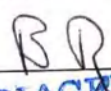


12
КОПИЯ

«УТВЕРЖДАЮ» / “APPROVE”
QIAGEN GmbH

Управляющий директор /Managing Director
(должность/position)

Бартхолд Пиэнинг / Barthold Piening
(имя/name)


QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
Germany
(подпись/signature)
М.П. / Stamp

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit для анализа мутаций в гене EGFR в пробе ДНК из образцов плазмы крови человека методом ПЦР

IVD Для диагностики in vitro

Предназначен для использования на оборудовании Rotor-Gene Q

CE

REF 870311

 QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ)

Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany / Кайджен Штрассе 1, 40724 Хильден, Германия

R5 **MAT** 1121934EN


QIAGEN®

Deed Roll No. **2341** /2021 M

I hereby certify that signature on the document affixed and sealed hereto was authenticated before me by

Mr. Dr. Barthold Piening, born on 19. November 1958,
business address **QIAGEN Straße 1** in 40724 Hilden,
who identified himself by presentation of his passport.

Mr. Dr. Barthold Piening not acting in own matter, but on behalf of

QIAGEN GmbH

(Address: **QIAGEN Straße 1** in 40724 Hilden).

Upon my inspection to the electronic Commercial register of Düsseldorf under HR B 45822 I hereby certify that:

- there the Company **QIAGEN GmbH** with headquarters in Hilden is listed;
- there Mr. Dr. Barthold Piening as Managing Director is registered and empowered to represent the Company solely in each matter;
- Mr. Dr. Barthold Piening is always relieved from the restrictions on self-contracting according to § 181 of the German Civil Code ("BGB").

The need for certification and the intended use of the authentic instrument were credibly demonstrated to me, the notary.

I could not inform myself about the content of the certified document because I do not master the language of the document. The notarization does not refer to the correctness of the document.

Hilden, 21 October 2021



Ingrid Daugs
Officially appointed representative of
Dr. Niklas Mairose, Notary public
Mittelstraße 36-38, 40721 Hilden, Germany

176TE



Оглавление

1.	Наименование и состав изделия	4
2.	Назначение	4
2.1.	Назначение медицинского изделия	4
2.2.	Функциональное назначение	4
2.3.	Количество реакций	4
2.4.	Показания к применению	4
2.5.	Область применения медицинского изделия	4
2.6.	Противопоказания к применению	4
2.7.	Побочные действия	4
2.8.	Требования к квалификации пользователей	5
2.9.	Сведения о стерильности	5
2.10.	Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия	5
3.	Принцип метода	5
3.1.	Метод	5
3.2.	Тип анализируемого образца и время анализа	5
3.3.	Принцип определения	5
3.4.	Ограничения метода	6
4.	Описание целевого анализата	6
4.1.	Научная обоснованность	6
4.2.	Описание целевого анализата	6
5.	Классификация медицинского изделия	7
6.	Комплектность, описание и состав изделия	7
6.1.	Описание изделия	7
6.2.	Состав набора	7
6.3.	Комплект поставки	8
7.	Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки	8
8.	Условия хранения, эксплуатации и транспортирования, стабильность изделия.	9
8.1.	Условия хранения и эксплуатации	9
8.2.	Условия транспортирования	10
8.3.	Срок годности изделия	10
9.	Хранение и обращение с образцами	10
9.1.	Сбор и подготовка образцов	10
9.2.	Обработка и хранение образцов	11
9.3.	Перевозка образцов	11
9.4.	Выделение свободно циркулирующей ДНК	11
10.	Меры предосторожности и ограничения	11
10.1.	Меры предосторожности	11
10.2.	Ограничения	12
10.3.	Меры индивидуальной защиты	13
10.4.	Информация о безопасности	13
11.	Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения	13
12.	Характеристики изделия	14
12.1.	Технические характеристики	14
12.2.	Функциональные характеристики изделия	14
12.2.1.	Аналитическая чувствительность — предел бланка (LOB)	14
12.2.2.	Предел обнаружения (LOD)	14
12.2.3.	Пороговые значения ΔCt	15
12.2.4.	Аналитическая специфичность	15

12.2.5.	Повторяемость и воспроизводимость	15
12.2.6.	Влияние содержания ДНК	15
12.2.7.	Интерферирующие вещества	15
13.	Клиническая эффективность	16
14.	Процедура анализа	17
14.1.	Выделение ДНК	17
14.2.	Протокол: Определение мутаций EGFR	17
14.3.	Протокол: Настройка Rotor-Gene Q EGFR	20
15.	Интерпретация результатов	28
16.	Требования к техническому обслуживанию и ремонту	34
17.	Перечень рисков, связанных с применением изделия	34
18.	Маркировка	35
19.	Требования к охране окружающей среды	35
20.	Утилизация медицинского изделия и его компонентов	36
21.	Стандарты, применимые к медицинскому изделию	36
22.	Контроль качества	36
23.	Сведения о производителе и разработчике медицинского изделия	36
24.	Гарантийные обязательства	37
25.	Рекламации	37
26.	Руководство по устранению неисправностей	37
27.	Литература	38
28.	Редакция документа	38
	Приложение А: Список мутаций	39

Технологии QIAGEN для пробоподготовки и проведения анализов

QIAGEN является лидирующим поставщиком инновационных технологий для пробоподготовки образцов и проведения анализов, обеспечивающих выделение веществ и определение состава любого образца биологического материала. Предлагаемые нашей компанией усовершенствованные высококачественные продукты и услуги обеспечивают успешное выполнение любых процедур, от отбора образца до получения результата исследования.

Компания QIAGEN устанавливает стандарты в сферах:

Очистки ДНК, РНК и белков

Анализ на содержание нуклеиновых кислот и белков

Исследований микро-РНК и РНК-интерференции

Автоматизации исследований и обработки образцов

Задачей компании является обеспечение исключительных результатов для клиентов. Дополнительную информацию можно найти на сайте: www.qiagen.com.

1. Наименование и состав изделия

Набор реагентов *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit для анализа мутаций в гене EGFR в пробе ДНК из образцов плазмы крови человека методом ПЦР

Состав:

1. Контрольная реакционная смесь (EGFR Control Reaction Mix) (2 x 600 мкл)
2. Реакционная смесь для определения T790M (EGFR T790M Reaction Mix) (1 x 600 мкл)
3. Реакционная смесь для определения делеций (EGFR Deletions Reaction Mix) (1 x 600 мкл)
4. Реакционная смесь для определения L858R (EGFR L858R Reaction Mix) (1 x 600 мкл)
5. Положительный контроль (EGFR Positive Control) (1 x 300 мкл)
6. ДНК-полимераза Taq (Taq DNA Polymerase) (2 x 80 мкл)
7. Вода безнуклеазная для отрицательного контроля (Water for NTC) (1 x 1,9 мл)
8. Вода безнуклеазная для разведения (Water for sample dilution) (1 x 1,9 мл)
9. Инструкция по применению

(далее по тексту – набор, набор реагентов, медицинское изделие, *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit)

2. Назначение

2.1. Назначение медицинского изделия

Набор реагентов *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit для анализа мутаций в гене EGFR в пробе ДНК из образцов плазмы крови человека методом ПЦР предназначен для качественного выявления соматических мутаций - делеций экзона 19, замены в экзонах 20 и 21 (T790M и L858R соответственно) в гене рецептора эпидермального фактора роста EGFR (in vitro). Позволяет качественно оценить статус мутации ДНК из образцов плазмы пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМРЛ), для прогнозирования или мониторинга ответа на терапию ингибиторами EGFR-тирозинкиназы.

Медицинское изделие предназначено для диагностики in vitro,

2.2. Функциональное назначение

Определение показаний к таргетной терапии при мутациях в гене EGFR у пациентов с немелкоклеточным раком легких с помощью определения мутаций методом ПЦР анализа в пробе ДНК из плазмы крови.

2.3. Количество реакций

Набор *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit представлен в одном варианте исполнения, число анализируемых проб ДНК биологического материала: 24.

2.4. Показания к применению

Набор *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR позволяет провести качественную оценку статуса мутаций (делеций экзона 19, замены в экзонах 20 и 21 (T790M и L858R соответственно)) в гене рецептора эпидермального фактора роста EGFR. Результаты помогут врачам выявить пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМРЛ), для прогнозирования или мониторинга ответа на терапию ингибиторами EGFR-тирозинкиназы. Также результаты потенциально могут использоваться для изменения режимов терапии пациентов с НМРЛ. Оценка статуса мутаций в гене EGFR позволяет оценить эффективность таргетной терапии на основе ингибиторов EGFR, либо резистентность к ней.

2.5. Область применения медицинского изделия

Клиническая лабораторная диагностика.

2.6. Противопоказания к применению

При использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

2.7. Побочные действия

Не применимо для данного МИ.

2.8. Требования к квалификации пользователей

Медицинское изделие может использоваться только квалифицированным персоналом (обученными лаборантами или врачами клинической лабораторной диагностики) в условиях профессиональной клинико-диагностической лаборатории. Пользователь также должен быть обучен методам безопасной работы с образцами крови и молекулярно-биологическим методам с использованием автоматизированного оборудования, и знаком с основными методами, необходимыми для правильного выполнения исследований, описанных в данной инструкции по применению медицинского изделия.

Медицинское изделие предназначено только для профессионального использования и не предназначено для самотестирования.

2.9. Сведения о стерильности

Медицинское изделие нестерильно. В процессе производства дозирование растворов производится в стерилизованные пробирки, стерилизация радиацией.

2.10. Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия

Без ограничений

3. Принцип метода

3.1. Метод

Набор предназначен для выявления мутаций в гене EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением приборов (амплификаторов) Rotor-Gene Q. Процесс выявления мутаций в гене EGFR включает предварительную подготовку образца, настройку прибора Rotor-Gene Q, выполнение исследования по определению мутаций и анализа результатов. Весь процесс и анализ выявления мутаций проводят в соответствии с инструкцией по применению набора *therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit* и руководства по эксплуатации Rotor-Gene Q.

3.2. Тип анализируемого образца и время анализа

Плазма цельной периферической венозной крови, стабилизированная ЭДТА.

Время полного цикла анализа с использованием набора, исключая пробоподготовку и настройку, не превышает 90 минут.

3.3. Принцип определения

Для определения мутаций в ходе анализа методом ПЦР в реальном времени используется принцип 2 технологий — ARMS и Scorpions.

ARMS

Аллель- или специфичная к мутации амплификация обеспечивается благодаря технологии ARMS (Amplification Refractory Mutation System, амплификация рефракторной мутационной системы). ДНК-полимераза Taq (Taq) является эффективным инструментом для различения соответствия и несоответствия на 3'-конце праймера ПЦР. Специфические последовательности мутаций избирательно амплифицируются даже в образцах, где большинство последовательностей не несут мутации. Когда праймер полностью правильно подобран, амплификация протекает с максимальной эффективностью. При несовпадении 3'-основания происходит лишь низкоуровневая фоновая амплификация.

Scorpions

Обнаружение в процессе амплификации осуществляется с помощью технологии Scorpions. Scorpions - это бифункциональные молекулы, в состав которых входит праймер для ПЦР, ковалентно связанный с зондом. Флуорофор в этом зонде взаимодействует с гасителем, также входящим в состав зонда, что снижает флуоресценцию. В ходе ПЦР, когда зонд связывается с ампликоном, флуорофор и гаситель разделяются. Это приводит к повышению флуоресценции в реакционной пробирке.

3.4. Ограничения метода

Обнаружение мутаций зависит от целостности образца и количества ДНК, присутствующей в образце. Содержание ДНК, необходимое для проведения анализа определяется анализом с контрольной реакционной смесью и должно составлять 1-2000 нг.

Метод ПЦР крайне чувствителен к контаминации. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать контаминации образцов исследуемой ДНК и реакционных смесей содержимым пробирки «Положительный контроль» или продуктами ПЦР.

Набор предназначен в качестве вспомогательного диагностического средства для качественного подтверждения наличия мутаций гена EGFR. Набор не может использоваться для диагностики патологии. Данные анализа следует использовать в совокупности с результатами других медицинских и диагностических обследований.

4. Описание целевого анализа

4.1. Научная обоснованность

Рак легкого остается основной причиной смертности от рака во всем мире [1] с 5-летним периодом выживаемости только в 16,8% случаев. Высокая смертность обусловлена несколькими факторами, включая приобретенную резистентность к стандартной терапии [1].

Мутация рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) является важным маркером, идентифицируемым в 10-30% всех немелкоклеточных форм рака легких (НМРЛ). Было показано, что соматические мутации в EGFR ассоциированы с прогнозируемым клиническим исходом благодаря применению ингибиторов EGFR-тирозинкиназы [2; 3]. Мутации гена EGFR были широко классифицированы либо как чувствительные к ингибиторам тирозинкиназы (делеции экзона 19, L858R, G719X), либо как резистентные к ингибиторам тирозинкиназы мутации (главным образом, мутация гена EGFR по типу замены T790M) [4]. В настоящее время тестирование EGFR при немелкоклеточном раке (аденокарциноме) легкого является стандартной медицинской практикой для определения применимости ингибиторов EGFR-тирозинкиназы в терапевтическом курсе.

Свободноциркулирующая ДНК (cfДНК) состоит из небольших фрагментов ДНК, высвобождаемых в кровоток из клеток организма. cfДНК присутствует в крови за счет высвобождения из некротических и апоптотических клеток и других механизмов спонтанного высвобождения и, как предполагается, представляет весь клеточный состав организма. Необходимость и польза диагностики cfДНК у пациентов с немелкоклеточным раком легкого возникает из-за частых проблем с получением хирургического биопсийного материала из-за состояния здоровья пациентов. Возможность обнаружения мутаций гена EGFR с малоинвазивным взятием крови может сделать тестирование и диагностику доступными для многих пациентов, для которых хирургическая биопсия не является вариантом или тестирование невозможно из-за недостатка материала. cfДНК может иметь дополнительные преимущества при исследовании всего опухолевого ландшафта, включая первичные гетерогенные опухоли, циркулирующие опухолевые клетки и отдаленные метастатические опухоли на предмет мутаций, что уменьшает погрешность при взятии пробы, известную при хирургической биопсии [5].

4.2. Описание целевого анализа

Набор *therascreen®* EGFR Plasma RGQ PCR Kit позволяет качественно выявлять следующие мутации гена EGFR на фоне геномной ДНК дикого типа.

- делеции в экзоне 19
- мутация T790M в экзоне 20
- мутация L858R в экзоне 21

therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit - это готовый к использованию набор реагентов для обнаружения мутаций в связанном с НМРЛ гене EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборах Rotor-Gene Q.

5. Классификация медицинского изделия

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б.

Изделие однократного применения, нестерильно.

6. Комплектность, описание и состав изделия

6.1. Описание изделия

Реагенты набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit представляют собой прозрачную бесцветную жидкость, находящуюся в пробирках с герметично закрытыми крышками, маркированные разным цветом. Пробирки с реагентами фиксируются на устойчивой подставке из гофрированного картона, и упаковываются в потребительскую упаковку (картонную коробку «колорфлекс»).

Изделие состоит из 10 флаконов рассчитанных на 24 теста, включая реакционные смеси, положительный контрольный материал и отрицательный контроль. Каждая упаковка сопровождается инструкцией по применению изделия.

6.2. Состав набора

В состав набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit входят четыре реакционные смеси для анализа и два контрольных анализа:

одна контрольная реакционная смесь (EGFR Control Reaction Mix);

три реакционные смеси для определения мутаций:

- Реакционная смесь для определения T790M (EGFR T790M Reaction Mix),
- Реакционная смесь для определения делеций (EGFR Deletions Reaction Mix),
- Реакционная смесь для определения L858R (EGFR L858R Reaction Mix).

положительный контроль

отрицательный контроль

Все четыре реакционные смеси содержат праймеры и зонды, меченные FAM, для обнаружения целевых мишеней. Кроме того, все реакционные смеси содержат внутренний контроль, представляющий собой систему из фрагмента матрицы EGFR (внутренний контрольный образец) и специфичных к ней праймеров и зондов, меченных HEX. Цель внутреннего контроля состоит в том, чтобы показать, что результат анализа без амплификации по FAM является истинно отрицательным результатом, а не ошибкой при подготовке ПЦР.

Анализ с контрольной реакционной смесью

Контрольная реакционная смесь, используется для оценки общего содержания ДНК в образце по каналу FAM. Этот анализ вызывает амплификацию области экзона 2 гена EGFR. Праймер и зонд разработаны таким образом, чтобы избежать любых известных полиморфизмов EGFR.

Анализ с реакционными смесями для определения мутаций

Каждая реакционная смесь для определения мутаций включает FAM-меченый зонд Scorpion и праймер ARMS для различения ДНК дикого типа от специфической мутантной ДНК.

Контроли

Все запуски ПЦР должны включать использование следующих контрольных материалов:

Положительный контроль

Набор *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit включает реагент Положительный контроль (EGFR Positive Control) (далее – PC либо положительный контроль), для использования в качестве «шаблона» целевых фрагментов ДНК. В каждом запуске ПЦР анализа положительный контроль должен добавляться в пробирки с 1 по 4 (см. Протокол: Определение мутаций EGFR). Оценка результатов анализа положительного контроля необходима для подтверждения функциональных свойств набора в соответствии с заданными характеристиками.

Отрицательный контроль

Реагент Вода безнуклеазная для отрицательного контроля (Water for NTC) (далее отрицательный контроль, контроль без матрицы, NTC) представляет собой безнуклеазную воду в качестве «шаблона» контроля отсутствия матрицы ДНК. В каждом запуске ПЦР анализа следует использовать отрицательный контроль в пробирках 9–12 (см. Протокол: Определение мутаций EGFR). Отрицательный контроль применяется для оценки возможной контаминации во время подготовки анализа и надлежащей работы внутреннего контроля.

Внутренний контроль

Каждая реакционная смесь содержит внутренний контроль (IC) в дополнение к целевой реакции. Внутренний контроль необходим для подтверждения отсутствия ингибирования, приводящего к ложноотрицательным результатам. Сбой внутреннего контроля также возможен из-за ошибки оператора при подготовке анализа для данной пробирки.

Если сбой внутреннего контроля вызван ингибированием ПЦР, разбавление образца может уменьшить эффект ингибиторов, но следует отметить, что это также приведет к разбавлению целевой ДНК. Амплификация по FAM может превзойти усиление внутреннего контрольного образца, так что генерируемое значение Ct HEX может выйти за пределы заданного диапазона. Результаты по FAM все еще действительны для таких образцов.

6.3. Комплект поставки

Таблица 1. Комплект поставки набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Цвет маркировки и крышки	Компонент	Обозначение/идентификатор	Количество пробирок x объем реагента в пробирке
Красный	Контрольная реакционная смесь (EGFR Control Reaction Mix)	CTRL	2 x 600 мкл
Фиолетовый	Реакционная смесь для определения T790M (EGFR T790M Reaction Mix)	T790M	1 x 600 мкл
Оранжевый	Реакционная смесь для определения делеций (EGFR Deletions Reaction Mix)	Del	1 x 600 мкл
Розовый	Реакционная смесь для определения L858R (EGFR L858R Reaction Mix)	L858R	1 x 600 мкл
Бежевый	Положительный контроль (EGFR Positive Control)	PC	1 x 300 мкл
Мятный	ДНК-полимераза Taq (Taq DNA Polymerase)	Taq	2 x 80 мкл
Белый	Вода безнуклеазная для отрицательного контроля (Water for NTC)	NTC	1 x 1,9 мл
Белый	Вода безнуклеазная для разведения (Water for sample dilution)	Dil	1 x 1,9 мл
Инструкция по применению			1 шт

7. Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

Набор для выделения ДНК: Набор *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit прошел валидацию при выделении ДНК из плазмы крови на наборе для выделения QIAamp DSP Circulating NA Kit, производства QIAGEN, Германия. Возможно использование наборов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови от других производителей, обеспечивающих отсутствие ингибирования и соответствующие качество и чистоту ДНК, пригодные для последующего использования в ПЦР методе.

Специальные пипетки переменного объема* (регулируемые) для образцов и приготовления смесей для ПЦР

Наконечники одноразовые для пипеток, с аэрозольными фильтрами

Дробленый лед

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q* (регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.10) с каналами флуоресценции Green и Yellow (определение FAM и HEX соответственно) или аналогичный. Рекомендуется использование Rotor-Gene Q 5plex HRM*

Примечание: Оборудование Rotor-Gene Q 5plex HRM используется со встроенным программным обеспечением

Полипропиленовые пробирки в стрипах с крышками, 0,1 мл, для использования с 72-луночным ротором

Центрифужные микропробирки без ДНКаз, РНКаз и без ДНК для приготовления смесей для ПЦР.

Штатив для 0,1 мл пробирок (алюминиевый штатив 72 x 0,1-миллилитровые пробирки).

Нагреватель или аналогичное устройство, способное поддерживать температуру на уровне 60°C.

Настольная центрифуга с ротором для реакционных пробирок объемом 2 мл

Вортекс.

* Убедитесь, что оборудование прошло проверку и калибровку в соответствии с рекомендациями производителя.

8. Условия хранения, эксплуатации и транспортирования, стабильность изделия.

Условия применения, хранения и транспортирования приведены в таблицах ниже.

Таблица 2. Условия применения

Параметр	Значение
Допустимые диапазоны температуры, °C	+15..+25°C
Допустимые диапазоны влажности, %	10..80

Таблица 3. Условия хранения

В защищенном от света месте

Параметр	Значение
Допустимые диапазоны температуры, °C	-30..-15°C

Таблица 4. Условия транспортировки

Параметр	Значение
Допустимые диапазоны температуры, °C	-70..-15°C

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

8.1. Условия хранения и эксплуатации

Набор *therascreen®* EGFR Plasma RGQ PCR Kit следует хранить сразу после получения при температуре от -30 до -15°C в морозильной камере с постоянной температурой и защищать от света. При хранении в указанных условиях хранения и в оригинальной упаковке набор стабилен до указанного на упаковке срока годности. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

После вскрытия реактивы можно хранить в оригинальной упаковке при температуре от -30 до -15°C в течение 12 месяцев (в течении срока годности). Следует избегать повторного оттаивания и замораживания. Не превышайте максимум восьми циклов замораживания-оттаивания.

Реагенты должны размораживаться при температуре окружающей среды не менее 1 часа и не более 4,5 часов. Как только реагенты будут готовы к использованию, можно начать ПЦР-реакции, и пробирки, содержащие мастер-смеси и образец ДНК, должны быть

немедленно загружены в Rotor-Gene Q 5plex HRM. Общее время от начала подготовки ПЦР до начала запуска не должно превышать:

6 часов при хранении при комнатной температуре

18 часов при хранении в холодильнике (2 - 8°C)

Примечание: Это время включает в себя как настройку ПЦР, так и хранение.

Примечание: Scorpions (как и все флуоресцентно меченые молекулы) в реакционной смеси реагентов светочувствительны. Защитите реагенты контрольной и реакционных смесей от света, чтобы избежать фотообесцвечивания флуоресцентной метки.

Реагенты в наборе *therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit* оптимально разбавлены, и перед их использованием в анализе не требуется никакой дополнительной очистки или обработки.

Следует обратить внимание на сроки годности и условия хранения, указанные на этикетках набора и всех компонентов. Не используйте просроченные или неправильно хранящиеся компоненты. Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

8.2. Условия транспортирования

Набор *therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit* поставляется на сухом льду. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат. Если какой-либо компонент набора не был заморожен по прибытии, внешняя упаковка была вскрыта во время транспортировки или груз не содержит инструкции по применению или реагентов, пожалуйста, свяжитесь с одним из отделов технической службы QIAGEN или местным уполномоченным представителем производителя (посетите сайт www.qiagen.com).

8.3. Срок годности изделия

Изделие сохраняет заявленную производительность и функциональные свойства при хранении в течение 12 месяцев с даты изготовления при соблюдении условий хранения и транспортирования. Срок годности изделия указан на упаковке и включен в штрих-код для набора.

Срок хранения после вскрытия упаковки и компонентов набора – при температуре от -30°C до -15°C в течение 12 месяцев (в течение срока годности) при условии максимального допустимого количества циклов размораживания-замораживания – 8.

Максимальная приемлемая задержка по времени между приготовлением проб и началом ПЦР анализа – 6 часов при комнатной температуре (23°C), 18 часов при 2–8°C

9. Хранение и обращение с образцами

Примечание: Все образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал.

Образец материала должен быть геномной ДНК человека, выделенной из плазмы крови. Для анализа с использованием набора рекомендуется использовать образцы человеческой плазмы, стабилизированные ЭДТА (соли этилендиаминтетрауксусной кислоты). Образцы должны транспортироваться в соответствии со стандартной методикой для обеспечения качества образцов. Взятие, обработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к набору реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

Примечание: Для сбора плазмы рекомендуются пробирки для отбора образцов крови, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта

9.1. Сбор и подготовка образцов

Любой процесс взятия крови приводит к повреждению кровеносных сосудов (артерий, вен, капилляров). Следует использовать только нетоксичный и стерильный материал. Венозную кровь следует отбирать в соответствующих участках локтевого сгиба, предплечья или с тыльной стороны ладони. Отбор крови должен производиться с помощью стандартных пробирок для сбора образцов. Следует отбирать кровь с ЭДТА в объеме 5-10 мл.

Непосредственно после отбора образца пробирки следует перемешивать переворачиванием вверх дном (8 раз, не встряхивать).

9.2. Обработка и хранение образцов

Цельную кровь необходимо сепарировать на плазму и клеточные компоненты в течение 6 часов после забора посредством центрифугирования в течение 20 минут при 800-1600 x g.

Выделенную плазму переносят в стерильные полипропиленовые пробирки. Анализ рекомендуется проводить сразу после подготовки пробы. Чувствительность анализа может снижаться, если образцы повторно замораживать. Выделенная плазма стабильна до 6 часов при температуре 2-8 °C, в течение трех недель при температуре хранения -20°C, и в течение двух месяцев при температуре хранения -70°C.

9.3. Перевозка образцов

Материал образца следует перевозить в ударопрочном транспортном контейнере, чтобы избежать потенциального риска инфицирования из-за утечки образца. Образцы необходимо транспортировать согласно местным и национальным инструкциям по перевозке материала. Не рекомендуется хранить образцы в том месте, в котором они были собраны. После сбора, образцы следует отправлять в место проведения исследования в течение 6 часов.

Транспортировку образцов крови необходимо производить в охлажденном состоянии (2-8°C), а сепарированную плазму в глубокой заморозке (от -15 до -30°C).

9.4. Выделение свободно циркулирующей ДНК

Набор *therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit* прошел валидацию при выделении ДНК из плазмы крови на наборе для выделения *QIAamp DSP Circulating NA Kit*, производства *QIAGEN*, Германия. Возможно использование наборов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови от других производителей, обеспечивающих отсутствие ингибирования и соответствующие качество и чистоту ДНК, пригодные для последующего использования в ПЦР методе. Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов для выделения.

Очищенную геномную ДНК следует хранить при температуре от -15 до -30°C.

10. Меры предосторожности и ограничения

10.1. Меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Запрещается использовать набор с истекшим сроком годности и/или поврежденной упаковкой компонентов набора.

Следует использовать набор только для профессиональной диагностики в лабораторных условиях.

- Следует допускать к работе только обученный персонал.
- Следует использовать одноразовые перчатки без талька, халаты и защитные очки. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Следует использовать калиброванные пипетки и инструменты.
- Следует использовать наконечники с фильтрами для пипеток
- Хранить и экстрагировать положительные материалы (образцы и положительные контрольные реагенты) следует отдельно от остальных реагентов. Добавление этих реагентов в смесь следует осуществлять в отдельном помещении.
- Не следует хранить открытыми пробирки с реагентами
- До, во время и после применения этого набора, все потенциально опасные материалы (то есть материалы, которые могли войти в контакт с клиническими образцами), включая пробирки, наконечники и прочие материалы, следует обрабатывать и утилизировать в соответствии с применимыми и соответствующими муниципальными/правительственными нормами, действующими в месте применения этого продукта.

- Со всеми образцами следует обращаться как с потенциально биологически опасными веществами. Утилизацию образцов и отходов на различных стадиях обработки образца следует проводить в соответствии с местными/национальными правилами утилизации через уполномоченные организации в данном регионе.

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

Примечание: Соблюдайте особую осторожность для предотвращения загрязнения ПЦР синтетическим контрольным материалом. Рекомендуется использовать отдельные пипетки для добавления реакционных смесей и ДНК-матрицы. Приготовление и распределение реакционных смесей следует проводить в зоне, отдельной от зоны, в которой проводилось добавление матрицы. Пробирки для прибора Rotor-Gene Q не следует открывать после завершения цикла ПЦР. Это необходимо для предотвращения загрязнения лаборатории продуктами, получаемыми в результате ПЦР.

Примечание: Реагенты прошли валидацию на настройку вручную. Использование автоматического метода может уменьшить количество возможных реакций из-за дополнительного расхода реагентов, который потребуется для заполнения "мертвого объема" в анализаторе.

Примечание: Все реагенты в составе набора theascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit подготовлены специально для проведения описанных анализов. Все поставляемые реагенты в наборе theascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit предназначены для использования только с другими реагентами из того же набора. Для обеспечения оптимальной эффективности работы не следует заменять реагенты в наборе.

Примечание: Следует использовать только ДНК-полимеразу Taq (Taq) из набора. Не заменяйте ее ДНК-полимеразой Taq из других наборов этого или другого типа или ДНК-полимеразой Taq от других поставщиков.

Примечание: Реагенты в наборе theascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit разведены до оптимальной концентрации. Не рекомендуется дополнительно разводить реагенты, так как это может привести к ухудшению эффективности работы. Не рекомендуется применять реакционную смесь в объеме менее 25 мкл, так как это повысит риск получения ложноположительных результатов.

10.2. Ограничения

- Изделие предназначено в качестве вспомогательного диагностического средства для подтверждения наличия мутаций гена EGFR и для прогнозирования или мониторинга ответа на терапию ингибиторами рецепторов эпидермального фактора роста. Данные анализа следует использовать в совокупности с результатами других медицинских и диагностических обследований. Результаты анализа не должны самостоятельно использоваться для диагностики патологии.

- Изделие может использоваться исключительно для диагностики *in vitro*.

- Продукт предназначен для профессионального применения и должен использоваться только квалифицированным персоналом, специально проинструктированным и обученным процедурам диагностики *in vitro* и работе с прибором Rotor-Gene Q 5plex HRM (обученными лаборантами или врачами клинической лабораторной диагностики). Изделие не предназначено для самотестирования.

- Аналитические валидационные исследования включали ДНК человека, извлеченную из образцов плазмы.

- Для достижения оптимальных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора theascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Не рекомендуется разбавление реагентов, отличное от описанного в данной инструкции по применению, которое приводит к потере производительности.

- Следует обратить внимание на сроки годности и условия хранения, указанные на упаковке и этикетках всех компонентов. Не используйте просроченные или неправильно хранящиеся компоненты. Использование изделия с истекшим сроком годности запрещается.
- Для анализа с использованием набора рекомендуется использовать образцы человеческой плазмы, стабилизированные ЭДТА (соли этилендиаминтетрауксусной кислоты) в качестве антикоагулянта. Не следует использовать образцы, собранные в пробирки с содержанием гепарина в качестве антикоагулянта, или образцы пациентов с гепаринизированной кровью.
- С целью снижения ложноположительных и ложноотрицательных результатов по ДНК с мутациями, валидность и эффективность конструкции набора и анализа проходят регулярный пересмотр.

Примечание: Праймеры в реакционной смеси для определения делеций EGFR были разработаны для обнаружения множества делеций 19 экзона, охватывающие участок в диапазоне 23 b.p. (нуклеотиды от 55174772 до 55174795 (GRCh38 chr7)).

Хотя анализ делеций экзона 19 был аналитически подтвержден и продемонстрирован для обнаружения определенных делеций в экзоне 19 настоящей инструкции, тем не менее, возможно, что дополнительные мутации (включая, но не ограничиваясь, дополнительными делециями экзона 19, вставками экзона 19 и мутацией L747P) будут амплифицированы реакционной смесью для определения делеций (EGFR Deletions Reaction Mix). Если такие дополнительные мутации присутствуют, они приведут к результату "Мутация обнаружена" для данного образца пациента.

Кроме того, мутация L858Q может быть обнаружена с помощью реакционной смеси для определения L858R (EGFR L858R Reaction Mix). Поэтому, если мутация L858Q присутствует в образце пациента, она может привести к результату "Мутация обнаружена" по анализу L858R.

10.3. Меры индивидуальной защиты

Защита кожи рук	Во избежание попадания на кожу используются защитные одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные.
Защита глаз	Во избежание попадания в глаза используются защитные или лабораторные очки.
Защита тела	Надевайте лабораторный халат и специальную обувь, защищающую от химических веществ
Защита органов дыхания	В обычных условиях при использовании изделия защита органов дыхания не требуется. В случае плохой вентиляции помещения и длительной работы с изделием вопрос о респираторной защите решается квалифицированным специалистом.
Средства гигиены	Храните вдали от продуктов питания и напитков. При использовании запрещается принимать пищу, напитки или курить
Меры защиты окружающей среды	Не допускается попадание компонентов изделия в канализацию и водоемы.

Примечание - Набор реагентов не содержит материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

10.4. Информация о безопасности

Для получения дополнительной информации см. соответствующие паспорта безопасности (SDS). С ними можно ознакомиться в режиме онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety. Там можно найти, просмотреть и распечатать SDS по каждому набору QIAGEN и его компонентам.

11. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения

Лекарственные средства: не используются.

Материалы человеческого происхождения: не используются.
Материалы животного происхождения: не используются

12. Характеристики изделия

12.1. Технические характеристики

Характеристика	Масса, г ($\pm 5\%$)	Внешний вид
Контрольная реакционная смесь (EGFR Control Reaction Mix)	2.05	Прозрачная бесцветная жидкость без осадка и взвешенных твердых частиц
Реакционная смесь для определения T790M (EGFR T790M Reaction Mix)	2.05	
Реакционная смесь для определения делеций (EGFR Deletions Reaction Mix)	2.05	
Реакционная смесь для определения L858R (EGFR L858R Reaction Mix)	2.05	
Положительный контроль (EGFR Positive Control)	1.60	
ДНК-полимераза Taq (Taq DNA Polymerase)	1.48	
Вода безнуклеазная для отрицательного контроля (Water for NTC)	3.40	
Вода безнуклеазная для разведения (Water for sample dilution)	3.40	Герметично
Герметичность пробирок		

12.2. Функциональные характеристики изделия

12.2.1. Аналитическая чувствительность — предел бланка (LOB)

Для оценки функциональных свойств набора, а также для подтверждения того, что отсутствие матрицы ДНК или образец ДНК дикого типа не вызывает формирование сигнала анализатора, соответствующего низкой концентрации мутаций, был проведен анализ 59 разных образцов плазмы пациентов с диагнозом немелкоклеточного рака легких. Критерии приемлемости для исследования (не менее 95% образцов ДНК дикого типа должны иметь значение ΔC_t выше соответствующего допустимого диапазона) были соблюдены.

12.2.2. Предел обнаружения (LOD)

Предел обнаружения (LOD) – это минимальное содержание ДНК с мутацией, которое может быть выявлено на фоне ДНК дикого типа (в пределах рабочего диапазона содержания ДНК) в 95% случаев для каждого образца с мутацией (C95). Рабочий диапазон содержания ДНК определяется анализом с контрольной реакционной смесью и значение C_t должно составлять от 23,70 до 31,10.

Предел обнаружения для набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR определялся при низком уровне содержания ДНК (C_t контрольной реакционной смеси около 30,10, что соответствовало концентрации ДНК примерно 100-300 копий/мкл) с использованием как клинических образцов так и образцов клеточной линии.

Окончательные заявленные пределы обнаружения, указанные в таблице ниже, обозначают процент мутации, обеспечивающий прогнозируемую вероятность положительного отклика, 95% для каждой мутации.

Таблица 5. Предел обнаружения

Экзон	Мутация	Предел обнаружения (%)
20	T790M	17,50
19	Делеции*	0,81
21	L858R	5,94

*Праймеры в реакционной смеси для определения делеций были разработаны для нацеливания на множественные делеции экзона 19, охватывающие нуклеотиды от 55174772

до 55174795 (GRCh38 chr7), диапазон 23bp. В то время как анализ делеций экзона 19 был аналитически подтвержден и продемонстрирован для обнаружения указанных делеций (см. Таблицу 17), однако возможны дополнительные мутации (включая, но не ограничиваясь, дополнительными делециями экзона 19, вставками экзона 19 и мутация L747P), которые будут амплифицированы реакционной смесью для определения делеций.

Примечание: предел обнаружения для делеций указан для Del 6255 как минимальное значение, определяемое набором по совокупности всех делеций в экзоне 19.

12.2.3. Пороговые значения ΔC_t

При установке пороговых значений для анализа был использован риск-ориентированный подход в отношении частоты ложноположительных результатов, а значения LOB использовались в качестве одного из компонентов при разработке пороговых значений. Соответствующие допустимые диапазоны ΔC_t для анализа на каждую мутацию указаны в таблице ниже.

Мутация	ΔC_t
T790M	$-10,00 \leq \Delta C_t \leq 7,40$
Делеции	$-10,00 \leq \Delta C_t \leq 8,00$
L858R	$-10,00 \leq \Delta C_t \leq 8,90$

12.2.4. Аналитическая специфичность

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

12.2.5. Повторяемость и воспроизводимость

Оценка повторяемости и воспроизводимости осуществлялась путем тестирования образцов с уровнем мутации 3xLOD на фоне геномной ДНК дикого типа, на трех исследовательских площадках, с использованием наборов разных серий, операторов и запусков в разные дни, в двух повторностях для каждого образца.

Для всех 3-х анализов на мутации 100% образцов ДНК с мутацией были определены как мутационно-положительные, при этом образцы дикого типа тестировались как мутационно-отрицательные во всех повторностях на всех участках.

12.2.6. Влияние содержания ДНК

Допустимый уровень содержания ДНК в анализе определяется как общее количество амплифицируемой ДНК EGFR в образце и устанавливается значениями C_t для контрольной реакционной смеси. Чтобы продемонстрировать, что производительность набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit согласована во всем диапазоне значений C_t контрольной реакции C_t 23.70–31.10, все 3 анализа на мутации EGFR были протестированы при шести сериях разведения 1 к 3 (ДНК клеточных линий). Целевое значение C_t для первого разведения, для каждой мутации, было приблизительно 24,70. Окончательное разведение, которое дало C_t приблизительно 32-33, было вне допустимого диапазона C_t для контрольной реакционной смеси. В целом, пороговые значения ΔC_t , полученные на различных уровнях содержания ДНК, были согласованы заявленному рабочему диапазону набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

12.2.7. Интерферирующие вещества

Вещества, предположительно способные влиять на результат анализа, вводились в смоделированные 3xLOD мутационно-положительные образцы плазмы. Затем проводился анализ образцов с использованием набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Результаты для образцов с мутациями и дикого типа, содержащих интерферирующие

вещества, сравнивались с результатами образцов в которые не добавлялись интерференты. Каждый образец анализировался 4 раза.

Было принято, что отклонение между ΔC_t "испытуемого" и "контрольного" образца на величину более чем двукратное значение стандартного отклонения (SD) (из исследования прецизионности) указывает на влияние интерферирующего вещества на результат анализа (поскольку наблюдается достаточная разница ΔC_t).

Концентрации испытуемых веществ, указанные в таблицах 6 и 7, были выбраны на основании указаний руководства CLSI EP07-A2 и представляют собой максимальные концентрации, которые могут наблюдаться в образце в клинических условиях либо превышают обычно наблюдаемые терапевтические концентрации.

Таблица 6. Эндогенные интерференты

Потенциально интерферирующие вещества	Концентрация
Билирубин	15 мг/дл
Гемоглобин (человека)	0,2 г/дл
Триглицериды	3 г/дл

Таблица 7. Экзогенные интерференты

Потенциально интерферирующие вещества (ИВ)	Концентрация (мкг/мл)
Циталопрама гидробромид	0,75
Пароксетина гидрохлорид полугидрат	1,14
Сертралина гидрохлорид	0,67
Флуоксетина гидрохлорид	3,87
Ацетаминофен	200,7
K ₂ ЭДТА (двукальциевая соль ЭДТА)	3600

В целом, девять протестированных потенциально интерферирующих веществ, обычно обнаруживаемых в образцах пациентов, не влияют на способность набора правильно идентифицировать образцы с мутациями из плазмы. Однако некоторые вещества, в зависимости от мутации, действительно незначительно влияют на ΔC_t . Для большинства из них ΔC_t сузилась. Это может привести к ложноположительным результатам, а не к ложноотрицательным. Однако все эти вещества тестировались при очень высокой тестовой концентрации, превышающей терапевтическую концентрацию, а для некоторых веществ даже превышающей токсическую концентрацию. Таким образом, вероятность того, что эти вещества будут в такой высокой концентрации в фактическом образце пациента, очень мала.

13. Клиническая эффективность

Было проведено клиническое исследование NCT01203917 по оценке эффективности и безопасности/переносимости терапии с применением первой линии гефитиниба (gefitinib) у пациентов европеоидной расы с немелкоклеточным раком легких IIIA/B/IV стадии с положительным результатом анализа на наличие мутации EGFR.

Приемлемость для участия пациентов в клиническом исследовании NCT01203917 определялась наличием заявленных мутаций EGFR. Статус мутации EGFR у пациентов с немелкоклеточным раком легких определялся с помощью анализа, утвержденного для клинических исследований (СТА) с использованием ДНК из образцов ткани и плазмы. Исследование включало в себя заранее запланированную исследовательскую задачу по изучению биомаркеров, чтобы установить, можно ли рассматривать образцы плазмы для анализа мутаций, если образцы ткани недоступны. Результаты показали высокие показатели

соответствия между выбранными образцами FFPE ткани и плазмы - 94,3%, при специфичности анализа 99,8% и чувствительности 65,7%.

Ретроспективный анализ образцов плазмы пациентов, прошедших скрининг при участии в исследовании NCT01203917 проводился с использованием набора *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Было проведено вспомогательное исследование для оценки соответствия результатов анализа набором *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit и СТА, использованным при отборе пациентов для участия в клиническом исследовании NCT01203917. Была продемонстрирована эквивалентность между использованием СТА и анализом набором *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

14. Процедура анализа

14.1. Выделение ДНК

Набор *therascreen*® EGFR Plasma RGQ PCR Kit прошел валидацию при использовании набора для выделения ДНК «QIAamp DSP Circulating NA Kit», производства QIAGEN, Германия. Возможно использование наборов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови других производителей, обеспечивающих отсутствие ингибирования и соответствующие качество и чистоту ДНК, пригодные для последующего использования в ПЦР методе. Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов для выделения.

При использовании набора для выделения QIAamp DSP Circulating NA Kit (QIAGEN, Германия) проводить выделение ДНК из плазмы крови следует в соответствии с инструкцией по применению с учетом следующих положений:

Начальный объем плазмы – 2 мл.

Перед экстракцией ДНК 2 мл плазмы необходимо центрифугировать со скоростью 3000 об/мин в течение 2 минут и затем переместить супернатант в чистую пробирку.

Объем протеиназы К (РК) должен составлять 250 мкл.

Обработку протеиназой К следует проводить при температуре 60°C в течение 1 часа.

Очищенную ДНК следует элюировать 55 мкл буфера AVE (поставляется в наборе QIAamp DSP Circulating NA Kit)

Очищенную ДНК следует хранить при температуре от –15 до –30°C, допустимо в течении года.

Примечание: Все анализы набором theascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit вызывают образование коротких продуктов ПЦР. При этом, набор theascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit не будет эффективно функционировать с сильно фрагментированными ДНК.

14.2. Протокол: Определение мутаций EGFR

Важная информация перед началом работы

Перед началом работы прочитайте пункт «Меры предосторожности».

Не торопитесь и детально разберитесь в принципе работы анализатора Rotor-Gene Q перед запуском процедуры выполнения протокола. Прочитайте руководство пользователя прибора.

В каждом запуске может быть проанализировано до 16 образцов.

Для получения достоверных результатов необходимо чтобы процедуры приготовления смесей были выполнены на каждом требуемом этапе в процессе подготовки анализа.

Не перемешивайте на вортексе ДНК-полимеразу Таq или любые другие смеси, содержащие ДНК-полимеразу Таq, так как это может вызвать утрату активности фермента.

Набирайте дозатором ДНК-полимеразу Таq, слегка погрузив наконечник под поверхность жидкости, чтобы избежать чрезмерного покрытия наконечника раствором фермента.

Для каждого образца ДНК в одном запуске должны быть выполнены все 4 анализа: один с контрольной реакционной смесью и три с реакционными смесями для обнаружения мутаций. Это необходимо для минимизации разброса данных от запуска к запуску.

Для эффективного использования реагентов набора необходимо как можно больше образцов ДНК для заполнения ротора и полного запуска. Тестирование образцов по отдельности или в меньшем количестве чем 16 образцов использует больше реагентов и уменьшает общее количество образцов, которые могут быть протестированы с помощью одного набора *therascreen® EGFR RGQ PCR Kit*.

Подготовка перед началом работы

Перед каждым использованием все реагенты необходимо полностью разморозить в течение минимум 1 часа и максимум 4,5 часов при комнатной температуре (15-25°C), перемешать путем переворачивания 10 раз и кратковременно центрифугировать, чтобы собрать осадок на дне пробирки.

Перед каждым использованием следует проверить, что реагент ДНК-полимераза Taq разморожен до комнатной температуры 15-25 °C. Кратко центрифугировать пробирку.

Перемешать все образцы, переворачивая пробирку 10 раз, затем кратковременно центрифугировать, чтобы собрать осадок на дне пробирки.

Процедура

1. Полностью разморозьте все реакционные смеси, безнуклеазную воду для отрицательного контроля (NTC) и положительный контроль (PC) при комнатной температуре (15–25°C) в течение как минимум 1 часа. После размораживания перемешайте реагенты, переворачивая каждую пробирку 10 раз, чтобы избежать неоднородной концентрации солей, после чего центрифугируйте в течение короткого времени, чтобы собрать возможный осадок на дне пробирки.

Таблица 8. Время размораживания, время подготовки запуска ПЦР и температура хранения

Минимальное время оттаивания	Максимальное время оттаивания	Температура хранения при подготовке запуска ПЦР	Общее время до начала ПЦР, не более
1 час	4,5 часа	15–25°C	6 часов
1 час	4,5 часа	2 – 8°C	18 часов

Примечание: Подготовка запуска ПЦР должна выполняться при комнатной температуре. Время хранения относится к времени между началом подготовки ПЦР и запуском ПЦР на Rotor-Gene Q 5plex HRM.

Примечание: Доведите ДНК-полимеразу Taq (пробирка Taq) до комнатной температуры (15-25°C) одновременно с другими реагентами. Кратковременно центрифугируйте пробирку для сбора осадка на дне.

2. Выполните следующие стадии:

2a. Промаркируйте микроцентрифужные пробирки или стрипы пробирок (не входят в комплект), в соответствии с добавляемой при анализе реакционной смесью, нумерация указана в Таблице 10. Пробирки 5-8, 13-16, 17-72 используются для анализа образцов с соответствующей реакционной смесью (контрольная реакционная смесь или реакционные смеси для определения мутаций). Пробирки 1-4 используются для положительного контроля, 9-12 для отрицательного контроля с соответствующей реакционной смесью.

2b. Приготовьте достаточный объем мастер-микс (master mix) смесей для ПЦР. Мастер микс готовится для каждой из реакционных смесей из состава набора (для трех реакционных смесей для определения мутаций [пробирки T790M, Del, L858R] и для одной контрольной реакционной смеси [пробирка CTRL]) путем добавления в соответствующую реакционную смесь раствора ДНК-полимеразы Taq [пробирка Taq]. Необходимый объем мастер-микс смесей рассчитывается исходя из количества исследуемых образцов ДНК, плюс

одного положительного контроля (РС) и одного отрицательного контроля (NTC) согласно объемам, указанным в Таблице 9. Для обеспечения достаточного запаса объема следует включить в расчет 1 дополнительный образец. Мастер-микс смеси содержат все компоненты, необходимые для проведения ПЦР, за исключением анализируемого образца.

Таблица 9. Приготовление мастер-микс смесей для ПЦР*

Анализ	Реакционная смесь	Объем реакционной смеси	Объем ДНК-полимеразы Taq
Контрольный	Контрольная реакционная смесь	19,50 мкл x (n+1)	0,50 мкл x (n+1)
T790M	Реакционная смесь для определения T790M	19,50 мкл x (n+1)	0,50 мкл x (n+1)
Делеции	Реакционная смесь для определения делеций	19,50 мкл x (n+1)	0,50 мкл x (n+1)
L858R	Реакционная смесь для определения L858R	19,50 мкл x (n+1)	0,50 мкл x (n+1)

*n – количество реакций, соответствующее количеству образцов плюс 2 (положительный и отрицательный контроли). При подготовке мастер-микс смесей подготовьте объем, с запасом для одного дополнительного образца.

Примечание: При приготовлении мастер-микс смесей сначала добавляется в пробирку необходимый объем соответствующей реакционной смеси (контрольной или для определения мутаций), а затем добавляется ДНК-полимераза Taq.

3. Поместите необходимое количество стрипов 0,1 мл пробирок для ПЦР (каждый стрип содержит 4 пробирки), промаркированных на стадии 2а, в загрузочный блок согласно схеме, приведенной в Таблице 10. Не закрывайте пробирки крышками.

4. Закройте пробирки с подготовленными мастер-микс смесями крышками и переверните 10 раз, чтобы перемешать смеси, после чего отцентрифугируйте в течение короткого времени. Немедленно добавьте по 20 мкл каждой из мастер-микс смесей во все соответствующие пробирки для ПЦР согласно таблице 10.

5. Сразу добавьте 5 мкл воды безнуклеазной для отрицательного контроля (NTC) в соответствующие пробирки (ПЦР пробирки 9–12) и закройте пробирки колпачками.

6. Добавьте по 5 мкл каждого образца в пробирки для образцов (ПЦР пробирки 5–8, 13–16 и 17–72) и закройте пробирки колпачками.

7. Добавьте 5 мкл положительного контроля (РС) в пробирки для положительного контроля (ПЦР пробирки 1-4).

Анализ каждого образца ДНК следует проводить с использованием всех 4 реакционных смесей состава набора (одной контрольной реакционной смесью и тремя реакционными смесями для определения мутаций). Схема расположения пробирок указана в Таблице 10.

Таблица 10. Схема расположения ПЦР пробирок в загрузочном блоке

Анализ	Контроли		Номер образца							
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7	
Контрольный (контрольная реакционная смесь)	1	9	17	25	33	41	49	57	65	
T790M (реакционная смесь для определения T790M)	2	10	18	26	34	42	50	58	66	
Делеции (реакционная смесь для определения делеции)	3	11	19	27	35	43	51	59	67	
L858R (реакционная смесь для определения L858R)	4	12	20	28	36	44	52	60	68	
Анализ	Номер образца									
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Контрольный (контрольная реакционная смесь)	5	13	21	29	37	45	53	61	69	
T790M (реакционная смесь для определения T790M)	6	14	22	30	38	46	54	62	70	
Делеции (реакционная смесь для определения делеции)	7	15	23	31	39	47	55	63	71	
L858R (реакционная смесь для определения L858R)	8	16	24	32	40	48	56	64	72	

8. Несмываемым маркером пометьте крышки первых пробирок каждого стрипа (например, позиции 1, 5, 9 и т. д.), чтобы показать ориентацию загрузки пробирок в 72-луночный ротор Rotor-Gene Q 5plex HRM.

9. Переверните закрытые крышками стрипы пробирок 4 раза, чтобы перемешать содержимое.

10. Поместите все стрипы пробирок в соответствующие положения 72-луночного ротора и визуально убедитесь, что все пробирки содержат одинаковый объем жидкости.

11. Если ротор не заполнен полностью, заполните оставшиеся ячейки пустыми пробирками с закрытыми колпачками для уравнивания ротора..

12. Немедленно установите ротор в прибор Rotor-Gene Q 5plex HRM. Убедитесь, что прижимное кольцо (дополнительный элемент прибора Rotor-Gene Q 5plex HRM) установлено на верхней части ротора, чтобы закрепить пробирки во время выполнения анализа.

13. Для формирования температурного профиля и запуска анализа используйте меню Rotor-Gene Q 5plex HRM (см. «Протокол: Настройка Rotor-Gene Q EGFR»).

14.3. Протокол: Настройка Rotor-Gene Q EGFR

Используются следующие параметры циклирования для анализа:

Таблица 11. Параметры циклирования

Циклы	Температура	Время	Считывание данных
1	95°C	15 минут	Нет
40	95°C	30 секунд	Нет
	60°C	60 секунд	Каналы Green и Yellow

1. Выберите иконку Rotor-Gene Q. Выберите вкладку "расширенные настройки" (Advanced) в диалоговом окне "новый запуск" (New Run).
2. Для создания нового шаблона нажмите "холостой запуск" (Empty Run) и нажмите "Новый" (New), чтобы появился "Мастер настройки нового запуска" (New Run Wizard).
3. В качестве типа ротора выберите 72-луночный ротор. Подтвердите, что прижимное кольцо ротора установлено и нажмите "прижимное кольцо установлено" (Lockink Ring Attached). Нажмите "Далее" (Next) (см. Рис.1).

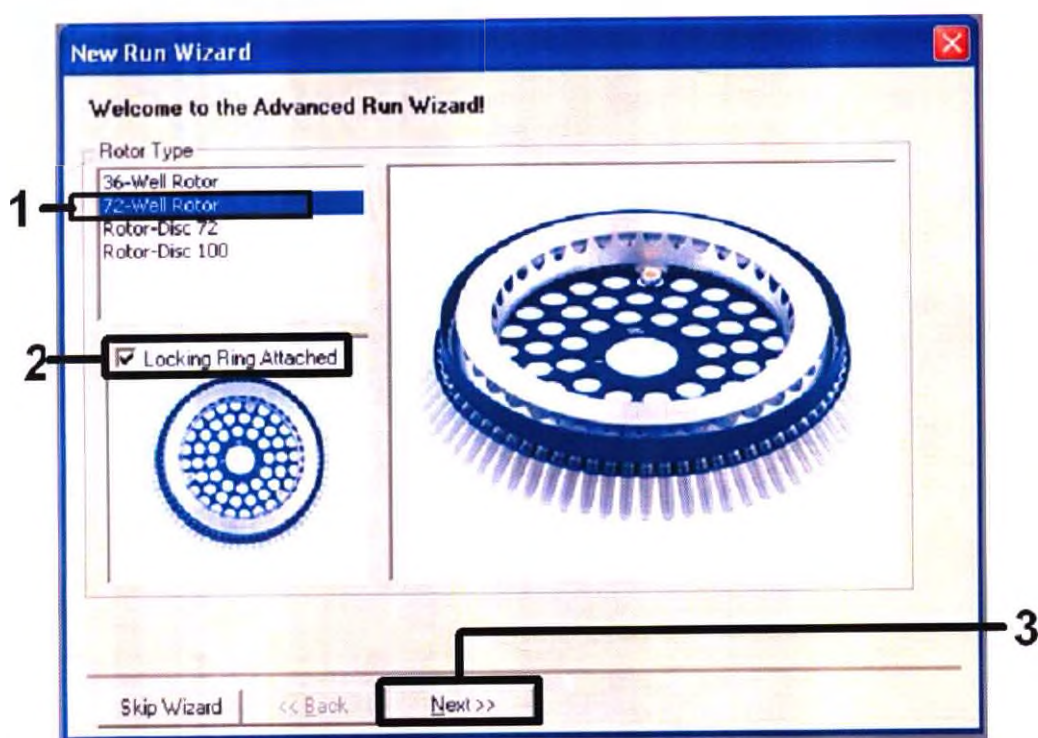


Рисунок 1. Диалоговое окно "мастер нового запуска".

4. Введите имя оператора. Добавьте примечания и задайте объем реакции, равный 25. Убедитесь, что на схеме образцов появились цифры "1, 2, 3...". Нажмите "Далее" (см. Рис.2).

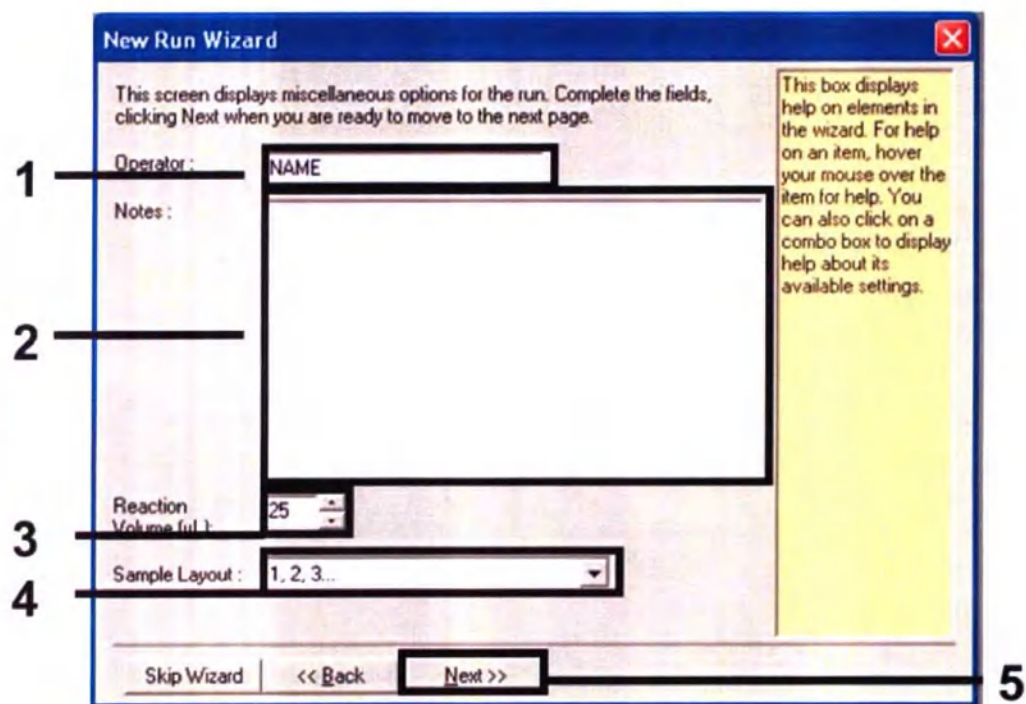


Рисунок 2. Ввод имени оператора и объема реакции.

5. Нажмите кнопку "редактировать профиль" (Edit Profile) в диалоговом окне "мастер нового запуска" (New Run Wizard) (см. Рис.3), после чего задайте параметры запуска в соответствии с описанными ниже этапами.

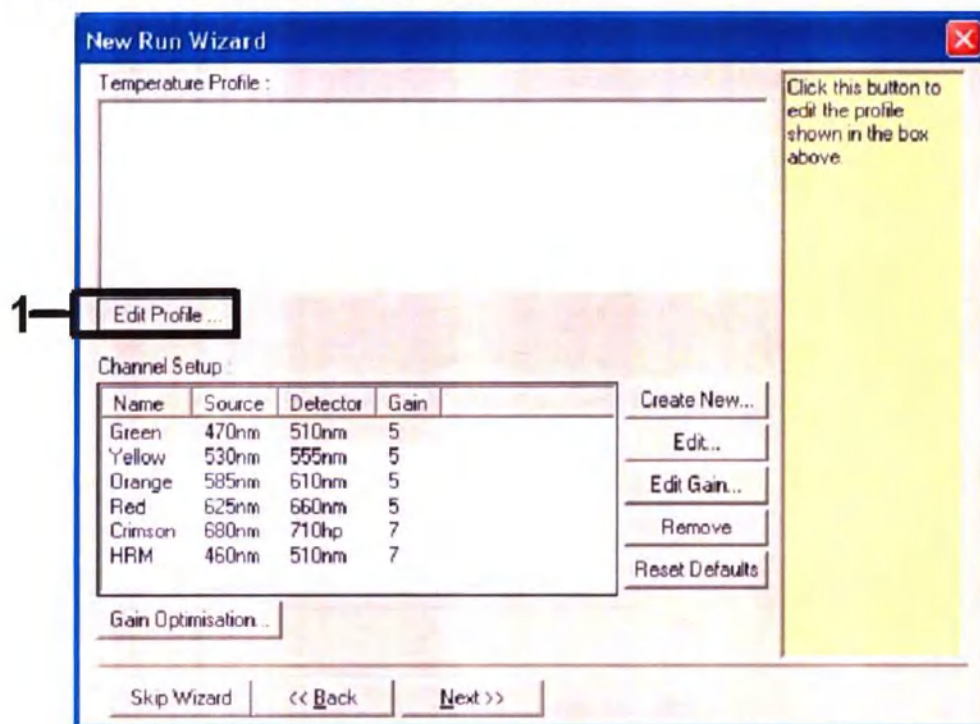


Рисунок 3. Редактирование профиля.

6. Нажмите кнопку "вставить после" (Insert After) и выберите "установка температуры" (New Hold at Temperature) (см. Рис.4).

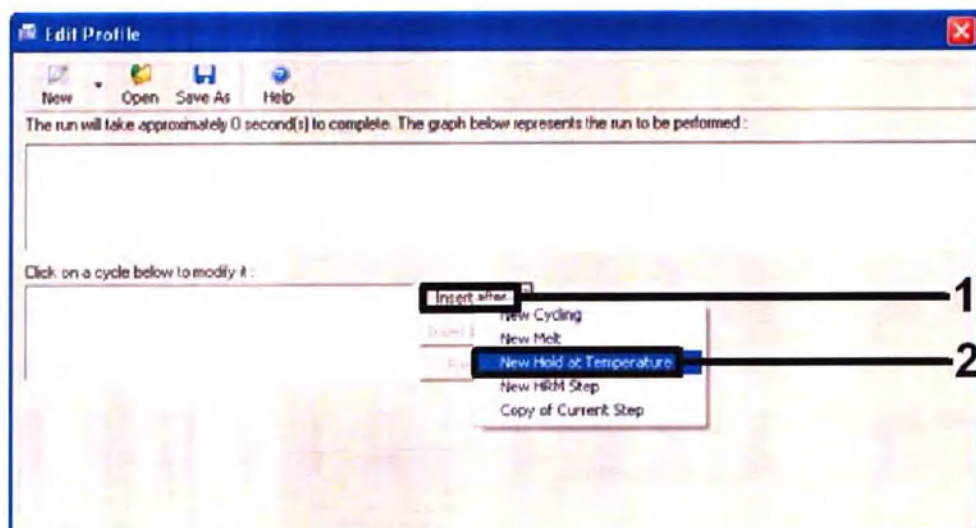


Рисунок 4. Вставка этапа начальной инкубации.

7. Измените значение в поле "поддерживать температуру" (Hold Temperature) на 95°C и в поле "время поддержания" (Hold Time) на 15 минут 0 секунд. Нажмите кнопку "вставить после" (Insert After) и выберите "новый цикл" (New Cycling) (см. Рис.5).

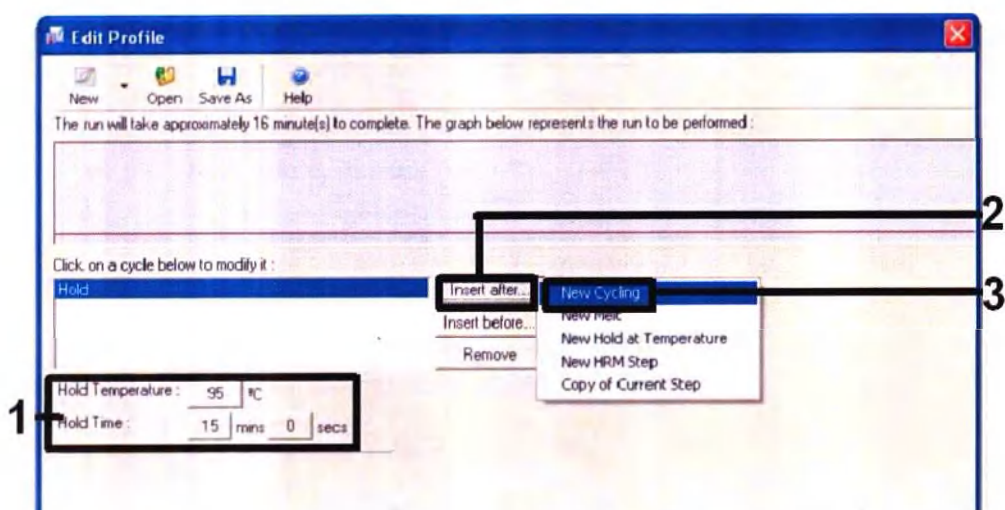


Рисунок 5. Начальный этап инкубации при температуре 95°C.

8. Установите количество повторов циклов на 40. Выберите первый цикл и установите 95°C на 30 секунд (см. Рис.6).

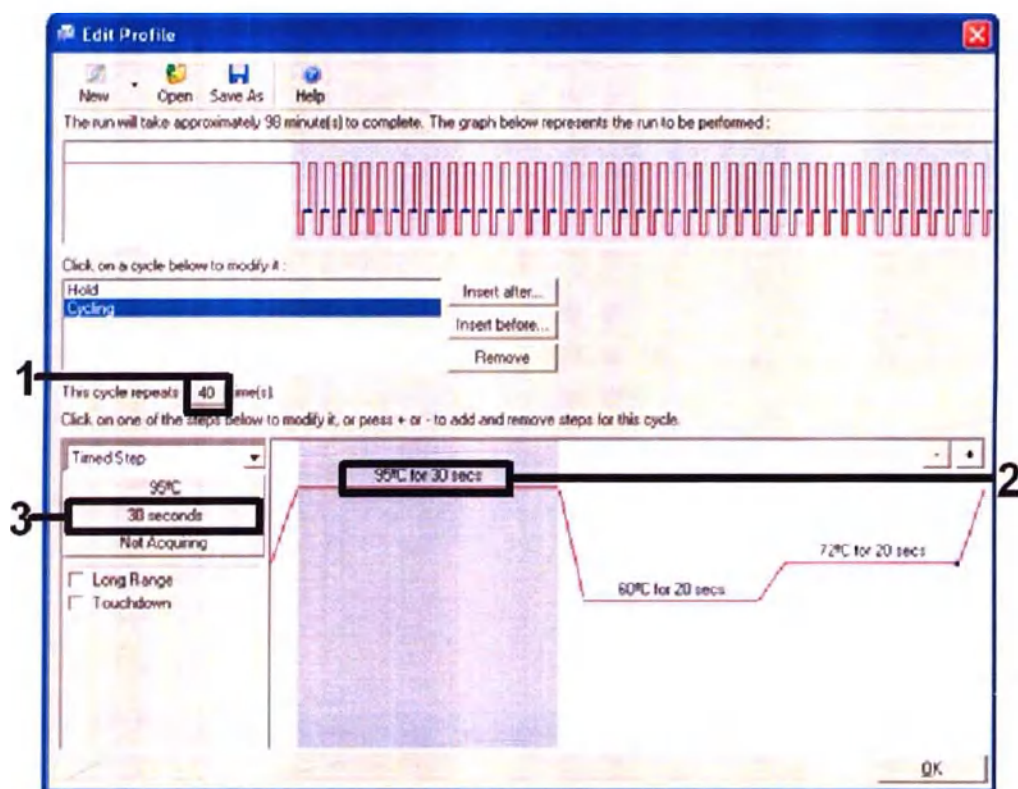


Рисунок 6. Этап цикла при температуре 95°C.

9. Выделите второй цикл и установите 60°C на 60 секунд. Разблокируйте функцию сбора данных на этом этапе, нажав кнопку "считывание не производится" (Not Acquiring) (см. Рис.7).

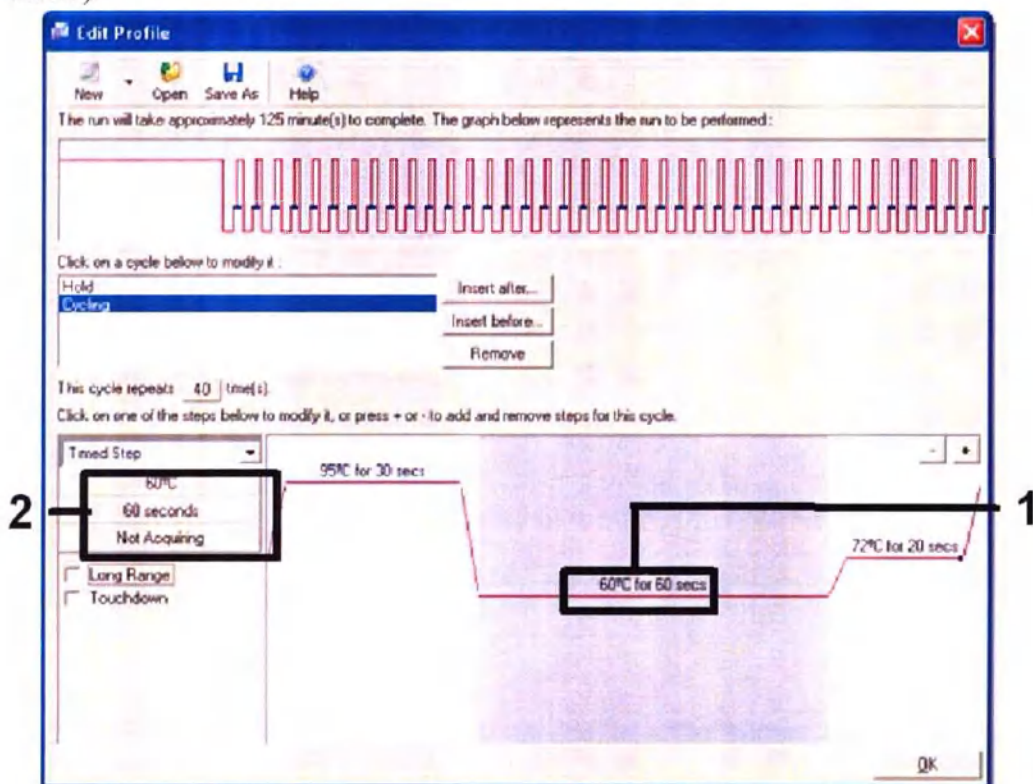


Рисунок 7. Этап цикла при температуре 60°C.

10. Выберите Green и Yellow из списка доступных каналов (Available Channels), нажав кнопку ">" для перемещения их в список "считываемых каналов" (Acquiring Channels). Нажмите "OK" (см. Рис.8).

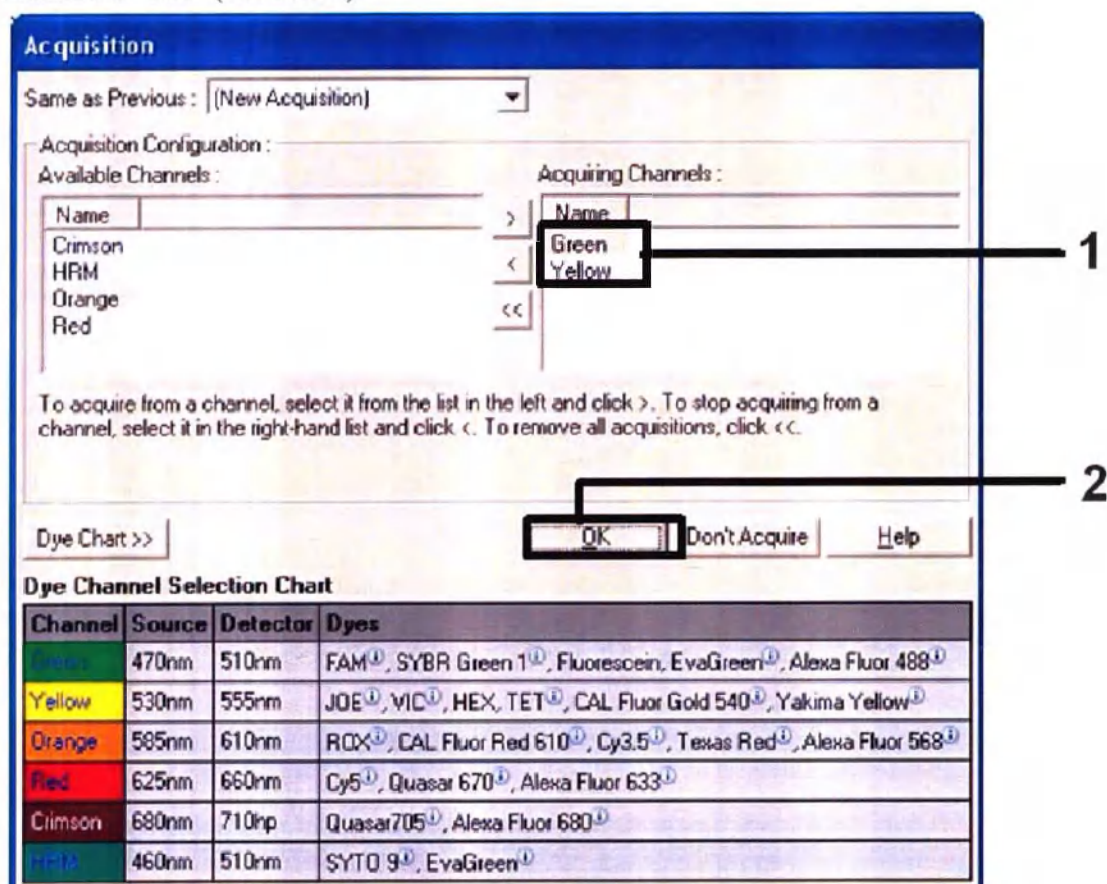


Рисунок 8. Сбор данных на этапе циклирования при температуре 60°C.

11. Выделите третий этап и нажмите кнопку "-" , чтобы его удалить. Нажмите "OK" (Рис.9).

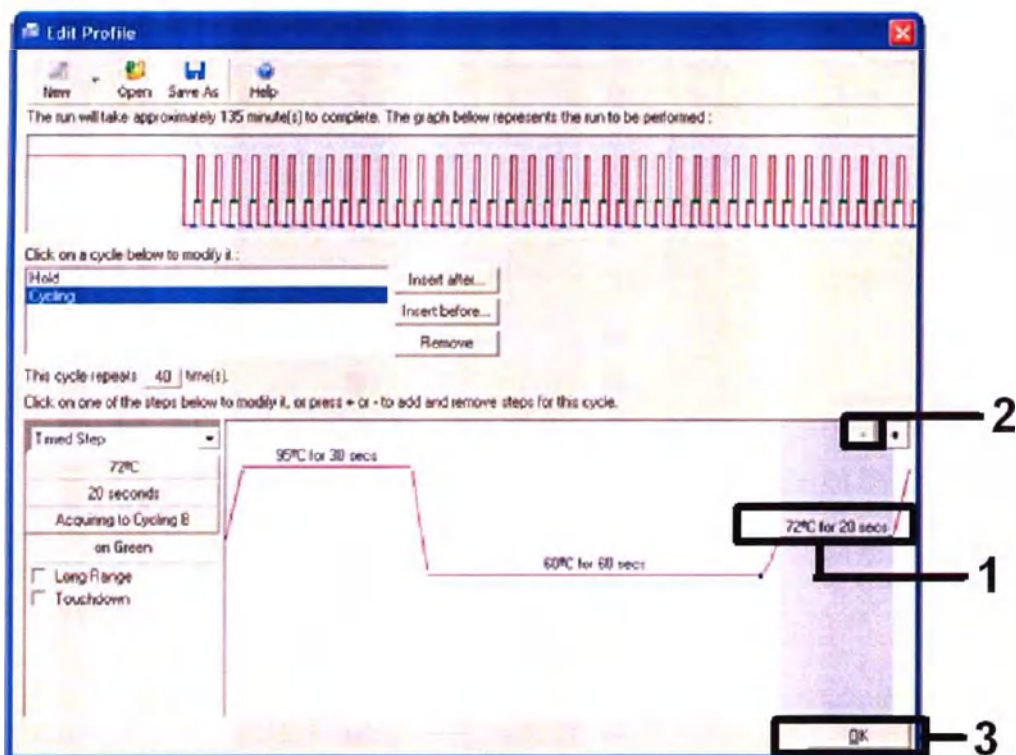


Рисунок 9. Удаление дополнительного этапа.

12. В следующем диалоговом окне нажмите кнопку "оптимизация уровня сигнала" (Gain Optimisation) (Рис.10).

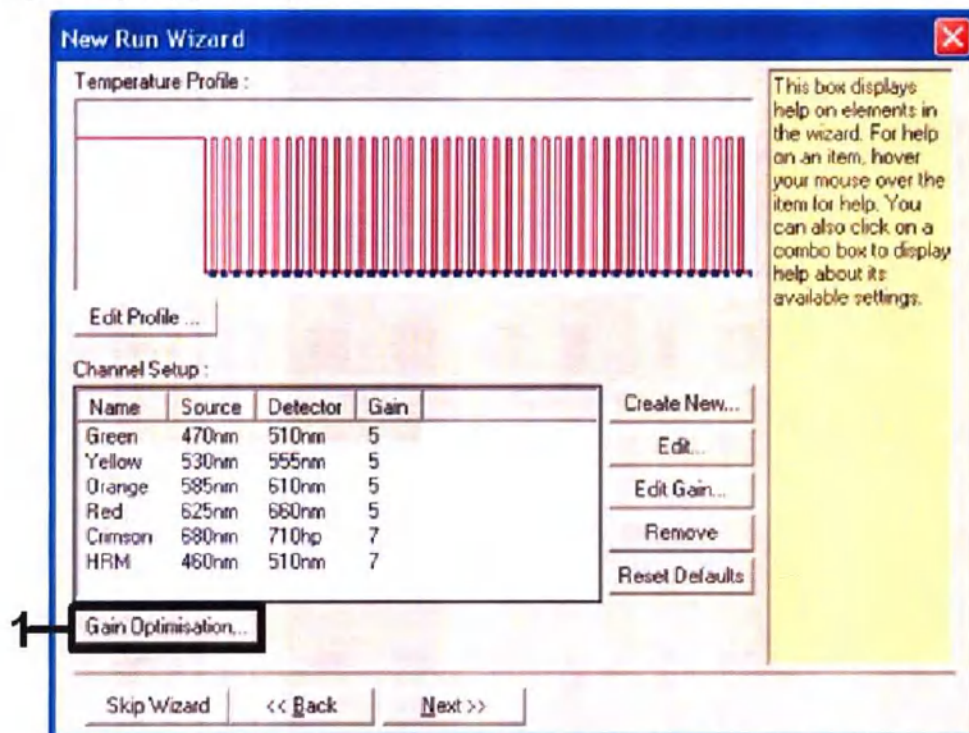


Рисунок 10. Оптимизация уровня сигнала.

13. Нажмите кнопку "оптимизация считывания" (Optimise Acquiring). Отобразятся настройки каждого канала. Подтвердите эти настройки по умолчанию для обоих каналов, нажав кнопку "ОК" (Рис.11).

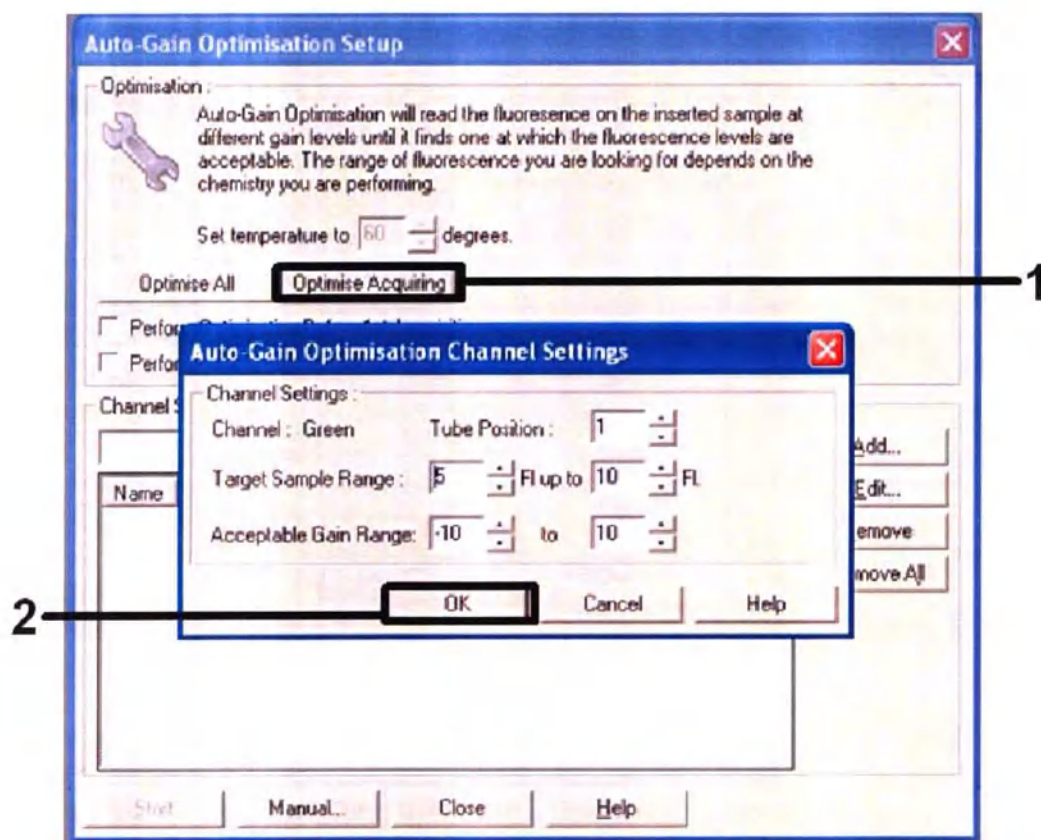


Рисунок 11. Автоматическая оптимизация уровня сигнала для зеленого канала.

14. Поставьте галочку в поле "выполнить оптимизацию перед 1-м считыванием" (Perform Optimisation before 1st Acquisition), после чего нажмите кнопку "закрыть", чтобы вернуться к окну мастера настройки (Рис.12).

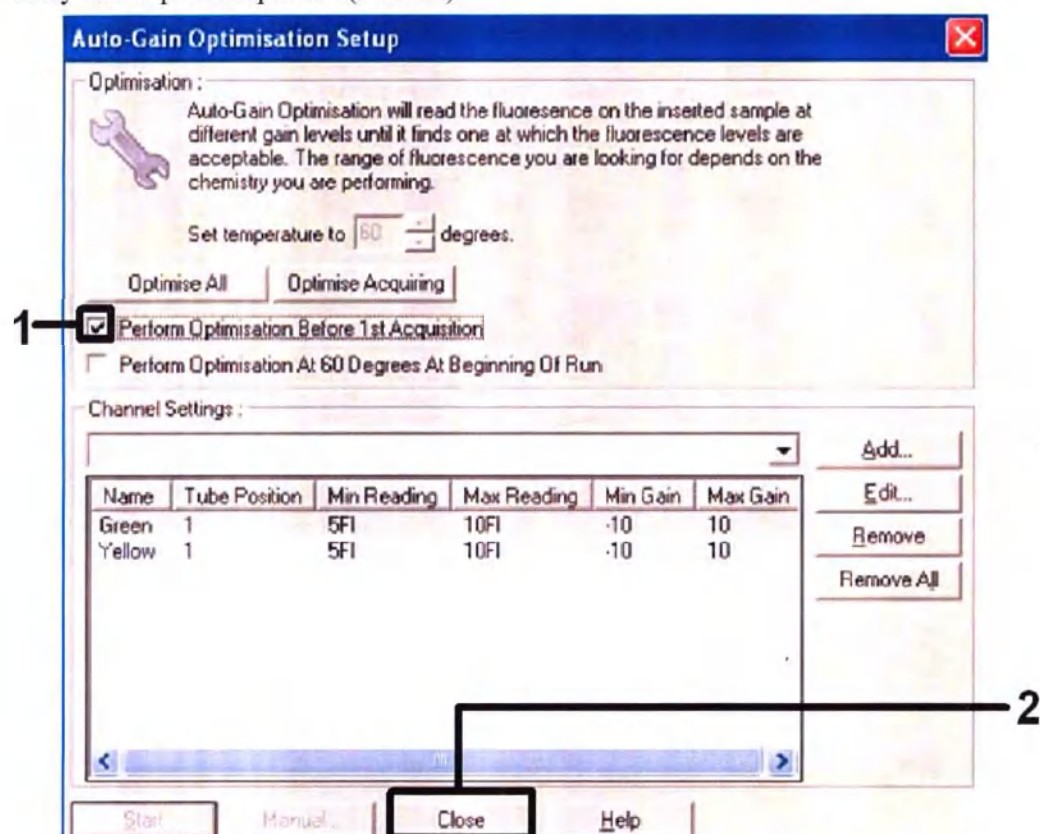


Рисунок 12. Оптимизация каналов детекции.

13. Нажмите кнопку "далее" (Next), чтобы сохранить шаблон в соответствующем месте расположения, нажав "сохранить шаблон" (Save Template).

15. Интерпретация результатов

При интерпретации результатов используются все данные, полученные по двум каналам детекции амплификатора Rotor-Gene Q: Green и Yellow. Первоначально анализируются данные для контролей (положительный контроль и отрицательный контроль), затем после признания результатов контролей действительными, проводится анализ результатов для контрольной реакционной смеси, чтобы убедиться в наличии ДНК в рабочем диапазоне концентраций. На последнем этапе проводится анализ данных, полученных для реакционных смесей для определения мутаций.

После завершения запуска проанализируйте данные по следующей процедуре.

Предварительные настройки

1. Откройте полученный файл данных, используя встроенное программное обеспечение Rotor-Gene Q.

2. Если образцам не были присвоены имена перед проведением запуска, нажмите кнопку "редактировать образцы" (Edit Samples).

3. В столбце "имя" (Name) укажите названия образцов.

Примечание: Не вводите названия в поля неиспользованных ячеек.

4. Нажмите кнопку "Анализ" (Analysis). На странице анализа нажмите кнопку "Cycling A, Yellow (циклирование, желтый канал)" для выбора канала HEX.

5. Проверьте, выделено ли поле "динамическая пробирка" (Dynamic Tube). Нажмите "наклон верный" (Slope correct) и "линейная шкала" (Linear scale).

6. Нажмите "настроить считывание" (Take Off Adj) и введите значения 15,01 и 20,01, как показано на Рисунке 13.

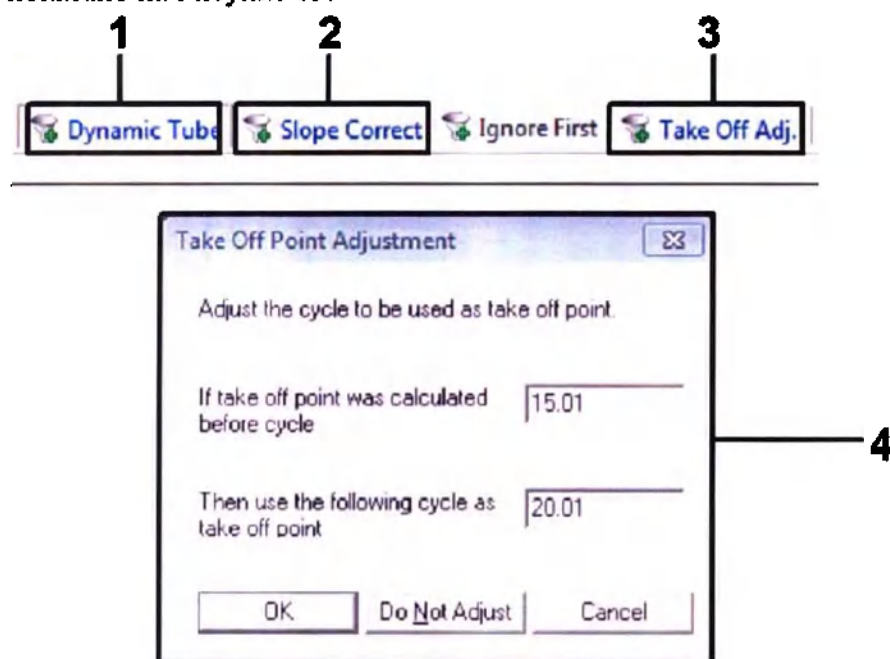


Рисунок 13. Настройка EGFR анализа данных. 1 = кнопка "динамическая пробирка", 2 = кнопка "наклон верный", 3 = кнопка "настроить считывание", 4 = диалоговое окно "настроить считывание" со значениями параметров.

7. Установите пороговое значение 0,02 и проверьте значения Ct HEX.

8. На странице "Анализ" (Analysis) (п.3) нажмите кнопку «циклирование, зеленый канал» (Cycling A, Green) для просмотра канала FAM. Задайте параметры в соответствии с Рисунком 13.
9. Динамическая пробирка должна быть подсвечена. Нажмите кнопки "наклон верный" "Slope Correct" и "линейная шкала" "Linear scale"
10. Установите пороговое значение 0,075 и проверьте значения Ct FAM.

Анализ положительного и отрицательного контролей

После завершения запуска проанализируйте данные следующим образом

Отрицательный контроль: В отсутствии контаминации, значение Ct NTC в зеленом канале (FAM) не должно быть меньше 40. Для подтверждения корректности подготовки и настройки запуска ПЦР используются значения Ct внутреннего контроля в желтом канале (HEX) для каждой из реакционных смесей (одной контрольной реакционной смеси и 3х реакционных смесей для определения мутаций). Канал HEX отрицательного контроля должен показывать подъем кривой амплификации и значения Ct HEX должны находиться в диапазоне от 29,85 до 35,84 (допустимый диапазон внутреннего контроля).

Если в зеленом канале отмечается положительная амплификация и/или значения Ct по каналу HEX выходят за диапазон от 29,85 до 35,84, результат считается недействительным.

Положительный контроль: Для каждой из четырех реакционных смесей значение Ct положительного контроля (PC) должно находиться в пределах диапазонов, указанных в Таблице 12. Если результаты для положительного контроля выходят за пределы этих диапазонов, то наблюдается ошибка в подготовке анализа, и результат считается недействительным. Если для положительного контроля было получено значение Ct FAM в пределах указанных диапазонов, но значение Ct HEX выходит за границы установленного для внутреннего контроля диапазона 29.85 - 35.84, следует продолжить интерпретацию данных.

Примечание: Результаты анализа образца нельзя использовать при сбое отрицательного или положительного контроля.

Таблица 12. Диапазон приемлемых значений Ct для положительного и отрицательного контролей

Контроль	Анализ	Канал	Диапазон Ct
Положительный контроль	Контрольная реакционная смесь	Зеленый (FAM)	28,13 - 34,59
	Реакционная смесь для определения T790M	Зеленый (FAM)	30,22 - 34,98
	Реакционная смесь для определения Делеции	Зеленый (FAM)	28,90 - 34,90
	Реакционная смесь для определения L858R	Зеленый (FAM)	29,97 - 34,81
	Все 4 реакционных смеси	Желтый (Hex)	29,85 - 35,84*
Отрицательный контроль	Все 4 реакционных смеси	Зеленый (FAM)	≥40,00
		Желтый (Hex)	29,85 - 35,84

*Если значение PC Ct HEX выходит за границы диапазона 29.85 - 35.84, следует продолжить интерпретацию данных

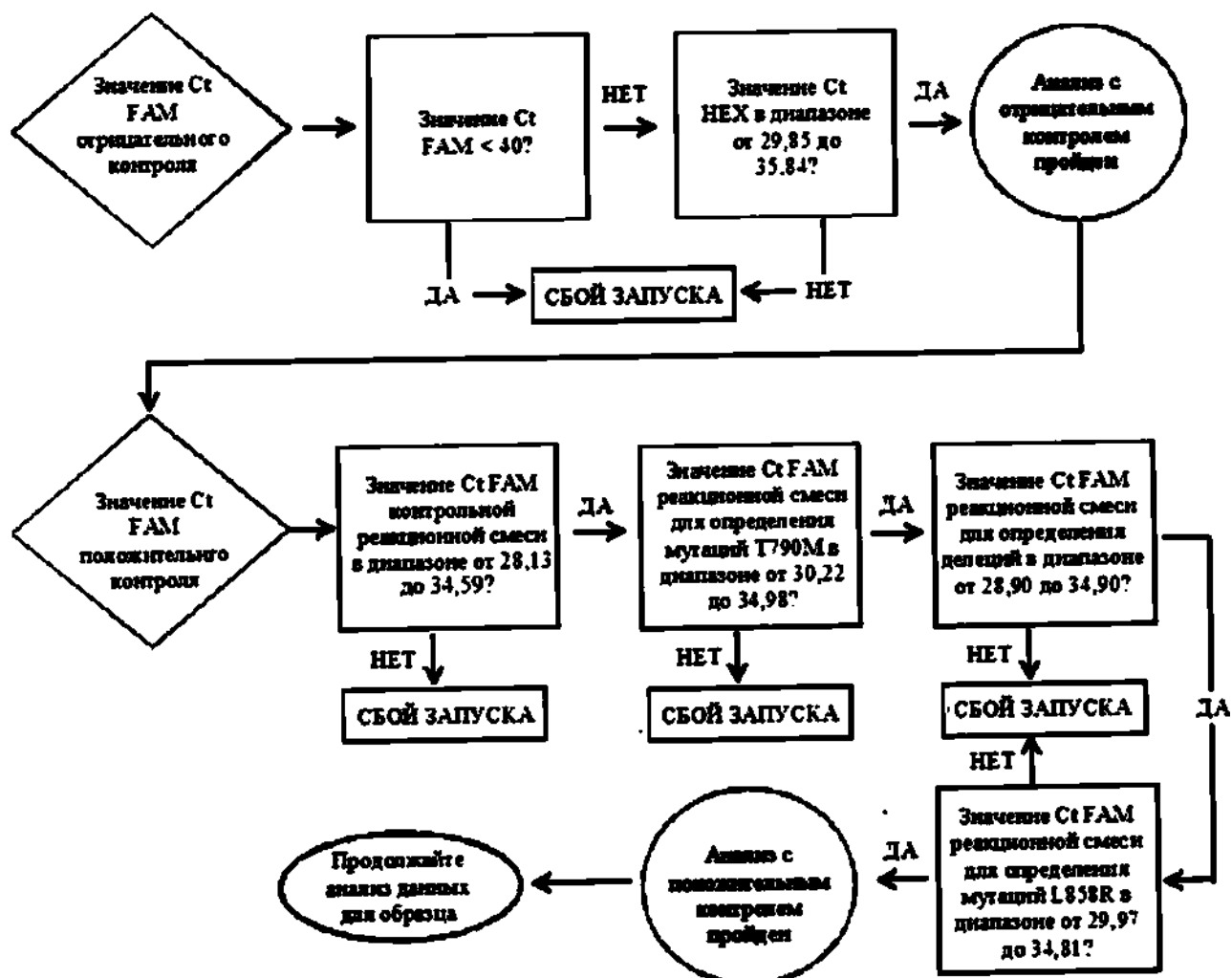


Рисунок 14. Блок-схема интерпретации результатов контролей.

Анализ результатов для контрольной реакционной смеси

Если результаты анализа обоих контролей (положительного и отрицательного) действительно, то значение Ct контрольной реакционной смеси для каждого образца должно находиться в диапазоне от 23,70 до 31,10 (в канале Green (FAM)). См. Таблицу 13.

Таблица 13. Допустимый диапазон Ct для анализа с контрольной реакционной смесью

Реакционная смесь	Канал	Допустимые значения Ct
Контрольная реакционная смесь	Green (FAM)	23,70 – 31,10
	Yellow (Hex)	не определен (любой Ct)

Если результат для конкретного образца выходит за пределы этого диапазона, руководствуйтесь следующим:

- Ct контрольной реакционной смеси < 23,70: Образцы со значением Ct < 23,70 «перегружают» анализ на выявление мутаций. Их следует разбавить. Для этого каждый концентрированный образец следует разбавить до получения значений Ct в пределах вышеуказанного диапазона на основании того, что разведение в два раза приведет к повышению Ct на 1.

- Ct контрольной реакционной смеси > 31,10: В образце недостаточное количество ДНК для проведения анализа.

Анализ результатов на мутации

Если результаты для образца с контрольной реакционной смесью достоверны и находятся в пределах диапазона, указанного в Таблице 13, то значения Ct по каналу Green (FAM) для образца с реакционными смесями для определения мутаций должны находиться в диапазонах, указанных в Таблице 14.

Таблица 14. Допустимые значения Ct образца с реакционными смесями для определения мутаций

Реакция	Реакционная смесь для определения мутаций	Канал	Диапазон Ct
Реакция на мутации	T790M	Green (FAM)	0,00 – 40,00
	Делеции	Green (FAM)	0,00 – 40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00 – 40,00
	Все 3 мутации	Yellow (Hex)	29,85 – 35,84

Примечание: Если для образца не определяется Ct (т.е. Ct > 40), это может быть обусловлено наличием ингибитора, ошибкой при подготовке анализа или отсутствием амплифицируемых ДНК EGFR.

Значение Ct HEX образца

Результат для образца по каналу Yellow (HEX) соответствует внутреннему контролю. Если значение Ct HEX выходит за пределы указанного в таблице 14 диапазона, руководствуйтесь следующим:

- Ct HEX внутреннего контроля находится в диапазоне от 29,85 до 35,84: результат действительный, ингибирование отсутствует.
- Ct HEX внутреннего контроля находится вне диапазона 29,85 - 35,84: это может указывать на ошибку в подготовке и постановке анализа или наличии ингибирования. Уменьшить влияние ингибитора можно путем разбавления образца, хотя это также приведет к разведению целевой ДНК.

Значение Ct FAM образца

Результаты по каналу FAM образца для всех трех реакционных смесей для определения мутаций следует проверить на соответствие значениям, указанным в Таблице 15.

Для этого, рассчитайте значение ΔCt образца с положительной амплификацией следующим образом, убедившись, что используются значения Ct конкретно для данного образца:

$$\Delta Ct = Ct \text{ реакционной смеси для определения мутации} - Ct \text{ контрольной реакционной смеси}$$

Сравните значение ΔCt образца с допустимым диапазоном значений проводимого анализа для определения мутаций (см. Таблицу 15).

Таблица 15. Диапазон значений ΔCt для анализов на мутации

Анализ на мутацию	ΔCt образца
T790M	$-10,00 \leq \Delta Ct \leq 7,40$
Делеции	$-10,00 \leq \Delta Ct \leq 8,00$
L858R	$-10,00 \leq \Delta Ct \leq 8,90$

Верхнее значение допустимого диапазона ΔCt это точка, выше которой положительный сигнал потенциально может быть обусловлен фоновым сигналом праймера ARMS на ДНК дикого типа. Если значение ΔCt образца выше допустимого диапазона, то анализу

присваивается статус "мутация не обнаружена" поскольку результат находится за пределом обнаружения набора. Если значение ΔC_t образца соответствует допустимому диапазону, указанному в таблице 15, то образец признается положительным по данному анализу на мутации. Если ΔC_t образца ниже допустимого диапазона значений ΔC_t , то возможно это в результате артефакта флуоресценции.

Примечание: Если не определяется C_t FAM образца с реакционной смесью для определения мутаций, требуется оценка внутреннего контроля C_t HEX: действительно ли мутация не была определена, или анализ проведен неверно. Если значение C_t HEX находится в диапазоне от 29,85 до 35,84, мутация не определена. Если значение C_t HEX выходит за пределы этого диапазона, то результат считается недействительным.

Таким образом, для каждого анализа с реакционной смесью для определения мутации будет присвоен статус "мутация обнаружена"; "мутация не обнаружена" или "недействительный" согласно следующим критериям.

Мутация обнаружена: Положительная амплификация по каналу Green (FAM), и ΔC_t находится в заданном диапазоне анализа на мутацию. Если для образца определяются несколько мутаций, можно указать их все.

Мутация не обнаружена:

- Положительная амплификация по каналу Green (FAM), ΔC_t выше заданного диапазона анализа на мутацию, значение HEX (внутренний контроль) в диапазоне от 29,85 до 35,84.

- Амплификация FAM отсутствует, значение HEX (внутренний контроль) в диапазоне от 29,85 до 35,84.

Недействительный: Амплификация FAM отсутствует, значение HEX вне диапазона 29,85 - 35,84.

- Значение ΔC_t ниже заданного диапазона анализа на мутацию и значение HEX (внутренний контроль) в диапазоне от 29,85 до 35,84. Значение ΔC_t ниже чем -10,00 может быть обусловлено артефактом флуоресценции.

Сводные данные для интерпретации результатов приведены в таблице 16 и блок-схеме на рис.15.

Таблица 16. Интерпретация результатов для контролей и исследуемого образца.

Пробирки	Анализ	Положительный результат		Отрицательный или недействительный результат	
		Ct канал FAM	Ct канал HEX	Ct канал FAM	Ct канал HEX
Положительный контроль	Контрольная реакционная смесь	28,13-34,59	29,85 - 35,84*	Ct<28,13, Ct>34,59	любой Ct действительный
	Реакционная смесь для определения T790M	30,22-34,98		Ct<30,22, Ct>34,98	
	Реакционная смесь для определения Делеции	28,90-34,90		Ct<28,90 Ct>34,90	
	Реакционная смесь для определения L858R	29,97-34,81		Ct<29,97 Ct>34,81	
Отрицательный контроль	Все 4 реакционных смеси	≥40,00	29,85-35,84	<40,00	Ct<29,85 Ct>35,84
Образец	Контрольная реакционная смесь	23,70–31,10	не определен (любой Ct)	Ct<23,70, Ct>31,10	любой Ct действительный
	Реакционная смесь для определения T790M	0,00–40,00	29,85-35,84	Ct>40	Ct<29,85 Ct>35,84
	Реакционная смесь для определения Делеции				
	Реакционная смесь для определения L858R				

*Если значение PC Ct HEX выходит за границы диапазона 29.85 - 35.84, следует продолжить интерпретацию данных

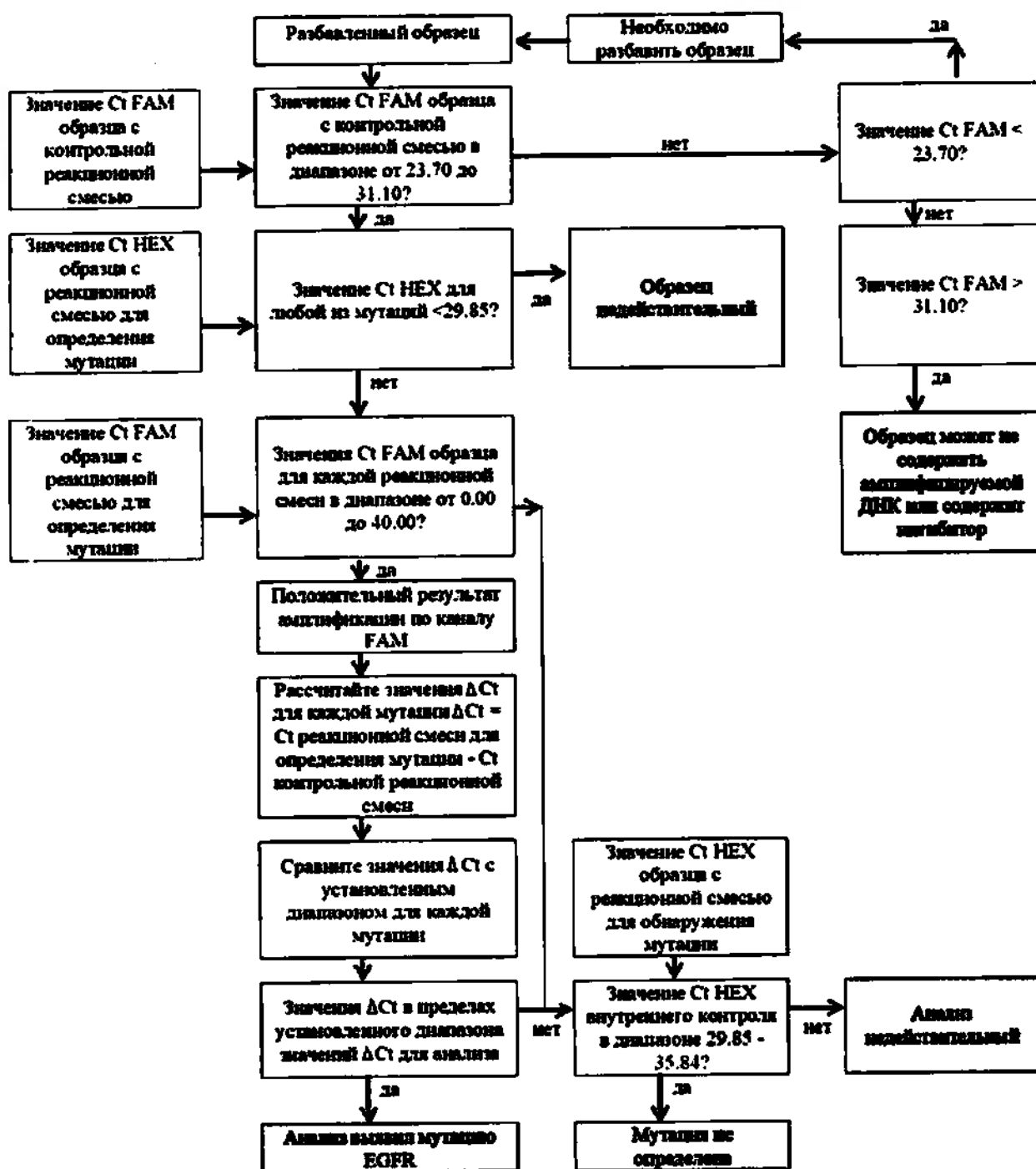


Рисунок 15. Блок-схема интерпретации результатов на наличие мутаций

16. Требования к техническому обслуживанию и ремонту

Изделие одноразового применения, не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту. В случае порчи, изделие подлежит утилизации в соответствии с требованиями законодательства в стране применения

17. Перечень рисков, связанных с применением изделия

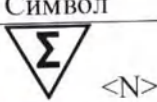
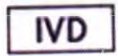
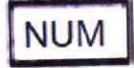
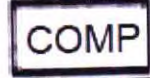
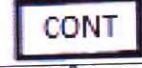
В области недопустимой зоны риски с неприемлемым уровнем не выявлены.

На основании критериев приемлемости рисков, с учетом назначения *therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit* и списка опасностей с соответствующей степенью тяжести, общая

окончательная оценка остаточных рисков считается приемлемой, а использование изделия считается безопасным.

18. Маркировка

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие обозначения:

Символ	Описание
	Содержимое достаточно для проведения N-количества тестов
	Использовать до..
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Номер по каталогу
	Номер серии
	Глобальный идентификационный номер единицы товара
	Номер материала (например, на маркировке компонента)
	Ограничение по температуре
	Изготовитель
	Обратитесь к инструкции по применению
	Знак соответствия Стандартам и Директивам ЕС
	Количество
	Компоненты
	Содержит
	Не допускать воздействия солнечного света
	Внимание
	R - версия инструкции, а n - номер пересмотра
	Приводит к

19. Требования к охране окружающей среды

Медицинское изделие при надлежащем использовании, транспортировке и хранении, не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду.

Не допускается попадание компонентов изделия в канализацию и водоемы.

20. Утилизация медицинского изделия и его компонентов

Чтобы избежать возможного загрязнения окружающей среды, изделие с истекшим сроком годности, отходы использованных реагентов, а также, в случае видимых повреждений индивидуальной упаковки, изделие должно утилизироваться местными публично-правовыми организациями, в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

На территории Российской Федерации набор, его компоненты и неиспользованные реагенты должны утилизироваться в соответствии с нормативными требованиями для отходов класса Б в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21).

21. Стандарты, применимые к медицинскому изделию

Номер документа	Название документа
EN 13612:2002	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
EN ISO 13485:2016	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
EN 13975:2003	Процедуры подготовки образца, используемые для приемочных испытаний диагностических медицинских устройств in vitro – статистические аспекты
EN ISO 14971:2012	Медицинские изделия - Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
EN ISO 15223-1:2016	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования
EN ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro - Информация, предоставляемая производителем (маркировка) - Часть 1: Термины, обозначения и общие требования
EN ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro - Информация, предоставляемая производителем (маркировка) - Часть 2: Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
EN ISO 23640:2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
IEC 62366-1:2015	Изделия медицинские. Часть 1. Проектирование медицинских изделий с учетом эксплуатационной пригодности (IEC 62366:2007).

22. Контроль качества

Согласно системе управления качеством компании QIAGEN, сертифицированной в соответствии с ISO, каждая партия набора *therascreen®* EGFR Plasma RGQ PCR Kit проходит испытание на соответствие установленным спецификациям, чтобы обеспечить стабильное качество продукта.

23. Сведения о производителе и разработчике медицинского изделия

Производитель

QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ)

Адрес: Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden , Germany (Кайджен Штрассе 1, 40724 Хильден, Германия)

Телефон: +49-02103-29-0

Адрес электронной почты: info@qiagen.com;

Сайт: www.qiagen.com

Разработчик

QIAGEN GmbH / «КАЙДЖЕН ГмбХ»

Юридический адрес: Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany / Кайджен Штрассе 1, 40724 Хильден, Германия

24. Гарантийные обязательства

Компания КАЙДЖЕН ГмбХ (QIAGEN GmbH) принимает на себя гарантийные обязательства в отношении медицинского изделия по отсутствию дефектов и соответствию заявленным производителем характеристикам в течение срока годности, при соблюдении условий применения, хранения и транспортировки, указанных в инструкции по применению.

Производитель не несёт ответственности за повреждения или несчастные случаи в результате неправильного использования, ошибки пользователя или внешних чрезвычайных ситуаций. По вопросам качества продукции обращайтесь к уполномоченному представителю производителя.

25. Рекламации

Уполномоченный представитель производителя на территории Российской Федерации:

Общество с ограниченной ответственностью "Кайджен РУС" (ООО "Кайджен РУС")

Россия, 123112, г. Москва, Пресненская набережная, дом 6, строение 2, этаж 50, помещение 5001

Номер телефона: +7 499 703 15 56

Адрес электронной почты: qiagenrus@qiagen.com

26. Руководство по устранению неисправностей

Данное руководство по устранению неисправностей может использоваться для устранения возможных проблем. Для получения дополнительной информации см. Часто задаваемые вопросы на сайте центра технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Научные сотрудники технической службы QIAGEN обязательно ответят на любые возможные вопросы касательно информации и протоколов, описанных в данном руководстве, или касательно технологий пробоподготовки и проведения анализов (контактная информация на сайте www.qiagen.com).

Отсутствие сигнала положительного контроля (PC) в зеленом (Green) канале флуоресценции

- | | |
|--|---|
| а) Выбранный канал флуоресценции для анализа данных ПЦР не соответствует протоколу | Для анализа данных выберите канал флуоресценции "зеленый" для анализа на мутации EGFR, и канал "желтый" для внутреннего контроля ПЦР. |
| б) Неправильное программирование температурного профиля амплификатора Rotor Gene Q 5 Plex HRM. | Сравните температурный профиль с протоколом. При неправильной настройке повторите запуск. |
| с) Неправильная подготовка ПЦР | Проверьте этапы работы и схемы пипетирования и повторите ПЦР, если необходимо. |

d) Условия хранения одного или более компонентов набора не соответствовали инструкциям, приведенным в разделе по хранению компонентов

Проверьте условия хранения и срок годности (см. этикетку) набора реагентов и при необходимости воспользуйтесь новым набором.

e) Срок годности набора *therascreen®* EGFR Plasma RGQ PCR Kit истек

Проверьте условия хранения и срок годности (см. этикетку) набора реагентов и при необходимости воспользуйтесь новым набором.

Сигнал отрицательного контроля в канале Green

a) Во время подготовки ПЦР произошла контаминация

Повторите ПЦР с новыми реагентами. Если возможно, закрывайте пробирки для ПЦР непосредственно после добавления испытуемого образца. Убедитесь, что обеззараживание рабочей области амплификатора проводится регулярно.

27. Литература

1. Глобальный эпиднадзор за выживаемостью от рака в 1995-2009 годах: анализ индивидуальных данных по 25 676 887 пациентам из 279 популяционных регистров в 67 странах (CONCORD-2). Allemani, Claudia, et al. 9972, s.l. : The Lancet, 2015, Vol. 385, pp. 977-1010.
2. Активирующие мутации в рецепторе эпидермального фактора роста, лежащие в основе чувствительности немелкоклеточного рака легких к Gefитинибу. Lynch, T J, et al. 2004, the New England Journal of Medicine, Vol. 350, pp. 2129-2139.
3. Лечение первой линии немелкоклеточного рака легкого с мутацией EGFR: критический обзор методологии исследования. Sebastian, M, Schmittl, A and Reck, M. 2014, Eur Respir Rev, Vol. 23, pp. 92-105.
4. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Sharma, S V, et al. s.l. : Nat Rev Cancer, 2007, Vol. 7, pp. 769-81.
5. Внутриопухолевая гетерогенность локализованных аденокарцином легких, выявленная с помощью многорегионального секвенирования. Zhang, J, et al. 6206, 2014, Science, Vol. 346, pp. 256-59.

28. Редакция документа

Дата	Изменения
R5, июнь 2020	Обновленные таблицы для реализации нового порогового диапазона отсечки ΔC_t и соответствующим образом скорректировали описания во всей инструкции Обновлены раздел «Процедура», чтобы включить информацию о важности перемешивания; выделены детали перемешивания на всех этапах. Добавлен этап перемешивания в подраздел «Протокол: обнаружение мутаций EGFR». Обновлен раздел устранения неполадок

Приложение А: Список мутаций

Идентификационные номера по каталогу COSMIC взяты из каталога соматических мутаций при раковых заболеваниях (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Таблица 17. Список мутаций и идентификационных номеров по каталогу COSMIC.

Мутация	Экзон	Замена основания	Номер в каталоге COSMIC	Заявленный предел обнаружения (%)
T790M	20	2369C>T	6240	17,5*
L858R	21	2573T>G	6224	5,94*
Делеции	19	2235_2249del15	6223	6,4*
		2235_2252>AAT (complex))	13551	4,24*
		2236_2253del18	12728	2,43†
		2237_2251del15	12678	10,40†
		2237_2254del18	12367	4,39†
		2237_2255>T (complex)	12384	7,54†
		2236_2250del15	6225	6,5*
		2238_2255del18	6220	2,7*
		2238_2248>GC (complex)	12422	3,24†
		2238_2252>GCA (complex)	12419	16,87†
		2239_2247del9	6218	9,83†
		2239_2253del15	6254	10,2*
		2239_2256del18	6255	0,81*
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complex)	12382	1,45*
		2239_2258>CA (complex)	12387	4,91†
		2240_2251del12	6210	7,44†
		2240_2257del18	12370	8,1*
		2240_2254del15	12369	4,94*
		2239_2251>C (complex)	12383	4,58*

*Пределы обнаружения в образцах плазмы были подтверждены в рамках исследования по подтверждению предела обнаружения набора *therascreen®* EGFR Plasma RGQ PCR

† Наличие этих мутаций в плазме не было подтверждено.

**ДОПЕРЕВОД ЭЛЕМЕНТА ТЕКСТА И ПЕЧАТЕЙ В
ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit**

«КАЙДЖЕН ГмбХ»

Номер по реестру 2341/2021 М

Настоящим подтверждаю, что подлинность подписи и печати на прилагаемом документе подтвердил в моем присутствии

г-н д-р Бартхолд Пиэнинг, род. 19 ноября 1958 г.
служебный адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,
удостоверивший личность предъявлением своего паспорта.

Г-н д-р Бартхолд Пиэнинг действует не от своего имени, а от имени компании

«КАЙДЖЕН ГмбХ»

(Адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене)

После сверки с электронным торговым реестром Дюссельдорфа, запись под № 45822, я удостоверяю, что

- в него внесена компания «КАЙДЖЕН ГмбХ» со штаб-квартирой в г. Хильден;
- в нем зарегистрирован г-н Бартхолд Пиэнинг в качестве Управляющего директора, который всегда вправе единолично представлять Компанию по любому вопросу;
- Г-н д-р Бартхолд Пиэнинг всегда освобожден от ограничений на заключение сделок с самим собой в соответствии с § 181 Гражданского кодекса Германии («ГК»).

Необходимость удостоверения и предполагаемое использование аутентичного документа были мне, нотариусу, убедительно продемонстрированы.

Мне неизвестно о содержании заверяемого документа, поскольку я не владею языком документа. Нотариальное удостоверение не относится к правильности документа.

Хильден, 21 октября 2021 г.

Ингрид Даукс

Официально назначенный представитель

Д-ра Никласа Майрозе,

Официального нотариуса

Миттельштрассе 36-38, 40721, Хильден, Германия

[Круглая гербовая печать: Д-р Никлас Майрозе* нотариус в Хильдене]

176TE

[Круглая гербовая рельефная печать: Д-р Никлас Майрозе* нотариус в Хильдене]

Текст данного документа перевёл переводчик Храмов Александр Александрович.
Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является
правильным, точным и полным.

ПОДПИСЬ

Российская Федерация

Город Москва

Двадцать девятого ноября две тысячи двадцать первого года

Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи
переводчика Храмова Александра Александровича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021-15-2183

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.

ПОДПИСЬ

Гербовая печать
нотариуса г.Москвы
Точкина Д.В

Д.В. Точкин

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 40 лист(а)(ов)

Нотариус

ПОДПИСЬ

Российская Федерация
Город Москва

Двадцать девятого ноября две тысячи двадцать первого года
Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы,
свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021-15-2184

Уплачено за совершение нотариального действия 2640 руб.

Д.В. Точкин

Всего прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 43 лист(а)(ов)

Нотариус