PILLAR BIOSCIENCES

User's manual of Medical Device for in vitro diagnostics Reagents kit ONCO / Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay for detecting genetic mutations associated with lung and rectal cancer using next generation sequencing manufactured by Pillar Biosciences, Inc.

Approved by:
Full name: Manfred Scholz
Position: Senior Vice President of Corporate Development
The name of the company: Pillar Biosciences, Inc.
Signature:
Approval Date: 10.09.2021
Stamp:

Commonwealth of Massachusetts

County of Middlesex, ss.

On this 5th of November 2021, before me, the undersigned notary public, personally appeared Manfred Scholz, proved to me through satisfactory evidence of identification, which was a Massachusetts Driver's License, to be the person whose name is signed on this document, and acknowledged to me that he signed it as his free act and deed for its stated purpose.

Notary Public

My commission expires: 06/10/21

DAVID D KISER JR
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires June 10, 2027

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

PILLAR BIOSCIENCES

Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay для выявления генетических мутаций, ассоциированных с раком легкого и раком прямой кишки методом секвенирования нового поколения

Руководство пользователя

CE
IVD

Для диагностики in vitro

Внимание! Федеральное законодательство США разрешает продажу этого изделия только медицинским специалистам или по заказу медицинских специалистов

Оглавление

Оглавление 1
НАИМЕНОВАНИЕ 2
НАЗНАЧЕНИЕ 2
ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ 2
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ 4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ПРОЦЕДУР 6
ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ 7
ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК 9
ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА 9
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 24
РЕЗУЛЬТАТЫ 24
ОГРАНИЧЕНИЯ 26
УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ 26
ОФИЦИАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ 28
ИНФОРМАЦИЯ О КОМПАНИИ 28

UM-0044, Редакция 4
Выпущено: 08.07.2021 09:12:00

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

НАИМЕНОВАНИЕ

Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay для выявления генетических мутаций, ассоциированных с раком легкого и раком прямой кишки методом секвенирования нового поколения (далее по тексту - набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay, ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay (O/RDx-LCCA), O/RDx-LCCA, набор реагентов, набор, тест, медицинское изделие).

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест предназначен для выявления генетических вариантов (мутаций) в образцах ДНК, выделенных из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов тканей (FFPE) рака легких и колоректального рака. Этот тест предназначен для выявления генетических вариантов (мутаций) в образцах ДНК пациентов с раком легких (NSCLC) и колоректальным раком (CRC), что может послужить основанием для прогноза течения болезни, а также предсказания об эффективности таргетной терапии лекарственными средствами (на основе актуальных клинических рекомендаций). Набор может применяться для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx компании Иллюмина (Illumina). Используется для диагностики in vitro.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay (O/RDx-LCCA) на основе методов секвенирования нового поколения предусмотрен для выявления соматических вариантов (мутаций) в образцах ДНК, выделенных из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов тканей (FFPE) рака легких (NSCLC) и колоректального рака (CRC). Этот тест предназначен для выявления пациентов с раком легких или колоректальным раком, которые могут получить лечение таргетными препаратами для назначения которых требуется определение статуса указанных в таблице 1 мутаций в соответствии с инструкцией по применению таких препаратов, назначаемых в соответствии с клиническими рекомендациями для лечения соответствующих онкологических заболеваний, а также, в случае идентификации вариантов, не указанных в таблице 1, для выбора и назначения терапии врачом соответствующей квалификации в согласии с клиническими рекомендациями для лечения соответствующих онкологических заболеваний. Набор может применяться для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx компании Иллюмина (Illumina). Используется для диагностики in vitro.

Таблица 1 Список соматических вариантов, для которых требуется определение статуса мутаций при назначении таргетной терапии в согласии с клиническими рекомендациями

Тип онкологии	Ген	Вариант
Колоректальный рак (CRC)	KRAS	KRAS дикого типа (отсутствие мутаций в кодонах 12 и 13)
Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC/HMPЛ)	EGFR	Делеции внутри рамки считывания в 19 экзоне Мутации замены нуклеотидов L858R в 21 экзоне

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 2 Варианты, для которых подтверждены только аналитические характеристики

Ген	ID варианта	Онкология
EGFR	T790M	NSCLC
EGFR	G719A	NSCLC
EGFR	G719C	NSCLC
EGFR	G719D	NSCLC
EGFR	G719S	NSCLC
EGFR	Инсерции внутри рамки считывания в 20 экзоне	NSCLC
BRAF	V600E	NSCLC
KRAS	Мутации в 2 экзоне	NSCLC
KRAS	A59E	CRC
KRAS	A59G	CRC
KRAS	A59T	CRC
KRAS	A59S	CRC
KRAS	Q61E	CRC
KRAS	Q61H	CRC
KRAS	Q61K	CRC
KRAS	Q61L	CRC
KRAS	Q61R	CRC
KRAS	K117N	CRC
KRAS	A146T	CRC
KRAS	A146P	CRC
KRAS	A146V	CRC
BRAF	V600E	CRC

ПРИНЦИП МЕТОДА

ОБЗОР

Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung & Colon Cancer Assay позволяет подготавливать образцы ДНК для секвенирования путем амплификации целевых областей ДНК, содержащих мутационные «горячие точки», с использованием технологии SLIMamp™ (stem-loop inhibition mediated amplification — подавление неспецифической амплификации посредством образования шпилек). Секвенирование осуществляется на генетическом секвенаторе MiSeqDx, также анализ и количественная оценка выявленных в образце генетических мутаций (вариантов) и составление отчета о результатах выполняется программным обеспечением PiVAT (Pillar Variant Analysis Toolkit), которое является собственностью компании Pillar Bioscience.

ВЫДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ FFPE

После выделения ДНК проводится количественное определение концентрации геномной ДНК из каждого образца фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов тканей (FFPE) для определения соответствия минимально необходимому для выполнения теста количеству ДНК.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИБЛИОТЕКИ

Ген-специфичная мультиплексная ПЦР (ГС-ПЦР) амплификация выполняется для обогащения горячих точек (вариантов) образца геномной ДНК в одной пробирке. Продукты ген-специфичной ПЦР очищаются и снова подвергаются амплификации с использованием индексных праймеров, позволяющих образование кластеров в приборе MiSeqDx. Индексированные библиотеки в дальнейшем проходят последовательные процессы очистки, количественной оценки и нормализации для создания пула библиотек. Пул библиотек используют для секвенирования по протоколу парных концевых последовательностей на приборе MiSeqDx.

АНАЛИЗ ДАННЫХ

Секвенирование запускается модулем п/о Pillar, сопряженным с п/о Local Run Manager (LRM) Illumina. Результаты распознавания нуклеотидов при первичном анализе на приборе MiSeqDx, демультиплексируются и разделяются на отдельные FASTQ файлы для каждого образца. Затем результаты секвенирования вручную переносятся в п/о PiVAT для вторичного анализа. Вторичный анализ включает выравнивание и сборку парных концевых последовательностей, распознавание вариантов и составление отчета.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay

ВНИМАНИЕ: набор(ы) реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay при получении следует распаковать и поместить на хранение при температуре, указанной в Таблице 3.

Таблица 3 Реагенты, входящие в набор

Коробка 1: реагенты для ГС-ПЦР:	**Количество**	**Хранение**
Мастер-микс для геноспецифической ПЦР (Gene-Specific Master Mix)	1 пробирка (с красной крышкой)	от -15 °C до -25 °C
Пул праймеров LC Oligo Pool	1 пробирка (с желтой крышкой)	от -15 °C до -25 °C
Положительный контроль (PosCtrl)	1 пробирка (с прозрачной крышкой)	от -15 °C до -25 °C
Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG)	1 пробирка (с синей крышкой)	от -15 °C до -25 °C
Коробка № 2: ПЦР-реагенты для индексирования	**Количество**	**Хранение**
Мастер-микс для индексирования (Indexing PCR Master Mix)	1 пробирка (с зеленой крышкой)	от -15 °C до -25 °C
Прямые индексные праймеры (A501-A508)	8 пробирок (с белыми крышками)	от -15 °C до -25 °C
Обратные индексные праймеры (A701-A706)	6 пробирок (с оранжевыми крышками)	от -15 °C до -25 °C
Коробка № 3: реагенты для очистки ПЦР-продуктов	**Количество**	**Хранение**
Реагент для очистки продуктов ПЦР	1 флакон	от 2 °C до 8 °C
Коробка № 4: крышки для пробирок с индексными праймерами	**Количество**	**Хранение**
Белые крышки (для праймеров A501-A508)	24 крышки	Комнатная температура (18-25 °C)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Оранжевые крышки (для праймеров A701-A706)	18 крышек	Комнатная температура (18-25 °C)

Таблица 4 Необходимое программное обеспечение, входящее в набор

Оборудование	Поставщик/каталожный номер
Программное обеспечение PiVAT	Pillar Biosciences/SFW-2001

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Таблица 5 Необходимые материалы, которые не входят в набор

Материал	Поставщик/каталожный номер
Реагенты для выделения и очистки ДНК	Любой поставщик лабораторных материалов См. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК
Набор реагентов MiSeqDx v3 (600 циклов)	Illumina/20012552
Этанол, абсолютный (200 proof) для молекулярной биологии	Любой поставщик лабораторных материалов
Вода очищенная, не содержащая нуклеаз	Любой поставщик лабораторных материалов
Р-р Трис-HCl 10 ммоль/л с 0,1 % Твин-20, pH 8,5	Любой поставщик лабораторных материалов
10 н. раствор NaOH или 1 н. раствор NaOH	Любой поставщик лабораторных материалов
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	Любой поставщик лабораторных материалов
96-луночные ПЦР-планшеты, 0,2 мл	Любой поставщик лабораторных материалов
Пленка для запечатывания микропланшетов	Любой поставщик лабораторных материалов
Конические пробирки объемом 15 мл	Любой поставщик лабораторных материалов
Конические пробирки объемом 50 мл	Любой поставщик лабораторных материалов
Наконечники для микродозатора с фильтром (с защитой против аэрозольных контаминаций)	Любой поставщик лабораторных материалов
Емкость для раствора (лоток или кювета)	Любой поставщик лабораторных материалов

Таблица 6 Необходимое оборудование и программное обеспечение, которые не входят в набор

Оборудование	Поставщик/каталожный номер
Прибор MiSeqDx†	Illumina/DX-410-1001
Сервер для установки ПО PiVAT	Сервер любого производителя, соответствующий следующими минимальным характеристикам: • Intel Xeon E3 v5, или эквивалентный • 6 ядер • 32 Гб RAM • 150 Гб на жестком диске
Спектрофотометр или флуориметр, обеспечивающий измерение концентрации ДНК	Прибор любого производителя, соответствующий следующим минимальным характеристикам: Объем образца – не более 4 мкл
Вортекс	Любой поставщик лабораторного оборудования
Магнитный штатив для 96-луночных планшетов	Life Technologies/12331D или 12027, Beckman Coulter/№ A32782 или аналог
Микроцентрифуга	Любой поставщик лабораторного оборудования
Термоциклер† с нагревающейся крышкой	Любой поставщик лабораторного оборудования
Одноканальные и многоканальные микродозаторы†, емкостью от 0,5 до 1000 мкл	Любой поставщик лабораторного оборудования

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Центрифуга для ПЦР-планшетов	Любой поставщик лабораторного оборудования

† Оборудование должно обслуживаться и/или калиброваться в соответствии с инструкциями производителя.

Для выполнения протокола необходимы другие лабораторные принадлежности, такие, как лабораторные перчатки, лед, кюветы для льда, стойки для пробирок и т.д. Для реагентов, расходных материалов и оборудования, которые используются в помещениях для подготовительных процедур, проведения ПЦР и последующих процедур (в «зоне до ПЦР», «зоне ПЦР» и «зоне после ПЦР») должны быть предусмотрены отдельные лабораторные принадлежности (включая перчатки, лабораторные халаты и т. п.).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ПРОЦЕДУР

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Пользователь должен придерживаться процедуры анализа и соблюдать меры предосторожности при использовании набора реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay.

- Набор ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay предназначен исключительно для диагностики in vitro.
- Методика анализа была валидирована для ДНК, выделенной из FFPE образцов тканей опухолей немелкоклеточного рака легких (NSCLC - НМРЛ) и колоректального рака (CRC -КРР).
- Не следует использовать реагенты после истечения срока годности или ненадлежащего хранения.
- Дополнительные особые указания, меры предосторожности и операции описаны в инструкции по применению устройства MiSeqDx.
- Для проведения анализа используются все реагенты, входящие в набор ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay. Не следует заменять реагенты аналогами, так как это может повлиять на результаты анализа.
- Особое внимание следует уделить выполнению расчетов и переводу значений в соответствующие единицы измерения.
- Следует соблюдать меры предосторожности при загрузке образца и его дозировании, в частности, при разведении.
- На всех этапах рабочего процесса необходимо соблюдать меры предосторожности в отношении количественной оценки FFPE ДНК и подготовленных библиотек.
- Использование плохо обслуживаемого и/или некалиброванного оборудования может повлиять на результаты анализа.
- При работе используйте средства индивидуальной защиты (защитную одежду, защитные перчатки и маску).

НАДЛЕЖАЩАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА

1. **Рабочие зоны**: в целях снижения риска контаминации ПЦР-ампликонами не следует перемещать материалы из одной рабочей зоны в другую. Для материалов, предназначенных для использования в зоне ПЦР и зоне подготовительных процедур,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

должны быть предусмотрены отдельные области для хранения (включая холодильники и морозильники).

2. **Обеспечение чистоты в лаборатории**: в перерывах между использованием рабочих зон поверхности очищают специальным раствором (70% раствора спирта или свежеприготовленного 10% раствора гипохлорита) для уменьшения возможности загрязнения. Рекомендуется также проводить периодическую обработку поверхности пола.
3. **Пол**: предметы, упавшие на пол, считаются загрязненными и должны быть утилизированы. После контакта с загрязненными предметами следует также сменить перчатки. В случае, если упавшая пробирка с образцом или другим незаменимым материалом осталась закрытой, ее тщательно очищают снаружи специальным раствором (70% раствора спирта или свежеприготовленного 10% раствора гипохлорита) перед дальнейшими манипуляциями.
4. **Многоканальные дозаторы**: для достижения однородного и эффективного распределения или переноса реагентов и/или образцов следует использовать многоканальные дозаторы.
5. **Наконечники для дозаторов**: для предотвращения перекрестного загрязнения между образцами следует использовать наконечники с защитой против аэрозольной контаминации и сменные наконечники. Наконечники, которые могли быть контаминированы в результате контакта с перчатками, лабораторным столом, внешней поверхностью пробирки и т. п., следует выбросить.
6. **Открытые емкости и крышки**: чтобы предотвратить возможное загрязнение из воздуха, следует закрывать пробирки, если они не используются в данный момент, накрывать планшеты пленкой или безворсовыми лабораторными салфетками и избегать манипуляций над открытыми емкостями.
7. **Подготовка образцов к ПЦР-амплификации** должна проводиться в помещении, физически отделённом от помещения, в котором проводится амплификация для подготовки библиотек. Это необходимо для предотвращения контаминации неамплифицированных образцов продуктами ПЦР, что может привести к неудовлетворительному результату отрицательного контроля (NTC) и перекрестной контаминации.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Методика анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay валидирована для исследования образцов ДНК, выделенных из FFPE тканей пациентов с CRC и NSCLC.

Подготовка тканей для выделения ДНК заключается в следующем:

1. Все ткани должны быть фиксированы в формалине и залиты в парафин в соответствии с надлежащими гистологическими методиками.
2. Без проведения макродиссекции можно использовать образцы с долей опухолевой ткани ≥ 30 % площади образца.
3. Если опухолевая ткань занимает меньше 30 % площади образца, следует провести макродиссекцию таким образом, чтобы долей опухолевой ткани составила ≥ 30 %.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Избыток парафина соскребают или срезают с тканей при помощи нового стерильного скальпеля.
5. При подготовке к выделению ДНК из нескольких комбинированных образцов изготавливают последовательные срезы.

ВНИМАНИЕ: для теста ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay пригодны образцы с содержанием ДНК ≥ 1,5 нг/мкл. Если выделенная ДНК не соответствует требованиям количественной оценки, для повторного выделения можно использовать дополнительные срезы, если они имеются в наличии.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПОЛУЧЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцы FFPE в виде микросрезов в пробирках или на стеклах рекомендовано хранить при температуре от 15 °C до 30 °C не дольше 30 дней до выделения ДНК.
Выделенную геномную ДНК (из тканей FFPE) рекомендовано хранить при температуре от -15 до -25 °C не дольше 30 дней до проведения анализа.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Набор реагентов был валидирован для работы с ДНК, выделенной из образцов FFPE тканей NSCLC и CRC пациентов. Для проведения теста по этой методике рекомендовано использовать набор для выделения ДНК, основанный на методике адсорбции на колонке с диоксидом кремния (silica column-based DNA extraction), включающий обработку протеиназой К.

Для проведения теста ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay пригодны образцы выделенной ДНК концентрации > 1,5 нг/мкл. Если количество выделенной ДНК не соответствует этому требованию, следует выделить и оценить количество ДНК из дополнительных образцов, если они имеются в наличии. Для получения наилучших результатов следует провести макродиссекцию таким образом, чтобы доля опухолевой ткани составила ≥ 30 %, а доля некротизированных тканей < 50 % площади среза.

ВНИМАНИЕ: тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay предназначен только для образцов FFPE тканей CRC или NSCLC.

ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТА

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ FFPE ТКАНЕЙ

ПРИМЕЧАНИЕ: методика теста ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay была валидирована для анализа ДНК, выделенной из тканей FFPE и прошедшей количественную оценку. Используйте соответствующее оборудование для измерения концентрации ДНК. Эту оценку проводят для подтверждения того, что ДНК выделена в количестве, достаточном для проведения анализа.

1. Следуйте руководству пользователя производителя оборудования для определения концентрации ДНК, чтобы узнать, как **рассчитать концентрацию образца**.
2. Измерьте концентрацию выделенной из образцов ДНК и рассчитайте концентрацию образца в нг/мкл.
3. Образцы с измеренным количеством ДНК, которое соответствует входным требованиям, могут быть переданы на ген-специфичную ПЦР в соответствии с рекомендациями, приведенными в таблице 7 ниже.

Таблица 7 Требования к количеству исходной ДНК и рекомендации по разведению

ДНК конц (нг/мл)	Рекомендации
<1,5	Не используется. Повторить выделение ДНК.
1,5–12,0	Разведение не требуется.
> 12,0	Разведение образца ДНК до 12,0 нг/мл.

4. Образцы ДНК, прошедшие количественную оценку, следует хранить на льду, если их

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

анализ будет проведен в течение дня, либо заморозить и хранить при температуре -20 °C (см. примечание ниже).

ПРИМЕЧАНИЕ: Образцы выделенной ДНК могут различаться по общему выходу ДНК, степени ее фрагментации и дезаминирования оснований вследствие вариабельности содержания ДНК в образцах тканей FFPE в зависимости от процессов фиксации и длительности хранения.
Если количество выделенной ДНК не соответствует этому требованию, следует выделить и количественно оценить ДНК из дополнительных образцов, если они имеются в наличии.

ТОЧКА ВОЗМОЖНОЙ ОСТАНОВКИ
Выделенную из тканей FFPE ДНК можно хранить при температуре от -15 °C до -25 °C не дольше 30 дней.

ГЕН-СПЕЦИФИЧНАЯ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ (ГС-ПЦР)

ВНИМАНИЕ: для каждой партии образцов (т. е. для образцов, исследуемых на одном планшете) **ОБЯЗАТЕЛЬНЫ отрицательный контроль (NTC) и положительный контроль (PosCtrl)**:

В качестве **отрицательного контроля** (NTC) следует использовать раствор, которым разбавлялась ДНК при выделении.

Положительный контроль (PosCtrl) входит в состав набора и представляет собой смесь фрагментов ДНК, выделенных из обработанных формалином и залитых в парафин тканей, и содержащих целевые мутации, в буферном растворе.

Представленные фрагменты содержат следующие мутации: BRAF V600E, EGFR G719S, Kras G13D, Kras G12D.

Подготовка

1. Определить схему планшета ГС-ПЦР, т.е. распределение по лункам планшета исследуемых образцов и контролей (NTC и PosCtrl) партии.
2. При необходимости развести образец ДНК согласно рекомендациям, приведенным в таблице 6.
3. Извлечь из морозильной камеры и разморозить реагенты **Коробки 1** — Мастер-микс для геноспецифической ПЦР (Gene-Specific Master Mix) и Пул праймеров LC Oligo Pool.
4. Подготовить емкость со льдом для хранения реагентов в процессе использования.
5. Настроить протокол ГС-ПЦР для выбранного термоциклера (амплификатора) согласно рекомендациям, приведенным в таблице 9.

Процедура

1. Подготовить реакционную смесь для ГС-ПЦР в достаточном количестве для партии образцов в соответствии с порядком внесения и объемами, приведенными в таблице 8. Общий объем реакционной смеси ГС-ПЦР составляет 25 мкл.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 8 Порядок внесения и объемы реагентов для подготовки реакционной смеси для одной реакции ГС-ПЦР

Реактив	Цвет крышки	1x объем (мкл)
Мастер-микс для геноспецифической ПЦР (Gene-Specific Master Mix)	Красный	12,5
Пул праймеров LC oligo pool	Желтый	5,0
Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG) (5 ед/мкл)	Синий	1,0

2. Тщательно перемешать реакционную смесь ГС-ПЦР. Быстро центрифугировать пробирку для сборки капель.
3. Перенести 18,5 мкл реакционной смеси ГС-ПЦР в соответствующие лунки планшета ГС-ПЦР.
4. Добавить 6,5 мкл раствора, которым разбавлялась ДНК, в лунку планшета ГС-ПЦР, предназначенную для отрицательного контроля (NTC).
5. Добавить 6,5 мкл положительного контроля (PosCtrl) в предназначенную для него лунку планшета ГС-ПЦР.
6. Добавить 6,5 мкл образца ДНК (при необходимости разведенного) в предназначенную для него лунку планшета ГС-ПЦР.
7. Планшет ГС-ПЦР запечатать и тщательно перемешать содержимое. Быстро центрифугировать для сбора капель и удаления пузырьков.
8. Запустить ГС-ПЦР (в термоциклере с нагревом крышки) со следующим протоколом (см. таблицу 9):

Таблица 9 Профиль ГС-ПЦР

Количество циклов	Температура (°C)	Время (мин)
1	37	10
1	95	15
5	95	1
	60	6
18	95	0,5
	72	3
1	8	Удержание

9. После завершения протокола ГС-ПЦР перейти к этапу очистки продуктов ГС-ПЦР, как показано далее.

ВНИМАНИЕ: соблюдайте меры предосторожности при возвращении реагентов для ГС-ПЦР из коробки № 1 набора O/RDx-LCCA в морозильную камеру с температурным режимом -15 °C – -25 °C для дальнейшего хранения.

ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ ГС-ПЦР

ПРИМЕЧАНИЕ: очистку продуктов ГС-ПЦР проводить в зоне, предназначенной для материалов и процедур «после ПЦР».

Подготовка

1. Температуру материалов довести до комнатной (18-25 °C). Критически важно, чтобы этап очистки выполнялся при комнатной температуре (18-25 °C).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2. Извлечь из **Коробки № 3** Реагент для очистки продуктов ПЦР (микрогранулы) и оставить их при комнатной температуре (18-25 °C) минимум на 30 минут.
3. Для достижения оптимальных результатов следует использовать свежеприготовленный раствор 70 % этанола.
4. Наполните одноразовую пробирку достаточным количеством 70% раствора этанола, очищающих микрогранул и воды для удобного дозирования с помощью многоканальной пипетки.

Процедура

1. Быстро центрифугировать планшет ГС-ПЦР для сбора капель со стенок лунок.
2. Распечатать планшет и добавить во все лунки по 25 мкл очищенной воды, не содержащей нуклеаз.
3. Микрогранулы перед использованием встряхнуть или перемешать. Цвет и консистенция содержимого лунок должны быть однородными и стабильными.
4. Добавить во все лунки по 60 мкл микрогранул для очистки. Десятикратно перемешать содержимое лунок при помощи дозатора. Если на дне лунок образуются пузырьки, планшет быстро центрифугировать и снова перемешать содержимое лунок.
5. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (18-25 °C).
6. Установить планшет на магнитный штатив на 5 минут до осветления раствора.
7. Оставить планшет на магнитном штативе.
8. Осторожно удалить супернатант из каждой лунки, не касаясь слоя микрогранул, осевших на стенке.
9. Добавить в каждую лунку с реактивами по 150 мкл свежеприготовленного 70 % раствора этанола, также, не касаясь слоя микрогранул, осевших на стенке.
10. Подождать 30 секунд, затем осторожно удалить супернатант из каждой лунки.
11. Провести еще одну такую же промывку 70 % этанолом. Оставить планшет на магнитном штативе до высыхания слоя микрогранул на воздухе при комнатной температуре (18-25 °C), примерно на 5 минут или до испарения остатков этанола.

ПРИМЕЧАНИЕ: следует избегать избыточного высушивания (кольца/пеллеты, образованные микрогранулами, приобретают потрескавшийся вид), так как это затрудняет дальнейшее разведение микрогранул и может снизить эффективность эллюции.

12. Снять образцы с магнитного штатива.
13. Ресуспендировать высушенные микрогранулы, добавляя в каждую лунку по 64 мкл очищенной воды, не содержащей нуклеаз и 10-кратно перемешивая с помощью пипетки. Если на дне лунок образуются пузырьки воздуха, планшет быстро центрифугировать и снова перемешать содержимое лунок.
14. Затем инкубировать планшет при комнатной температуре (18-25 °C) не менее 5 минут для элюирования продукта.
15. Очищенные продукты ПЦР хранить на льду, если пробоподготовка будет продолжена в течение дня, либо заморозить и хранить при температуре от -15 °C до -25 °C (см. примечание ниже).

ТОЧКА ВОЗМОЖНОЙ ОСТАНОВКИ
Очищенные продукты ПЦР можно хранить при температуре от -15 °C до -25 °C не дольше 60 дней.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ ДЛЯ ИНДЕКСИРОВАНИЯ

ПРИМЕЧАНИЕ: подготовку реакционной смеси для индексирования (реагент Indexing PCR Master Mix) проводят в зоне «до ПЦР». Добавление очищенных продуктов ГС-ПЦР проводят в зоне «после ПЦР».

ВНИМАНИЕ: количество реагентов в составе набора ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay достаточно для мультиплексирования 48 библиотек на одну проточную ячейку набора MiSeqDx v3, до 6 партий разного размера. Однако для реализации этой возможности необходимо тщательно планировать использование индексных пар для каждой партии.
Рисунок 1 возможные позиции индексных пар для всех 48 библиотек на одну проточную ячейку MiSeqDx. Рекомендуется отображать доступные позиции для партии (партий) библиотек образцов, чтобы количество библиотек нескольких партий не превысило предельного, т. е. 48 библиотек на одну проточную ячейку/запуск.

		1	2	3	4	5	6
		A701	A702	A703	A704	A705	A706
A	A501	A701 A501	A702 A501	A703 A501	A704 A501	A705 A501	A706 A501
B	A502	A701 A502	A702 A502	A703 A502	A704 A502	A705 A502	A706 A502
C	A503	A701 A503	A702 A503	A703 A503	A704 A503	A705 A503	A706 A503
D	A504	A701 A504	A702 A504	A703 A504	A704 A504	A705 A504	A706 A504
E	A505	A701 A505	A702 A505	A703 A505	A704 A505	A705 A505	A706 A505
F	A506	A701 A506	A702 A506	A703 A506	A704 A506	A705 A506	A706 A506
G	A507	A701 A507	A702 A507	A703 A507	A704 A507	A705 A507	A706 A507
H	A508	A701 A508	A702 A508	A703 A508	A704 A508	A705 A508	A706 A508

Рисунок 1 Возможные позиции парных индексных праймеров для максимального количества библиотек (48) в одном прогоне.

Подготовка

1. Необходимо определить комбинации индексных праймеров на схеме планшета для индексирования. В набор ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay входит восемь индексных праймеров 5 серии (i5) (A501-508) и шесть — 7й серии (i7) (A701-A706), этого количества достаточно для мультиплексирования 48 библиотек на одну проточную ячейку MiSeqDx v3.
2. Утилита **Pillar_sample_sheet_tool** (Таблица распределения образцов) в формате Microsoft Excel может служить вспомогательным средством для распределения образцов и реагентов. Файл утилиты можно скачать на веб-сайте Pillar Biosciences и установить на устройство, поддерживающее формат Excel. Кроме визуализации расположения индексных праймеров на планшете, утилита позволяет проводить различные проверки, позволяющие избежать основных ошибок.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3. Установить протокол ПЦР для термоциклера согласно приведенным в таблице 10 рекомендациям.
4. Извлечь из морозильной камеры и разморозить реагенты **Коробки 2**.
5. Подготовить емкость со льдом для хранения реагентов в процессе использования.

FILE NAME | Save to DESKTOP | RESET sample sheet | Instructions | PILLAR BIOSCIENCES

	Sample_ID	Description	Sample_Well	I7_Index_ID	I5_Index_ID	Control
A1	UOM64-10ng	BATCH_1	A1	A701	A501	
B1	UOM64-20ng	BATCH_1	B1	A701	A502	
C1	UOM64-40ng	BATCH_1	C1	A701	A503	
D1	608-10ng	BATCH_1	D1	A701	A504	
E1	608-20ng	BATCH_1	E1	A701	A505	
F1	608-40ng	BATCH_1	F1	A701	A506	
G1	632	BATCH_1	G1	A701	A507	
H1	UOM23	BATCH_1	H1	A701	A508	
A2	UOM74-10ng	BATCH_1	A2	A702	A501	
B2	UOM74-20ng	BATCH_1	B2	A702	A502	
C2	NTC1	BATCH_1	C2	A702	A503	NTC
D2	613-10ng	BATCH_1	D2	A702	A504	
E2	613-20ng	BATCH_1	E2	A702	A505	
F2	613-40ng	BATCH_1	F2	A702	A506	
G2	HzMod1	BATCH_1	G2	A702	A507	PosCtrl
H2	UOM37	BATCH_1	H2	A702	A508	
A3	UOM80-10ng	BATCH_1	A3	A703	A501	
B3	UOM80-20ng	BATCH_1	B3	A703	A502	
C3	UOM80-40ng	BATCH_1	C3	A703	A503	
D3	626-10ng	BATCH_1	D3	A703	A504	
E3	626-20ng	BATCH_1	E3	A703	A505	
F3	626-40ng	BATCH_1	F3	A703	A506	
G3	616	BATCH_2	G3	A703	A507	
H3	UOM62	BATCH_2	H3	A703	A508	
A4	UOM81-10ng	BATCH_2	A4	A704	A501	
B4	NTC2	BATCH_2	B4	A704	A502	NTC
C4	UOM81-40ng	BATCH_2	C4	A704	A503	
D4	628-10ng	BATCH_2	D4	A704	A504	
E4	628-20ng	BATCH_2	E4	A704	A505	
F4	628-40ng	BATCH_2	F4	A704	A506	
G4	UOM69	BATCH_2	G4	A704	A507	
H4	hzMod2	BATCH_2	H4	A704	A508	PosCtrl
A5	UOM91-10ng	BATCH_2	A5	A705	A501	
B5	UOM91-20ng	BATCH_2	B5	A705	A502	
C5	UOM91-40ng	BATCH_2	C5	A705	A503	
D5	629-10ng	BATCH_2	D5	A705	A504	
E5	629-20ng	BATCH_2	E5	A705	A505	
F5	629-40ng	BATCH_2	F5	A705	A506	
G5	UOM65	BATCH_3	G5	A705	A507	
H5	hzSev	BATCH_3	H5	A705	A508	
A6	UOM92-10ng	BATCH_3	A6	A706	A501	
B6	UOM92-20ng	BATCH_3	B6	A706	A502	
C6	UOM92-40ng	BATCH_3	C6	A706	A503	
D6	648-10ng	BATCH_3	D6	A706	A504	
E6	648-20ng	BATCH_3	E6	A706	A505	
F6	648-40ng	BATCH_3	F6	A706	A506	
G6	HzMod3	BATCH_3	G6	A706	A507	PosCtrl
H6	NTC3	BATCH_3	H6	A706	A508	NTC

SAMPLE ID

	1	2	3	4	5	6
A	UOM64-10ng	UOM74-10ng	UOM80-10ng	UOM81-10ng	UOM91-10ng	UOM92-10ng
B	UOM64-20ng	UOM74-20ng	UOM80-20ng	NTC2	UOM91-20ng	UOM92-20ng
C	UOM64-40ng	NTC1	UOM80-40ng	UOM81-40ng	UOM91-40ng	UOM92-40ng
D	608-10ng	613-10ng	626-10ng	628-10ng	629-10ng	648-10ng
E	608-20ng	613-20ng	626-20ng	628-20ng	629-20ng	648-20ng
F	608-40ng	613-40ng	626-40ng	628-40ng	629-40ng	648-40ng
G	632	HzMod1	616	UOM69	UOM65	HzMod3
H	UOM23	UOM37	UOM62	hzMod2	hzSev	NTC3

SAMPLE BATCHING

	1	2	3	4	5	6
A	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3
B	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3
C	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3
D	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3
E	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3
F	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3
G	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3	BATCH_3
H	BATCH_1	BATCH_1	BATCH_2	BATCH_2	BATCH_3	BATCH_3

INDEX PAIR

	1	2	3	4	5	6
A	A701|A501	A702|A501	A703|A501	A704|A501	A705|A501	A706|A501
B	A701|A502	A702|A502	A703|A502	A704|A502	A705|A502	A706|A502
C	A701|A503	A702|A503	A703|A503	A704|A503	A705|A503	A706|A503
D	A701|A504	A702|A504	A703|A504	A704|A504	A705|A504	A706|A504
E	A701|A505	A702|A505	A703|A505	A704|A505	A705|A505	A706|A505
F	A701|A506	A702|A506	A703|A506	A704|A506	A705|A506	A706|A506
G	A701|A507	A702|A507	A703|A507	A704|A507	A705|A507	A706|A507
H	A701|A508	A702|A508	A703|A508	A704|A508	A705|A508	A706|A508

CONTROL TYPE

	1	2	3	4	5	6
A	S	S	S	S	S	S
B	S	S	S	NTC	S	S
C	S	NTC	S	S	S	S
D	S	S	S	S	S	S
E	S	S	S	S	S	S
F	S	S	S	S	S	S
G	S	PosCtrl	S	S	S	PosCtrl
H	S	S	S	PosCtrl	S	NTC

Рисунок 2: Таблица распределения образцов

«FILE NAME»	ИМЯ ФАЙЛА
«Sample_ID»	ID Образца
«Description»	Описание
«Sample_Well»	Лунка образца
«i7_Index_ID»	i7_Индекс_ID
«i5_Index_ID»	i5_Индекс_ID

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

«Control»	Контроль
«Save to DESKTOP»	Сохранить на РАБОЧЕМ СТОЛЕ
«RESET sample sheet»	ОБНОВИТЬ таблицу распределения образцов
«Instructions»	Инструкции
«SAMPLE ID»	ID ОБРАЗЦА
«SAMPLE BATCHING»	ПАРТИЯ
«INDEX PAIR»	ПАРЫ
«CONTROL TYPE»	ТИП КОНТРОЛЯ

Процедура

1. Для подготовки к индексной ПЦР- необходимо взять новый планшет.
2. Для каждой реакции добавить по 4 мкл соответствующих прямых и обратных индексных праймеров во все лунки с образцами и контролями, руководствуясь приведенной выше схемой во избежание дублирования индексных пар в проточной ячейке MiSeqDx. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не допустить случайной перекрестной контаминации индексных праймеров. Объем индексных праймеров в каждой из предназначенных для них лунке должен составить 8 мкл.
3. Подготовить реакционную смесь ПЦР в достаточном количестве в соответствии с объемами, указанными в таблице 10. Общий объем реакционной смеси индексной ПЦР составляет 50 мкл.

Таблица 10 Объемы реагентов для подготовки реакционной смеси для одного цикла индексной ПЦР

Реагент	Цвет крышки	1х объем (мкл)
Мастер-микс для индексирования (Indexing PCR Master Mix)	Зеленый	25,0
Вода очищенная, не содержащая нуклеаз	Н/П	11,0

4. Тщательно перемешать реакционную смесь для индексной ПЦР. Быстро центрифугировать планшет, чтобы собрать капли.
5. Перенести 36 мкл реакционной смеси для индексной ПЦР в соответствующие лунки планшета. Во избежание перекрестной контаминации индексных праймеров при переходе от лунки к лунке необходимо убедиться, что наконечник дозатора заменен.
6. Планшет с очищенными продуктами ГС-ПЦР установить на магнитный штатив для отделения микрогранул от элюата.
7. Осторожно открыть планшет с очищенными продуктами ГС-ПЦР, забрать по 6 мкл супернатанта, стараясь не задевать слой микрогранул, и перенести в соответствующие лунки с индексными праймерами в планшете для индексной ПЦР. Небольшое количество микрогранул, попавшее в лунки с индексными праймерами, не повлияет на ПЦР.
8. Планшет для ПЦР-индексирования запечатать и тщательно перемешать содержимое. Быстро центрифугировать, чтобы собрать капли и удалить пузырьки воздуха.
9. Запустить индексную ПЦР (в термоциклере с нагревом крышки) со следующим протоколом (см. таблицу 10):

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 11 Профиль цикла ПЦР-индексирования

Количество циклов	Температура (°C)	Время (мин)
1	95	2
5	95	0,5
	66	0,5
	72	1
1	72	5
1	8	Удержание

10. После завершения протокола ПЦР перейти к этапу очистки индексированных библиотек, как показано далее.

ВНИМАНИЕ: соблюдайте меры предосторожности при возвращении реагентов для индексной ПЦР коробки № 2 набора O/RDx-LCCA в морозильную камеру с температурным режимом -15 °C – -25 °C для дальнейшего хранения.

ОЧИСТКА ИНДЕКСИРОВАННЫХ БИБЛИОТЕК

ПРИМЕЧАНИЕ: очистку индексированных библиотек проводят в зоне, предназначенной для материалов и процедур «после ПЦР».

Подготовка

1. Температуру материалов довести до комнатной (18-25 °C). Критически важно, чтобы этап очистки выполнялся при комнатной температуре (18-25 °C).
2. Извлечь из **Коробки № 3** микрогранулы для очистки продуктов ПЦР и оставить их при комнатной температуре (18-25 °C) минимум на 30 минут.
3. Для достижения оптимальных результатов следует использовать свежеприготовленный 70 % этанол.
4. Наполните одноразовую кювету достаточным количеством 70% раствора этанола, очищающих микрогранул и воды для удобного дозирования с помощью многоканальной пипетки.

Процедура

1. Центрифугировать планшет после индексной ПЦР, чтобы собрать капли со стенок лунок.
2. Микрогранулы перед использованием встряхнуть или перемешать. Цвет и консистенция содержимого лунок должны быть однородными и стабильными.
3. Распечатать планшет и добавить во все лунки по 50 мкл микрогранул для очистки. Десятикратно перемешать содержимое лунок при помощи дозатора. Если на дне лунок образуются пузырьки, планшет быстро центрифугировать и снова перемешать содержимое лунок.
4. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре (18-25 °C).
5. Установить планшет на магнитный штатив на 5 минут до осветления раствора.
6. Оставить планшет на магнитном штативе.
7. Осторожно удалить супернатант из каждой лунки, не касаясь слоя микрогранул, осевших на стенке.
8. Добавить в каждую лунку с реактивами по 150 мкл свежеприготовленного 70 % раствора этанола, также, не касаясь слоя микрогранул, осевших на стенке.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9. Подождать 30 секунд, затем осторожно удалить супернатант из каждой лунки.
10. Провести еще одну такую же промывку 70 % этанолом. Оставить планшет на магнитном штативе до высыхания слоя микрогранул на воздухе при комнатной температуре (18-25 °C), примерно на 5 минут или до испарения остатков этанола.

ПРИМЕЧАНИЕ: следует избегать избыточного высушивания (кольца/пеллеты, образованные микрогранулами, приобретают потрескавшийся вид), так как это затрудняет дальнейшее разведение микрогранул и может снизить эффективность элюции продуктов ГС-ПЦР.

11. Снять планшет с магнитного штатива.
12. Развести высушенные микрогранулы до суспензии, добавляя в каждую лунку по 32 мкл очищенной воды, не содержащей нуклеаз и 10-кратно перемешивая. Если на дне лунок образуются пузырьки воздуха, планшет быстро центрифугировать и снова перемешать содержимое лунок.
13. Затем планшет инкубировать при комнатной температуре (18-25 °C) не менее 5 минут для вымывания продуктов ГС-ПЦР.
14. Установить планшет на магнитный штатив на 5 минут до осветления раствора.
15. Перенести по 30 мкл прозрачного супернатанта (очищенных индексированных библиотек) из каждой лунки планшета индексированной ПЦР в лунки нового планшета.
16. Очищенные индексированные библиотеки следует хранить на льду, если их анализ будет проведен в течение дня, либо заморозить и хранить при температуре -20 °C — см. примечание ниже.

ТОЧКА ВОЗМОЖНОЙ ОСТАНОВКИ
Очищенные индексированные библиотеки можно хранить при температуре -20 °C не дольше 90 дней.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ИНДЕКСИРОВАННЫХ БИБЛИОТЕК ОБРАЗЦОВ

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ
Тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay был валидирован для количественно оцененных библиотек ДНК. Используйте соответствующее оборудование для количественной оценки концентрации ДНК. Количественная оценка ДНК выполняется, чтобы определить, имеет ли библиотека ДНК достаточный выход для секвенирования на приборе MiSeqDx .

Следуйте руководству пользователя производителя оборудования для измерения дцДНК, чтобы узнать, как подготовить образцы, прочитать образцы и рассчитать концентрацию образцов. Для измерения концентрации каждой библиотеки используйте минимум 4 мкл на библиотеку образцов. Измерьте концентрацию проиндексированных библиотек образцов и рассчитайте концентрацию образцов в нг / мкл. Преобразуйте концентрацию библиотеки образцов в нг/мкл в нмоль/л, умножив измеренную концентрацию в нг/мкл на коэффициент преобразования 5.

$$Конц_{библ.}\ (нмоль/л) = Конц_{библ.}\ (нг/мкл) \times 5$$

PosCtrl и NTC должны соответствовать следующей проверке производительности библиотеки в таблице ниже, прежде чем переходить к нормализации и объединению библиотек.

ВНИМАНИЕ: Убедитесь, что концентрация библиотеки измерена и рассчитана и указана в нмоль/л для проверки выхода библиотеки.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 12 Контроли для проверки выхода библиотеки

Контроль	Конц. библиотеки (нмоль/л)	Рекомендации
PosCtrl	≥ 3,5	Перейти к следующему этапу.
	< 3,5	Значения положительного контроля слишком низкое. Повтор процедуры приготовления библиотеки - от индексной ПЦР- или ген-специфичной амплификации
NTC	< 2,0	Переходят к следующему этапу.
	≥ 2,0	Возможна контаминация негативного контроля. Повтор процедуры приготовления библиотеки - от индексной ПЦР- или ген-специфичной амплификации

Индексированные библиотеки следует хранить на льду, если следующий этап пробоподготовки будет проведен в течение дня, либо заморозить и хранить при температуре -20 °C - см. примечание ниже.

ТОЧКА ВОЗМОЖНОЙ ОСТАНОВКИ
Очищенные индексированные библиотеки можно хранить при температуре -20 °C не дольше 90 дней.

НОРМАЛИЗАЦИЯ И ПУЛИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕК

ПРИМЕЧАНИЕ: индексированные библиотеки перед объединением в один пул должны быть нормализованы до конечной концентрации 3,5–5,0 нмоль/л.

Подготовка

1. Если библиотеки хранились в замороженном состоянии, их следует полностью разморозить при комнатной температуре (18-25°C). Размороженные библиотеки перемешивают вортексом и центрифугируют, чтобы собрать капли со стенок лунок.

Процедура

1. Каждую из библиотек необходимо нормализовать, исходя из ее концентрации в нмоль/л, в соответствии с рекомендациями, приведенными в таблице 12 далее.

ВНИМАНИЕ: Убедитесь, что измеренная концентрация библиотеки рассчитана и представлена в **нмоль/л** для проверки выхода библиотеки и расчета разведения.

Таблица 13 Таблица разведений индексированных библиотек

Конц. библиотеки (нмоль/л)	Рекомендации
< 3,5	Не используется.
3,5 - 5,0	Разведение не требуется.
> 5,0	Библиотеку разводят до 4,0 нмоль/л

2. Объем буфера (10 ммоль/л Трис-HCl с 0,1 % Твин 20, pH 8,5) для библиотек, требующих разведения (**из расчета для 4 мкл каждой библиотеки при разведении до концентрации 4,0 нмоль/л**), рассчитывают по формуле, приведенной ниже.

$$\text{Объем}_{\text{разб.}}\text{ в мкл} = \frac{4\text{ мкл x Конц.}_{\text{библ.}}}{4\text{ нмоль/л}} - 4\text{ мкл}$$

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3. Для нормализации библиотек необходимо взять новый планшет.
4. Добавить рассчитанный объем буфера для библиотек в лунки планшета, предназначенные для растворов библиотек соответствующих концентраций на планшете для нормализации. Контроль NTC разводят таким же количеством буфера, как наименее концентрированный раствор библиотеки.
5. Перенести по 4 мкл очищенных индексированных библиотек в предназначенные для них лунки планшета для нормализации.
6. После подготовки нормализованных библиотек планшет запечатать и тщательно перемешать содержимое. Быстро центрифугировать планшет для сбора капель.
7. Промаркировать новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для пула библиотек. Добавить по 4 мкл нормализованных библиотек каждого образца, предназначенного для секвенирования, в пробирку. Рекомендуется использовать многоканальный дозатор для забора библиотек из лунок планшета в одну неиспользованную колонку («объединенная» кювета), после чего содержимое лунок «объединенной» колонки можно вручную переместить в пробирку.
8. Содержимое пробирки тщательно перемешать при помощи вортекса.
9. В результате объединения библиотек получают **пул библиотек.**
10. Индексированные библиотеки следует хранить на льду, если их анализ будет проведен в течение дня, либо заморозить и хранить при температуре -20 °C — см. примечание ниже.

ТОЧКА ВОЗМОЖНОЙ ОСТАНОВКИ
Очищенные индексированные библиотеки можно хранить при температуре -20 °C не дольше 90 дней.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПУЛА БИБЛИОТЕК

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ
Тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay валидирован для количественно оцененных библиотек ДНК. Используйте соответствующее оборудование для количественной оценки концентрации ДНК. Эту оценку проводят для подтверждения концентрации 3,5–4,5 нмоль/л ДНК в пуле библиотек, что необходимо для предотвращения недостаточной или избыточной кластеризации при секвенировании на приборе MiSeqDx .

Подготовка

Следуйте инструкции производителя прибора для измерения концентрации ДНК для считывания образцов и расчета концентрации образцов.

Процедура

1. Поместите смешанную библиотеку и холостой образец в соответствующие пробирки.
2. Измерьте концентрацию ДНК подготовленных образцов: холостой образец и пул библиотек. измеренная концентрация пула библиотек (в нг/мл) должна соответствовать следующей проверке концентрации в таблице ниже, прежде чем переходить к следующим шагам.

ВНИМАНИЕ: Убедитесь, что измеренная концентрация пула библиотек рассчитана и указана в нг/мл

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 14 Результаты проверки измерения концентрации пула библиотеки

Концентрации пула библиотеки (нг/ мл)	Рекомендации
< 180	Повторить подготовку и измерению концентраций QC и пула библиотек.
180–220	Перейти к следующему этапу.
> 220	Повторить подготовку и измерение концентраций QC и пула библиотек.

3. Вычислить концентрацию пула библиотек в нг/мкл.
4. Перевести концентрацию пула библиотек из нг/мкл в нмоль/л. Для этого необходимо умножить значение измеренной концентрации в нг/мкл на коэффициент, равный 5.

$$Конц_{библ.}\ (нмоль/л) = Конц_{библ.}\ (нг/мкл) \times 5$$

5. Перейти к этапу секвенирования пула библиотек, следуя рекомендациям таблицы 14.

ВНИМАНИЕ: Убедитесь, что измеренная концентрация пула библиотек рассчитывается и указывается в **нмоль/л** для проверки концентрации пула библиотеки и расчета разведения.

Таблица 15 Таблица разведения смешанной библиотеки

Конц. Пула библиотек (нмоль/л)	Рекомендации
< 3,0	Не используется. Повторить этап нормализации и объединения библиотек.
3,0 - 4,5	Разведение не требуется, перейти к этапу денатруации пула библиотек
> 4,5	Развести до 4,0 нмоль/л.

6. Объем буфера (10 ммоль/л Трис-HCl с 0,1 % Твин 20, pH 8,5) для пула библиотеки, требующей разведения (из расчета для 4 мкл каждой библиотеки при разведении до концентрации 4,0 нмоль/л), рассчитывают по формуле, приведенной ниже.

$$Объем_{разб.}\ в\ мкл = \frac{4\ мкл \times Конц._{библ.Mix}}{4\ нмоль/л} - 4\ мкл$$

7. Добавить рассчитанный объем к пулу библиотек.
8. Повторите количественный анализ концентрации пула библиотек для смеси, приведенной к концентрации 4 нмоль/л
9. До начала процесса денатурации готовый пул библиотек помещают на лед.

ДЕНАТУРАЦИЯ ПУЛА БИБЛИОТЕК

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ
Валидированная методика анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay подразумевает использование набора реагентов ИВД MiSeq™ Dx v3 (MiSeq™ Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот и секвенирование на приборе MiSeqDx, производства «Иллюмина, Инк.» (Illumina, Inc.), США

Подготовка картриджа с реактивами

1. Размораживают картридж с реактивами MiSeqDx, помещая его в водяную баню с достаточным количеством деионизированной воды комнатной температуры (18-25 °C) таким

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

образом, чтобы основание картриджа было погружено до имеющейся на нем линии (water line). Картридж не должен погружаться глубже этой линии.

2. Оставляют картридж с реактивами в водяной бане комнатной температуры (18-25 °C) до полного размораживания, примерно на 1 час.

3. Извлекают картридж из водяной бани, устанавливают на поверхности стола и осторожно постукивают, стряхивая капли воды. Насухо вытирают основание картриджа. Необходимо убедится, что вода не попала на верхнюю часть картриджа.

4. Все оставшиеся капли воды удаляют безворсовой салфеткой.

Проверка картриджа

5. Переворачивают картридж десять раз, чтобы перемешать размороженные реагенты, и проверяют, все ли реагенты оттаяли.

6. Проверяют реагенты в портах 1, 2 и 4, чтобы убедится, что они хорошо перемешаны и не содержат преципитатов.

7. Осторожно постукивают картриджем по поверхности стола — это позволит уменьшить количество пузырьков воздуха в реактивах.

8. Помещают картридж на лед или в холодильник с температурой 2 °C–8 °C (до 6 часов).

Подготовка реагентов для денатурации

9. Маркируют новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для 0,2 н. р-ра NaOH. Вносят в пробирку 800 мкл очищенной воды, не содержащей нуклеаз, и 200 мкл 1,0 н. р-ра NaOH. Перемешивают, переворачивая пробирку несколько раз.
10. В результате получают 1 мл 0,2 н. р-ра NaOH. Этот раствор можно использовать в течение 12 часов.
11. Извлекают HT1 из морозильника (-15°C – -25°C) и размораживают при комнатной температуре (18-25 °C). Хранят при температуре от 2°C до 8°C до разведения денатурированных библиотек.

Денатурация пула библиотеки

12. Маркируют новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для денатурированной пула библиотеки.
13. Вносят в пробирку 5 мкл пула библиотеки и 5 мкл 0,2 н. р-ра NaOH.
14. Быстро перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 1 минуты.
15. Инкубируют 5 минут при комнатной температуре (18-25 °C).

Разведение денатурированнового пула библиотеки

16. Добавляют 990 мкл предварительно охлажденного реактива HT1 в пробирку с денатурированного пула библиотек.
17. Быстро перемешивают на вортексе и центрифугируют.
18. До начала этапа конечного разведения денатурированный пул библиотек помещают на лед.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

19. Маркируют новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для пула библиотеки, предназначенной для загрузки в картридж с реактивами.
20. Объединяют 594 мкл денатурированной и разведенного пула библиотеки с 6 мкл деионизированной воды.
21. Оставляют пробирку со смесью на льду до загрузки в картридж с реактивами.

СОЗДАНИЕ ЗАПУСКА ПРИ ПОМОЩИ ПРОГРАММЫ LOCAL RUN MANAGER

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ
Валидированная методика анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay подразумевает секвенирование на приборе Illumina MiSeqDx.

1. Для создания нового запуска необходимо выбрать команду «Create Run» (создать запуск) на основной панели Local Run Manager. Страница создания запуска (Create Run) включает следующие разделы:
   - Название запуска (Run Name)
   - Образцы (Samples)
2. Название запуска задается для идентификации запуска в процессе анализа. Название может состоять из 40 буквенных/числовых символов. В названии можно использовать пробелы, нижнее подчеркивание и косую черту.
3. Описание запуска вводится по желанию и может состоять из 150 буквенных/числовых символов.
4. Характеристики исследуемых в запуске образцов указывают следующим образом:

Ввод информации об образцах вручную

1. Используют пустую таблицу на экране «Create Run» (создать запуск).
2. В выпадающем списке выбирают количество образцов и набор индексных праймеров.
3. Вводят уникальное название библиотеки. В названии можно использовать буквенные/числовые символы, пробелы и нижнее подчеркивание.
4. Положительный контроль или отрицательный контроль выбирают нажатием правой кнопки мыши, задавая тип контроля.
5. [Опционально] Выбирают функцию «Description» (описание) и вводят идентификатор библиотеки. В названии можно использовать буквенные/числовые символы, пробелы и нижнее подчеркивание. Положительный контроль или отрицательный контроль должны быть заданы для каждой серии.
6. Из выпадающего списка выбирают «Index 1» (индексные праймеры 1) (i7) и «Index 1 adapter» (адаптер 1 для индексных праймеров).
7. Из выпадающего списка выбирают «Index 2» (индексные праймеры 2) (i5) и «Index 2 adapter» (адаптер 2 для индексных праймеров).
8. Выбирают опции просмотра, распечатки и сохранения схемы планшета для подготовки библиотек:
   - Для просмотра схемы планшета выбирают иконку «Print» (печать). Для вывода схемы планшета на печать нажимают кнопку «Print» (печать).
   - Для сохранения схемы планшета во внешнем файле выбирают опцию «Export» (экспорт).
9. Выбирают опцию «Save Run» (сохранить запуск)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Импорт информации об образцах

1. Выбирают опцию (щелкнув кнопкой мыши) импорта информации об образцах («Import Samples») для выбора расположения файла с информацией об образцах. Можно импортировать три типа файлов.
   - Для создания новой схемы планшета нужно выбрать опцию «Template» (шаблон) на экране «Create Run» (создать запуск). В файле с шаблоном содержаться сведения о правильных заголовках полей для импорта. Вводят информацию обо всех образцах запуска в каждое поле. Удаляют сведения, приведенные в качестве примера, из неиспользованных полей и сохраняют файл.
   - Используют файл с информацией об образце, который был экспортирован из модуля анализа с помощью функции «Export» (экспорт).
   - Загружают файл Pillar_sample_sheet_tool (таблицу для распределения образцов) с веб-сайта Pillar Biosciences или с рабочей станции PiVAT для создания новой схемы планшета. Вводят необходимые данные и выбирают «Save to DESKTOP» (сохранить на рабочем столе).
2. Для просмотра схемы планшета выбирают иконку «Print» (печать).
3. Для вывода схемы планшета на печать нажимают кнопку «Print» (печать).
4. Выбирают опцию «Save Run» (сохранить запуск)

ЗАГРУЗКА БИБЛИОТЕК ОБРАЗЦА В КАРТРИДЖ

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ
После полного размораживания и подготовки картриджа можно помещать в него образцы.

1. При помощи чистого пустого наконечника пипетки на 1 мл и прокалывают фольгу на емкости картриджа с реактивами в позиции 17, маркированной «Load Samples» (загрузка образцов). Примечание: на остальных емкостях с реактивами фольгу не прокалывают. Фольга, закрывающая остальные емкости с реактивами, прокалывается в приборе автоматически в процессе секвенирования.
2. Переносят дозатором 600 мкл подготовленной денатурированного пула библиотек в емкость, маркированную «Load Samples» (загрузка образцов). Не следует касаться фольги.
3. После загрузки образца проверяют наличие пузырьков воздуха. Если имеются пузырьки воздуха, следует осторожно постучать картриджем по поверхности стола, чтобы они исчезли.
4. Сразу после этого переходят к настройке запуска при помощи интерфейса операционного программного обеспечения MiSeq Operating Software (MOS).

КОНФИГУРИРОВАНИЕ ЗАПУСКА

ВАЖНОЕ ПРИМЕЧАНИЕ
Полные инструкции по конфигурированию запуска прибора MiSeqDx приведены в Справочном руководстве генетического секвенатора MiSeqDx для MOS v2 (документ # 1000000021961).

1. Выполняют вход в программу Local Run Manager прибора MiSeqDx , используя пароль.
2. На главном экране программного обеспечения MOS выбирают «Sequence» (секвенирование).
3. Выбирают прогон из списка, затем опцию «Next» (следующее).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. Открываются серии экранов установки запуска в следующем порядке: Load Flow Cell (загрузка проточной кюветы), Load Reagents (загрузка реагентов), Review (просмотр) и Pre-Run check (проверка перед запуском).
5. При появлении экрана «Load Flow Cell» (загрузка проточной кюветы) следует загрузить чистую проточную кювету.
6. После установки проточной кюветы закрывают защелку и дверцу отсека проточной кюветы.
7. Защелка и дверца отсека проточной кюветы должны быть закрыты перед началом запуска. После загрузки проточной кюветы программное обеспечение считывает и записывает радиочастотную метку (RFID). Подтверждение того, что RFID была успешно считана, появляется в правом нижнем углу экрана.
8. Следуя подсказкам программного обеспечения, загружают бутыль с реактивом MiSeqDx SBS Solution (PR2), убеждаются, что бутыль для слива отходов пуста, и загружают картридж с реактивами.
9. Когда загружена бутыль MiSeqDx SBS Solution (PR2) и картридж с реактивами, программное обеспечение считывает и записывает радиочастотную метку (RFID). Подтверждение того, что RFID была успешно считана, появляется в правом нижнем углу экрана.
10. При начале запуска открывается экран «Sequencing» (секвенирование). Этот экран обеспечивает визуальное представление о ходе выполнения секвенирования, включая оценки интенсивности и качества (Q-показатели).

АНАЛИЗ PIVAT

1. После завершения прогона данные переносят на компьютер PiVAT при помощи съемного USB-накопителя.
2. Инструкции по переносу данных, началу анализа и выводу результатов приведены в Руководстве пользователя PiVAT (UM-0038)

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для каждого запуска секвенирования, включающего до 46 образцов (т. е. для образцов, подготовленных на одном планшете), требуется внести отрицательный контрольный образец (NTC) и положительный контрольный образец (PosCtrl). Если недействительные результаты получены для NTC и/или PosCtrl, недействительным считается весь запуск. В этом случае необходимо обратиться к таблице 16 для выполнения рекомендуемых действий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Валидация всех запусков и образов выполняется ПО ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay PiVAT. Валидный запуск может включать и валидные и невалидные результаты.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 16. Интерпретация результатов краткого обзора запуска PiVAT.

Результаты	Интерпретация	Действия
Запуск ВАЛИДЕН (RUN PASS)	Результаты положительного контроля и отрицательного контроля находятся в пределах ожидаемого диапазона.	Отсутствуют.
Запуск НЕ ВАЛИДЕН (RUN FAIL); Отрицательный контрольный образец НЕ ВАЛИДЕН (NTC FAIL)	Результат отрицательного контроля находится выше ожидаемого диапазона и/или контаминирован.	См. раздел «Устранение неисправностей» для рекомендованных решений относительно отрицательных контролей ампликонов. Повторить секвенирование с подготовленными библиотеками и анализом PiVAT для целого запуска. Если запуск становится невалидным при повторном запуске, повторить целый запуск, начиная с этапа «Ген-специфичная мультиплексная ПЦР».
Запуск НЕ ВАЛИДЕН; Положительный контрольный образец НЕ ВАЛИДЕН (PosCtr FAILl	Результат положительного контроля находится ниже ожидаемого диапазона и/или контаминирован.	См. раздел «Устранение неисправностей» для рекомендованных решений относительно ненадлежащей количественной оценки библиотеки и перекрестной контаминации. Если ошибка может быть связана с неправильной количественной оценкой библиотеки образцов или пула библиотек, повторить секвенирование подготовленных библиотек с правильной количественной оценкой и анализом PiVAT всего запуска. В противном случае повторить весь запуск, начиная с этапа «Ген-специфичная мультиплексная ПЦР».
Запуск НЕ ВАЛИДЕН (RUN FAIL); Отрицательный контрольный образец НЕ ВАЛИДЕН (NTC FAIL) Положительный контрольный образец НЕ ВАЛИДЕН (PosCtr FAIL)	Результаты отрицательного и положительного контроля находятся вне ожидаемого диапазона и/или контаминированы.	Повторить весь запуск, начиная с этапа «Ген-специфичная мультиплексная ПЦР».
Мутация обнаружена (Mutation detected)	Обнаружена мутация из списка в таблицах 1 и 2 данного руководства.	Отсутствуют.
Мутация не обнаружена (Mutation not detected)	Не обнаружено мутаций из списка в таблицах 1 и 2 данного руководства.	Отсутствуют.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Тест предназначен только для тканей указанных типов. Методика анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay валидирована для исследования образцов тканей CRC и NSCLC.

Тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay предназначен для качественного анализа. Результатом этого теста является выяснение наличия или отсутствия мутаций KRAS, EGFR и BRAF, перечисленных в таблице 1 и таблице 2.

- Методика анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay была валидирована для ДНК, выделенной из FFPE образцов тканей опухолей NSCLC и CRC.
- Эта валидированная методика подразумевает использование соответствующего набора реагентов для количественной оценки ДНК, выделенной из FFPE образцов.
- Валидированная методика анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay подразумевает секвенирование на приборе MiSeqDx.
- Процедуры теста должны выполнять только сотрудники, обладающие навыками приготовления библиотеки для методик секвенирования нового поколения (Next-Generation Sequencing) и навыками обращения с прибором MiSeqDx.

Тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay предназначен для качественного анализа. Результатом этого теста является выяснение наличия или отсутствия мутаций KRAS, EGFR и BRAF, перечисленных в таблице 1 и таблице 2 раздела «Показания к применению».

- В образце ДНК, для которого получен результат теста “Варианты не выявлены”, могут присутствовать другие варианты KRAS, EGFR и BRAF, не выявляемые этим тестом.
- Тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay не должен использоваться для постановки диагноза.

УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема	Возможные причины	Решение
Низкий выход ген-специфичного продукта	Количество или качество ДНК	Рекомендованное количество исходной геномной ДНК для анализа составляет 10-80 нг. Для выделения ДНК может потребоваться большее количество ткани FFPE, если образцы FFPE имеют низкое качество.
	Непроизводительная ПЦР	Проверяют ПЦР протокол на соответствие надлежащему протоколу ген-специфичной амплификации.
Низкая эффективность индексирования	Недостаточная очистка	Неполная очистка либо потеря ген-специфичных продуктов могут повлиять на индексную ПЦР. Можно провести оценку очищенных продуктов в агарозном геле, чтобы убедится в отсутствии потерь.
		На очистку ПЦР-продуктов влияет соотношение концентраций микрогранул и этанола. Убедитесь, что используется надлежащая концентрация микрогранул для очистки, а для промывки — свежеприготовленный 70 % раствор этанола.
		Этанол, оставшийся после промывки, может затруднять ПЦР. После последнего этапа промывки удаляют остатки этанола пипеткой, насколько возможно, и высушивают микрогранулы до полного испарения этанола.
	Непроизводительная ПЦР	Проверяют протокол ПЦР на соответствие надлежащему протоколу амплификации для индексирования.
Низкий выход библиотеки	Количество или качество ДНК	Рекомендованное количество исходной геномной ДНК для анализа составляет 10-80 нг. Для выделения ДНК может

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Проблема	Возможные причины	Решение
		потребоваться большее количество ткани FFPE, если образцы FFPE имеют низкое качество. Для оценки выхода проводят проверку продуктов, полученных в ген-специфичной ПЦР, в агарозном геле. Проверку в агарозном геле можно провести также после индексной ПЦР и до и после очистки микрогранулами.
	Недостаточная очистка	Неполная очистка либо потеря продуктов могут повлиять на конечный выход. Можно провести оценку очищенных продуктов в агарозном геле, чтобы убедится в отсутствии потерь при очистке. На очистку ПЦР-продуктов влияет соотношение концентраций микрогранул и этанола. Убедитесь, что используется надлежащая концентрация микрогранул для очистки, а для промывки — свежеприготовленный 70 % раствор этанола.
Недостаточное или избыточное образование кластеров библиотек на приборе MiSeqDx	Концентрация нормализованных пулов библиотек не равна 4 нмоль/л	Проверьте соответствие пула библиотек (Library Mix) номинальной концентрациии 4 нмоль/л. При необходимости разведите денатурированный пул библиотек (Library Mix) для устранения различий концентрации.
	Неудовлетворительное качество библиотек Количественная оценка	Неверная количественная оценка библиотеки может приводить к артефактам в виде высокого или низкого выхода, влияющим на последующую нормализацию. Проводят повторную количественную оценку конечных библиотек и/или нормализованных библиотек на соответствие ожидаемым значениям.
	Недостаточная очистка	Изменение доли микрогранул для очистки влияет на очистку продуктов. В частности, к чрезмерному кластерообразованию может привести занижение значений общего количества, вызванное присутствием димеров праймеров. На очистку ПЦР-продуктов влияет соотношение концентраций микрогранул и этанола. Убедитесь, что используется надлежащая концентрация микрогранул для очистки, а для промывки — свежеприготовленный 70 % раствор этанола. Можно провести проверку на надлежащий размер продуктов и наличие димеров в конечных библиотеках в агарозном геле.
Присутствие ампликонов в отрицательном контроле	Перекрестная контаминация	Обязательно заменяйте наконечники дозаторов при работе с разными образцами и не выполняйте манипуляций над открытыми пробирками или планшетами. Соблюдайте меры предосторожности при работе с жидкостями, и не проносите использованные наконечники над образцами. Контаминация соседних образцов может происходить, если емкости неплотно закрыты или при наличии остатков растворов в наконечниках дозаторов. Если возможно, лучше оставлять между образцами пустые лунки. Для предотвращения контаминаций ампликонами рабочие пространства и принадлежности для процедур, проводимых до и после ПЦР, должны быть разделены. Рабочие поверхности, полы, оборудование и принадлежности для работы следует периодически очищать специальным раствором (10 % р-р гипохлорита натрия, 70 % р-р изопропанола или 70 % р-р этанола), удаляющим ампликоны с

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Проблема	Возможные причины	Решение
		поверхностей. Повторяют этап промывки (template line wash) секвенатора MiSeqDx раствором гипохлорита натрия (NaOCl) согласно инструкция по применению.

ОФИЦИАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

PiVAT®, SLIMamp®, Pillar® и ONCO/Reveal™ являются зарегистрированными или ожидающими регистрации товарными знаками компании Pillar Biosciences, Inc. в США и/или в других странах.
Illumina™ и MiSeqDx® являются зарегистрированными или ожидающими регистрации товарными знаками компании «Иллюмина Инк.» (Illumina, Inc.) в США и/или в других странах.

ИНФОРМАЦИЯ О КОМПАНИИ

Pillar Biosciences, Inc.
9 Strathmore Road, Natick Massachusetts 01760, United States

techsupport@pillar-biosciences.com
https://pillar-biosciences.com/

Уполномоченный представитель в Европе: QAdvis EAR AB

Адрес уполномоченного представителя: Ideon Science Park, Scheelevagen 17, SE-223 70, Лунд, Швеция (Lund, Sweden)

Данное руководство пользователя предназначено для Российской Федерации (РФ) и незначительно отличается от руководства пользователя для Соединенных Штатов Америки (США), различия не затрагивают назначение и принципов процедуры медицинского изделия.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение к Руководству пользователя медицинского изделия «Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay для выявления генетических мутаций, ассоциированных с раком легкого и раком прямой кишки методом секвенирования нового поколения» для Российской Федерации

СОСТАВ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay для выявления генетических мутаций, ассоциированных с раком легкого и раком прямой кишки методом секвенирования нового поколения, в составе:

I. Коробка 1: реагенты для ГС-ПЦР:

1) Мастер-микс для геноспецифической ПЦР (Gene-Specific Master Mix) - 1 пробирка (с красной крышкой).
2) Пул праймеров LC Oligo Pool - 1 пробирка (с желтой крышкой).
3) Положительный контроль (PosCtrl) - 1 пробирка (с прозрачной крышкой).
4) Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG) - 1 пробирка (с синей крышкой).

II. Коробка 2: ПЦР-реагенты для индексирования:

1) Мастер-микс для индексирования (Indexing PCR Master Mix) - 1 пробирка (с зеленой крышкой).
2) Прямые индексные праймеры (A501-A508) - 8 пробирок (с белыми крышками).
3) Обратные индексные праймеры (A701-A706) - 6 пробирок (с оранжевыми крышками).

III. Коробка 3: реагент для очистки ПЦР-продуктов:

1) Реагент для очистки продуктов ПЦР - 1 флакон.

IV. Коробка 4: крышки для пробирок с индексными праймерами:

1) Белые крышки (для праймеров A501-A508) - 24 крышки.
2) Оранжевые крышки (для праймеров A701-A706) - 18 крышек.

V. Программное обеспечение PiVAT на съемном носителе, в составе (при необходимости):

1) Программное обеспечение PiVAT
2) Руководство пользователя программного обеспечения PiVAT на бумажном носителе и/или в электронном виде.

VI. Руководство пользователя набора реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay на бумажном носителе и/или в электронном виде.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Производитель и разработчик

Pillar Biosciences, Inc.
Адрес: 9 Strathmore Road, Natick Massachusetts 01760, United States
Тел.: (508) 655-3027
Адрес эл.почты: info@pillar-biosciences.com

Уполномоченный представитель на территории Российской Федерации

ООО "Р-ГЕН ПРОИЗВОДСТВО"
Адрес: Россия, 119421, г. Москва, проспект Ленинский, д. 111, корпус 1, комната 99
Тел. +7 (495) 956-79-37
Факс +7 (495) 956-79-38
Адрес эл.почты: info@rpharm.ru

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Клиническая лабораторная диагностика.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ

Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay предназначен только для профессионального использования.

КОНКРЕТИЗАЦИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО УРОВНЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay для выявления генетических мутаций, ассоциированных с раком легкого и раком прямой кишки методом секвенирования нового поколения - это медицинское изделие для диагностики in vitro, предназначенное только для профессионального использования врачами клинической лабораторной диагностики, биологами клинической лабораторной диагностики, фельдшерами, лаборантами.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Тест ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay (O/RDx-LCCA) на основе методов секвенирования нового поколения предусмотрен для выявления соматических вариантов (мутаций) в образцах ДНК, выделенных из фиксированных в формалине и залитых в парафин образцов тканей (FFPE) рака легких (NSCLC) и колоректального рака (CRC). Этот тест предназначен для выявления пациентов с раком легких или колоректальным раком, которые могут получить лечение таргетными препаратами для назначения которых требуется определение статуса указанных в таблице 1 мутаций в соответствии с инструкцией по применению таких препаратов, назначаемых в соответствии с клиническими рекомендациями для лечения соответствующих онкологических заболеваний, а также, в случае идентификации вариантов, не указанных в таблице 1, для выбора и назначения терапии врачом соответствующей квалификации в согласии с клиническими рекомендациями для лечения соответствующих онкологических заболеваний. Набор может применяться для секвенирования на генетическом секвенаторе MiSeqDx компании Иллюмина (Illumina). Используется для диагностики in vitro.

Таблица 1 Список соматических вариантов, для которых требуется определение статуса мутаций при назначении таргетной терапии в соответствии с клиническими рекомендациями

Тип онкологии	Ген	Вариант	Клинические рекомендации
Колоректальный рак (CRC)	KRAS	KRAS дикого типа (отсутствие мутаций в кодонах 12 и 13)	Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/396_1 Рак прямой кишки https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/554
Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC/HMPЛ)	EGFR	Делеции внутри рамки считывания в 19 экзоне	Злокачественное новообразование бронхов и легкого https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/30_3

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

		Мутации замены нуклеотидов L858R в 21 экзоне	

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Противопоказаний к использованию медицинского изделия для диагностики in vitro не выявлено.

ОЖИДАЕМЫЕ И ПРОГНОЗИРУЕМЫЕ ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ, СВЯЗАННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ПО НАЗНАЧЕНИЮ

Побочных эффектов при использовании медицинского изделия для диагностики in vitro не выявлено.

РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Результаты процесса управления рисками показывают, что общий остаточный риск продукта является приемлемым, приняты соответствующие меры для получения производственной и постпроизводственной информации, и что с точки зрения управления рисками продукт готов к коммерческому выпуску.

ПРИНЦИП КАЛИБРОВКИ

Данное медицинское изделие для диагностики in vitro не требует калибровки.

ТИП АНАЛИЗИРУЕМОГО ОБРАЗЦ

Образцы ДНК, выделенные из фиксированных формалином, залитых в парафин образцов тканей (FFPE) немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и колоректального рака (CRC).

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Таблица 1 Необходимые материалы, которые не входят в набор

Материал	Производитель/Номер регистрационного удостоверения
Реагенты для выделения и очистки ДНК	Любой поставщик лабораторных материалов, например: 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, РУ № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018
Набор реагентов MiSeqDx® v3 (600 циклов)	«Иллюмина, Инк.» (Illumina, Inc.), США номер по каталогу 20012552 Набор реагентов ИВД MiSeq™ Dx v3 (MiSeq™ Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот, РУ № РЗН 2020/13097 от 30.12.2020
Этанол, абсолютный (200 proof) для молекулярной биологии	Любой производитель лабораторных материалов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Материал	Производитель/Номер регистрационного удостоверения
Вода очищенная, не содержащая нуклеаз	Любой производитель лабораторных материалов
Р-р Трис-HCl 10 ммоль/л с 0,1 % Твин-20, pH 8,5	Любой производитель лабораторных материалов
10 н. раствор NaOH или 1 н. раствор NaOH	Любой производитель лабораторных материалов
Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл	Любой производитель лабораторных материалов, например: Микроцентрифужные пробирки 1,5 мл: Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro: 5. Пробирки микроцентрифужные объемом от 0,2 мл до 2,0 мл, с крышками и без крышек, стерильные и нестерильные, градуированные и неградуированные, упакованные в пакеты и герметичные коробки, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
96-луночные ПЦР-планшеты, 0,2 мл	Любой производитель лабораторных материалов, например: 96-луночные ПЦР-планшеты, 0,2 мл: Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro: 12. Планшеты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики) на 6, 12, 24, 32, 48, 96 и 384 лунки, с объемом лунки от 1,0 мкл до 2,2 мл, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Пленка для запечатывания микропланшетов	Любой производитель лабораторных материалов, например: Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro: 14. Пленки адгезивные для заклеивания ПЦР-планшетов, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Конические пробирки объемом 15 мл	Любой производитель лабораторных материалов, например: Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro 8. Пробирки для хранения и транспортировки проб и образцов, завинчивающиеся, конические и с основанием, с крышками и без крышек, объемом от 0,5 мл до 50 мл, упакованные в пакеты и штативы. РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Конические пробирки объемом 50 мл	Любой производитель лабораторных материалов, например: Посуда из

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Материал	Производитель/Номер регистрационного удостоверения
	полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro 8. Пробирки для хранения и транспортировки проб и образцов, завинчивающиеся, конические и с основанием, с крышками и без крышек, объемом от 0,5 мл до 50 мл, упакованные в пакеты и штативы. РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Наконечники для микродозатора с фильтром (с защитой против аэрозольных контаминаций)	Любой производитель лабораторных материалов, например: Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. 2. Наконечники универсальные с фильтром, для лабораторных дозаторов, объемом от 0,1 мкл до 10 мл, стерильные и нестерильные, упакованные в пакеты и штативы. РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017
Емкость для раствора (лоток или кювета)	Любой производитель лабораторных материалов, например: Емкость для раствора (лоток или кювета): Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro Резервуары для реагентов (вид 108740), РУ № ФСЗ 2009/05024 от 10.09.09

Таблица 2 Необходимое оборудование и программное обеспечение, которые не входят в набор

Оборудование	Поставщик/каталожный номер
Прибор MiSeqDx†	«Иллюмина, Инк.» (Illumina, Inc.), США номер по каталогу DX-410-1001 Генетический секвенатор MiSeq в вариантах исполнения: MiSeq, MiSeqDx, РУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014
Сервер для установки ПО PiVAT	Сервер любого производителя, соответствующий следующими минимальным характеристикам: • Intel Xeon E3 v5, или эквивалентный • 6 ядер • 32 Гб RAM • 150 Гб на жестком диске
Спектрофотометр или флуориметр, обеспечивающий измерение конценрации ДНК	Прибор любого производителя, соответствующий следующим минимальным характеристикам: Объем образца – не более 4 мкл
Вортекс	Любой производитель лабораторного оборудования, например: Вортекс

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

	персональный V-1 plus, РУ № ФЗС 2011/09797 от 25.05.2011 г.
Магнитный штатив для 96-луночных планшетов	Life Technologies Limited, Великобритания или Beckman Coulter, Inc., США
Микроцентрифуга	Любой производитель лабораторного оборудования, например: Лабораторные центрифуги MiniSpin, вариант исполнения: MiniSpin. II. Принадлежности: Ротор F-45-12-11, РУ № ФСЗ 2012/13316 от 05.12.2012 г.
Термоциклер† с нагревающейся крышкой	Любой производитель лабораторного оборудования, например: Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнение: С 1000, РУ № ФЗС 2008/03399 от 21.06.2016 г.
Одноканальные и многоканальные микродозаторы†, емкостью от 0,5 до 1000 мкл	Любой производитель лабораторного оборудования, например: Одно- и многоканальные дозаторы † от 0,5 до 1000 мкл: Дозаторы пипеточные переменного объема Eppendorf Research® Plus, вариант исполнения: 1. Дозаторы механические переменного объема одноканальные, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011 г.
Центрифуга для ПЦР-планшетов	Любой производитель лабораторного оборудования, например: Центрифуга адаптированная для планшетов ПЦР: Центрифуги лабораторные многофункциональные серии 58 в вариантах исполнения: 5804, 5804 R, 5810, 5810 R, с принадлежностями, РУ № РЗН 2013/757 от 21.06.2013

† Оборудование должно обслуживаться и/или калиброваться в соответствии с инструкциями производителя.

ИНФОРМАЦИЯ О МАТЕРИАЛАХ ДЛЯ ВЗЯТИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ ОБРАЗЦА ИЛИ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАТЕРИАЛОВ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ДЛЯ ЭТИХ ЦЕЛЕЙ.

Материалы не поставляются.

ИНФОРМАЦИЯ О НАЛИЧИИ В МЕДИЦИНСКОМ ИЗДЕЛИИ МАТЕРИАЛОВ ЖИВОТНОГО И (ИЛИ) ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Не применимо. Набор не содержит материалов человеческого или животного происхождения.

ПЕРЕЧЕНЬ И ОПИСАНИЕ МАТЕРИАЛОВ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO, ВСТУПАЮЩИХ В КОНТАКТ С ТЕЛОМ ПАЦИЕНТА (ТЕЛОМ ЧЕЛОВЕКА)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Не применимо. Медицинское изделие не контактирует ни прямо, ни косвенно с телом пациента (телом человека). При проведении анализа персонал работает в защитной одежде, защитных перчатках и маске.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ РЕФЕРЕНТНЫЙ ИНТЕРВАЛ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Не применимо.

ИНФОРМАЦИЯ О ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ КОНЕЧНОГО ПРОДУКТА, ВКЛЮЧАЯ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ

Не применимо. Не содержит фармацевтических субстанций.

МЕТОД ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Не применимо: не стерильно. Не подлежит стерилизации.

ИНФОРМАЦИЯ О РАНЕЕ ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ ВЕРСИЯХ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Другие версии ранее не были зарегистрированы в России.

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay для выявления генетических мутаций, ассоциированных с раком легкого и раком прямой кишки методом секвенирования нового поколения составляет 13 месяцев.

УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Температура эксплуатации: 18-25 ° С.
Относительная влажность (RH): от 20 до 80% RH без конденсации
Давление: 101,5 - 71 кПа

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ

ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay можно транспортировать любым видом транспорта в сухом льду.
Материалы и упаковка обеспечивают возможность использования теста ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay после транспортировки и хранения в соответствии с рекомендациями, содержащимися в инструкции по применению.
При рекомендуемых условиях хранения набор стабилен в течение всего срока годности, указанного на упаковке (Использовать до).
Относительная влажность (RH): от 20 до 80% RH без конденсации
Давление: 101,5 - 71 кПа

МАРКИРОВКА. СИМВОЛЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Список обозначений, используемых на маркировке:

Символ	***Значение***

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

REF	Номер по каталогу
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Изготовитель
LOT	Код партии
	Осторожно!
CE	Знак соответствия основным требованиям директив и стандартов Европейского союза
	Использовать до
	Предел температуры
Σ	Содержимого достаточно для проведения n тестов
CONTROL +	Контроль с положительным результатом
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
	Не допускать воздействия солнечного света
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Беречь от влаги

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Наименование характеристики	Спецификация
Тип Образца	FFPE
Аналит	ДНК
Диапазон ввода ДНК	≥10 нг
Биомаркеры, имеющие значение для выбора таргетной терапии согласно	NSCLC - EGFR Exon 19 Del NSCLC - EGFR L858R CRC - KRAS G12X CRC - KRAS G13X

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

клиническим рекомендациям	
Варианты соматических мутаций, для которых подтверждены только аналитические характеристики	EGFR-T790M.(NSCLC) EGFR-G719A.(NSCLC) EGFR-G719C.(NSCLC) EGFR-G719D.(NSCLC) EGFR-G719S.(NSCLC) EGFR-Инсерции внутри рамки считывания в 20 экзоне (NSCLC) BRAF-V600E.(NSCLC) KRAS-Мутации в 2 экзоне (NSCLC)KRAS-A59E.(CRC) KRAS-A59G.(CRC) KRAS-A59T.(CRC) KRAS-A59S.(CRC) KRAS-Q61E.(CRC) KRAS-Q61H.(CRC) KRAS-Q61K.(CRC) KRAS-Q61L.(CRC) KRAS-Q61R.(CRC) KRAS-K117N.(CRC) KRAS-A146T.(CRC) KRAS-A146P.(CRC) KRAS-A146V.(CRC) BRAF-V600E.(CRC)
Все анализируемые гены	AKT1 ALK BRAF CTNNB1 DDR2 EGFR ERBB2 ERBB4 FBXW7 FGFR1 FGFR2 FGFR3 KRAS MAP2K1 MET NOTCH1 NRAS PIK3CA PTEN SMAD4 STK11 TP53
Тип обнаруживаемых генетических вариантов	SNVs и InDels
Уровень мультиплексирования за прогон	<=48 проиндексированных библиотек
Чувствительность PPA	99.4%
Специфичность NPA	100%
Коэффициент недействительных результатов	1%
Предел обнаружения мутантных аллелей	5%
Отсутствие мутаций в отрицательном контрольном образце (NTC)	Глубина покрытия для всех целевых регионов ниже порога покрытия
Положительный контрольный образец (PosCtrl)	Глубина покрытия для всех целевых регионов выше порога покрытия

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Срок годности набора для анализа	13 месяцев

ОПИСАНИЕ КОМПОНЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Компонент	Количество, объем, размеры	Характеристики
I. Коробка 1: реагенты для ГС-ПЦР		
Мастер-микс для геноспецифической ПЦР (Gene-Specific Master Mix) - 1 пробирка (с красной крышкой).	**Количество:** 1 пробирка **Объем реагента**: 730 мкл ± 10 % **Масса**: 2 г ± 10 % **Пробирка:** Высота: 4,5 см ± 10 % Диаметр:1 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 0,6 см ± 10 % Диаметр: 1,2 см ± 10 %	**Назначение:** смесь реагентов для проведения ген-специфической ПЦР. **Внешний вид:** Прозрачная бесцветная жидкость **Запах:** без запаха
Пул праймеров LC Oligo Pool - 1 пробирка (с желтой крышкой)	**Количество:** 1 пробирка **Объем реагента**: 290 мкл **Масса**: 2 г ± 10 % **Пробирка:** Высота: 4,5 см ± 10 % Диаметр:1 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 0,6 см ± 10 % Диаметр: 1,2 см ± 10 %	**Назначение:** праймеры для проведения ген-специфической ПЦР **Внешний вид:** Прозрачная бесцветная жидкость **Запах:** Слабый чесночный запах
Положительный контроль (PosCtrl) - 1 пробирка (с прозрачной крышкой)	**Количество:** 1 пробирка **Объем реагента**: 33 мкл ± 10 % **Масса**: 2 г ± 10 % **Пробирка:** Высота: 4,5 см ± 10 % Диаметр:1 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 0,6 см ± 10 % Диаметр: 1,2 см ± 10 %	**Назначение:** положительный контрольный образец (PosCtrl) **Внешний вид:** Прозрачная бесцветная жидкость **Запах:** без запаха
Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG) - 1 пробирка (с синей крышкой)	**Количество:** 1 пробирка **Объемреагента**: 58 мкл ± 10 % **Масса**:2 г ± 10 % **Пробирка:** Высота: 4,5 см ± 10 % Диаметр:1 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 0,6 см ± 10 % Диаметр: 1,2 см ± 10 %	**Назначение:** фермент, необходимый для проведения ген-специфической ПЦР. **Внешний вид:** Прозрачная бесцветная жидкость **Запах:** без запаха
II. Коробка 2: ПЦР-реагенты для индексирования		
Мастер-микс для индексирования (Indexing PCR Master Mix) - 1	**Количество:** 1 пробирка **Объем реагента**: 1460 мкл ± 10 % **Масса**: 2,2 г ± 10 %	**Назначение:** смесь реагентов для проведения ПЦР, обеспечивающая индексирование библиотек ДНК

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

пробирка (с зеленой крышкой)	**Пробирка:** Высота: 4,5 см ± 10 % Диаметр:1 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 0,6 см ± 10 % Диаметр: 1,2 см ± 10 %	**Внешний вид:** Прозрачная бесцветная жидкость **Запах:** без запаха
Прямые индексные праймеры (A501-A508) - 8 пробирок (с белыми крышками)	**Количество:** 8 пробирок **Объем реагента**: 33 мкл ± 10 % **Масса**: 1г ± 10 % **Пробирка:** Высота: 3,5 см ± 10 % Диаметр: 0,8 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 0,6 см ± 10 % Диаметр: 0,9 см ± 10 %	**Назначение:** праймеры для индексирования библиотек ДНК **Внешний вид:** Прозрачная бесцветная жидкость **Запах:** без запаха
Обратные индексные праймеры (A701-A706) - 6 пробирок (с оранжевыми крышками).	**Количество:** 6 пробирок **Объем реагента**: 44 мкл **Масса**:1 г ± 10 % **Пробирка:** Высота: 3,5 см ± 10 % Диаметр: 0,8 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 0,6 см ± 10 % Диаметр: 0,9 см ± 10 %	**Назначение:** праймеры для индексирования библиотек ДНК **Внешний вид:** Прозрачная бесцветная жидкость **Запах:** без запаха
III. Коробка 3: реагент для очистки ПЦР-продуктов		
Реагент для очистки продуктов ПЦР - 1 флакон.	**Количество:** 1 флакон **Объемреагента**: 6900 ± 10 % **Масса**: 8 г ± 10 % **Пробирка:** Высота: 4,3 см ± 10 % Диаметр: 2,0 см ± 10 % **Крышка:** Высота: 2,4 см ± 10 % Диаметр: 1,4 см ± 10 %	**Назначение:** реагент применяется для этапа очистки продуктов ПЦР от компонентов ПЦР смеси, таких как ферменты, основания ДНК, соли **Внешний вид:** Прозрачная жидкость с коричневым осадком. **Запах:** без запаха
Коробка 4: крышки для пробирок с индексными праймерами		
Белые крышки (для праймеров A501-A508) - 24 крышки	**Количество:** 24 крышки **Масса**:0,379 г ± 10 % Высота: 1,4 см ± 10 % Диаметр: 0,8 см ± 10 %	**Назначение:** крышки для закрывания пробирок **Описание:** белые крышки **Запах:** н/п
Оранжевые крышки (для праймеров A701-A706) - 18 крышек	**Количество:** 18 крышек **Масса**: 0,379 г ± 10 % Высота: 1,4 мм ± 10 % Диаметр: 0,8 см ± 10 %	**Назначение:** крышки для закрывания пробирок **Описание:** оранжевые крышки **Запах:** н/п
Программное обеспечение PiVAT на съемном носителе		
Программное обеспечение PiVAT*	**Количество:** 1 твердотельный накопитель Толщина: 0,7 см ± 10 %	**Назначение:** Программное обеспечение PiVAT предназначено для анализа генов,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

	Длина: 10 см ± 10 % Ширина: 7 см ± 10 %	ассоциированных с раком легкого и толстой кишки, методом ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay. PiVAT выполняет вторичный анализ и создает отчет по данным запусков секвенирования для анализа соотвтествующих генов. **Описание:** Программное обеспечение PiVAT на съемном носителе **Запах:** н/п

*Массогабаритные характеристики могут отличаться в зависимости от производителя твердотельного накопителя.

ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ И МЕЖДУНАРОДНЫХ ПРАВИЛ/СТАНДАРТОВ, КОТОРЫМ СООТВЕТСТВУЕТ МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

Применимые стандарты	***Название***
ISO 13485:2016/EN ISO 13485:2016	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования к регулированию
EN ISO 14971:2012	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
EN ISO 23640:2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
EN ISO 18113-1:2011	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования
EN ISO 18113-2:2009	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
EN ISO 15223-1:2016	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
EN 13612:2002	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
EN 13975:2003	Методики выборочного контроля для приемочных испытаний медицинских изделий для диагностики in vitro. Статистические аспекты
EN 62366-1:2015	Изделия медицинские. Часть 1. Проектирование медицинских изделий с учетом эксплуатационной пригодности
EN 62366--2:2015	Изделия медицинские. Часть 2. Руководство по применению проектирования с учетом эксплуатационной пригодности к медицинским изделиям
IEC 62304/A1:2006	Программное обеспечение для медицинских изделий - процессы жизненного цикла программного обеспечения
SFS 1993:584	Шведский закон о медицинских изделиях для диагностики in vitro

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

LVFS 2001:7	Шведский закон о медицинских изделиях для диагностики in vitro

Регулирование: Директива IVD 98/79 / EC - Медицинские средства и оборудование для лабораторной диагностики in vitro

РЕКЛАМАЦИЯ

Для получения технической консультации и поддержки просьба обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории Российской Федерации:
ООО "Р-ГЕН ПРОИЗВОДСТВО"
Россия, 119421, г. Москва, проспект Ленинский, д. 111, корпус 1, комната 99
Тел.: +7 (495) 956-79-37
Факс: +7 (495) 956-79-38
E-mail: info@rpharm.ru
При возникновении побочных эффектов, не указанных в инструкции по применению или руководстве пользователя медицинского изделия, нежелательных реакциях при его использовании, особенностях взаимодействия медицинских изделий между собой, фактах и обстоятельствах, представляющих угрозу для жизни и здоровья людей. здоровья граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации изделий медицинского назначения необходимо отправить сообщение, содержащее указанную информацию, в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения в соответствии с действующим законодательством.

ЗАЩИТА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Во время работы и хранения медицинское изделие Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay не оказывает отрицательного влияния на пациента, медицинских работников и на окружающую среду при соблюдении правил, описанных в Руководстве по эксплуатации.

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

Утилизируйте использованные и неиспользованные реагенты и любые другие загрязненные одноразовые материалы в соответствии с правилами утилизации инфицированных или потенциально инфекционных продуктов.
Персонал лаборатории несет ответственность за обработку и удаление образующихся отходов и сточных вод в соответствии с их типом и степенью опасности в соответствии со всеми применимыми нормами и правилами.
Уничтожение продукции осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными действующими федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ТРЕБОВАНИЯ К РЕМОНТУ И ТЕХНИЧЕСКОМУ ОБСЛУЖИВАНИЮ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Не применимо.

РАЗРАБОТКА, ВЕРИФИКАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Выполняются следующие тесты:

Категория	**Уровень Определения проекта**	**Метод тестирования**	**Деятельность**
Проверка кода	Код	Рассмотрение	Обзор программного кода
Проверка компонентов	Спецификация разработки программного обеспечения	Модульное тестирование	Проверка программного модуля
	SOUP Список	Обзор и тестирование	Проверка SOUP
Проверка интеграции	Программная архитектура и требования к программному обеспечению	Тест	Автоматическая функциональная проверка программного обеспечения
	Спецификация разработки программного обеспечения	Тест	Проверка программного модуля
	Архитектура устройства и требования к продукту	Обзор и тестирование	Проверка набора реагентов. Не требуется для этого выпуска.
Проверка системы	Требования к программному обеспечению	Тест	Проверка требований к программному обеспечению
	Требования к программному обеспечению (показатели контроля качества и варианты отсечения)	Тест	Проверка требований к программному обеспечению
	Проверка новых функций программного обеспечения	Тест	Проверка требований к программному обеспечению
	Требования к продукту	Обзор и инспектирование	Обзор маркировки

Все тесты пройдены успешно.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

НАУЧНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АНАЛИТА

Колоректальный рак

Колоректальный рак (CRC) представляет собой серьезную проблему для здоровья, поскольку это самый распространенный рак желудочно-кишечного тракта во всем мире, ежегодно диагностируемый у более 1,2 миллиона человек[1]. Это третий по частоте диагноз рака как у мужчин, так и у женщин[2]. Ежегодно в западном мире у более 520 000 человек впервые диагностируется колоректальный рак[1]. Из всех диагностированных 35–50% умрут от колоректального рака, что делает его второй ведущей причиной смерти от рака, поражающей оба пола[1–3]. Лечебные подходы ограничены у значительной части пациентов, так как почти у 25% пациентов будет метастатическое заболевание, а у 40–50% тех, у кого изначально диагностирована ранняя стадия заболевания, в конечном итоге разовьется метастатическое заболевание[2,4].

Американский объединенный комитет по раку (AJCC) сообщает, что общая 5-летняя выживаемость при колоректальном раке составляет 65,2% [5]. Ранняя стадия заболевания имеет более благоприятный прогноз, и пациенты часто излечиваются только хирургической резекцией. К сожалению, большинство пациентов с запущенным или метастатическим заболеванием не подходят для резекции, и лечение является частью паллиативного, а не лечебного подхода. В таких условиях цели лечения заключаются в замедлении прогрессирования заболевания, продлении жизни и поддержании качества жизни.

Первая линия лечения

Хирургия, химиотерапия и лучевая терапия по-прежнему являются лечением первой линии при первичных опухолях, но в значительной степени зависят от стадии заболевания - адъювантная терапия обычно рекомендуется только при заболевании, прошедшем стадию II. Количество и способы действия химиотерапевтических препаратов неуклонно увеличивались на протяжении многих лет, и теперь в терапии первой линии используется фторпиримидин (внутривенный 5-ФУ или пероральный капецитабин) в сочетании с оксалиплатином или иринотеканом по различным схемам[12,13].

Генетическая вариация

Считается, что за онкогенез ответственны множественные критические гены и пути, кодирующие белок. Колоректальные опухоли содержат в среднем 76 мутаций, в среднем 15 из которых затрагивают гены-кандидаты[7,8]. Более глубокое понимание генетических и геномных изменений CRC помогло направить терапию и предсказать ответ, как показано для пациентов с мутациями KRAS и BRAF[9,10]. Генетические и эпигенетические ошибки в путях передачи сигналов приводят к злокачественным трансформациям и, таким образом, становятся ключевыми кандидатами для молекулярно-направленной терапии[11].

Лечение рака прямой кишки

Существует восемь одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) таргетных методов лечения метастатического CRC: крупномолекулярные моноклональные антитела (mAb) (бевацизумаб, цетуксимаб, ниволумаб, панитумумаб и рамуцирумаб), рекомбинантный фьюжн белок (зив-афлиберцепт), а также низкомолекулярный ингибитор (регорафениб) и аналоги нуклеозидов (трифлуридин / типирацил) [31-35]. Из них бевацизумаб, рамуцирумаб и зив-афлиберцепт нацелены на неоангиогенез за счет ингибирования фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Несмотря на то, что резистентность к ингибиторам VEGF известна, на сегодняшний день клинически значимых биомаркеров не установлено.

Лекарства цетуксимаб и панитумумаб нацелены на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), клеточный поверхностный рецептор эпидермального фактора роста, молекула,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

которая помогает раковым клеткам расти. В ходе клинических испытаний было установлено, что опухоли CRC, которые имеют мутации в экзонах 2, 3 и 4 генов KRAS и NRAS и экзоне 15 гена BRAF, плохо реагируют на ингибиторы EGFR[31,32]. Поскольку мутации в генах KRAS и NRAS встречаются у 56% пациентов с метастатическим CRC[36], опухоли обычно проверяются на наличие этих мутаций перед лечением.
Мутации BRAF V600E обнаруживаются в 5–15% метастатических CRC и тесно связаны с RAS дикого типа и с микросателлитными нестабильными (MSI) опухолями[6]. BRAF мутантные опухоли, ассоциированные с MSI, являются результатом высокого уровня гиперметилирования CpG-островков [фенотип гиперметилирования CpG-островков] [44]. Этот CIMP + фенотип объясняет почти все случаи метастатического CRC мутанта BRAF V600E. Тестирование на мутацию BRAF V600E рекомендуется из-за ее прогностической и потенциально предсказательной роли[45].

Выводы CRC

Стандарт лечения и прогноз для пациентов с CRC резко изменились за последние несколько лет, поскольку стали доступны новые таргетные методы лечения. Кроме того, понимание опухолевых мутаций и их вклада в терапевтическую эффективность расширяется. Выбор лечения часто бывает сложным, особенно в случае вторичной терапии, и использование профилирования опухолей для помощи при выборе терапии является обычным делом.
Для пациентов с опухолями, имеющими немутантный KRAS / NRAS, лечение цетуксимабом и панитумумабом, нацеленным на EGFR, в сочетании с химиотерапией увеличивало ожидаемую продолжительность жизни на несколько месяцев по сравнению с одной химиотерапией.
Таргетная терапия меняет парадигмы лечения и увеличивает выживаемость пациентов с метастатическим CRC на более поздних стадиях, группы, у которой традиционно был очень плохой прогноз.

Немелкоклеточный рак легкого

Лечение первой линии

Хирургия, химиотерапия и лучевая терапия по-прежнему остаются первыми методами лечения первичных опухолей немелкоклеточного рака легких (NSCLC - НМРЛ). Химиотерапия включает различные соединения платины (например, цисплатин и карбоплатин), ингибиторы топоизомеразы и полимеразы (например, иринотекан, этопозид и гемцитабин) и ингибиторы полимеризации микротрубочек (например, паклитаксел, доцетаксел, винорелбин, винбластин). В некоторых случаях для лечения запущенного заболевания назначают таргетную терапию, такую как ингибиторы антиангиогенеза (например, бевацизумаб и рамуцирумаб) и ингибиторы иммунных контрольных точек (например, ниволумаб и атезолизумаб).

Терапия первой линии с ингибиторами тирозинкиназы (TKI)

Ингибиторы тирозинкиназы (TKI), которые ингибируют EGFR, в настоящее время являются стандартом лечения первой линии у пациентов с метастатическим неплоскоклеточным немелкоклеточным раком легких (NSCLC - НМРЛ), опухоли которых несут мутацию EGFR. Рандомизированные испытания показали, что пациенты демонстрируют более высокую частоту общего ответа (ЧОО) и выживаемость без прогрессирования (ВБП) при лечении TKI EGFR по сравнению с химиотерапией для терапии первой линии. TKI в клинической практике включают эрлотиниб[47,48], гефитиниб[49-52], афатиниб[53-55], осмертиниб и дакомитиниб.
Эрлотиниб и гефитиниб относятся к ИКИ первого поколения, а афатиниб - к ИИ второго поколения. TKI второго поколения блокируют большее количество лигандов семейства HER и являются неконкурентными ингибиторами на сайте киназы, что обеспечивает более

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

длительный период устойчивости[56]. Также важно учитывать подтип мутации EGFR. В отличие от химиотерапии, TKI продолжают прогрессировать до тех пор, пока есть клиническая польза для пациента.

Лечение немелкоклеточного рака легких (NSCLC - НМРЛ) с мутацией EGFR

Известно, что различные делеции в рамке считывания в экзоне 19 EGFR и мутации L858R в экзоне 21 EGFR, как внутри киназного домена, так и в более чем 40% опухолей NSCLC, несущих мутацию EGFR. TKI, эффективные как для мутированного, так и для немутантного EGFR, включают ингибиторы первого поколения (гефитиниб (Iressa), эрлотиниб (Tarceva) и икотиниб (доступны только в Китае) и ингибиторы второго поколения (фатиниб (гилотриф), дакомитиниб) и нератиниб). TKI третьего поколения являются мутант-селективными и включают бригатиниб, осимертиниб и рокилетиниб. Понимание статуса мутации EGFR в опухолях NSCLC имеет решающее значение для выбора терапевтического режима, который, скорее всего, обеспечит хороший терапевтический результат для пациента.

Повторное тестирование мутаций EGFR при прогрессировании

Приобретенная мутация в экзоне 20 EGFR, T790M, которая приводит к лекарственной устойчивости, может быть обнаружена почти у 60% пациентов, прогрессирующих на TKI57. Теперь рекомендуется повторное тестирование на мутации. Биопсия по-прежнему считается золотым стандартом для молекулярного тестирования T790M.

Вторая линия терапии

Для пациентов с T790M-положительным заболеванием TKI EGFR третьего поколения продемонстрировали RR более 60% и пролонгированную ВБП, что привело к одобрению осимертиниба (AZD9291) в нескольких странах[58].

Для пациентов без T790M терапия второй линии представляет собой дуплет химиотерапии. У пациентов без мутации T790M, у которых наблюдается прогресс при химиотерапии, есть несколько других вариантов, и они могут рассмотреть возможность клинического исследования.

Выводы NSLC

Схемы лечения немелкоклеточного рака легких (NSCLC - НМРЛ) резко изменились за последние несколько лет. Исследователи продолжают выяснять многие молекулярные пути, участвующие в злокачественных новообразованиях грудной клетки. Выбор лечения сложен, и в настоящее время разрабатывается множество новых целевых методов лечения. Понимание опухолевых мутаций и их вклада в терапевтическую эффективность расширяется.

Для пациентов с опухолями, управляемыми EGFR, лечение осимертинибом, ингибитором третьего поколения, может привести к увеличению выживаемости пациентов, опухоли которых приобрели мутации EGFR в киназном домене.

Таргетная терапия меняет парадигмы лечения и увеличивает выживаемость пациентов с немелкоклеточным раком легких (NSCLC - НМРЛ), группы, у которой раньше был очень плохой прогноз. Окончательный победитель - это пациент.

ССЫЛКИ

1. Ferlay J., Shin H., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 127: 2893–2917
2. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (2012) Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 62: 10–29.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3. US Cancer Statistics Working Group. (2009) United States Cancer Statistics: 1999–2005 Incidence and Mortality Web-based Report. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention & National Cancer Institute; Atlanta, Georgia.
4. Ferlay J., Autier P., Boniol M., Heanue M., Colombet M., Boyle P. (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol 18: 581–592.
5. O'Connell J., Maggard M., Ko C. (2004) Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst 96: 1420– 1425.
6. Goldberg R., Sargent D., Morton R., Fuchs C., Ramanathan R., Williamson S., et al. (2004) A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 22: 23–30.
7. Meyerhardt J., Mayer R. (2005) Systemic therapy for colorectal cancer. N Engl J Med 352: 476–487.
8. Tournigand C., André T., Achille E., Lledo G., Flesh M., Mery-Mignard D., et al. (2004) FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. J Clin Oncol 22: 229–237.
9. Erlichman C., Carlson R., Valone F., Labianca R., Park R., Hospital M., et al. (1992) Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. J Clin Oncol 10: 896–903.
10. Piedbois P. (1998) Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal
11. Fuchs C., Marshall J., Barrueco J. (2008) Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. J Clin Oncol 26: 689–690.
12. Tabernero J., Van Cutsem E., Diaz-Rubio E., Cervantes A., Humblet Y., Andre T., et al. (2007) Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 25: 5225–5232.
13. Van-Cutsem E., Lang I., D'haens G., Moiseyenko V., Zaluski J., Folprecht G., et al. (2008) KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: the CRYSTAL experience. J Clin Oncol 26: abstr 2.
14. Simon R. (2008) The use of genomics in clinical trial design. Clin Cancer Res 14: 5984–5993.
15. Stuart D., Sellers W. (2009) Linking somatic genetic alterations in cancer to therapeutics. Curr Opin Cell Biol 21: 304–310.
16. Schrag D. (2004). The price tag on progress – chemotherapy for colorectal cancer. N Engl J Med 351: 317–319.
17. Strimpakos A., Syrigos K., Saif M. (2009) Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal cancer. Pharmacogenomics J 9: 147–160.
18. Workman P., Aboagye E., Chung Y., Griffiths J., Hart R., Leach M., et al. (2006) Minimally invasive pharmacokinetic and pharmacodynamic technologies in hypothesis-testing clinical trials of innovative therapies. J Natl Cancer Inst 98:580–598.
19. Cancer T., Atlas G. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 487: 330–337.
20. Vecchione L., Jacobs B., Normanno N., Ciardiello F., Tejpar S. (2011) EGFR-targeted therapy. Exp Cell Res 317: 2765–2771.
21. Wood L., Parsons D., Jones S., Lin J., Sjöblom T., Leary R., et al. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science 318: 1108–1113.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

22. Sclafani F., Gullo G., Sheahan K., Crown J. (2013) BRAF mutations in melanoma and colorectal cancer: a single oncogenic mutation with different tumour phenotypes and clinical implications. Crit Rev Oncol Hematol 87: 55–68.
23. Vaughn C., Zobell S., Furtado L., Baker C., Samowitz W. (2011) Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer 50: 307–312.
24. Tan D., Thomas G., Garrett M., Banerji U., de Bono J., Kaye S., et al. (2009) Biomarker-driven early clinical trials in oncology. Cancer J 15: 406–420.
25. Grothey A., Van Cutsem E., Sobrero A., Siena S., Falcone A., Ychou M., et al. (2013) Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase III trial. Lancet 381: 303–312.
26. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., et al. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 350: 2335–2342.
27. Van-Cutsem E., Nordlinger B., Cervantes A. (2010) Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. Ann Oncol 21: v93–v97.
28. Van-Cutsem E., Peeters M., Siena S., Humblet Y., Hendlisz A., Neyns B., et al. (2010b) Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 25: 1658–1664.
29. Van-Cutsem E., Tabernero J., Lakomy R., Prenen H., Prausová J., Macarulla T., et al. (2012) Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. J Clin Oncol 30: 3499–3506.
30. Peeters M, Kafatos G, Taylor A, et al. Prevalence of RAS mutations and individual variation patterns among patients with metastatic colorectal cancer: A pooled analysis of randomised controlled trials. Eur J Cancer 2015;51:1704-13.
31. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. Ann Oncol 2015;26:13-21.
32. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Acta Oncol 2014;53:852-64.
33. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. Eur J Cancer 2005;41:1649-54.
34. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. Brevia: high frequency of mutations of the PIK3Ca gene in human cancers. Science 2004;304:554.
35. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy- refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. Lancet Oncol 2010;11:753-62.
36. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer Res 2009;69:1851-7.
37. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 2012;487:330-7.
38. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. Nat Genet 2006;38:787-93.
39. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, et al. Esmo consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. Ann Oncol 2012;23:2479-516.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

40. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med (2002) 346(2):92–
41. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2012) 13(3):239–46.
42. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol (2011) 12(8):735–42.
43. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N Engl J Med (2010) 362(25):2380–8.
44. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol (2010) 11(2):121–8.
45. Mok TSWY, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med (2009) 361(10):947–57.
46. Fukuoka M, Wu Y-L, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong S-S, Sriuranpong V, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non–small-cell lung cancer in Asia (IPASS). J Clin Oncol (2011) 29(21):2866–74.
47. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. J Clin Oncol (2013) 31(27):3327–34.
48. Yang JC, Wu YL, Schuler M, Sebastian M, Popat S, Yamamoto N, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX- Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. Lancet Oncol (2015) 16(2):141–51.
49. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol (2014) 15(2):213–22.
50. Kosaka T, Yamaki E, Mogi A, Kuwano H. Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. J Biomed Biotechnol (2011) 2011:165214.
51. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. Clin Cancer Res (2013) 19(8):2240–7.
52. Yang JC, Ramalingam SS, Janne PA, Cantarini M, Mitsudomi T. LBA2_PR – osimertinib (AZD9291) in pre-treated patients with T790M-positive advanced NSCLC: updated Phase 1 (P1) and pooled Phase 2 (P2) results. European Lung Cancer Conference; 2016 April 14; Geneva, Switzerland (2016).
53. Janku F, Garrido-Laguna I, Petruzelka LB, Stewart DJ, Kurzrock R. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol (2011) 6(9):1601–12.
54. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First- line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. N Engl J Med (2014) 371(23):2167–77.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

55. Kim D, Mehra R, Tan DS-W, Felip E, Chow LQM, Camidge DR, et al., edi- tors. Ceritinib in Advanced Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)-Rearranged (ALK+) Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Results of the ASCEND-1 Trial. Chicago: ASCO (2014).
56. Felip E, Kim D, Mehra R, Tan DSW, Chow LQ, Camidge DR, et al., editors. Efficacy and safety of ceritinib in patients (pts) with advanced anaplastic lymphoma kinase (ALK)- rearranged (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC). Ann Oncol (2014) 25(Suppl 4):iv426–70.
57. Crinò L, Ahn M-J, De Marinis F, Groen HJM, Wakelee H, Hida T, et al. Multicenter phase II study of whole-body and intracranial activity with ceri- tinib in patients with ALK- rearranged non–small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy and crizotinib: results from ASCEND-2. J Clin Oncol (2016) 34(24):2866–73.
58. Felip E, Orlov S, Park K, Yu C-J, Tsai C-M, Nishio M, et al., editors. ASCEND-3: A Single-Arm, Open-Label, Multicenter Phase II Study of Ceritinib in ALKI- Naïve Adult Patients (pts) with ALK-Rearranged (ALK+) Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Chicago, IL: ASCO (2015).
59. Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, Chiappori AA, West HL, Azada MC, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. Lancet Oncol (2014) 15(10):1119–28.
60. Ou SH, Ahn JS, De Petris L, Govindan R, Yang JC, Hughes B, et al. Alectinib in crizotinib-refractory ALK-rearranged non-small-cell lung cancer: a phase II global study. J Clin Oncol (2016) 34(7):661–8.
61. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, Riely GJ, Cetnar J, West H, et al. Alectinib in ALK- positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. Lancet Oncol (2016) 17(2):234–42.
62. Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, et al. CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non- small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. Lancet Oncol (2013) 14(7):590–8.
63. Nokihara H, Hida T, Kondo M, Kim YH, Azuma K, Seto T, et al., editors. Alectinib (ALC) versus Crizotinib (CRZ) in ALK-Inhibitor Naive ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (ALK+ NSCLC): Primary Results from the J-ALEX Study. (Abstract 9008). Chicago, IL: 2016 ASCO Annual Meeting (2016).
64. News Release FDA. FDA Approves New Oral Therapy to Treat ALK-Positive Lung Cancer. (2017). Available from: http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm476926.htm
65. Meijuan Li (2016) Statistical Methods for Clinical Validation of Follow-On Companion Diagnostic Devices via an External Concordance Study, Statistics in Biopharmaceutical Research, 8:3, 355-363.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ВАЛИДАЦИЯ

1. КЛИНИЧЕСКАЯ ВАЛИДАЦИЯ

Клинические исследования проводились с тестом O / RDx-LCCA с использованием тканей FFPE с двумя видами рака (немелкоклеточный рак легкого и колоректальный рак). Клиническая польза теста O / RDx-LCCA при обнаружении мутаций в соответствии с предполагаемым использованием была продемонстрирована в двух клинических исследованиях согласованности с использованием ранее одобренных FDA тестов в качестве методов сравнения. Все исследования, основанные на подходе статистического тестирования не меньшей эффективности (NI - non-inferiority), соответствовали критериям приемлемости, указанным в протоколе исследования. Соответствие, наблюдаемое между тестом O / RDx-LCCA и одобренными сопутствующими диагностическими тестами, подтверждает эффективность теста O / RDx-LCCA для выявления пациентов, опухоли которых

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

положительны по наличию мутаций в соответствии с предполагаемым использованием и могут реагировать на соответствующие терапевтические препараты.

Вывод

Критерии приемлемости	**Наблюдалось**	**Пройден / Не пройден**
Клинические характеристики теста O / RDx-LCC не должны быть хуже, чем у согласованного диагностического теста, одобренного FDA, с запасом не меньшей эффективности не более 10%.	NSCLC: 4% CRC: 5%	Пройден

2. Предел холостой пробы (LoB)

Предел холостой пробы (LoB), равный нулю, был определен для 72 независимых библиотек образцов, приготовленных из четырех образцов FFPE, каждый из нормальной толстой кишки и нормальной ткани легкого, с 4-6 повторами на образец, охватывающими низкий и высокий ввод ДНК, две партии реагентов и три секвенирования. Не было сделано ложноположительных наблюдений для клинически и аналитически значимых генов, и никакие образцы или библиотеки не были исключены из анализа. Было подтверждено, что каждый образец LoB был отрицательным для соматических вариантов, включенных в анализ предела обнаружения (LoD). Результаты анализа LoB представлены в таблице ниже.

Таблица - Наблюдаемые показатели LoB

Показатель	**Наблюдаемое значение**
Уровень ложноположительных результатов (FPR)	0%
Предел холостой пробы (LoB)	0

Вывод

Критерии приемки	**Наблюдалось**	**Пройден /Не пройден**
Порог вариантных результатов для секвенированных областей должен быть установлен таким образом, чтобы соответствовать уровню ложноположительных результатов ≤5% (риск ошибки типа I $\alpha \leq 0{,}05$).	Уровень ложноположительных результатов (FPR) 0,01% наблюдался во всех областях, охваченных ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay.	Пройден
Частота ложно-положительных срабатываний целевых вариантов должна быть равна нулю.	Наблюдался уровень ложных срабатываний 0%.	Пройден

3. ТОЧНОСТЬ

Соответствие ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay оценивалось по способности обнаруживать однонуклеотидные замены (SNV), короткие и средние делеции с помощью одного проверенного извне метода сравнения (Oncomine Focus Assay).

Всего было протестировано 208 образцов (84 CRC и 124 NSCLC), 6 из которых дали недействительные результаты с помощью проверенного метода сравнения NGS, а 2 - с недействительными результатами с ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay. Среди 200 действительных образцов 168 (84,0%) были идентифицированы как положительные по крайней мере для одного варианта с помощью метода сравнения. Образцы включали простые SNV, короткие и средние вставки, на которые нацелен ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Совпадение данных клинического исследования соответствия также считается демонстрацией аналитической точности.

Выводы

Критерии приемки	Наблюдалось	Пройден /Не пройден
Значения PPA и NPA для всех вариантов в заявлении о предполагаемом использовании должны быть равны или превышать 95%.	PPA = 99,4% (96,8%, 99,9%) и NPA = 100% (100%, 100%) для всех вариантов в заявлении о предполагаемом использовании.	Пройден
Точность: Частота необнаружения ≤ 5%	Частота необнаружения = Частота недействительных результатов = 1%	Пройден

4. ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Анализ перекрестной реактивности in silico проводили для оценки специфичности праймеров, используемых в анализе ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay. Праймеры проверяли на специфичность к геному человека и геномам типичных протозойных, вирусных, грибковых и бактериальных патогенов человека. Всего 177 человеческих и 259 патогенных нецелевых последовательностей с некоторым сходством с человеческим геномом были идентифицированы с использованием in-silico ПЦР и анализа BLAST. Эти последовательности были преобразованы в формат FASTQ и обработаны с помощью программного обеспечения PiVAT. Тестовые образцы не произвели считывания на целевых объектах и не выявили вариантных результатов для любой из нецелевых последовательностей, в то время как получение ожидаемых вариантных результатов для положительных контролей, включенных в анализ. Эти результаты продемонстрировали, что праймеры специфичны для намеченных целевых последовательностей.

Выводы

Критерии приемки	Наблюдалось	Пройден /Не пройден
Нецелевые области генома человека должны не давать целевых чтений.	Наблюдалось нулевое количество целевых чтений с использованием набора данных теста генома человека	Пройден
Человеческие патогены, присутствие которых можно ожидать в пробах для анализа, не должны давать целевых чтений.	Наблюдалось нулевое количество целевых чтений с использованием набора данных по тестированию генома патогенов человека	Пройден

5. ДОПУСТИМЫЕ ОТКЛОНЕНИЯ

Допуски, охватывающие этапы рабочего процесса подготовки библиотеки и секвенирования, были оценены в соответствии с наиболее критическими этапами теста, которые могут привести к сбою анализа. Каждый протестированный этап рабочего процесса включал 3 тестовых условия: низкое, номинальное, как определено инструкциями по применению, и высокое. Диапазон допустимых отклонений для каждого исследования был разработан таким образом, чтобы максимальная и минимальная контрольные точки вызывали проблемы с системой, но при этом оставались в пределах диапазона эксплуатационных ошибок.

Были подготовлены 10 образцов ДНК FFPE и проанализированы в течение 4 прогонов секвенирования для оценки этапов рабочего процесса подготовки библиотеки, таких как ввод ПЦР и смещение температуры термоциклирования. Один эталонный стандарт ДНК был подготовлен и проанализирован в течение 5 прогонов секвенирования для оценки этапов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

рабочего процесса секвенирования библиотеки, таких как концентрация библиотеки и количество библиотек за цикл. Все исследования привели к нулю отказов и 100% согласованию условий.

Выводы

Общий PPA = 100% и NPA = 100%. Результаты исследования допустимых отклонений не выявили какого-либо влияния переменных процесса на эффективность анализа.

6. ПОВТОРЯЕМОСТЬ

Повторяемость оценивается в рамках исследования воспроизводимости.

7. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay оценивалась с использованием в общей сложности панели из 10 образцов: 2 образца FFPE CRC с мутациями KRAS (Gly12Asp и Gly13Asp), 1 образец FFPE CRC с мутацией BRAF (Val600Glu) и 2 образца FFPE NSCLC с Мутацией EGFR (Glu746_Ser752delinsVal и Leu858Arg) были получены с высокой и низкой частотой вариантов.

Исследование проводилось в трех лабораториях с 2 операторами в каждой лаборатории, выполнявшими 3 цикла в разные дни. В каждой лаборатории использовали один прибор для секвенирования и 2 партии реагентов. Каждый образец был протестирован в 4 повторах в каждом прогоне, получив в общей сложности 36 возможных результатов (3 лаборатории X 3 прогона X 4 повтора).

Была рассчитана частота положительных результатов с двухсторонним доверительным интервалом 95%. Частота положительных результатов для вариантов ДНК составила 100% (90,4%, 100%) для всех протестированных образцов. Для каждого уровня образца / варианта был проведен компонентный анализ вариации, чтобы оценить вариабельность анализа, включая лабораторию, оператора, день (лаборатория, оператор) и повтор. Общие стандартные отклонения VAF варьировались от 0,33% до 0,70%.

Критерии приемки	**Наблюдалось**	**Пройден /Не пройден**
Воспроизводимость (общая): PPA и NPA больше или равны 95%, а нижняя граница 95% доверительного интервала больше или равна 75%.	Воспроизводимость (общая) PPA = 100% (98,9%, 100%) и NPA = 100% (100%, 100%).	Пройден
Повторяемость (по сайту): PPA и NPA каждого сайта больше или равны 95%, а нижняя граница 95% доверительного интервала больше или равна 50%.	Повторяемость (по лаборатории) PPA = 100% (96,9%, 100%) и NPA = 100% (100%, 100%) для всех трех оцениваемых лабораторий.	Пройден
Эквивалентность термоциклера: такая же, как повторяемость	Такая же, как повторяемость	Пройден

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Эквивалентность партии реагентов: PPA и NPA каждой партии реагентов больше или равно 95%, а нижняя граница 95% доверительного интервала больше или равна 50%.	Воспроизводимость (по партии реагентов) PPA = 100% (96,9%, 100%) и NPA = 100% (100%, 100%) для всех трех оцениваемых партий реагентов.	Пройден
Общее время обработки ≤ 4 дней от образца ДНК до окончательного отчета.	Общее время обработки = 45 часов от образца ДНК до окончательного отчета.	Пройден
Время цикла подготовки библиотеки ≤ 8 часов от образца ДНК до индексированных библиотек.	Время оборота подготовки библиотеки = 7 часов от образца ДНК до количественно проиндексированных библиотек.	Пройден

8. ВВОД ДНК

Стандартный диапазон ввода ДНК для анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay составляет от 10 до 80 нг. Диапазон ввода ДНК оценивался как 5, 10, 20, 40, 80 и 160 нг в дубликатах с использованием ДНК, выделенной из 15 образцов FFPE, содержащих репрезентативные SNV, вставки и делеции. Ожидаемые варианты (KRAS G12D, KRAS G12S, KRAS G12V, KRAS G13D, KRAS A146T, BRAF V600E, делеция экзона 19 EGFR, EGFR L858R, экзон EGFR 20 вставки и EGFR G719S), присутствующие во всех 15 образцах, были правильно определены при входных значениях ДНК 5–160 нг. При вводе 5 нг ДНК 8 из 30 образцов не смогли сгенерировать библиотеки секвенирования, которые соответствуют требованию выхода библиотеки ≥ 3,5 нМ. При вводе 10 нг ДНК 2 из 30 образцов не соответствовали требованиям к выходу библиотеки.

Это исследование подтверждает, что ввод 10-80 нг ДНК для анализа O / RDx-LCCA дает точные результаты (PPA = 100,0% (126/126), NPA = 100,0% (27013/27014).

- *Полученные результаты*

• Данные были проанализированы по всему диапазону входных значений отобранной ДНК и по рекомендованному диапазону входных ДНК от 10 до 80 нг экстрагированной FFPE ДНК для PPA, NPA и проценту произведенных недопустимых библиотек образцов.

• Поскольку эталонного стандарта для наблюдений не существует, запрос с наибольшим количеством наблюдений был принят в качестве эталонного значения. Учитывая высокий уровень согласованных вызовов в репликах выборки, это, по-видимому, позволяет без двусмысленности определять эталонное значение.

• Истинно-отрицательные (TN) наблюдения рассчитывались следующим образом:

• TN = все возможные наблюдения наблюдения - положительные наблюдения, где

• Все возможные наблюдения = количество библиотек образцов * количество целевых вариантов (= 230) и

• Положительные наблюдения = истинно положительные наблюдения + ложноположительные наблюдения.

Заключение

Исследование подтверждает, что вводимые количества от 10 до 80 нг для ДНК, экстрагированной FFPE, дают приемлемые значения PPA и NPA, а также приемлемую недопустимую норму для библиотек образцов.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Критерии приемки	Наблюдалось	Пройден /Не пройден
Общий PPA / NPA составляет ≥ 95% при уровнях ввода ДНК от 10 до 80 нг.	При всех уровнях ввода ДНК от 10 нг до 80 нг общие PPA и NPA составляли 100% и 99-100%, соответственно.	Пройден
Неверные результаты образца составляют ≤ 30% при уровнях ввода ДНК от 10 до 80 нг.	0% недействительных результатов в совокупности наблюдались для уровней ввода ДНК от 10 до 80 нг.	Пройден

9. ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Чтобы оценить потенциальное влияние интерферирующих веществ на производительность анализа ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay, оценивали три образца FFPE колоректального рака и три образца немелкоклеточного рака легкого в присутствии экзогенных и эндогенных веществ. Каждый образец оценивали в двух повторностях, всего 12 библиотек с добавлением следующих интерферирующих веществ: парафин в ксилоле (0,0001% и 0,0002%), протеиназа K (0,04 и 0,08 мг / мл), промывочный буфер для экстракции (1% и 2,5%), этанол (0,8% и 1,6%) и гемоглобин (1 мг / мл и 2 мг / мл).

Были оценены 285 образцов CRC и NSCLC FFPE с различной степенью некроза (от 1% до 50%). При CRC наблюдались 4 противоречивых результата, которые не коррелировали с высоким содержанием некроза. Не наблюдалось четкой тенденции к снижению эффективности с увеличением доли опухоли в образце, подтверждающей вывод о том, что эффективность анализа рака легких и толстой кишки ONCO / Reveal Dx стабильна в пределах рекомендуемого диапазона некротического содержания менее 50%.

Заключение

Критерии приемки	Наблюдалось	Пройден /Не пройден
PPA / NPA вариантных результатов должно составлять ≥ 95% по крайней мере для одного уровня каждого интерферирующего вещества (за исключением уровней некроза тканей). Если оба уровня для интерферирующего вещества не соответствуют требованиям, выполните дальнейшее разбавление, пока не будет достигнут один приемлемый уровень.	PPA = 100% и NPA = 100 для все попарные сравнения по веществу с соответствующим контролем. Сбоев не обнаружено; поэтому дальнейшего разбавления интерферирующего вещества не требовалось.	Пройден
Выход экстракции ДНК, выход библиотеки и качество секвенирования будет оцениваться в корреляции с известным содержанием некротических тканей в исследуемых образцах.	Режимы отказа, такие как низкий выход библиотек, несоответствие результатов и покрытие секвенирования не коррелировал с увеличением содержания некротической ткани.	Пройден

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10. ПЕРЕКРЕСТНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

24 повтора образца положительной клеточной линии, содержащей EGFR L858R ~ 50% и BRAF V600E ~ 67%, и 24 повтора NTC обрабатывали на том же планшете в шахматном формате. Во всех образцах NTC не наблюдалось ложноположительных результатов (0/24, 0%). Положительные образцы были обнаружены в диапазоне VAF от 50% до 68%. Перекрестного загрязнения не наблюдалось.

Выводы

Критерии приемки	Наблюдалось	Пройден /Не пройден
Все образцы NTC отрицательны на ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay	Ни один вариант (ы) не был обнаружен во всех образцах NTC.	Пройден
Анализ должен соответствовать> = 95% при тестировании в формате, имитирующем наихудшее возможное перекрестное загрязнение образца.	Результаты анализа на 100% соответствовали ожидаемым результатам при тестировании в формате шахматной доски.	Пройден

11. ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ (LoD)

Предел обнаружения (LoD), основанный на положительных результатах для ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay, был оценен для определения самой низкой частоты вариантного аллеля (VAF), при которой не менее 95% тестовых реплик давали правильные результаты. Всего было оценено 10 клинических образцов NSCLC и CRC, в том числе образцы с SNV, делеции в диапазоне до 18 нуклеотидов и вставки до 6 нуклеотидов и SNV, включая варианты рядом с гомополимерными блоками из 5 или более осиований и в областях с содержанием GC от 39% до 65%. Было протестировано пять уровней концентрации, и каждый уровень был протестирован с 10 повторами на образец для каждой из двух партий реагентов.

LoD основан на самом высоком VAF% с 95% или более правильными результатами, наблюдаемыми для тестируемого варианта, и заявленный LoD для каждого варианта был рассчитан как средний VAF% для повторений для этого уровня. Измеренные значения LoD варьировались от 1,4% до 3,0% для вариантов SNV, 1,7% для варианта DelIns и 2,2% для варианта вставки. Набор образцов содержал два разных образца FFPE, содержащих один и тот же вариант.

Выводы

Критерии приемки	Наблюдалось	Пройден /Не пройден
Варианты, обнаруженные в этом исследовании, включают SNV и вставку 1-30 п.н. варианты делеции	Набор образцов, использованный в этом исследовании, содержал 1 делинс, 1 вставку и 9 SNVs	Пройден
Расчетный предел обнаружения для варианта KRAS G12X не должен превышать 8%	Измеренные значения LoD для KRAS G12D из двух образцов, содержащих этот вариант, составили 1,8%.	Пройден
Расчетный предел обнаружения для варианта KRAS G13X не должен превышать 8% частоту вариантного аллеля.	Измеренная LoD для KRAS G13D составила 2,6%.	Пройден

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Расчетный предел обнаружения для варианта EGFR L85R не должен превышать 8% вариантного аллеля частота.	Измеренное значение LoD для EGFR L858R составило 1,5%.	Пройден
Расчетный предел обнаружения вариантной делеции EGFR Exon19 не должен превышать 8% частоту вариантного аллеля.	Измеренное значение LoD для делеции EGFR Exon19 составило 1,7%.	Пройден

Предел обнаружения для набора O / RDx-LCCA установлен на уровне 5%, чтобы гарантировать стабильность результатов анализа для набора для всех мутаций с использованием различных типов систем выделения ДНК.

12. СОДЕРЖАНИЕ ОПУХОЛИ

Была оценена минимальная фракция опухоли, необходимая для поддержки устойчивости теста ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay. Десять клинических образцов с различным процентом исходного содержания опухолевых клеток (от 30% до 85%) были оценены перед исследованием внешней лабораторией патологин. Затем их разводили до пяти уровней и анализировали с 20 повторами на уровень с помощью ONCO / Reveal Lung & Colon Cancer Assay.

Данные показывают, что анализ устойчив к содержанию опухоли до 9,8%, при этом все образцы дают 100% обнаружение ожидаемых вариантов. Данные подтверждают требование ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay о содержании опухоли 30%.

Выводы

Критерии приемки	**Наблюдалось**	**Пройден /Не пройден**
Образцы с содержанием опухоли ≥ 30% должны давать точные результаты, измеренные по соответствию (PPA и NPA) известному статусу варианта образца для всех 20 повторений образцов.	Образцы с содержанием опухоли ≥ 9,8% дали точный вызов, измеренный по конкордантности (PPA = 100% и NPA = 100%) с известным статусом варианта образца во всех 20 случаях. образец повторяется.	Пройден

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Руководство пользователя медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов ONCO/Reveal Dx Lung and Colon Cancer Assay для выявления генетических мутаций, ассоциированных с раком легкого и раком прямой кишки методом секвенирования нового поколения» производства компании Pillar Biosciences, Inc.

Согласовано: */Подпись/*
Имя и фамилия: Манфред Шольц (Manfred Scholz)
Должность: старший вице-президент по корпоративному развитию
Название компании: Pillar Biosciences, Inc.
Подпись:
Дата утверждения: 10.09.2021
Штамп:

Штат Массачусетс

Округ Мидлсекс

Сегодня, 5 ноября 2021 года, ко мне, нижеподписавшемуся нотариусу, лично обратился Манфред Шольц, который на основании убедительных доказательств, а именно водительского удостоверения штата Массачусетс, подтвердил, что является лицом, подписавшим настоящий документ, а также что подписал указанный документ для заявленной цели без принуждения и по собственному желанию.

/Подпись/

Нотариус

Срок истечения полномочий: *4 октября 2021 года*

/Штамп/: ДЕВИД Д. КАЙЗЕР-мл. (DAVID D KISER JR), нотариус штата Массачусетс * Срок истечения полномочий: 10 июня 2027 года

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Перевод данного текста с английского языка на русский язык выполнен мной, переводчиком Веселовым Павлом Дмитриевичем.

_____

Российская Федерация

Город Москва
Тринадцатого декабря две тысячи двадцать первого года.
Я, Якубова Татьяна Олеговна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Веселова Павла Дмитриевича.
Подпись сделана в моем присутствии.
Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2171-н/77-2021- 11-1235
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.

Т.О. Якубова

Всего прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 58 лист(а)(ов)

Нотариус

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU