліфікаційної кривої **для позитивного контрольного зразка**.



Зокрема, трешхолд має бути заданий як **10% від чисельного значення F<sub>max</sub> у РС** для всієї відповідної постановки, але окремо по кожному з каналів детекції **FAM**, **HEX** і **Cy5**. Значення трешхолда має бути розраховане за допомогою програмного забезпечення, яке використовується в лабораторії, згідно з інструкціями виробника.

**10.2. Контроль постановки РТ-ПЛР.** Перед початком аналізу основного масиву даних, отриманих в постановці, необхідно оцінити загальну якість її проведення по позитивному (РС) та негативному (NC) контрольним зразкам. Значення C<sub>t</sub>, які свідчать про валідність отриманих результатів, мають бути наступними:

	<b>FAM</b>	<b>HEX</b>	<b>Cy5</b>
<b>РС</b>	≤ 40	≤ 40	≤ 35

**NC**

Відсутній

Відсутній

Відсутній



**УВАГА!** Важливим критерієм якості проведення реакції також слугує S-подібна форма кривих ампліфікації. Ті криві, які не відповідають цьому критерію, мають бути визнані **невалідними**. Це стосується як контрольних, так і дослідних зразків.

**10.3. Контроль проходження ампліфікації.** Критерієм валідності даних, отриманих по кожному зразку, є наявність у ньому **амплікону внутрішнього контролю**, який детектується по каналу **Sy5**. Відсічне значення (cut-off value)  $C_t$  для IC дорівнює **35 циклам**.



**УВАГА!** Якщо продукт, який детектується по каналу Sy5, відсутній або має  $C_t > 35$  **циклів**, результат має бути визнаний невалідним і постановку з цим зразком необхідно повторити, починаючи з етапу виділення. Винятком є результат, коли по каналах **FAM** і **HEX** детектується висока копійність вірусної РНК (див. нижче).

**10.4. Аналіз даних від клінічних зразків.** Інтерпретацію даних, отриманих за допомогою цієї реагентної системи, слід проводити згідно з відсічними значеннями  $C_t$ , наведеними у таблиці:



**УВАГА!** Результати ПЛР-аналізу є лише частиною даних, які слугують за основу для постановки остаточного діагнозу. Після їх отримання вони мають бути передані лікарю, який використовує їх разом з іншими клінічними даними для винесення комплексного висновку.

<b>FAM / HEX</b>	<b>Sy5</b>	<b>Інтерпретація</b>
<b><math>\leq 40</math></b>	<b><math>\leq 35</math></b>	<b>Зразок позитивний</b>
Відсутні або <b><math>&gt; 40</math></b>	<b><math>\leq 35</math></b>	<b>Зразок негативний</b>
<b>Відсутні або <math>&gt; 40</math> обидва</b>	<b><math>&gt; 35</math></b>	<b>Результат невалідний, необхідне повторення процедури, починаючи з екстракції РНК</b>

**5) Інтерпретувати отримані по каналах FAM, HEX, ROX, Sy5 за кривими плавлення керуючись наступним:**

## 11. Транспортування і зберігання

Реагенти набору мають зберігатися та транспортуватись за температури **мінус  $20 \pm 5^\circ\text{C}$** . Всі компоненти лишаються стабільними до закінчення терміну придатності, що складає **12 місяців** з дати виготовлення, в разі дотримання рекомендованих умов зберігання.



**УВАГА!** Для уникнення пошкодження ферментів, які входять до складу набору **категорично забороняється** транспортування та зберігання набору за температури **нижчої за мінус  $25^\circ\text{C}$** .




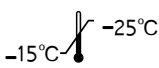

## 12. Технічна підтримка

У разі виникнення будь-яких технічних проблем при використанні набору звертайтеся до спеціалістів підприємства-виробника – компанії ТОВ «АСТРАВІР ТЕКНОЛОДЖІ».

Рекламації на якість наборів надсилайте підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки аналізу з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.

## 13. Пояснення до символів

	Виробник
	Кількість досліджень
	Медичний виріб для діагностики IN VITRO
	Температурне обмеження
	Дата виробництва (формат РРРР-ММ-ДД)



Використати до (формат РРРР-ММ-ДД)



Номер серії



Номер за каталогом



Ознайомлення з інструкціями для використання



Засторога