



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«28» августа 2017 г

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для определения статуса мутаций
гена *EGFR* методом ПЦР-РВ (Тест-EGFR)
по ТУ 9398-004-97638376-2015 в исполнениях:

- 1) «Тест-EGFR-12» на 12 определений,
- 2) «Тест-EGFR-24» на 24 определения

ТУ 9398-004-97638376-2015

Версия 4 от 28.08.2017

Содержание

1. Назначение	3
2. Характеристика набора	5
3. Принцип действия	7
4 Аналитические и диагностические характеристики набора	8
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-EGFR»	9
6. Меры предосторожности при работе с набором	10
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	11
8. Анализируемые пробы	12
9. Подготовка компонентов набора для исследования	14
10. Проведение анализа	15
11. Регистрация и интерпретация результатов	19
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	21
13. Утилизация	21
14. Гарантийные обязательства, контакты	22

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение: Набор реагентов предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического профиля при обследовании пациентов с диагнозом метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) III- IV стадии для качественного определения статуса мутаций L858R, T790M и делеции (del) в 19 экзоне гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе свободно циркулирующей ДНК, содержащей опухолевую ДНК, выделенной из плазмы крови, для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы *EGFR* и мониторинга ответа на них.

Клиническая значимость теста, выполняемого с помощью набора реагентов, состоит в определении показаний к таргетной терапии (направленного лечения) и мониторинга ответа при патологии – метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) III-IV стадии, с помощью выявления методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией активирующих мутаций L858R, T790M и делеции в экзоне 19 гена *EGFR*.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы свободно циркулирующей ДНК, содержащей опухолевую ДНК, выделенной из плазмы крови.

Анализ для установления статуса мутаций L858R, T790M и делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR* рекомендуется проводить на поздних стадиях (III- IV стадия) немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), так как на ранних стадиях опухолевой прогрессии циркулирующая опухолевая ДНК еще не попала в кровоток.¹

¹ Еникеев Р.Ф., Гордиев М.Г., Моммаева М.С. Тестирование *EGFR*-мутаций при раке легкого. Собственный опыт / Р.Ф. Еникеев, М.Г. Гордиев, М.С. Моммаева // Поволжский онкологический вестник. – 2012. - № 4. – С. 33-38.

Принцип определения.

Анализ проводится методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Продукты ПЦР исследуемого гена *EGFR* идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зонда меченного FAM. Набор содержит реагенты для анализа мутаций L858R, T790M и делеций в экзоне 19 гена исследуемого *EGFR* и реагенты для внутреннего эндогенного контроля (*Норма*). Внутренний эндогенный контроль (*Норма*) позволяет выявить наличие ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам. ПЦР смеси состоят из всех необходимых реагентов. Набор также включает положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). В качестве положительного контрольного образца (ПКО) используют 5% ПКО, представляющий собой смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Jurkat концентрацией 400 ГЭ/мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 20 ГЭ/мкл, содержащей эквимольную смесь мутаций L858R, T790M и делеций.

Концентрация ПКО выбрана исходя из средних значений концентрации свободно циркулирующей ДНК (200-500 копий/мкл раствора ДНК), выделяемой из плазмы крови

Геномная ДНК из культуры клеток человека линии Jurkat, используемая для получения положительного контрольного образца, контрольного образца для определения чувствительности и внешнего контроля амплификации имеет отрицательный статус гена *EGFR* по мутациям L858R, T790M и делециям (del) в 19 экзоне.

В качестве ОКО используют воду деионизованную.

Делеции в 19 экзоне (Del19) или замена L858R в 21 экзоне являются активирующими мутациями гена *EGFR* связанными с чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназы (ТК), поэтому опухоли с мутациями Del19 или L858R наиболее чувствительны к терапии ингибиторами тирозинкиназы (ТК).

Назначение ингибиторов тирозинкиназы (ТК) больным НМРЛ с наличием мутаций Del19 или L858R гена *EGFR*, является эффек-

тивным методом лечения, приводящим к существенному сокращению размеров опухолевых очагов. Определение этих мутаций в плазме крови в динамике позволяет оценивать ответ на проводимую терапию.

Мутация Т790М связана с устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназы (ТК) и ответственна за резистентность к терапии ингибиторами ТК. Выявление мутации Т790М позволяет оптимизировать тактику лечения, выявить опухоли, не чувствительные к проводимой терапии и своевременно назначить пациенту другой режим химиотерапии, что является клинически и экономически выгодным, учитывая необходимость длительного применения и высокую стоимость терапии.²

Показания к применению. Набор реагентов «Тест-EGFR» рекомендуется пациентам с диагнозом метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) III- IV стадии для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR и мониторинга ответа на них.

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического профиля. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

Общее время проведения анализа составляет 2-2,5 ч.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов «Тест-EGFR» выпускается в двух вариантах исполнения:

- 1) «Тест-EGFR-12» на 12 определений;
- 2) «Тест-EGFR-24» на 24 определения.

² Real-time PCR and digital PCR approach for detecting EGFR status in plasma of patients with NSCLC / M. Gordiev [et al.] // Journal of Thoracic Oncology. - 2016. - V 11. - N 4. - p. 124-125. doi:10.1016/S1556-0864(16)30263-5.

Каждый набор «Тест-EGFR-12» на 12 определений содержит реагенты, рассчитанные на проведение анализа 12 образцов с учетом положительных и отрицательных контролей.

Каждый набор «Тест-EGFR-24» на 24 определения содержит реагенты, рассчитанные на проведение анализа 24 образца с учетом положительных и отрицательных контролей.

Состав набора

Наборы реагентов на 12 и 24 определения включают:

№ пп	Название реагента	Описание	Исполнение	
			«Тест-EGFR-12»	«Тест-EGFR-24»
1	ПЦР-смесь Норма, Норма	Прозрачная жид- кость розового цвета	1 пробирка, (192 мкл)	1 пробирка, (384 мкл)
2	ПЦР-смесь del, del	Прозрачная жид- кость розового цвета	1 пробирка, (288 мкл)	2 пробирки (по 288 мкл)
3	ПЦР-смесь L858R, L858R	Прозрачная жид- кость розового цвета	1 пробирка, (288 мкл)	2 пробирки (по 288 мкл)
4	ПЦР-смесь T790M, T790M	Прозрачная жид- кость розового цвета	1 пробирка, (288 мкл)	2 пробирки (по 288 мкл)
5	ПКО 0,5%, K+ 0,5%	Прозрачная бес- цветная жид- кость	1 пробирка, (400 мкл)	2 пробирки (по 400 мкл)
6	ПКО 5%, K+ 5%	Прозрачная бес- цветная жид- кость	1 пробирка, (400 мкл)	2 пробирки (по 400 мкл)
7	ПКО-1к 0%, K+ 1к 0%	Прозрачная бес- цветная жид- кость	1 пробирка, (150 мкл)	2 пробирки (по 150 мкл)
8	ПКО-10к 0%, K+ 10к 0%	Прозрачная жид- кость розового цвета	1 пробирка, (150 мкл)	2 пробирки (по 150 мкл)
9	ОКО, K-	Прозрачная бес- цветная жид- кость	1 пробирка, (1600 мкл)	2 пробирки (по 1600 мкл)

№ пп	Название реагента	Описание	Исполнение	
			«Тест-EGFR-12»	«Тест-EGFR-24»
10	Тақ-полимераза, Тақ	Прозрачная бес- цветная жид- кость	1 пробирка, (55 мкл)	1 пробирка, (110 мкл)

Примечание:

- ПКО 0,5% - содержит 400 ГЭ/мкл ДНК без мутации и 2 ГЭ/мкл ДНК с мутациями L858R, T790M и делециями в эквимольной концентрации
- ПКО 5% - содержит 400 ГЭ/мкл ДНК без мутации и 20 ГЭ/мкл ДНК с мутациями L858R, T790M и делециями в эквимольной концентрации
- ПКО-1к 0% - содержит 100 ГЭ/мкл ДНК без мутации (1 000 ГЭ на одну реакцию)
- ПКО-10к 0% - содержит 1000 ГЭ/мкл ДНК без мутации (10 000 ГЭ на одну реакцию)

Наборы поставляются в двух вариантах – на 12 и на 24 определения, включая все положительные и отрицательные контроли. То есть, даже при условии единичных постановок анализов со всеми контролями реагентов в наборе варианта «12» или «24» достаточно реактивов для постановки 12 и 24 клинических образцов, соответственно. Допускается одновременная постановка нескольких клинических образцов. В этом случае набором варианта «12» можно выполнить анализ до 24, а варианта «24» – до 48 клинических образцов, т.к. при одновременной постановке нескольких образцов сокращаются расходы реактивов на положительные и отрицательные контроли.

3. Принцип действия

Определение статуса мутаций L858R, T790M и делеции (del) в 19 экзоне гена *EGFR* в препарате нуклеиновых кислот (НК), полученном из клинического образца, методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа:

- 1) ПЦР-амплификацию ДНК;
- 2) гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится во время прохождения ПЦР;
- 3) интерпретацию результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков гена *EGFR* в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют аллель-специфичные праймеры и флуоресцентно-меченые олиго-нуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

4 Аналитические и диагностические характеристики набора

4.1 Аналитические характеристики:

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к мутациям L858R, T790M и делеции (del) в 19 экзоне гена <i>EGFR</i>
Аналитическая чувствительность	1 копия гена <i>EGFR</i> в 1 мкл раствора ДНК
Диапазон определяемых концентраций ДНК	от 1 до 1000 копий гена <i>EGFR</i> в 1 мкл раствора ДНК
Результат теста, соответствующий норме	Отсутствие мутаций L858R, T790M и делеции (del) в 19 экзоне гена <i>EGFR</i>

4.2 Диагностические характеристики:

Диагностическая специфичность – 96,0 % с доверительной вероятностью 90%

Диагностическая чувствительность – 88,1 % с доверительной вероятностью 90%

Доля ложноотрицательных результатов – 11,9 % с доверительной вероятностью 90%

Специфичность анализа определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам генов, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции.

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-EGFR»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;

- утилизация набора с нарушением соответствующих мер безопасности и дезактивации;

- перекрестная контаминация образцов;

- загрязнение материалов ингибирующими веществами;

- контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержимым из пробирок ПКО 0,5% или 5%, или продуктами ПЦР;

- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, в следствии работы с набором неквалифицированным персоналом.

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом ПЦР-РВ (Тест-EGFR) по ТУ 9398-004-97638376-

2015 в исполнениях: 1) «Тест-EGFR-12» на 12 определений, 2) «Тест-EGFR-24» на 24 определения», производства ООО «ТестГен» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «Тест- EGFR», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «Тест-EGFR» обладают низкой упругостью пара, и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Тест- EGFR» не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113 МУ 1.3.2569-09. При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4.28 СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

- Не использовать набор по истечению срока годности.

- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Оборудование:

1. ПЦР-бокс (типа «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (типа «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (типа «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник от +2 до +8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

5. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, Real-Time CFX96 Touch («BioRad», США), «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия) или эквивалентные.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 и до 10 мкл. (например, «Ахуген», США).

2. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

3. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

4. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:

а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).

б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «CFX96», «ДТ-Прайм»).

8. Анализируемые пробы

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы свободно циркулирующей ДНК, в том числе опухолевой ДНК, выделенной из плазмы крови.

8.1 Процедура получения пробы свободно циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы крови

Для экстракции свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови (ДНК-Плазма-М) по ТУ 9398-002-97638376-2015 в исполнениях: 1) «ДНК-Плазма-М-50» на 50 выделений, 2) «ДНК-Плазма-М-100» на 100 выделений (ТестГен, Россия);

- Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм МАГНО-сорб» по ТУ 9398-004-09286667-2012 (НекстБио, Россия)

- NucleoSpin® Blood (MACHEREY-NAGEL, Германия)

- QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, QIAamp UltraSens Virus Kit (QI-Aamp, Германия)

или аналогичных, предназначенных для выделения циркулирующих нуклеиновых кислот из биологических жидкостей.

ВНИМАНИЕ! В случае получении свободно циркулирующей опухолевой ДНК из плазмы, рекомендуем соблюдать следующую

процедуру получения плазмы. Для получения плазмы кровь (не менее 8-10 мл) отбирают в пробирку с ЭДТА или ЦФДА. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 24 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 10-15 мин при 2000-3000g, после чего аккуратно отбирают верхний слой плазмы и переносят его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Плазму центрифугируют 15 минут при 13000g или 10 минут при 16000g (при отсутствии высокоскоростной центрифуги допускается проводить второе центрифугирование при 3000g), вновь отбирают верхний слой в отдельную пробирку, не затрагивая осадка на дне пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения ДНК или заморозить при температуре не выше минус 70°C для дальнейшего использования. Выделять ДНК следует не менее чем из 1 мл плазмы (рекомендуется 2-3 мл) и растворять в конечном объеме не менее 100 мкл.

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя и др. может приводить к ингибированию реакции амплификации.

Для выделения препарата нуклеиновых кислот (НК) из клинического образца, необходимой для проведения ПЦР-анализа чистоты, рекомендуется использовать наборы для выделения, указанные в п. 8.1 настоящей инструкции.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внешнего контроля амплификации (ВКО ПКО-10к 0%), представляющий собой геномную ДНК из культуры клеток человека линии Jurkat (производства «СибЭнзим», Россия) концентрацией 1000 копий гена EGFR в 1 мкл. Для проведения внешнего контроля амплификации необходимо добавить 10 мкл ДНК (ВКО) в реакцию амплификации с праймерами на «Норму». Прохождение реакции

говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

При отсутствии реакции результат следует считать недостоверным, и в этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется провести повторное выделение ДНК для проведения ПЦР-анализа.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- Для исследования не пригодны образцы плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

- Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание).

- Не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

- Не брать в работу гемолизированную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты.

8.3 Условия возможного хранения анализируемых образцов

Полученная ДНК должна храниться при температуре +4°C и использоваться для анализа в течение 12 часов.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

Подготовка пробирок для проведения амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора. Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать

реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетным таблицам.

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок.

2. После размораживания тщательно перемешать содержимое пробирок (встряхнув пробирки на вортексе в течение нескольких секунд или же перевернув 10 раз), стряхнуть содержимое пробирок на дно на центрифуге.

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

А) ПЦР-амплификация ДНК;

Б) гибридационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

В) интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) ПЦР-амплификация ДНК

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения реакции ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!!!

1. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельных стерильных пробирках смешать из расчета на одну реакцию все необходимые компоненты согласно расчетным таблицам. Необходимо использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

2. При работе с малыми объемами вязких жидкостей (таких как Taq-полимераза) рекомендуется готовить микс для 5-10 реак-

ций, чтобы отбирать автоматической пипеткой не менее 1 мкл жидкости. Отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не отобрать избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

Приготовление реакционных смесей (в расчете на один образец)

Тест	Мастермикс			
	Реакционная смесь (мкл)	Таг (мкл)	ОКО (мкл)	Всего пробирок
<i>Норма</i>	4	0,2	5,8	4
<i>del</i>	4	0,2	5,8	6
<i>L858R</i>	4	0,2	5,8	6
<i>T790M</i>	4	0,2	5,8	6

Рекомендуемый порядок расположения реакций

96-луночный планшет												
Тест	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Норма</i>	ОКО	ПКО-1к	ПКО-10к	О1			О2			О3		
<i>del</i>	ОКО	ПКО-0,5%	ПКО-5%	О1	О1	О1	О2	О2	О2	О3	О3	О3
<i>L858R</i>	ОКО	ПКО-0,5%	ПКО-5%	О1	О1	О1	О2	О2	О2	О3	О3	О3
<i>T790M</i>	ОКО	ПКО-0,5%	ПКО-5%	О1	О1	О1	О2	О2	О2	О3	О3	О3

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

3. Внести по 10 мкл каждого мастермикса в соответствующие лунки согласно рекомендованному порядку размещения реакций.

4. Внести по 10 мкл раствора ОКО в реакции ОКО.

5. Внести по 10 мкл смеси стандартов ПКО в реакции ПКО.

6. Внести по 10 мкл образцов в контрольную и мутационные реакции.

7. Заклеить ПЦР-планшет/заккрыть пробирки, убедиться, что все крышки или пленка прилегают плотно.

8. Открутить ПЦР-планшет/пробирки, чтобы собрать реакционную смесь на дне лунок, сохраняя правильную ориентацию плашки или серии пробирок.

Б) Гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Обратите внимание, что приборы для ПЦР в «реальном времени» должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации для приборов

«ДНК-Технология»

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	94	10 сек	60
3	62 	60 сек	

Программа амплификации для приборов

других фирм

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	94	10 сек	60
3	60 	60 сек	

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала на стадии 3.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по одному каналу:

- по каналу **FAM/Green** в реакционной смеси *Норма* регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормального варианта гена *EGFR*.

- по каналу **FAM/Green** в реакционных смесях *del*, *L858R*, *T790M* регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК мутантных вариантов гена *EGFR* и делеций в экзоне 19.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «C_t».

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, при прохождении реакций «Норма», «del», «L858R», «T790M» в пробирках с соответствующими ПКО не позднее 38 цикла.

Правильные результаты для ОКО – отсутствие прохождения реакции в пробирках с ОКО.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводят только при правильных результатах для ОКО и ПКО данной постановки.

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производится с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

– мутантная ДНК гена *EGFR* обнаружена, если для данной пробы сигналы по каналу FAM в двух пробирках образца из трех выше установленного порогового значения, и сигнал по каналу FAM в пробирке *Норма* выше установленного порогового значения.

– мутантная ДНК гена *EGFR* не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в трех пробирках образца ниже установленного порогового значения, а сигнал по каналу FAM в пробирке *Норма* выше установленного порогового значения.

– Результат анализа невалидный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирке *Норма* ниже установленного порогового значения.

Если для пробы получен невалидный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца плазмы или отвергнуть образец, как непригодный для данного вида анализа.

- Результат анализа сомнительный, если для данной пробы сигнал по каналу FAM в пробирке *Норма* значение порогового цикла «C_t» для этой пробирки составляет более 38 или сигналы по каналу FAM выше установленного порогового значения только в одной пробирке из трех.

Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца. В случае повторения сомнительного результата следует повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца.

Набор непригоден к дальнейшему использованию, если сигнал по каналу FAM в реакционных смесях *Норма* в пробирках ПКО ниже установленного порогового значения и этот результат устойчиво воспроизводится.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от минус 18 до минус 25°C. На рабочем столе хранить при температуре +4°C с использованием «ледяной бани» не более 10 минут. Следует избегать повторного оттаивания-замораживания.

ПЦР-смеси Норма, del, L858R, T790M хранить в защищенном от света месте.

Транспортировка. Набор реагентов транспортировать при температуре от минус 18 до минус 25°C. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8°C не более трех суток или при температуре до 25°C не более суток.

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора. 12 месяцев при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 25°C.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «Тест-EGFR» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Тест-EGFR» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента), направлять информацию по адресу:

**Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),**

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

Тел.: +7 927 737 83 40

Е-mail: help@testgen.ru



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

12 (двадцать два) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.Н.

А.Н. Тороповский