



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Л-сфера»
Р. Р. Халилов
«11» августа 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для определения статуса мутаций
гена *EGFR* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК
человека из образцов фиксированной в парафине
ткани (Тест-EGFR-ткань-5)
по ТУ 21.20.23-004-25226389-2020**

Версия 2 от 11.08.2021

Содержание

Введение	3
1. Назначение	5
2. Принцип метода	6
3. Состав набора реагентов	8
4. Характеристики набора реагентов	9
4.2 Характеристики аналитической эффективности	10
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5»	12
6. Меры предосторожности при работе с набором	12
8. Анализируемые пробы	15
9. Подготовка компонентов набора для исследования	20
10. Проведение анализа	21
11. Регистрация и интерпретация результатов	24
12. Информация о стабильности медицинского изделия	26
13. Условия хранения, транспортирования	26
и эксплуатации набора	26
14. Утилизация	27
15. Гарантийные обязательства, контакты	28
Приложение А	30

Введение

Целевой анализ – ген *EGFR*, исследуемый при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и 27 делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR* для определения показаний к таргетной терапии.

Материалом для проведения исследования служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

Научная обоснованность. Рак легкого — одна из наиболее распространенных форм злокачественных онкологических заболеваний. Ежегодно в России от рака легкого погибают около 60 тыс. человек, что составляет 20% от всех умерших от злокачественных заболеваний.

Идентификация и расшифровка механизма действия рецептора эпидермального фактора роста опухоли (EGFR — Epidermal Growth Factor Receptor) стала одним из многообещающих открытий в онкологии.

За последние несколько лет изучение рецептора эпидермального фактора роста стало одним из актуальных аспектов современной онкологии. Установлено, что высокая частота гиперэкспрессии EGFR характерна для немелкоклеточного рака легкого (40—70%), рака яичников (35—70%), толстой кишки (25—77%) и др. Известно, что выявление повышенной экспрессии *EGFR* является фактором неблагоприятного прогноза течения болезни. Активация механизмов с участием *EGFR* приводит к усилению пролиферативной активности опухолевых клеток, неоангиогенезу, замедлению апоптоза, более раннему появлению метастазов.

Большинство соматических мутаций гена *EGFR*, обнаруживаемых у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), локализованы в экзонах 18—21, кодирующих тирозинкиназный домен. Открытие этих мутаций немедленно связали с положительным ответом на терапию ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

Наиболее частыми являются делеции в экзоне 19 (45% от всех мутаций), за ними следует нуклеотидная замена Т на G в положении

2573 экзона 21, что приводит к аминокислотной замене лейцина на аргинин в положении 858 аминокислотной последовательности (L858R, 41%), на вставки в экзоне 20 и нуклеотидные замены в экзонах 18 и 20 приходится 14% мутаций. Данные мутации встречаются у 10% больных НМРЛ европеоидного происхождения и у 50% азиатов.

Назначение ингибиторов тирозинкиназы (ТК) больным НМРЛ с наличием делеций в 19 экзоне (Del19) или мутации L858R гена *EGFR*, связанных с чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназы (ТК), является эффективным методом лечения, приводящим к существенному сокращению размеров опухолевых очагов и контролю проявлений заболевания на достаточно продолжительный срок.

Область применения набора реагентов - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» рекомендуется при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и 27 делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани, для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

Противопоказания: отсутствуют.

1. Назначение

1.1 Назначение: набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического профиля при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и 27 делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

1.2. Количество реакций

Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» представлен в одном варианте исполнения рассчитанный на проведение 5 определений.

1.3 Область применения - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

1.4 Требования к квалификации пользователей: для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных потребителей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник

1.5 Функциональное назначение теста, выполняемого с помощью набора реагентов, состоит в определении показаний к таргетной терапии (направленного лечения) при патологии – немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), с помощью выявления методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией активирующей мутации L858R и 27 делеций (del) в экзоне 19 гена *EGFR*.

1.6 Показания к применению

Рекомендуется при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и 27 делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани, для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

1.7 Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений

1.8 Противопоказаний к применению нет.

1.9 Стерильность: изделие не стерильно.

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца. Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

Принцип определения

Анализ проводится методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Продукты ПЦР исследуемого гена *EGFR* идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зондов, меченных FAM и HEX. Набор содержит реагенты для анализа мутации L858R и 27 делеций в 19 экзоне исследуемого гена *EGFR*. ПЦР смеси состоят из всех необходимых реагентов. Набор также включает положительный контрольный образец (ПКО), содержащий эквимольную смесь мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне в концентрации 5% и отрицательный контрольный образец (ОКО).

Все ПЦР-смеси содержат праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Зонды к ВКО помечены HEX (см. раздел 11 «Регистрация и интерпретация результатов»). Это контроль эффективности экстракции ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

Обнаружение мутаций зависит от целостности образца и количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце. Чистота выделенной ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей ($A_{260/280\text{nm}}$), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4. Концентрация ДНК,

достаточная для проведения исследования должна составлять 1-10 нг/мкл.

Ткань опухоли не является гомогенной, в связи с этим результаты анализа, полученные из образца ткани, могут не совпадать с результатами других секций той же самой опухоли. Кроме того, образцы опухоли могут содержать и нормальную (неопухолевую ткань). При использовании пробы геномной ДНК выделенной из ткани, не содержащей опухоль, набор «Тест-EGFR-ткань-5» не сможет выявить мутации гена *EGFR*.

Метод ПЦР крайне чувствителен к контаминации. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать контаминации образцов исследуемой ДНК и реакционных смесей содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР.

Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» предназначен только для качественного определения статуса мутации L858R и 27 делеции (del) в 19 экзоне гена *EGFR*.

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

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации – «Тест-EGFR-ткань-5». Каждый набор «Тест-EGFR-ткань-5» содержит реагенты, рассчитанные на проведение 5 определений.

Состав набора

Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» включает:

Таблица 1 – Состав набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество пробирок, объём, мкл
1	ПЦР-смесь del	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
2	ПЦР-смесь L858R	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
3	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (60 мкл)
4	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (60 мкл)
5	Тaq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, (300 мкл)

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Jurkat в концентрации 400 копий гена *EGFR* в 1 мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н., содержащей эквимольную смесь мутации L858R и 27 делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR*, в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 20 копий плазмидной ДНК в 1 мкл. Содержит 5% мутантных и 95% нормальных копий ДНК.

В качестве ОКО используют воду деионизованную.

Все ПЦР-смеси содержат праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Зонды к ВКО помечены HEX (см. раздел 11 «Регистрация и интерпретация результатов»). Это

контроль эффективности экстракции ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 2 – Технические и функциональные характеристики набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
ПЦР-смесь del	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь L858R	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
Тaq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-004-25226389-2020
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-004-25226389-2020
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-004-25226389-2020
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции с $C_t \leq 35$ в реакции «del» и «L858R» с ПКО по каналам FAM и HEX

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Отрицательный результат с ОКО	Отсутствие роста сигнала флуоресценции в реакциях «del» и «L858R» с ОКО по каналам FAM и HEX

4.2 Характеристики аналитической эффективности

Таблица 3 – Аналитические характеристики набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5»

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к мутации L858R и 27 делециям (del)* в 19 экзоне гена EGFR
Аналитическая чувствительность	10 копий гена EGFR в 1 мкл раствора ДНК

* обнаруживает наличие любой из 27 делеций, но не различает их

Список определяемых делеций с указанием ID делеции представлен в таблице 4.

Таблица 4 - Список определяемых делеций с указанием ID делеции

Набор делеций, определяемых с помощью набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5»	COSMIC ID**
2235_2249del15	6223
2235_2252>AAT (complex)	13551
2236_2253del18	12728
2237_2251del15	12678
2237_2254del18	12367
2237_2255>T (complex)	12384
2236_2250del15	6225
2238_2255del18	6220

Набор делеций, определяемых с помощью набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5»	COSMIC ID**
2238_2248>GC (complex)	12422
2238_2252>GCA (complex)	12419
2239_2247del9	6218
2239_2253del15	6254
2239_2256del18	6255
2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
2239_2258>CA (complex)	12387
2240_2251del12	6210
2240_2257del18	12370
2240_2254del15	12369
2239_2251>C (complex)	12383
2236_2252>AT (complex)	26680
2236_2251>T (complex)	26513
2238_2252del15	23571
2237_2252>T (complex)	12386
2235_2255>GGT (complex)	85797
c.2235_2246del12	28517
2235_2251>AG (complex)	13549
2236_2253>CAA (complex)	22999

** идентификационный номер мутации согласно международно-базе соматических мутаций при раковых заболеваниях COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer).

Специфичность анализа определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам генов, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации

комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции.

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

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержащим из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;
3. проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
4. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
5. использование непригодного для применения набора (использование по истечению срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *EGFR* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-EGFR-ткань-5) по ТУ 21.20.23-004-25226389-2020, производства ООО «Л-Сфера» 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-ткань-5», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования

безопасности». Меры предосторожности против любых специальных, несвойственных экологических рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

Реагенты, входящие в набор «Тест-EGFR-ткань-5», обладающие низкой упругостью пара, и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Тест-EGFR-ткань-5» и токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий. Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, М. 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий.

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

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

2. допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским или биологическим образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III-IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также со средним специальным медицинским образованием);
3. не использовать набор по истечении срока годности;
4. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

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

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

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников взрыва или возгорания не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

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°C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.
5. Амплификатор¹ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам

¹ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора

FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Rad, Cy5.5/Crimson например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм», «ДТлайт» («ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), Rotor-Gene 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

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»).

6. ПЦР-планшеты (могут использоваться вместо пробирок указанных в пункте 5).

7. Оптически прозрачная пленка для заклеивания планшетов.

8. Анализируемые пробы

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинической

в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

8.1 Процедура получения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани

Для выделения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани, необходимой для проведения ПЦР-анализа концентрации и чистоты, рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016, производства ООО «ТестГен», Россия. Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018;

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей "ДНК-Ткань-М" по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия. Регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14273 от 06.05.2021 г.

или аналогичных, предназначенных для выделения ДНК из фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани и обеспечивающих следующее качество выделенной ДНК

- чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280nm), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4;

- концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-100 нг/мкл.

Критерии пригодности гистологических препаратов для выделения ДНК для последующего молекулярно-генетического анализа опухолевых клеток

• По результатам морфологического исследования опухолевые комплексы должны занимать не менее 60 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.

• По результатам морфологического исследования зоны некроза и кровоизлияния в совокупности должны занимать не более 15 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.

В случае, если образец не соответствует хотя бы одному из перечисленных критериев, рекомендуется использовать другой образец.

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

При подготовке срезов с парафиновых блоков необходимо минимизировать риск кросс-контаминации образцов, для чего необходимо:

- работать в одноразовых неопудренных перчатках;
- проводить процедуру в ПЦР-боксе или в ламинарном шкафу;
- использовать одноразовые лезвия для микротомы и стерильные пинцеты;
- первые два среза с каждого блока утилизировать, а для молекулярного исследования использовать срезы начиная с третьего;
- не помещать срезы на водяную баню.

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5», на способность набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» различать мутантные и нормальные варианты гена *EGFR*, была проведена с использованием компонентов набора реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2017, производства ООО «ТестГен» (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018).

Для того, чтобы оценить влияние потенциально интерферирующих веществ было выполнено исследование путем анализа воздействия каждого вещества на значения C_t и качественное определение статуса мутаций в анализируемом

образце, в двух концентрациях (максимальной и минимальной), диапазон которых, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5».

При применении в соответствии с назначением набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5», материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

Интерферирующие вещества в данном случае могут происходить от следующих источников:

1. Вещества, добавляемые во время подготовки образца (консерванты, стабилизаторы) – в данном случае парафин, который используется для приготовления FFPE-блоков.
2. Вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов – в данном случае, загрязнение образца ткани гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке во время выделения.
3. Компоненты набора для выделения ДНК из ткани. (Для выделения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани предполагается использование набора реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей.)

Потенциально интерферирующие вещества и их концентрации приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Потенциально интерферирующие вещества и их концентрации

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)	Минимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)
Парафин (в ксилоле)	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$
Гемоглобин, мг	0,19 мг	0,1 мг

Установлено, что ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» различать мутантные и нормальные варианты гена *EGFR*.

В дополнение к исследованию интерферирующих веществ было оценено влияние некротической ткани в образцах опухолей на способность набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» выдавать достоверные результаты. Исследование влияния некроза было проведено на 9 образцах, которые имели некроз на уровне > 50%, как определено в обзоре патологии. После проведения анализа с помощью набора реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» и интерпретации результатов, полученные данные сравнивались с результатами двунаправленного секвенирования данных образцов по Сэнгеру. В ходе проведения исследования был выявлен 1 ложноотрицательный результат, что может быть связано с недостаточным количеством ДНК.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание). Анализируемая ДНК должна храниться при температуре от 2 до 8 °С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре минус 20 °С.

- Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей ($A_{260/280nm}$), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4.

- Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-100 нг/мкл.

- Не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

- Для анализа необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенные из ткани опухоли, подтвержденной гистологически.

8.3 Условия возможного хранения анализируемых образцов

Условия хранения пробы геномной ДНК человека, выделенной из образцов фиксированной в парафине ткани:

Полученная ДНК должна храниться при температуре от 2 до 8 °С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре минус 20 °С.

Условия хранения исходного клинического материала:

Наиболее доступным клиническим материалом для выделения ДНК является ткань, фиксированная в формалине и заключенная в парафин (FFPE-блоки). FFPE-блоки могут храниться при комнатной температуре.

Парафиновые срезы могут храниться при комнатной температуре в течение 4 недель до выделения ДНК.

Условия хранения биопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК²:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре 2–8 °С — в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С — длительно.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

Тщательно перемешать содержимое пробирок переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешать на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек, а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! Не встряхивать Таq-полимеразу на вортексе, так как это может инактивировать фермент.

² МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

А) Подготовка ПЦР:

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

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

А) Подготовка ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 20 мкл.

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

Непосредственно перед проведением анализа необходимо приготовить реакционные смеси (мастермиксы) для анализируемой ДНК, ПКО и ОКО. Для этого в отдельных стерильных пробирках смешать все компоненты исходя из того, что для проведения одной реакции необходимо взять 4 мкл ПЦР-смеси и 10 мкл Taq-полимеразы. Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

Готовить мастермиксы необходимо согласно таблице 6. В таблице учтен запас реактивов (+1 объём каждого вида) для компенсации возможных потерь при раскапывании.

ВНИМАНИЕ! При работе с Таq-полимеразой отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не взять избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

Таблица 6 - Приготовление мастермиксов (в расчете на количество анализируемых образцов).

Количество образцов	ПЦР-смесь, мкл	Тaq, мкл	Итого, мкл
---------------------	----------------	----------	------------

1	16	40	56
2	20	50	70
3	24	60	84
4	28	70	98
5	32	80	112

1. Внести по 14 мкл каждого мастермикса в соответствующие пробирки согласно рекомендованному порядку расположения реакций (см. табл. 7).

2. Внести по 6 мкл ОКО в пробирки «ОКО».

3. Внести по 6 мкл ПКО в пробирки «ПКО».

4. Внести по 6 мкл образцов ДНК в пробирки «О».

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

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

Таблица 7 - Рекомендуемый порядок расположения реакций

[illegible]

О1 – ДНК, выделенная из анализируемого образца №1 и т.д.

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»

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

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 (см. табл. 8, 9).

Таблица 8 - Программа амплификации для приборов производства «ДНК – Технология»

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 сек	50
3	64 ^{±0,5}	15 сек	

Таблица 9 - Программа амплификации для других приборов

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 сек	50
3	62 ^{±0,5}	15 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 двум каналам:

– по каналу **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК мутантных вариантов гена *EGFR* и делеций в экзоне 19.

– по каналу **HEX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормальных вариантов гена *EGFR* (выступает в качестве внутреннего контрольного образца – ВКО).

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции пороговой линии.

Принцип интерпретации результатов в исследуемых образцах и контрольных образцах представлен в табл. 10 и табл. 11 соответственно.

Таблица 10 - Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Пробирки	Мутантная ДНК гена <i>EGFR</i> обнаружена	Мутантная ДНК гена <i>EGFR</i> не обнаружена	Сомнительный	Невалидный
del, L858R	Канал FAM : Ct ≤ 35 Канал HEX : подъем кривой амплификации (любой Ct) или отсутствие подъема кривой.	Канал FAM : отсутствие кривой амплификации. Канал HEX : Ct ≤ 35	Канал FAM : подъем кривой амплификации, Ct > 35 Канал HEX : Ct ≤ 35	Отсутствие кривой амплификации по обоим каналам HEX и FAM

Таблица 11 - Интерпретация результатов в контрольных образцах

Пробирки	Правильный результат	Невалидный результат
ПКО	Канал FAM и HEX : $Ct \leq 35$	Отсутствие подъема кривой амплификации по HEX и/или FAM
ОКО	Канал FAM и HEX : отсутствие подъема кривой амплификации	Подъем кривой амплификации по каналу FAM и/или HEX (любой Ct)

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Набор считают годным при прохождении реакций «del», «L858R» в пробирках с соответствующим ПКО не позднее 35 цикла (канал FAM и HEX: $Ct \leq 35$).

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

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

Интерпретация производится с помощью программного обеспечения используемого прибора. Пороговая линия устанавливается на уровне перехода кривых в экспоненциальную фазу роста.

Мутантная ДНК гена EGFR обнаружена, если кривая амплификации по каналу FAM поднимается выше установленной пороговой линии, и при этом $Ct \leq 35$. По каналу HEX подъем кривой амплификации (любой Ct) или отсутствие подъема кривой.

Мутантная ДНК гена EGFR не обнаружена, если кривая амплификации по каналу FAM не поднимается выше установленной пороговой линии, а кривая амплификации по каналу HEX поднимается выше установленной пороговой линии, $Ct \leq 35$ (то есть проходит ВКО).

Результат анализа сомнительный, если кривая амплификации по каналу FAM поднимается выше установленной пороговой линии, но при этом $Ct > 35$. Кривая амплификации по каналу HEX поднимается выше установленной пороговой линии и $Ct \leq 35$.

Результат анализа невалидный, если кривые амплификации не поднимаются ни по каналу FAM, ни по каналу HEX выше установленной пороговой линии. Это свидетельствует о том, что не прошли реакции ни на нормальную ДНК, ни на мутантную.

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

Если получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца ткани.

Набор непригоден к дальнейшему использованию, если кривые амплификации по каналам FAM и HEX в пробирках ПКО ниже установленной пороговой линии и этот результат устойчиво воспроизводится.

12. Информация о стабильности медицинского изделия

Срок годности набора. 12 месяцев.

Срок годности набора после вскрытия. 12 месяцев.

13. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение.

Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» в упаковке предприятия-изготовителя должен храниться при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора;

- ПЦР-смеси del, L858R следует хранить в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование.

Транспортировать набор реагентов «Тест-EGFR-ткань-5» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор реагентов транспортировать при температуре от минус 20 до 8°C в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при комнатной температуре (15–25°C) не более пяти суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности. Срок годности набора «Тест-EGFR-ткань-5» 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора. 12 месяцев при условии хранения при температуре от 2 до 8 °C.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора. 1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

14. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1 3684 21.

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиНом 2.1 3684 21 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

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-ткань-5» 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.

15. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Тест-EGFR-ткань-5» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

Организация-производитель:

Общество с Ограниченной Ответственностью «Л-сфера» (ООО «Л-сфера»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, помещение 69

Тел.: +7 (903)320-00-84

E-mail: info@l-sfera.com

Наименование, юридический, (фактический) адрес и контактные данные (телефон, факс, электронная почта) уполномоченного представителя производителя на территории Российской Федерации:

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

432072 Россия

г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 499 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Наименование и контактные данные (телефон, факс, электронная почта) организации, принимающей, претензии (предложения) по медицинскому изделию для диагностики in vitro от потребителей на территории Российской Федерации:

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

432072 Россия

г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 499 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Перечень применяемых национальных стандартов

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.

ГОСТ Р ЕН 13612-2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro»;

ГОСТ Р 56894-2016 «Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro»;

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ ISO 13485-2017 «Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования».

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

В (два экземпляра) листов

Должность: ген. директор

Халилов Р.Р.

