



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Л-сфера»
Р.Р. Халилов
«12» января 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для определения статуса мутаций
гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в
режиме реального времени в пробе геномной ДНК
человека из образцов фиксированной в парафине
ткани (Тест-KRAS-ткань-5)
по ТУ 21.20.23-001-25226389-2020**

Содержание

Введение	4
1. Назначение.....	6
2. Принцип метода	8
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	12
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-KRAS-ткань-5»	18
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	18
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	20
8. Анализируемые пробы	22
9. Подготовка компонентов набора для исследования	26
10. Проведение анализа	27
11. Регистрация и интерпретация результатов	31
12. Информация о стабильности медицинского изделия.....	33
13. Условия хранения, транспортирования	33
и эксплуатации набора	33
14. Утилизация	35
15. Гарантийные обязательства, контакты	35

Введение

Целевой анализ – ген *KRAS*, исследуемый при диагностике пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» при проведении молекулярно-генетического исследования для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS*.

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

Научная обоснованность.

В соответствии с из Клиническими рекомендациями «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020¹:

«Рекомендуется пациентам с метастатическим раком прямой кишки выполнять молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и определение микросателлитных повторов ДНК в биопсийном (операционном) материале методом ПЦР, если диагностированы отдаленные метастазы, что может повлиять на выбор таргетного агента в лечении метастатического процесса».

В состав семейства белков Ras входят H-Ras, K-Ras, N-Ras, R-Ras и другие гомологичные белки. Каскадная последовательность реакций сигнального пути Ras действует как включатель, определяющий регуляцию генной экспрессии, требующуюся для решения клетки делиться или дифференцироваться. Постоянная активация Ras ведет к злокачественному перерождению клеток. Характерный механизм перерождения - точечные активирующие мутации. Наиболее известными онкогенными мутациями являются

мутации в генах *KRAS* и *NRAS* в 12, 13 кодонах (2 экзон), 59, 61 кодонах (3 экзон), 117, 146 кодонах (4 экзон). Мутации *KRAS*, *NRAS* приводят к постоянной активации белка и передаче митотического сигнала независимо от стимуляции и медикаментозного ингибирования EGFR, поэтому у больных с мутированным геном *KRAS* терапия ингибиторами EGFR и тирозинкиназ неэффективна².

Мутации *KRAS* обнаружены у 30-40% больных метастатическим КРР³.

В настоящее время для лечения метастатического КРР применяют таргетные препараты на основе моноклональных антител - ингибиторы EGFR цетуксимаб (cetuximab) и панитумумаб (panitumumab). Связывание антител с EGFR приводит к угнетению инвазии опухолевых клеток в нормальные ткани, препятствуя распространению опухоли в другие органы. У пациентов с диким типом гена *KRAS* анти-EGFR препараты достоверно увеличивают медиану выживаемости⁴. Мутации гена *KRAS* определяют агрессивное поведение опухоли: КРР развивается в кратчайшие сроки, быстро метастазирует и плохо поддается химиотерапии. Поэтому было рекомендовано определять мутации в гене *KRAS* у всех больных метастатическим КРР для решения вопроса об анти-EGFR терапии.

Область применения набора реагентов - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-5» рекомендуется к применению при диагностике пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» при проведении

¹ Клиническими рекомендациями: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020 (Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г).

² Молекулярно-генетические исследования в практике онкологической клиники / Н.Е. Торопова [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т.17, № 2 (3). – С. 690-696.

³ Имянитов Е.Н. Стандартные и потенциальные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта/ Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. - 2012. - Т. 13, №4. - С. 219-228.

⁴ Владимирова Л.Ю., Геворкян Ю.А., Абрамова Н.А., Солдаткина Н.В. Оценка эффективности и токсичности моноклонального антитела к EGFR панитумумаба при колоректальном раке // Мат. VII съезд онкологов и радиологов стран СНГ. - Астана, 2012. - С. 189.

молекулярно-генетического исследования для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса., в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020 (Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г).

Противопоказания: отсутствуют.

1. Назначение

1.1 Назначение: Набор реагентов «Тест-KRAS-ткань-5» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля при диагностике пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» при проведении молекулярно-генетического исследования для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса., в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020 (Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское

общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г).

1.2. Количество реакций

Набор реагентов «Тест-KRAS-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 клинико-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных потребителей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

1.5 Функциональное назначение: Набор реагентов «Тест-KRAS-ткань-5» используется при диагностике пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» при проведении молекулярно-генетического исследования для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса., в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020 (Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г).

1.6 Показания к применению: набор реагентов «Тест-KRAS-ткань-5» рекомендуется к применению при диагностике пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» при проведении

молекулярно-генетического исследования для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса., в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020 (Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г).

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 *KRAS* идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зондов, меченных FAM и HEX. Набор содержит реагенты для анализа шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg,

Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) исследуемого гена *KRAS*. ПЦР смеси состоят из всех необходимых реагентов. Набор также включает положительный контрольный образец (ПКО), содержащий эквивалентную смесь мутаций Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys, Gly13Asp 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. Минимальное количество ДНК, которое необходимо для проведения анализа – 210 нг (30 нг ДНК на реакцию). Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280нм), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,6-1,8. Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять не менее 5 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-KRAS-ткань-5» не сможет выявить мутации гена *KRAS*.

Минимальное содержание опухоли в образце для проведения теста - 20% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

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-KRAS-ткань-5» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор реагентов «Тест-KRAS-ткань-5» предназначен только для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS*.

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

3. Состав набора реагентов

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

Состав набора

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

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

№ пп	Название реагента	Описание	Количество пробирок, объём, мкл
1	ПЦР-смесь Gly12Ser	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
2	ПЦР-смесь Gly12Arg	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
3	ПЦР-смесь Gly12Cys	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
4	ПЦР-смесь Gly12Asp	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
5	ПЦР-смесь Gly12Ala	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
6	ПЦР-смесь Gly12Val	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)

7	ПЦР-смесь Gly13Asp	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
8	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (210 мкл)
9	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (210 мкл)
10	Taq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (1050 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 *KRAS* в 1 мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н., содержащей эквимольную смесь мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS*, 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-KRAS-ткань-5»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
ПЦР-смесь Gly12Ser	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь Gly12Arg	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь Gly12Cys	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь Gly12Asp	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь Gly12Ala	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь Gly12Val	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь Gly13Asp	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 21.20.23-001-25226389-2020
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-001-25226389-2020
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-001-25226389-2020
2. Функциональные характеристики	

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции с $Ct \leq 35$ в реакциях Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys, Gly13Asp с ПКО по каналам FAM и HEX
Отрицательный результат с ОКО	Отсутствие роста сигнала флуоресценции в реакциях Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys, Gly13Asp с ОКО по каналам FAM и HEX

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к шести мутациям двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS*

Список определяемых мутаций с указанием ID мутации представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Список определяемых мутаций с указанием ID мутации

Набор мутаций, определяемых с помощью «Тест-KRAS-ткань-5»	Изменения в нуклеотидах	Изменения в аминокислотах	COSMIC ID*
Gly12Asp	c.35G>A	p.G12D	521
Gly12Ala	c.35G>C	p.G12A	522
Gly12Arg	c.34G>C	p.G12R	518
Gly12Val	c.35G>T	p.G12V	520
Gly12Ser	c.34G>A	p.G12S	517
Gly12Cys	c.34G>T	p.G12C	516

Набор мутаций, определяемых с помощью «Тест-KRAS-ткань-5»	Изменения в нуклеотидах	Изменения в аминокислотах	COSMIC ID*
Gly13Asp	c.38G>A	p.G13D	532

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

4.2.2 Аналитическая чувствительность

10 копий гена *KRAS* в 1 мкл раствора ДНК

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости были проведены последовательные исследования следующих образцов:

- СОП-ПКО-N, представляющий собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК- нормальные варианты гена *KRAS*, заключённых в плазмидный вектор pAl-TA с концентрацией 10 000 коп в 1 мкл ТЕ буфера. (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА), производства ООО «Л-сфера». Содержит 100% нормальных копий ДНК (образец «дикого типа»).

- СОП-ПКО-M, представляющий собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК – специфических фрагментов с гомозиготным содержанием шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS*, заключённых в плазмидный вектор pAl-TA с концентрацией 10 000 коп плазмидной ДНК в 1 мкл в ТЕ буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА), производства ООО «Л-сфера». Содержит 100% мутантных копий ДНК.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости контрольные образцы были исследованы в 10 повторах.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию,

среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет: 1) для мутантных вариантов гена *KRAS* не более 3%; 2) для нормальных вариантов гена *KRAS* не более 3%.

4.2.4. Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости, однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях воспроизводимости набора составляет: 1) для мутантных вариантов гена *KRAS* не более 3%; 2) для нормальных вариантов гена *KRAS* не более 3%.

4.2.5 Минимальное содержание опухоли для проведения анализа – 20 % по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом

4.2.6 Предел обнаружения (LoD), как наименьшая частота заявленных аллелей в образце в гене *KRAS*, которое способно выявить изделие – 5 %

4.2.7 Подтверждена специфичность изделия в отношении микрофлоры ободочной и прямой кишки в максимальной концентрации патогена. При исследовании ДНК штаммов:

- из коллекции «ГКПМ-ОБОЛЕНСК»: *Escherichia coli* M-17(номер штамма B-2929), *Shigella sonnei* «S-форма» (номер штамма B-4385), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* 79 (номер штамма B-4376), *Shigella flexneri* 1a 8516 (номер штамма B-4388), *Candida albicans* NCTC 885-653 (номер штамма B-7940),
- из коллекции Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)»: *Enterococcus faecium* (*Streptococcus faecium*) (номер штамма B-4954), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (номер

штамма В-8837), *Salmonella typhimurium* TA102 (номер штамма В-5393).

в концентрации от 10^6 до 10^7 клеток на мл неспецифических реакций выявлено не было. Данные микроорганизмы не оказывают влияние на способность набора реагентов «Тест-KRAS-ткань-5» различать мутантные и нормальные варианты гена *KRAS*.

4.2.8. Проведено тестирование изделия на гомологичных генах *KRAS* – *NRAS*, *HRAS*. Набор реагентов «Тест-KRAS-ткань-5» не дает перекрестных реакций с гомологичными генами *KRAS* - *NRAS*, *HRAS*

4.2.9 Минимальное количество ДНК, которое необходимо для проведения анализа – 210 нг (30 нг ДНК на реакцию).

Набор рекомендован для работы с образцами ДНК с концентрацией не менее 5 нг/мкл.

Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения оптических плотностей раствора выделенной ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8.

Проверку чистоты выделения нуклеиновых кислот, выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК (A260/280нм), и концентрации выделенной ДНК рекомендуется проводить с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Спектрофотометр Nanodrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) внесён в Государственный реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590.

4.2.10. Информация об **интерферирующих веществах** указана в разделе «8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала».

4.3. Характеристики клинической эффективности

В ходе проведения клинических испытаний было отобрано 36 образцов фиксированной в парафине ткани (FFPE-блок), от пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» с подтвержденным положительным статусом исследуемых мутаций в гене *KRAS*.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «Тест-KRAS-ткань-5», производства ООО «Л-сфера».

Для проведения ПЦР-исследования были использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

Воспроизводимость результатов 100%. Результаты изучения диагностических характеристик исследуемого медицинского изделия по отношению к каждой выявляемой мутации в гене *KRAS* приведены в таблице 4.

Таблица 4

Кодон	Мутация	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с достоверной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с достоверной вероятностью 95 %
12 кодон	Gly12Asp	20	52	100% (95% ДИ: 83,16%-100%)	100% (95% ДИ: 93,15%-100%)
	Gly12Ala	6	66	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)	100% (95% ДИ: 94,56%-100%)
	Gly12Arg	4	68	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 94,72%-100%)
	Gly12Val	16	56	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)	100% (95% ДИ: 93,62%-100%)
	Gly12Ser	6	66	100% (95% ДИ: 54,07%-100%)	100% (95% ДИ: 94,56%-100%)
	Gly12Cys	4	68	100% (95% ДИ: 39,76%-100%)	100% (95% ДИ: 94,72%-100%)
13 кодон	Gly13Asp	16	56	100% (95% ДИ: 79,41%-100%)	100% (95% ДИ: 93,62%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-KRAS-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 содержимым 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 *KRAS* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань-5) по ТУ 21.20.23-001-25226389-2020», 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-KRAS-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-KRAS-ткань-5», обладают низкой упругостью пара, и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Тест-KRAS-ткань-5» 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 2.1.3684-21 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, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с 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 (пробирок, 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. Амплификатор⁵ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам

⁵ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Rad, Cy5.5/Crimson: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

6. Спектрофотометр NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Внесён в Государственный реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590.

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. 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.»

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 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.

Набор рекомендован для работы с образцами ДНК с концентрацией не менее 5 нг/мкл. Минимальная валидированная концентрация ДНК – 5 нг/мкл.

Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения оптических плотностей раствора выделенной ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8.

Проверку чистоты выделения нуклеиновых кислот, выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК (A260/280нм), и концентрации выделенной ДНК рекомендуется проводить с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Спектрофотометр Nanodrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) внесён в Государственный реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590.

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

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Тест-KRAS-ткань-5» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение образца ткани гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-KRAS-ткань-5», приведены в таблице 5.

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	2 мг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Ропивакаин (обезболивающее средство)	0,004 мг/мл
Бевацизумаб (применяется для терапии колоректального рака)	0,02 мг/мл
Капецитабин (препарат для лечения колоректального рака)	0,1 мг/мл
Цисплатин (противоопухолевое средство)	0,002 мг/мл

На основании результатов исследования данные вещества не оказывают интерферирующего воздействия на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

В дополнение к исследованию интерферирующих веществ было оценено влияние некротической ткани в образцах опухолей на способность набора реагентов «Тест-KRAS-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-KRAS-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.

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

- минимальное содержание опухоли в образце для проведения теста - 20% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

- минимальное количество ДНК, которое необходимо для проведения анализа – 210 нг (30 нг ДНК на реакцию). Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280нм), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,6-1,8. Концентрация

ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять не менее 5 нг/мкл.

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 ДНК⁶:

- 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.

⁶ 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 объема 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 Таq-полимеразы. Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

Готовить мастермиксы необходимо согласно таблице 6. В таблице учтен запас реагентов (+1 объем 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	Таq, мкл	Итого, мкл
1	16	40	56
2	20	50	70

Количество образцов	ПЦР-смесь, мкл	Таг, мкл	Итого, мкл
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/заккрыть 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

96-луночный планшет	12	O10	O10	O10	O10	O10	O10	O10
	11	O9	O9	O9	O9	O9	O9	O9
	10	O8	O8	O8	O8	O8	O8	O8
	9	O7	O7	O7	O7	O7	O7	O7
	8	O6	O6	O6	O6	O6	O6	O6
	7	O5	O5	O5	O5	O5	O5	O5
	6	O4	O4	O4	O4	O4	O4	O4
	5	O3	O3	O3	O3	O3	O3	O3
	4	O2	O2	O2	O2	O2	O2	O2
	3	O1	O1	O1	O1	O1	O1	O1
	2	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО
	1	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО
Тест		Gly12Ser	Gly12Arg	Gly12Cys	Gly12Asp	Gly12Ala	Gly12Val	Gly13Asp

O1 – 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 *KRAS*.

– по каналу **HEX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормальных вариантов гена *KRAS* (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>KRAS</i> обнаружена	Мутантная ДНК гена <i>KRAS</i> не обнаружена	Сомнительный	Невалидный
Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys, Gly13Asp	Канал FAM : Ct ≤ 35 Канал HEX : подъём кривой амплификации (любой Ct) или отсутствие подъёма кривой.	Канал FAM : отсутствие кривой амплификации. Канал HEX : Ct ≤ 35	Канал FAM : подъём 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

Результат ПЦР-исследования можно учитывать при подъеме кривых амплификации Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys, Gly13Asp в пробирках с соответствующими ПКО не позднее 35 цикла и при отсутствии подъема кривой амплификации 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.

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

Мутантная ДНК гена KRAS 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 KRAS 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-KRAS-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 Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys, Gly13Asp 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-KRAS-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 холодоэлементами. Тип, объем и количество холодоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем 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-KRAS-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 со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя 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 твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий" собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого 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-KRAS-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-KRAS-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 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 15223-1-2020 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».

Примечание – 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

20 (двадцать) листов

Должность: ген. директор

Халилов Р.Р.

