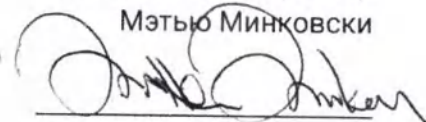


13
КОПИЯ

УТВЕРЖДАЮ
ЭнтроГен, Инк.
20950 Ворнер центр Лн.,
офис Б, Вудлэнд Хиллс,
Калифорния, 91367, США
Генеральный директор
Мэтью Минковски



подпись

December 13th 2021

дата

Инструкция по применению медицинского изделия

**“Набор реагентов для in vitro диагностики
наличия мутаций гена EGFR методом
полимеразной цепной реакции в режиме
реального времени в образцах плазмы крови
человека, 48 реакций”**

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

CIVIL CODE § 1189

A notary public or other officer completing this certificate verifies only the identity of the individual who signed the document to which this certificate is attached, and not the truthfulness, accuracy, or validity of that document.

State of California)
County of Los Angeles)
On 12/13/2021 before me, MITRA N. KATZ Notary Public,
Date Here Insert Name and Title of the Officer
personally appeared MATTHEW MINKOVSKY
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



Place Notary Seal Above

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature [Signature]
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though this section is optional, completing this information can deter alteration of the document or fraudulent reattachment of this form to an unintended document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Instructions for use for medical device
Document Date: _____ Number of Pages: _____
Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Individual ☐ Attorney in Fact
☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____
Signer Is Representing: _____

Signer's Name: _____
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Individual ☐ Attorney in Fact
☐ Trustee ☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____
Signer Is Representing: _____



Для диагностики in-vitro



Хранить при
температуре от -25 °C
до -15 °C



CTEGFR-48

“Набор реагентов для in vitro диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах плазмы крови человека, 48 реакций”

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

Инструкция по применению — версия 2.1

Содержание

Наименование медицинского изделия	5
Производитель и его уполномоченный представитель	5
Назначение медицинского изделия	5
3.1. Описание целевого анализа	5
3.2. Функциональное назначение медицинского изделия	8
3.3. Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено изделие	8
3.4. Тип анализируемого образца	8
Описание функциональных элементов и составных частей	8
4.1. Комплект поставки	8
4.2. Состав реагентов	9
4.3. Описание характеристик	10
4.3.1. Внешний вид	10
4.3.3. Диагностические характеристики изделия	12
Сведения о предназначении изделия для клинической лабораторной диагностики	12
Перечень и описание материалов медицинского изделия, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента	12
Предназначение изделия с указанием пользователя	12
Принцип действия медицинского изделия	12
8.1. Проведение анализа	13
8.1.1. Выделение ДНК	13
8.1.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)	14
8.1.3. Настройки прибора	17
8.2. Анализ данных	21
8.2.1. Этапы анализа, специфические для прибора	21
8.2.2. Интерпретация результатов	22
8.3. Ограничения анализа	24
Перечень материалов и специальных материалов, которые требуются для проведения тестирования, но не содержатся в комплекте поставки изделия	25
9.1. Реагенты	25
9.2. Оборудование	25
9.3. Вспомогательные материалы	25

Сведения для идентификации медицинских изделий с целью получения безопасной комбинации и информация об известных ограничениях по совместному использованию медицинских изделий 25

Условия хранения и обслуживания медицинского изделия 26

Информация о порядке действий в случае нарушения упаковки, о стерильном состоянии и методе стерилизации 26

Информация для пользователей 26

13.1. Сведения и меры предосторожности, предпринимаемые в отношении потенциально инфекционного материала, содержащегося в изделии 26

13.2. Сведения о мерах предосторожности и меры, предпринимаемые в случае сбоя или отклонений в функционировании изделия, определяемых по внешним признакам 27

13.3. Сведения о безопасности от воздействия химических и загрязняющих веществ, в том числе предельно допустимые концентрации веществ или входящих в него компонентов 27

13.4. Сведения о пожарной безопасности 27

13.5. Сведения о взрывобезопасности 27

13.6. Сведения о радиационной безопасности 27

13.7. Сведения о безопасности при обслуживании изделия, в том числе требования безопасности при ошибочных действиях обслуживающего персонала и самопроизвольном нарушении функционирования 27

13.8. Сведения о защитных средствах и мероприятиях обеспечения безопасности 27

13.9. Требования к помещениям 28

13.10. Меры предосторожности при использовании изделия по назначению 28

13.11. Меры предосторожности в случае предсказуемого риска 29

13.12. Меры по защите окружающей среды 29

13.13. Информация о токсикологическом воздействии 29

13.14. Информация об обстоятельствах, при которых пользователь должен проконсультироваться с медицинским специалистом 30

Кратность применения и техническое обслуживание 30

Информация о надлежащей обработке изделия для его повторного использования, включая очистку, дезинфекцию, упаковку и при необходимости метод повторной стерилизации 30

Специальные требования в отношении помещений, специальной подготовки или особой квалификации пользователя и третьих лиц 30

Информация об условиях, необходимых для сбора, обработки и подготовки образцов, данные по стабильности анализируемых образцов, в том числе условия и длительность хранения, условия транспортировки, ограничения по циклам заморозки (размораживания) 31

Информация о подготовке к использованию изделия 31

Информация, необходимая для проверки правильности установки изделия и его готовности к безопасной работе по назначению	31
19.1. Методы снижения рисков при работе с изделием	31
Рекомендации в отношении процедур контроля качества	33
Информация о прослеживаемости значений, заданных для калибраторов или контрольных материалов, которая обеспечивается посредством доступных референтных методик измерения и эталонов	33
22. Биологический референтный интервал	33
23. Информация об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования	33
24. Утилизация	33
25. Информация о необходимости направления сообщения производителю или его уполномоченному представителю о нежелательных событиях, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента)	34
26. Дополнительная информация	35
27. Мутации, определяемые этим набором.	36
28. Приложение	40

1. Наименование медицинского изделия

“Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах плазмы крови человека, 48 реакций”

Примечание: Далее наименование также читать, как: Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК; Набор; Изделие

2. Производитель и его уполномоченный представитель

Сведения о производителе:

Производитель изделия	EntroGen, Inc. ЭнтроГен, Инк.
Адрес производителя	20950 Warner Center Ln., suite B, Woodland Hills, California, 91367, USA / 20950 Ворнер центр Лн., офис Б, Вудлэнд Хиллс, Калифорния, 91367, США
Номера телефонов	1 818 716 1070
Адрес электронной почты	info@entrogen.com

Сведения об уполномоченном представителе:

Уполномоченный представитель	Общество с ограниченной ответственностью "БиоВитрум"
Адрес представителя	Российская Федерация, 199106, Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 68, лит. А
Номера телефонов	7 (812) 305 06 06
Адрес электронной почты	zakaz@biovitrum.ru

3. Назначение медицинского изделия

Изделие предназначено для определения соматических мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR во внеклеточной, полученной из плазмы, геномной ДНК человека (циркулирующей опухолевой ДНК, цоДНК).

3.1. Описание целевого анализа

Изделие является высокочувствительным набором для определения соматических мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR в семи реакциях. Мутации, определяемые настоящим набором, перечислены в Таблице 1.

Примечание: Эти обозначения последний раз обновлялись в сентябре 2020 г. на основе COSMIC v92.

Таблица 1.

Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Cosmic ID
Экзон 18		
c.2155G>A	p.G719S	6252
c.2155G>T	p.G719C	6253
c.2156G>A	p.G719D	18425
c.2156G>C	p.G719A	6239
Экзон 19		
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038
c.2234_2248del15	p.K745_A750>T	1190791
c.2235_2246del12	p.E746_E749delELRE	28517
c.2235_2248>AATTC	p.E746_A750>IP	13550
c.2235_2249del15	p.E746_A750delELREA	6223
c.2235_2251>AATTC	p.E746_T751>IP	13552
c.2235_2252>AAT	p.E746_T751>I	13551
c.2235_2255>AAT	p.E746_S752>I	12385
c.2236_2248>AGAC	p.E746_A750>RP	12413
c.2236_2248>CAAC	p.E746_A750>QP	13557
c.2236_2250del15	p.E746_A750delELREA	6225
c.2236_2253del18	p.E746_T751delELREAT	12728
c.2236_2256del21	p.E746_S752delELREATS	133189
c.2237_2251del15	p.E746_T751>A	12678
c.2237_2251>TTC	p.E746_T751>VP	18421
c.2237_2252>T	p.E746_T751>V	12386
c.2237_2253>TC	p.E746_T751>V	133193
c.2237_2253>TTCCT	p.E746_T751>VP	52935
c.2237_2253>TTGCT	p.E746_T751>VA	12416
c.2237_2254del18	p.E746_S752>A	12367
c.2237_2255>T	p.E746_S752>V	12384

c.2237_2256>TC	p.E746_S752>V	18426
c.2237_2257>TCT	p.E746_P753>VS	18427
c.2238_2248>GC	p.L747_A750>P	12422
c.2238_2252>GCA	p.L747_T751>Q	12419
c.2238_2255del18	p.E746_S752>D	6220
c.2239_2247delTTAAGAGAA	p.L747_E749delLRE	6218
c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	p.L747_A750>P	12382
c.2239_2251>C	p.L747_T751>P	12383
c.2239_2252>CA	p.L747_T751>Q	12420
c.2239_2256>CAA	p.L747_S752>Q	12403
c.2239_2256del18	p.L747_S752delLREATS	6255
c.2239_2258>CA	p.L747_P753>Q	12387
c.2239_2262del24	p.L747_K754delLREATSPK	24970
c.2240_2251del12	p.L747_T751>S	6210
c.2240_2254del15	p.L747_T751delLREAT	12369
c.2240_2257del18	p.L747_P753>S	12370
c.2250_2264del	p.T751_A755del	26718
c.2248_2273>CC	p.A750_E758>P	26440
c.2252_2275del24	p.T751_E758delTSPKANKE	23634
c.2252_2276>A	p.T751_I759>N	96856
c.2252_2277>AT	p.T751_I759>N	24270
c.2253_2276del24	p.S752_I759delSPKANKEI	13556
c.2254_2277del24	p.S752_I759delSPKANKEI	6256
Экзон 20		
c.2369C>T	p.T790M	6240
c.2361G>A	p.Q787Q	1451600
c.2389T>A	p.C797S	6493937
c.2390G>C	p.C797S	5945664
c.2303G>T	p.S768I	6241
c.2300 2308dup (ранее	p.A767 V769dup (ранее	12376

c.2307-2308insGCCAGCGTG)	p.V769 D770insASV)	
c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG	12378
c.2317_2319dup (ранее c.2319_2320insCAC)	p.H773dup (ранее p.H773 V774insH)	12377
Экзон 21		
c.2573T>G	p.L858R	6224
c.2582T>A	p.L861Q	6213

3.2. Функциональное назначение медицинского изделия

Набор используется для прогнозирования ответа на таргетную терапию или сопротивляемость ей при местно-распространенном или метастатическом немелкоклеточном раке лёгкого.

3.3. Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено изделие

Наличие соматических мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR при местно-распространенном или метастатическом немелкоклеточном раке лёгкого.

3.4. Тип анализируемого образца

Геномная ДНК человека, полученная из плазмы крови.

4. Описание функциональных элементов и составных частей

4.1. Комплект поставки

В состав изделия входит:

Наименование	Количество пробирок	Объем реагента, (мкл)
Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакции 1	1	800
Реакционная смесь 2 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакций 2-7	4	1300
Смесь праймеров / проб	7*	158
Смесь положительных контролей (ПК) [§]	1	615
Краткая инструкция (при необходимости) – 1 шт.**		

* В каждой пробирке содержится особая смесь праймеров для амплификации конкретных мутаций. Содержимое этих пробирок не следует смешивать.

§ Смесь положительных контролей содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором и внутренним контролем.

** Полная инструкция по применению изделия размещена на сайте <https://biovitrum.ru/directions/oncodiagnostics.html>

4.2. Состав реагентов

Наименование	Состав	№ CAS	Концентрация	Общий объем
Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2Х) (Синяя крышка)	ДНК-полимераза	-	5 Ед/мкл	1 х 800 мкл
	дНТФ (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты): - дАТФ (дезоксаденозинатрифосфат) - дГТФ (дезоксигуанозинатрифосфат) - дЦТФ (дезоксцитидинтрифосфат) - дТТФ (дезокситимидинтрифосфат)	1927-31-7 2564-35-4 951-77-9 365-08-2	400 ммоль дНТФ	
	ПЦР-буфер (коммерчески доступный буфер) - глицерол - магния хлорид	56-81-5 7786-30-3	0,1-1 % Глицерол 3 ммоль магния хлорид	
Реакционная смесь 2 для определения мутации цоДНК (2Х) (Фиолетовая крышка)	ДНК-полимераза	-	5 Ед/мкл	4 х 1300 мкл
	дНТФ (дезоксирибонуклеозидтрифосфаты): - дАТФ (дезоксаденозинатрифосфат) - дГТФ (дезоксигуанозинатрифосфат) - дЦТФ (дезоксцитидинтрифосфат) - дТТФ (дезокситимидинтрифосфат)	1927-31-7 2564-35-4 951-77-9 365-08-2	400 ммоль дНТФ	
	ПЦР-буфер (коммерчески доступный буфер) - глицерол - магния хлорид	56-81-5 7786-30-3	0,1-1 % глицерол 3 ммоль магния хлорид	
Смесь праймеров/проб 1 (Коричневая крышка с номером 1)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	68% вода 32% IDTA 280 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 158 мкл
Смесь праймеров/проб 2 (Коричневая крышка с номером 2)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	39% вода 61% IDTA 304 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 158 мкл
Смесь праймеров/проб 3 (Коричневая крышка с номером 3)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	80% вода 20% IDTA 296 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 158 мкл

Смесь праймеров/проб 4 (Коричневая крышка с номером 4)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	83% вода 17% IDTA 296 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 158 мкл
Смесь праймеров/проб 5 (Коричневая крышка с номером 5)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	58% вода 42% IDTA 319 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 158 мкл
Смесь праймеров/проб 6 (Коричневая крышка с номером 6)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	77% вода 23% IDTA 247 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 158 мкл
Смесь праймеров/проб 7 (Коричневая крышка с номером 7)	- Пробы (флуоресцентно-меченные гидролизные олигонуклеотидные пробы) - Праймер (известная последовательность нуклеотидов, комплементарная мутантному варианту испытуемого гена) - Вода* - IDTE (1X TE буфер pH 8)	- - 7732-18-5 1185-53-1 60-00-4	80% вода 20% IDTA 296 нг/мкл олигонуклеотиды	1 х 158 мкл
Смесь положительных контролей (ПК) (Красная крышка)	- Смесь синтетических специфических последовательностей олигонуклеотидов - Вода*	- 7732-18-5	0,50 фг/мкл олигонуклеотиды 99 % вода Прошел финальную проверку	1 х 615 мкл

4.3. Описание характеристик

4.3.1. Внешний вид

Параметр	Наименование			
	Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакции 1	Реакционная смесь 2 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакций 2-7	Смесь праймеров / проб	Смесь положительного контроля (ПК) [§]
Количество (шт)	1	4	7 [§]	1
Объем реагента (мкл)	Не менее 800	Не менее 1300	Не менее 158	Не мене 615

Цвет крышки пробирки	Синий	Фиолетовый	Коричневый	Красный
----------------------	-------	------------	------------	---------

* В каждой пробирке содержится особая смесь праймеров для амплификации конкретных мутаций. Содержимое этих пробирок не следует смешивать.

§ Смесь положительного контроля содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором и внутренним контролем.

4.3.2 Рабочие характеристики изделия

Рабочие характеристики изделия

Характеристика	Реакция	Мутация	Репорт	Значение
Предел обнаружения	1	Ex19del	CY5	10 копий
		T790M	FAM	25 копий
		L858R	ROX	25 копий
	2	C797S	FAM	25 копий
	3	L861Q	FAM	25 копий
	4	S768I	FAM	50 копий
	5	G719X	FAM	50 копий
	6	Ex20InsGGT/CAC	FAM	75 копий
	7	Ex20Ins9 (с.2300-2308dup)	FAM	75 копий
Характеристика	Реакция	Мутация	Значение	
Аналитическая специфичность	1	Ex19del	NTC не должен быть обнаружен или Ct > 38,5 для всех каналов (VIC, FAM, ROX, CY5). Образцы с мутациями должны иметь VIC Ct равный 23,5-27,0 (для прибора Rotor-Gene Q) или 28 - 31,5 (для остальных приборов)	
		T790M		
		L858R		
	2	C797S		
	3	L861Q		
	4	S768I		
	5	G719X		
	6	Ex20InsGGT/CAC		
	7	Ex20Ins9 (с.2300-2308dup)		
Характеристика	Реакция	Мутация	Значение	

Прецизионность	1	Ex19del	NTC не должен быть обнаружен или Ct > 38,5 для каналов VIC, FAM, ROX, CY5. гДНК WT не должен быть обнаружен или >38.5Ct для каналов FAM/ROX/CY5 Все образцы должны иметь корректное определение сигнала в ≥95% случаев и CV (%) менее или равный 5 % в FAM, CY5, ROX, и значения Ct для VIC
		T790M	
		L858R	
	2	C797S	
	3	L861Q	
	4	S768I	
	5	G719X	
	6	Ex20InsGGT/CAC	
	7	Ex20Ins9 (с.2300 2308dup)	

4.3.3 Диагностические характеристики изделия

Диагностические характеристики изделия

Характеристика	Значение
Диагностическая чувствительность	100 % (15/15 CI _{0,05%} 79,61-100)

5. Сведения о предназначении изделия для клинической лабораторной диагностики

Область применения - клиническая лабораторная диагностика (in vitro).

6. Перечень и описание материалов медицинского изделия, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента

Набор не содержит материалов, вступающих в непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента (телом человека).

7. Предназначение изделия с указанием пользователя

Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике (in vitro) квалифицированным персоналом со средним и высшим медицинским образованием, дополнительно прошедшим специальное обучение для работы изделием.

8. Принцип действия медицинского изделия

Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК является высокочувствительным набором для определения соматических мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR с использованием 7 реакционных смесей. В основе метода выявления мутаций лежит амплификация мутант-специфичных последовательностей в образцах, которые содержат смесь мутантной ДНК

и ДНК дикого типа, с использованием меченных флуорофорами проб. В таблице ниже показан краткий обзор мутаций, определяемых в каждой реакции.

Реакция	Мутация	Репортер
1	Ex19del	CY5
	T790M	FAM
	L858R	ROX
2	C797S	FAM
3	L861Q	FAM
4	S768I	FAM
5	G719X	FAM
6	Ex20InsGGT/CAC	FAM
7	Ex20Ins9 (с.2300 2308dup)	FAM
Все	Внутренний контроль	VIC

Дополнительная информация о выявленных мутациях:

- T790M с и без соседнего ОНП, (rs1050171 (с. G2361A, р. Q787Q), MAF: 0.43 [4])
- G719X — определяет G719A, G719S, G719D и G719C, но не различает их
- Вставки в экзоне 20 — определяет insCAC и insGGT, но не различает их
- C797S — определяет с.2389T>A и с.2390G>C, но не различает их

Этот набор содержит смеси праймеров для определения вышеупомянутых мутаций гена EGFR, а также ген внутреннего контроля. Внутренние контрольные праймеры усиливают бета-2-микроглобулин (B2M) и используются для определения состояния реагентов и содержания достаточного количества ДНК в реакции.

8.1. Проведение анализа

8.1.1. Выделение ДНК

Внеклеточная ДНК может быть выделена с использованием Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit” (P3H 2021/15704).

Следует придерживаться процедуры выделения вкДНК в соответствии с протоколом. Для настоящего анализа требуется приблизительно 1,5-15 нг вкДНК/реакцию.

Пробирка(-и) для сбора внеклеточной ДНК ВСТ компании «Штрек» (Streck): плазма из крови, собранной с помощью пробирки(-ок) для сбора внеклеточной ДНК ВСТ компании «Штрек» должна пройти обработку протеиназой К перед выделением внеклеточной ДНК, чтобы обеспечить оптимальный выход ДНК. Отказ от обработки протеиназой К может снизить выделение на 50%.

После выделения ДНК измерить концентрацию с помощью флуоресцентного анализатора (например, Qubit) или количественной ПЦР и, при необходимости, разбавить до 0,5-3 нг/мкл. При концентрации ниже 0,5 нг/мкл следует скорректировать объем воды во время постановки реакции. Выделение ДНК из плазмы дает низкий выход. Обычно при выделении ДНК из плазмы крови приводит к низким концентрациям в образце в пределах 0,2-3 нг/мкл. При выделении из больших объемов плазмы (> 5 мл) можно получить большее количество выделенной ДНК, однако высокие концентрации могут также свидетельствовать о загрязнении геномной ДНК.

Примечание: эта концентрация ДНК основана на флуоресцентном анализе выделенной вкДНК с помощью флуориметра Qubit. В некоторых наборах для выделения вкДНК используется РНК-носитель для усиления связывания нуклеиновых кислот с кремнеземной мембраной. РНК-носитель может способствовать поглощению УФ-излучения на спектрофотометрах, таких как Nanodrop. Поэтому каждая лаборатория должна оценивать оптимальную концентрацию ДНК для анализа. Дополнительную информацию можно получить в руководстве к набору для выделения.

8.1.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)

- Разморозить пробирки смеси праймеров/проб, смеси положительных контролей и 2X реакционного мастер-микса для определения мутаций, на льду.

Каждая пробирка смеси праймеров/проб в наборе содержит достаточное количество реагентов для выполнения исследований на 48 образцах (включая контроли).

- Содержимое пробирки необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при комнатной температуре.

Примечание: рекомендуется хранить реагенты, контроли и образцы на льду.

Общий объем реакционных смесей для ПЦР составляет 30 мкл/образец. Реакционные смеси для нескольких образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избытком объема, чтобы компенсировать ошибки пипетирования. С каждой реакцией на каждой плашке следует исследовать по 5 мкл положительного контроля.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Компоненты	Объем (мкл)
------------	-------------

Реакционная смесь 1 для определения мутаций цоДНК (2X) ИЛИ Реакционная смесь 2 для определения мутаций цоДНК (2X)	15
Смесь праймеров	3
Образец вкДНК (1,5–15 нг)	5*
Вода без нуклеаз	7**

*Объем образца может составлять от 1 до 12 мкл.

**Объем воды должен быть скорректирован в соответствии с объемом образца для конечного объема реакции 30 мкл.

1. Для расчета соответствующих объемов (с допустимым избытком 5%) необходимо приготовить следующие мастер-миксы, используя приведенные ниже формулы. Приготовить отдельный мастер-микс для положительных контролей и NTC (контроля без матрицы, КБМ), если объем образца не равен 5 мкл. Объем воды должен составлять 7 мкл для положительного контроля и КБМ, но должен быть доведен для завершения реакции 30 мкл, если объем образца не равен 5 мкл.

Для реакции 1:

Реагенты	Состав*
Реакционная смесь 1 для определения мутаций цоДНК (2X)	N x 15 мкл x 1,05
Смесь праймера для реакции 1	N x 3 мкл x 1,05
Вода без нуклеаз	N x 7 мкл* x 1,05

N = количество образцов для постановки (включая контроли).

* Объем воды в этой формуле рассчитывается на основе внесения 5 мкл образца на реакцию.

Для реакций 2-7:

Реагенты	Состав*
Реакционная смесь 2 для определения мутаций цоДНК (2X)	N x 15 мкл x 1,05
Смеси праймеров для реакций 2-7	N x 3 мкл x 1,05
Вода без нуклеаз	N x 7 мкл* x 1,05

N = количество образцов для постановки (включая контроли).

* Объем воды в этой формуле рассчитывается на основе внесения 5 мкл образца на реакцию.

2. Аккуратно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при комнатной температуре.
3. Распределить по 25 мкл мастер-микса в каждую лунку плашки. Скорректировать объем мастер-микса, если объем образца не составляет 5 мкл (пример макета плашки см. на рисунке 1).

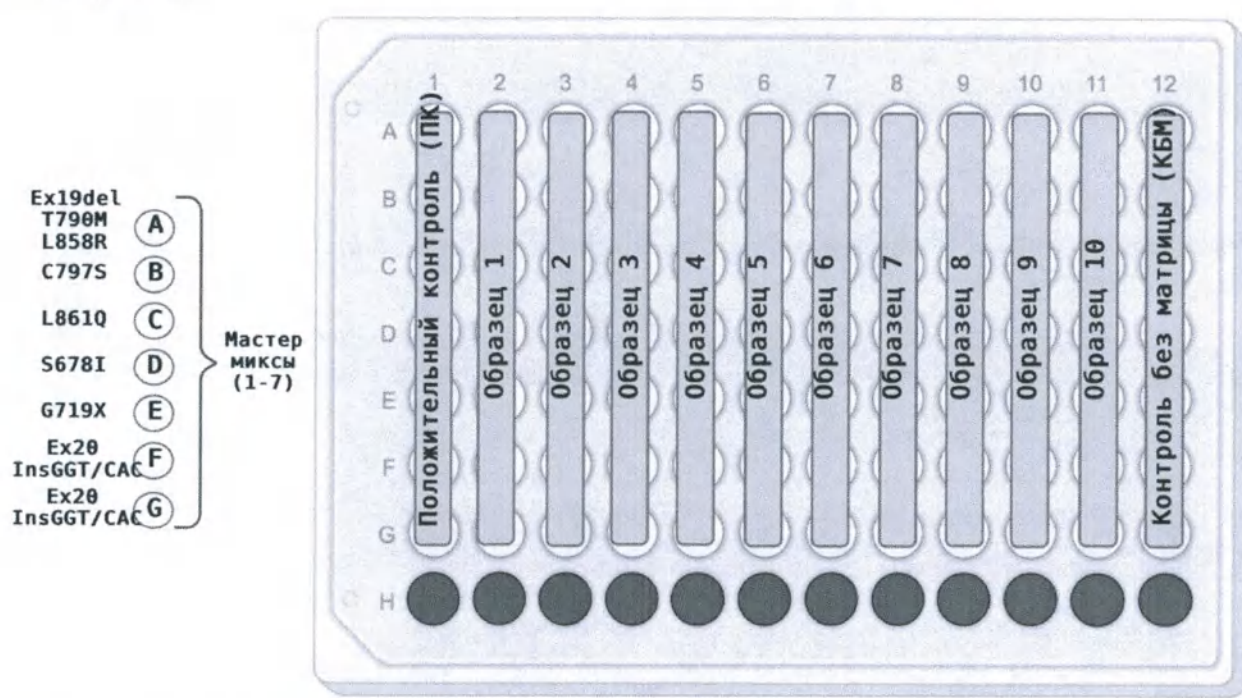


Рисунок 1. Разметка плашки для семи реакций для каждого образца. Одна 96-луночная плашка может вмещать до 10 исследуемых образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ, NTC). Ротор на 72 лунки (не показан) может вмещать до 7 исследуемых образцов, одну смесь положительных контролей и один КБМ. Рекомендуемый макет плашки показан на рисунке выше.

4. Добавить 25 мкл мастер-микса для положительного контроля и КБМ в контрольные лунки.
5. Добавить по 1–12 мкл образца вкДНК (в зависимости от концентрации) в каждую соответствующую лунку и перемешать пипетированием несколько раз.
6. Добавить по 5 мкл положительного контроля и воды (КБМ) в соответствующие лунки и перемешать пипетированием несколько раз.
7. Закрыть плашку оптической герметичной пленкой (для плашек) или крышками (для пробирок).

8. Необходимо быстро центрифугировать плашку для сбора капель на дне лунок и убедиться в отсутствии пузырьков на дне лунок.

8.1.3. Настройки прибора

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

1. В «Мастере запуска» (Startup Wizard) выбрать «Создать новый эксперимент» (Create New Experiment) и убедиться, что в раскрывающемся списке выбрано CFX96. Нажать ОК.
2. Во вкладке «Протокол» (Protocol) окна «Установка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры цикла:

Этап	Температура	Время
1	95 °C	10 мин
2	95 °C	15 сек.
3	58 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
4	Повторить с шага 2 еще 39 раз	
	ЗАВЕРШЕНИЕ	

3. После завершения нажать «ОК», чтобы сохранить шаблон протокола. Обратить внимание на расположение сохраненного файла шаблона, чтобы использовать его для последующих анализов. Нажать «Дальше» (Next), чтобы перейти к окну «Настройка» (Setup).
4. Изменить объем образца на 30 мкл.
5. Установить флуорофоры для всех каналов.
6. Нажать «Дальше» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

1. В программном обеспечении для проектирования и анализа QuantStudio необходимо выбрать создание нового эксперимента.

2. Во вкладке «Свойства» (Properties):

- a. Выбрать «96-луночный блок 0,2 мл» (96-Well 0.2 mL block) для «Блока»
- b. Выбрать «Сравнительный Ct ($\Delta\Delta Ct$)» (Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)) для «Типа эксперимента»
- c. Выбрать «Реагенты TaqMan®» (TaqMan® Reagents) для «Реагентов» (Chemistry)
- d. Выбрать «Быстрый» (Fast) для «Режима анализа»

3. Во вкладке «Метод» (Method):

- a. Изменить объем на 30 мкл.
- b. Изменить скорость охлаждения на 2,38°C/сек., а всех другие скорости изменений на 3°C/сек., как показано ниже.
- c. Ввести следующие параметры цикла:

Этап	Температура	Время
Этап инкубации		
	Скорость линейного изменения 3 °C/сек.	
1	95 °C	10 мин
Этап ПЦР		
	Скорость линейного изменения 3 °C/сек.	
1	95 °C	15 сек.
	Скорость линейного изменения 2,38 °C/сек.	
2	58 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
Повторить этап ПЦР 40х		
ЗАВЕРШЕНИЕ		

4. Во вкладке «Плашка» (Plate):

- a. Установить Пассивный стандарт на «Отсутствует» (None).
- b. Нажать вкладку «Расширенная настройка» (Advanced Setup) и добавить следующие цели в поле «Цели» (Targets).

Название цели	Краситель	Гаситель флуоресценции
---------------	-----------	------------------------

Реакция 1 Ex19Del	CY5	NFQ-MGB
Реакция 1 T790M	FAM	NFQ-MGB
Реакция 1 L858R	ROX	NFQ-MGB
Реакция 1 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 2 C797S	FAM	NFQ-MGB
Реакция 2 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 3 L861Q	FAM	NFQ-MGB
Реакция 3 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 4 S768I	FAM	NFQ-MGB
Реакция 4 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 5 G719X	FAM	NFQ-MGB
Реакция 5 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 6 Ex20InsGGT/CAC	FAM	NFQ-MGB
Реакция 6 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 7 Ex20Ins9	FAM	NFQ-MGB
Реакция 7 IC	VIC	NFQ-MGB

5. В поле «Образцы» (Samples) присвоить идентификаторы образцов необходимым лункам.
6. Нажать «Сохранить» (Save), чтобы сохранить выполняемый файл.
7. Открыть файл запуска на приборе QuantStudio™ 5.
8. Убедиться в том, что объем реакционной смеси установлен на 30 мкл, а «Сбор данных» (Data Collection) включен на этапе при температуре 58 °C.
9. Загрузить плашку на прибор и нажать «ЗАПУСТИТЬ АНАЛИЗ» (START RUN).

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

1. Выбрать «Файл» (File) > «Новый» (New), в диалоговом окне нажать вкладку «Расширенные» (Advanced), выбрать «Два этапа» (Two Step) и нажать «Новый» (New).
2. Выбрать 72-луночный ротор, отметить поле «Запирающее кольцо присоединено» (Locking Ring Attached) и нажать «Далее» (Next), затем пропустить «Мастер» (Wizard).
3. Перейти к «Вид» (View) > «Настройки анализа» (Run Settings), ввести 30 мкл для объема реакционной смеси и нажать «ОК».
4. Перейти к «Вид» > «Редактор профиля».

5. Нажать на «Инкубация» (Hold) и ввести 95 °С для «температура инкубации» (Hold Temperature) и 10 минут для «Время инкубации» (Hold Time).
6. Нажать на кнопку «Циклирование» (Cycling), ввести «Этот цикл повторяется» (This cycle repeats) 40 раз, затем ввести следующие параметры «Установленный этап» (Timed Step), нажимая на каждый этап на панели справа:

Этап	Температура (°C)	Время	Сбор данных
Инкубация	95 °C	10 мин	Нет
Установленный этап	95 °C	15 сек.	Нет
Установленный этап	58 °C	30 сек.	Запрос данных для Цикла А по «Зеленому» (Green), «Желтому» (Yellow), «Красному» (Red), «Оранжевому» (Orange)

7. Нажать ОК.

Дополнительно: сохранить эти параметры запуска для последующего использования, выбрав кнопку «Сохранить как» (Save As) в верхней части диалогового окна.

8. Перейдите к «Увеличение» (Gain), ввести следующие параметры:

Примечание: предлагаемые параметры увеличения, возможно, потребуются скорректировать с учетом изменчивости показателей по приборам.

Детектор	Увеличение
Зеленый	6,67
Желтый	10
Оранжевый	5
Красный	5
Crimson	7
HRM	7

9. Загрузить стрипы пробирок в ротор.
10. Перейти к «Анализ» (Run) > «Запустить анализ» (Start Run), затем нажать кнопку «Запустить» (Start), чтобы начать анализ.

Примечание: диалоговое окно «Редактировать образцы» (Edit Samples) открывается сразу после запуска анализа. Введите информацию об образце во время работы прибора или после завершения анализа.

8.2. Анализ данных

Важно: для пороговых значений может потребоваться корректировка с учетом чувствительности флуоресцентной детекции каждого термоциклера. В качестве исходной точки необходимо использовать перечисленные ниже параметры.

8.2.1. Этапы анализа, специфические для прибора

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

Проанализировать данные программным обеспечением прибора для ПЦР в режиме реального времени, используя следующие критерии:

- "Ct (Cq) Determination Mode" (Режим определения Ct): "Single Threshold" (Одиночное пороговое значение).
- "Baseline Setting" (Настройки исходных данных): "Baseline Subtracted Curve Fit" (Подбор кривой с вычетом исходных условий).
- Baseline and Threshold (Исходные данные и пороговое значение): заданные пользователем в соответствии с таблицей ниже:

Целевое значение	Реакция	Исходные данные	Пороговое значение
HEX (VIC)	1, 2	3-22	700
	3, 4, 6, 7	3-22	450
	5	3-22	400
FAM	1	3-22	400
	2-7	3-22	300
ROX	1	3-22	400
CY5	1	3-22	300

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

Проанализировать данные программным обеспечением прибора для ПЦР в режиме реального времени, используя следующие критерии:

- Исходные данные и пороговое значение: заданные пользователем в соответствии с таблицей ниже:

Целевое значение	Реакция	Исходные данные	Пороговое значение
HEX (VIC)	1, 2	3-22	55 000
	3, 4, 6, 7	3-22	27 500
	5	3-22	20 000
FAM	1	3-22	65 000
	2-7	3-22	40 000
ROX	1	3-22	35 000
CY5	1	3-22	30 000

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

Проанализировать данные программным обеспечением прибора для ПЦР в режиме реального времени, используя следующие критерии:

- "Dynamic Tube" (Динамическая пробирка): Вкл.
- "Slope Correct" (Поправка наклона): Вкл.
- Удаление выбросов (Outlier Removal): 5 %

Установить следующие пороговые значения:

VIC -желтый	FAM — Зеленый	CY5 — Красный	ROX — Оранжевый
0,1	0,15	0,05	0,05

8.2.2. Интерпретация результатов

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

1. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый канал на наличие сигнала. ПК должен иметь аналогичные значения C_t для канала VIC для каждой реакции.
2. Выбрать лунки с отрицательным контролем и убедиться в отсутствии сигнала или в том, что значение C_t больше 38,5 для каждого канала.
3. Выбрать лунки с реакциями для каждого исследуемого образца и проверить сигнал для каждого канала. Для интерпретации результатов необходимо использовать таблицу C_t ниже.

Целевое Ct:	VIC (HEX) Ct:	Результат
Ct = любое	$0 < Ct \leq 28$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК.
$38,5 < Ct$; Ct = Н/П	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Отрицательный образец. Повторный анализ не требуется.
$Ct \leq 38,5$	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Положительный для целевого канала: Ex19Del (Cy5), L858R (ROX), все остальные (FAM).
Ct = любое	$Ct > 31,5$; Ct = Н/П	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

1. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый детектор на наличие сигнала. ПК должен иметь аналогичные значения Ct для канала VIC для каждой реакции.
2. Выбрать лунки с отрицательным контролем и убедиться в отсутствии сигнала или в том, что значение Ct больше 38,5 для каждого детектора.
3. Выбрать лунки с реакциями для каждого исследуемого образца и проверить сигнал для каждого детектора. Для интерпретации результатов необходимо использовать таблицу Ct ниже.

Целевое Ct:	VIC (HEX) Ct:	Результат
Ct = любое	$0 < Ct < 28$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК.
$38,5 < Ct$; Ct = неопределено	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Отрицательный образец. Повторный анализ не требуется.
$Ct \leq 38,5$	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Положительный для целевого канала: Ex19Del (Cy5), L858R (ROX), все остальные (FAM).
Ct = любое	$Ct > 31,5$; Ct = неопределено	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК.

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

1. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый канал на наличие сигнала. ПК должен иметь аналогичные значения Ct для канала VIC для каждой реакции.
2. Выбрать лунки с отрицательным контролем и убедиться в отсутствии сигнала или в том, что значение Ct больше 38,5 для каждого канала.
3. Выбрать лунки с реакциями для каждого исследуемого образца и проверить сигнал для каждого канала. Для интерпретации результатов необходимо использовать таблицу Ct ниже.

Целевое Ct:	VIC (желтый) Ct:	Результат
Ct = любое	$0 < Ct < 23,5$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК.
$38,5 < Ct$; Ct = 0	$23,5 \leq Ct \leq 27$	Отрицательный образец. Повторный анализ не требуется.
$Ct \leq 38,5$	$23,5 \leq Ct \leq 27$	Положительный для целевого канала: Ex19Del (Cy5-Red), L858R (ROX-Orange), все прочие (FAM-Green).
Ct = любое	$Ct > 27$; Ct = 0	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК.

8.3. Ограничения анализа

- Успешное определение целевых мутаций зависит от качества образца и количества имеющейся в наличии амплифицируемой ДНК. Образцы, с избыточной или недостаточной начальной концентрацией должны быть пройти анализ повторно.
- Эффективность этого анализа не была установлена в присутствии редких полиморфизмов.
- Набор для определения мутации гена EGFR в цодНК предназначен для использования только внеклеточной ДНК. Неизвестно, подходят ли другие типы образцов для исследований с помощью этого набора.
- Цельную кровь необходимо немедленно обработать для выделения внеклеточной ДНК. Хранение крови до выделения приведет к образованию тромбов, которые значительно снизят получение внеклеточной ДНК.
- Перенос реагента из выделения может снизить эффективность амплификации.

· Этот анализ предназначен для использования лабораторным персоналом, обученным методам молекулярной биологии.

· Соблюдение этого протокола необходимо для достижения оптимальных результатов. Отклонения от протокола могут привести к снижению производительности.

· Комбинация реагентов из различных партий наборов не оценивалась. Характеристики эффективности для данной модификации не были установлены.

9. Перечень материалов и специальных материалов, которые требуются для проведения тестирования, но не содержатся в комплекте поставки изделия

9.1. Реагенты

Набор для определения мутации гена EGFR в цодНК не содержит реагентов для ферментации белка (протеиназа К) или выделения внеклеточной ДНК. Внеклеточная ДНК может быть выделена с использованием Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: "Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit" (РЗН 2021/15704). Подробную информацию в отношении выделения вкДНК см. в разделе 8.1.1.

Для анализа требуется использование воды без нуклеазной активности (для ПЦР).

9.2. Оборудование

Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени, Центрифуга для ПЦР-плашек, Микроцентрифуга для микроцентрифужных пробирок 0,2 мл и 2,0 мл.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

9.3. Вспомогательные материалы

Одноразовые неопудренные перчатки, Вортекс, Стерильные наконечники пипеток с фильтром, Пипетки переменной емкости, Оптическая герметизирующая пленка для ПЦР плашек, 96-луночные ПЦР плашки, 20 % хлоросодержащий отбеливатель (или эквивалент), 70 % этанол, Микроцентрифужные пробирки 0,2 мл (дополнительно) и 2,0 мл.

10. Сведения для идентификации медицинских изделий с целью получения безопасной комбинации и информация об известных ограничениях по совместному использованию медицинских изделий

Неприменимо.

11. Условия хранения и обслуживания медицинского изделия

Срок годности изделия: 12 месяцев.

Гарантийный срок хранения равен сроку годности.

Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2X) для реакции 1; Реакционная смесь 2 для определения мутации СТ (2X) для реакций 2-7: хранить в морозильной камере при температуре от -25 °С до -15 °С. Разморозить один флакон реакционной смеси за один раз и хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность фермента. Если предполагается использование одного флакона этого реагента в течение более 30 дней, после первого размораживания рекомендуется использовать небольшой объем аликвоты.

Смесь праймеров / проб: хранить в морозильной камере при температуре от -25 °С до -15 °С. После размораживания смесь праймеров/проб сохраняет стабильность в течение 30 дней при хранении при температуре от 2 °С до 8 °С. Если предполагается использование смеси праймеров/проб в течение более 30 дней, для длительного хранения при температуре -25 °С до -15 °С после первого размораживания рекомендуется использовать небольшой объем аликвоты.

Смесь положительного контроля (ПК): хранить при температуре от 2 °С до 8 °С после размораживания.

При транспортировке, осуществлении погрузки и выгрузки изделия должны быть приняты меры, предохраняющие тару от механических повреждений, воздействия атмосферных осадков, горючих материалов и кислот.

При соблюдении условий хранения, эксплуатации и транспортировки, изделие остается стабильным до истечения срока годности, указанного на внешней этикетке.

12. Информация о порядке действий в случае нарушения упаковки, о стерильном состоянии и методе стерилизации

Неприменимо. Изделие поставляется нестерильным и не требует стерилизации.

13. Информация для пользователей

При соблюдении требований инструкции возникновение нежелательных событий маловероятно. Для соблюдения требований безопасности необходим инструктаж персонала и выполнение соответствующих обязательных инструкций по технике безопасности и технологических процессов.

13.1. Сведения и меры предосторожности, предпринимаемые в отношении потенциально инфекционного материала, содержащегося в изделии

Неприменимо. Изделие не содержит потенциально инфицированный материал.

13.2. Сведения о мерах предосторожности и меры, предпринимаемые в случае сбоя или отклонений в функционировании изделия, определяемых по внешним признакам

Не используйте изделие с истекшим сроком годности, при нарушении целостности упаковки. В случае отклонения внешнего вида изделия от нормального проверьте функционирование изделия на заведомо пригодном образце биоматериала.

13.3. Сведения о безопасности от воздействия химических и загрязняющих веществ, в том числе предельно допустимые концентрации веществ или входящих в него компонентов

Неприменимо. Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК не содержит загрязняющих веществ.

13.4. Сведения о пожарной безопасности

Неприменимо. Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК не является пожароопасным.

13.5. Сведения о взрывобезопасности

Неприменимо. Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК не является взрывоопасным.

13.6. Сведения о радиационной безопасности

Неприменимо. Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК не содержит источников излучения.

13.7. Сведения о безопасности при обслуживании изделия, в том числе требования безопасности при ошибочных действиях обслуживающего персонала и самопроизвольном нарушении функционирования

При использовании изделия квалифицированным персоналом согласно инструкции по эксплуатации и с соблюдением мер предосторожности, ошибочные действия персонала и нарушения функционирования исключены.

13.8. Сведения о защитных средствах и мероприятиях обеспечения безопасности

При использовании Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК по назначению и соблюдении мер предосторожности (использовании специальной лабораторной одежды: халат и одноразовые перчатки, фартук) контакт с организмом человека исключен.

Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с разделом 24 “Утилизация”.

При работе с жидкими реагентами использовать лицевой щиток или очки для защиты глаз.

13.9. Требования к помещениям

Работы должны проводиться в проветриваемых помещениях или в помещениях, оборудованных приточно-вытяжной вентиляцией. Кратность обмена воздуха – не менее 8.

На рабочих местах должны быть обеспечены допустимые параметры микроклимата согласно нормативным актам.

В помещениях должно быть обеспечено наличие кипяченой воды и аптечки с медикаментами для оказания первой медицинской помощи.

Требования к помещениям регулируются действующими локальным законодательством и нормативными актами.

13.10. Меры предосторожности при использовании изделия по назначению

При контакте с биоматериалом необходимо соблюдать меры предосторожности. Во время работы следует пользоваться перчатками и специальной лабораторной одеждой, так как образцы биоматериала следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любого другого возбудителя инфекции.

Меры предосторожности: при работе с изделием необходимо использовать СИЗ и средства защиты глаз. При попадании в глаза промыть водой и немедленно обратиться к врачу. При проглатывании обратиться к врачу.

ПЦР амплификация отличается высокой чувствительностью к перекрестной контаминации. Очень важно проводить этапы, предшествующие амплификации (т.е. выделение ДНК, приготовление ПЦР реакции) в отдельных местах, в идеале в отдельных помещениях с изолированными системами вентиляции. Особенно важно, чтобы подготовка ПЦР реакции осуществлялась в помещении с положительным давлением воздуха (или в ламинарном шкафу).

Во избежание контаминации между образцами/реагентами при работе с ДНК и реагентами для ПЦР необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности:

- Протирать рабочую зону, пипеточные дозаторы и оборудование, предназначенное для использования вблизи рабочей зоны, дезинфицирующим средством для очистки поверхностей (20%-отбеливатель или аналог), с тем чтобы устранить ДНК и ДНКазы, с последующим использованием 70 % этилового спирта.
- Перед применением каждую пробирку следует перемешать на вортексе.
- Центрифугировать все пробирки перед открытием.
- После перемешивания/смешивания на вортексе каждую микроцентрифужную пробирку открывать осторожно, при этом следует избегать касания внутренней части крышки.

- Во избежание перекрестной контаминации для всех этапов пипетирования следует использовать аэрозоль-устойчивые (с фильтром) наконечники.
- Между всеми переносами жидкостей необходимо менять наконечники пипеток.
- При работе с ДНК/реагентами всегда следует надевать перчатки и менять перчатки между этапами пре-амплификации и пост-амплификации.
- Перемещение пробирок, штативов, пипеток и другого используемого оборудования должно быть от пре-амплификации до пост-амплификации, а не наоборот.

13.11. Меры предосторожности в случае предсказуемого риска

Если в ходе предварительного анализа рисков выявляются риски, требующие мероприятий по снижению уровня риска до приемлемого, то к ним применяются процедуры этапа по управлению рисками.

Меры по уменьшению вреда и вероятности риска для изделия направлены на то, чтобы остаточный риск снизился до приемлемого.

В результате возможные риски для изделия являются допустимыми: преимуществ для пациента и медицинского работника больше, чем возможных опасностей.

13.12. Меры по защите окружающей среды

Не допускайте попадания изделия в канализацию.

После использования изделия образцы следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любого другого возбудителя инфекции. Образцы должны утилизироваться в соответствии с действующими локальным законодательством и нормативными актами в отношении биологически опасных отходов.

Жидкие отходы (загрязненная вода, образующаяся после промывки оборудования) должны быть собраны в специально предназначенные емкости и своевременно вывезены в места захоронения.

13.13. Информация о токсикологическом воздействии

Информация о токсикологическом воздействии представлена в таблице 3.

Таблица 3. Информация о токсикологическом воздействии.

Наименование медицинского изделия (модификаций при наличии)	Состав
Набор реагентов для in vitro диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах плазмы крови человека, 48 реакций	Отсутствует

13.14. Информация об обстоятельствах, при которых пользователь должен проконсультироваться с медицинским специалистом

При случайном попадании изделия в желудочно-кишечный тракт немедленно обратитесь к врачу.

При попадании на кожу или слизистую оболочку глаз немедленно обратитесь к врачу.

14. Кратность применения и техническое обслуживание

Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК для многократного применения.

Изделие не требует технического обслуживания.

15. Информация о надлежащей обработке изделия для его повторного использования, включая очистку, дезинфекцию, упаковку и при необходимости метод повторной стерилизации

Неприменимо. Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК не требует обработки при повторном использовании.

16. Специальные требования в отношении помещений, специальной подготовки или особой квалификации пользователя и третьих лиц

Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике (in vitro) квалифицированным персоналом со средним и высшим медицинским образованием, дополнительно прошедшим специальное обучение для работы изделием.

Работы должны проводиться в проветриваемых помещениях или в помещениях, оборудованных приточно-вытяжной вентиляцией. Кратность обмена воздуха – не менее 8.

На рабочих местах должны быть обеспечены допустимые параметры микроклимата:

- температура воздуха: 17-23 °С (в холодный период года);
- 18-27 °С (в теплый период года);
- влажность воздуха 15-75 %.

В помещениях должно быть обеспечено наличие кипяченой воды и аптечки с медикаментами для оказания первой медицинской помощи.

Для соблюдения требований безопасности необходим инструктаж персонала и выполнение соответствующих обязательных инструкций по технике безопасности и технологических процессов. Регулируется действующими локальным законодательством и нормативными актами.

17.Информация об условиях, необходимых для сбора, обработки и подготовки образцов, данные по стабильности анализируемых образцов, в том числе условия и длительность хранения, условия транспортировки, ограничения по циклам заморозки (размораживания)

Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2X): хранить в морозильной камере при температуре от -25 °С до -15 °С. Разморозить один флакон реакционной смеси за один раз и хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность фермента. Если предполагается использование одного флакона этого реагента в течение более 30 дней, после первого размораживания рекомендуется использовать небольшой объем аликвоты.

Смесь праймеров / проб: хранить в морозильной камере при температуре от -25 °С до -15 °С. После размораживания смесь праймеров/проб сохраняет стабильность в течение 30 дней при хранении при температуре от 2 °С до 8 °С. Если предполагается использование смеси праймеров/проб в течение более 30 дней, для длительного хранения при температуре -25 °С до -15 °С после первого размораживания рекомендуется использовать небольшой объем аликвоты.

Смесь положительного контроля: хранить при температуре от 2 °С до 8 °С после размораживания.

Настоящее изделие и его компоненты сохраняют свою эффективность до истечения срока годности, указанного на этикетках каждой пробирки, при условии надлежащего соблюдения вышеописанных условий хранения и обращения.

18.Информация о подготовке к использованию изделия

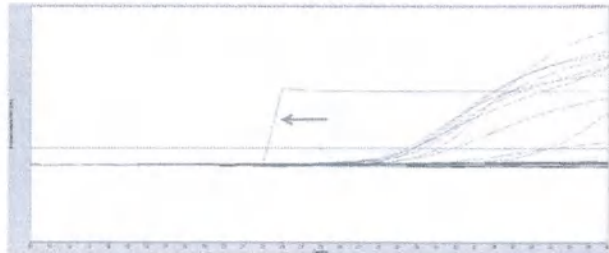
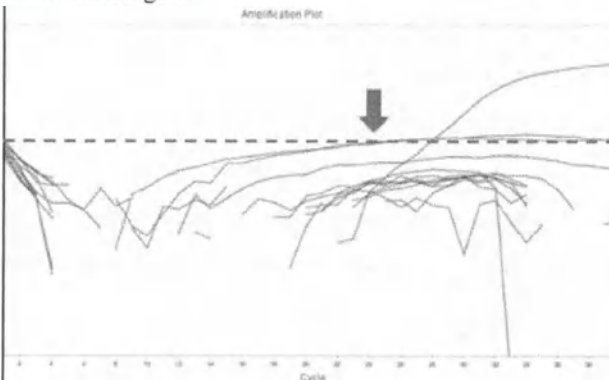
Неприменимо. Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК готово к использованию.

19.Информация, необходимая для проверки правильности установки изделия и его готовности к безопасной работе по назначению

Неприменимо. Изделие не требует установки.

19.1. Методы снижения рисков при работе с изделием

Проблема:	Решение:
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение C_t выше, чем верхнее пороговое значение C_t , указанное в разделе 8.2 настоящей инструкции.	Если внутренний контрольный сигнал возникает после порогового значения или не возникает, реакция была недостаточно насыщена (недостаточно ДНК), необходимо провести повторный анализ с большим количеством ДНК. Если анализ образца, в котором, точно имеются ингибиторы ПЦР (например, образцы меланомы имеют меланин, который является ингибитором ПЦР), необходимо провести повторный анализ образца с меньшим количеством ДНК или разбавить образец водой в соотношении 1:5 и повторно провести анализ. Если увеличение/уменьшение объема ДНК не решает проблему:

	1. Выделить ДНК заново (при возможности). 2. Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. 3. Использовать коммерчески доступный концентратор ДНК.
Целевой и внутренний контрольные сигналы являются отрицательными для положительного контроля (ПК).	Реагенты могут деградировать. Для получения дополнительной информации необходимо связаться со своим поставщиком. Во избежание последующих сбоев в работе реагента необходимо выполнять инструкции по хранению и обращению, которые содержатся в разделе 11 настоящей инструкции.
Аномальный пик на графике усиления образца с помощью прибора Life Technologies.  Fluorescence Флуоресценция (465-510) Cycle Цикл	Аномальная линия пика может быть результатом пузырьков в лунке, содержащей образец. Центрифугировать плашку перед выполнением анализа образца. Аномальный пик может быть ошибкой детекции флуоресценции прибором. Провести повторный анализ другой плашки, чтобы убедиться в отсутствии воспроизводимости. Если пик воспроизводится, необходимо связаться с производителем прибора.
Сигнал в контроле КБМ.	Указывает контаминацию геномной ДНК. Оценить лабораторную процедуру. Предложения по сведению к минимуму загрязнения рабочей поверхности см. в разделе 13.10 настоящей инструкции. При наличии целевого сигнала и (или) сигнала внутреннего контроля, результаты могут давать ложно-положительный результат и требуется повторный анализ.
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ при проведении анализа на приборе Life Technologies. 	Обеспечить установку ручных пороговых значений, предложенных в настоящей инструкции. Убедиться в том, что сигнал не является истинной амплификацией путем проверки сигнала на многокомпонентном графике (приборы Life Technologies). Если сигнал горизонтальный, то это не истинная амплификация. Если сигнал на многокомпонентном графике является линейным и сигнал пересекает пороговое значение, необходимо отрегулировать базовый конечный цикл. Установить начальный цикл на 3 и остановить: самый ранний цикл VIC Ct (если сигнал по-прежнему пересекает пороговое значение, увеличивать число циклов с шагом 3 до тех пор, пока сигнал не перестанет пересекать пороговое значение).

<i>Amplification Plot</i>	<i>График амплификации</i>	
<i>Cycle</i>	<i>Цикл</i>	
Образец дикого типа имеет значение Ct целевого сигнала, которое попадает в параметры для статуса положительной мутации.		Если сигнал внутреннего контроля находится в пределах диапазона, тогда образец дикого типа имеет контаминацию положительным образцом, геномной ДНК или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа. Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.

20. Рекомендации в отношении процедур контроля качества

Компоненты настоящего Набора для определения мутации гена EGFR в цоДНК производятся в соответствии со стандартом GMP (Надлежащая производственная практика). Для обеспечения наивысшего качества продукции GMP требует обширной валидации и документирования производственных процедур.

Каждая серия испытывалась на приборе Bio-Rad CFX96 или QuantStudio™ 5. Сертификат анализа для каждой серии предоставляется по запросу.

21. Информация о прослеживаемости значений, заданных для калибраторов или контрольных материалов, которая обеспечивается посредством доступных референтных методик измерения и эталонов

Неприменимо.

22. Биологический референтный интервал

Неприменимо.

23. Информация об интерферирующих веществах или ограничениях, связанных с пробой, которые могут повлиять на результат исследования

Неприменимо.

24. Утилизация

Уничтожать неиспользованные при исследованиях изделия и другие реактивы следует как эпидемиологически опасные отходы в соответствии с принятыми локальными правилами по обращению и утилизации медицинских отходов.

Дезинфекцию оборудования и помещений также проводить в соответствии с локальными требованиями.

Общий порядок действий:

1) Изделия, пришедшие в негодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации.

- 2) Изделия, пришедшие в негодность, с истекшим сроком годности, являющиеся подделками или незаконными копиями изделий, а также изделия, обнаруженные и конфискованные таможенными органами, подлежат уничтожению или утилизации.
- 3) Уничтожение изделий осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию. Уничтожать изделия необходимо на специально оборудованных площадках или полигонах, а также в помещениях в соответствии с локальными требованиями и с соблюдением требований по охране окружающей среды.
- 4) Изготовитель, поставщики, продавцы, импортеры могут уничтожать изделия, потерявшие потребительские свойства или с истекшим сроком годности, при использовании методов, согласованных с территориальными органами, ответственными за санитарно-эпидемиологическое благополучие населения.
- 5) Изделия во внешней упаковке с предупредительными знаками об опасности следует уничтожать с соблюдением соответствующих мер безопасности и дезактивации.
- 6) Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются раздавливанием внутренней упаковки и разведением водой в соотношении 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственного или бытового мусора.
Твердые компоненты подлежат дроблению, разведению водой в соотношении 1:100, сливом раствора в промышленную канализацию и вывозом остатков упаковок как производственного или бытового мусора. Компоненты изделий, нерастворимые в воде, уничтожаются путем сжигания.
- 7) Изделия, содержащие потенциально опасные материалы, перед уничтожением должны быть обеззаражены в соответствии с действующим локальным законодательством.
- 8) Технические приспособления, принадлежности, входящие в комплектацию изделия, подлежат механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора или сжиганию.
- 9) Персонал, осуществляющий уничтожение изделий, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

25. Информация о необходимости направления сообщения производителю или его уполномоченному представителю о нежелательных событиях, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента)

По всем вопросам, касающимся эксплуатации, качества изделия и др., на территории Российской Федерации следует обращаться:

ООО «БиоВитрум»

199106, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Большой проспект В.О., дом 68, лит. А.

Телефон: +7 (812) 305 0606

Email: cert@biovitrum.ru.

26. Дополнительная информация

Сведения, находящиеся в данной инструкции, основаны на данных, имеющихся на момент разработки последней редакции. Пользователь обязан убедиться в полноте и соответствии информации для использования изделия по назначению.

В связи с тем, что использование изделия не происходит под непосредственным наблюдением производителя, пользователь обязан руководствоваться законами и действующими положениями по вопросам гигиены и безопасности при использовании изделия по назначению, под собственную ответственность. Производитель не несет ответственности за использование изделия не по назначению.

27. Мутации, определяемые этим набором.

Примечание: эти обозначения последний раз обновлялись в сентябре 2020 года на основе COSMIC v92.

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Cosmic ID	Нуклеотид по HGVS	Белок по HGVS
Exon 18				
c.2155G>A	p.G719S	6252	LRG_304t1:c.2155G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Ser)
c.2155G>T	p.G719C	6253	LRG_304t1:c.2155G>T	LRG_304p1:p.(Gly719Cys)
c.2156G>A	p.G719D	18425	LRG_304t1:c.2156G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Asp)
c.2156G>C	p.G719A	6239	LRG_304t1:c.2156G>C	LRG_304p1:p.(Gly719Ala)
Exon 19				
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2234_2248del15	p.K745_A750delinsT	1190791	LRG_304t1:c.2234_2248del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Ala750delinsThr)
c.2235_2246del12	p.E746_E749delELRE	28517	LRG_304t1:c.2235_2246del12	LRG_304p1:p.(Glu746_Glu749del)
c.2235_2248delinsAATTC	p.E746_A750delinsIP	13550	LRG_304t1:c.2235_2248delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsIlePro)
c.2235_2249del15	p.E746_A750delELREA	6223	LRG_304t1:c.2235_2249del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2235_2251delinsAATTC	p.E746_T751delinsIP	13552	LRG_304t1:c.2235_2251delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIlePro)
c.2235_2252delinsAAT	p.E746_T751delinsI	13551	LRG_304t1:c.2235_2252delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIle)
c.2235_2255delinsAAT	p.E746_S752delinsI	12385	LRG_304t1:c.2235_2255delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsIle)
c.2236_2248delinsAGAC	p.E746_A750delinsRP	12413	LRG_304t1:c.2236_2248delinsAGAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsArgPro)

c.2236_2248delinsCAAC	p.E746_A750delinsQP	13557	LRG_304t1:c.2236_2248delinsCAAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsGlnPro)
c.2236_2250del15	p.E746_A750delELREA	6225	LRG_304t1:c.2236_2250del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2236_2253del18	p.E746_T751delELREAT	12728	LRG_304t1:c.2236_2253del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751del)
c.2236_2256del21	p.E746_S752delELREATS	133189	LRG_304t1:c.2236_2256del21	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752del)
c.2237_2251delinsTTC	p.E746_T751delinsVP	18421	LRG_304t1:c.2237_2251delinsTTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)
c.2237_2251del15	p.E746_T751delinsA	12678	LRG_304t1:c.2237_2251del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsAla)
c.2237_2252delinsT	p.E746_T751delinsV	12386	LRG_304t1:c.2237_2252delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTC	p.E746_T751delinsV	133193	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTTCCT	p.E746_T751delinsVP	52935	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTCCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)
c.2237_2253delinsTTGCT	p.E746_T751delinsVA	12416	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTGCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValAla)
c.2237_2254del18	p.E746_S752delinsA	12367	LRG_304t1:c.2237_2254del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAla)
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384	LRG_304t1:c.2237_2255delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2256delinsTC	p.E746_S752delinsV	18426	LRG_304t1:c.2237_2256delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2257delinsTCT	p.E746_P753delinsVS	18427	LRG_304t1:c.2237_2257delinsTCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Pro753delinsValSer)
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2238_2248delinsGC	p.L747_A750delinsP	12422	LRG_304t1:c.2238_2248delinsGC	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)
c.2238_2252delinsGCA	p.L747_T751delinsQ	12419	LRG_304t1:c.2238_2252delinsGCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2240_2254del	p.L747_T751delLREAT	23571	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2238_2255del18	p.E746_S752delinsD	6220	LRG_304t1:c.2238_2255del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp)
c.2239_2247delTTAAGAGAA	p.L747_E749delLRE	6218	LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGA	LRG_304p1:p.(Leu747_Glu749del)

			G A A	
c.2239_2248TTAAGAGAAG> C	p.L747_A750delinsP	12382	LRG_304t1:c.2239_2248delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)
c.2239_2251delinsC	p.L747_T751delinsP	12383	LRG_304t1:c.2239_2251delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsPro)
c.2239_2252delinsCA	p.L747_T751delinsQ	12420	LRG_304t1:c.2239_2252delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2239_2256delinsCAA	p.L747_S752delinsQ	12403	LRG_304t1:c.2239_2256delinsCAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752delinsGln)
c.2239_2256del18	p.L747_S752delLREATS	6255	LRG_304t1:c.2239_2256del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)
c.2239_2258delinsCA	p.L747_P753delinsQ	12387	LRG_304t1:c.2239_2258delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsGln)
c.2239_2262del24	p.L747_K754delLREATSP K	24970	LRG_304t1:c.2239_2262del24	LRG_304p1:p.(Leu747_Lys754del)
c.2240_2251del12	p.L747_T751delinsS	6210	LRG_304t1:c.2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)
c.2240_2254del15	p.L747_T751delLREAT	12369	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2240_2257del18	p.L747_P753delinsS	12370	LRG_304t1:c.2240_2257del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer)
c.2248_2273delinsCC	p.A750_E758delinsP	26440	LRG_304t1:c.2248_2273delinsCC	LRG_304p1:p.(Ala750_Glu758delinsPro)
c.2250_2264del15	p.T751_A755del	26718	LRG_304t1:c.2250_2264del15	LRG_304p1:p.(Thr751_Ala755del)
c.2252_2275del24	p.T751_E758delTSPKANKE E	23634	LRG_304t1:c.2252_2275del24	LRG_304p1:p.(Thr751_Glu758del)
c.2252_2276delinsA	p.T751_I759delinsN	96856	LRG_304t1:c.2252_2276delinsA	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2252_2277delinsAT	p.T751_I759delinsN	24270	LRG_304t1:c.2252_2277delinsAT	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2253_2276del24	p.S752_I759delSPKANKE I	13556	LRG_304t1:c.2253_2276del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)
c.2254_2277del24	p.S752_I759delSPKANKE	6256	LRG_304t1:c.2254_2277del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)

	I			
Exon 20				
c.2369C>T	p.T790M	6240	LRG_304t1:c.2369C>T	LRG_304p1:p.(Thr790Met)
c.2303G>T	p.S768I	6241	LRG_304t1:c.2303G>T	LRG_304p1:p.(Ser768Ile)
c.2300_2308dup	p.A767_V769dup	12376	LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGC G TGG	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)
c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG	12378	LRG_304t1:c.2310_2311insGGT	LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)
c.2317_2319insCAC	p.H773_V774insH	12377	LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC	LRG_304p1:p.(His773dup)
c.2361G>A	p.Q787Q	1451600	LRG_304t1:c.2361G>A	LRG_304(p1):p.(=)
c.2389T>A	p.C797S	6493937	NM_005228.5:c.2389T>A	NM_005228.5(NP_005219.2):p.(Cys797Ser)
c.2390G>C	p.C797S	5945664	NM_005228.5:c.2390G>C	NM_005228.5(NP_005219.2):p.(Cys797Ser)
Exon 21				
c.2573T>G	p.L858R	6224	LRG_304t1:c.2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)
c.2582T>A	p.L861Q	6213	LRG_304t1:c.2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)

Приложение

Руководство пользователя (краткая инструкция)

“Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах плазмы крови человека, 48 реакций”

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

Содержание

1. Реагенты	3
1.1. Комплект поставки	3
1.2. Внешний вид	3
1.3 Условия хранения и обслуживания медицинского изделия	3
1.4 Предостережения и меры предосторожности	4
2. Необходимое оборудование и материалы	6
2.1 Реагенты	6
2.2. Оборудование	6
Вспомогательные материалы:	6
3. Принцип действия медицинского изделия	7
4. Проведение анализа	8
4.1. Выделение ДНК	8
4.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)	8
4.3. Настройки прибора	10
5. Анализ данных	14
5.1. Этапы анализа, специфические для прибора	14
5.2. Интерпретация результатов	15
5.3. Ограничения анализа	16
6. Приложения	17
6.1 Устранение неисправностей	17
6.2 Мутации, определяемые этим набором	19

1. Реагенты

1.1. Комплект поставки

В состав изделия входит:

Наименование	Количество пробирок	Объем реагента, (мкл)
Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакции 1	1	800
Реакционная смесь 2 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакций 2-7	4	1300
Смесь праймеров / проб	7*	158
Смесь положительных контролей (ПК) [§]	1	615
Краткая инструкция (при необходимости) – 1 шт.**		

* В каждой пробирке содержится особая смесь праймеров для амплификации конкретных мутаций. Содержимое этих пробирок не следует смешивать.

§ Смесь положительных контролей содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором и внутренним контролем.

** Полная инструкция по применению изделия размещена на сайте <https://biovitrum.ru/directions/oncodiagnostics.html>

1.2. Внешний вид

Параметр	Наименование			
	Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакции 1	Реакционная смесь 2 для определения мутации цоДНК (2X) Для реакций 2-7	Смесь праймеров / проб	Смесь положительного контроля (ПК) [§]
Количество (шт)	1	4	7 [#]	1
Объем реагента (мкл)	800	1300	158	615
Цвет крышки пробирки	Синий	Фиолетовый	Коричневый	Красный

* В каждой пробирке содержится особая смесь праймеров для амплификации конкретных мутаций. Содержимое этих пробирок не следует смешивать.

§ Смесь положительного контроля содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором и внутренним контролем.

1.3 Условия хранения и обслуживания медицинского изделия

Срок годности изделия: 12 месяцев.

Гарантийный срок хранения равен сроку годности.

Реакционная смесь 1 для определения мутации цоДНК (2X) для реакции 1;
Реакционная смесь 2 для определения мутации цоДНК (2X) для реакций 2-7: хранить в морозильной камере при температуре от -25 °С до -15 °С. Разморозить один флакон реакционной смеси за один раз и хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 30 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность фермента. Если предполагается использование одного флакона этого реагента в течение более 30 дней, после первого размораживания рекомендуется использовать небольшой объем аликвоты.

Смесь праймеров / проб: хранить в морозильной камере при температуре от -25 °С до -15 °С. После размораживания смесь праймеров/проб сохраняет стабильность в течение 30 дней при хранении при температуре от 2 °С до 8 °С. Если предполагается использование смеси праймеров/проб в течение более 30 дней, для длительного хранения при температуре -25 °С до -15 °С после первого размораживания рекомендуется использовать небольшой объем аликвоты.

Смесь положительных контролей (ПК): хранить при температуре от 2 °С до 8 °С после размораживания.

При транспортировке, осуществлении погрузки и выгрузки изделия должны быть приняты меры, предохраняющие тару от механических повреждений, воздействия атмосферных осадков, горючих материалов и кислот.

При соблюдении условий хранения, эксплуатации и транспортировки, изделие остается стабильным до истечения срока годности, указанного на внешней этикетке.

1.4 Предостережения и меры предосторожности

При контакте с биоматериалом необходимо соблюдать меры предосторожности. Во время работы следует пользоваться перчатками и специальной лабораторной одеждой, так как образцы биоматериала следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любого другого возбудителя инфекции.

Меры предосторожности: при работе с изделием необходимо использовать СИЗ и средства защиты глаз. При попадании в глаза промыть водой и немедленно обратиться к врачу. При проглатывании обратиться к врачу.

ПЦР амплификация отличается высокой чувствительностью к перекрестной контаминации. Очень важно проводить этапы, предшествующие амплификации (т. е. выделение ДНК, приготовление ПЦР реакции) в отдельных местах, в идеале в отдельных помещениях с изолированными системами вентиляции. Особенно важно, чтобы подготовка ПЦР реакции осуществлялась в помещении с положительным давлением воздуха (или в ламинарном шкафу).

Во избежание контаминации между образцами/реагентами при работе с ДНК и реагентами для ПЦР необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности:

- Протирать рабочую зону, пипеточные дозаторы и оборудование, предназначенное для использования вблизи рабочей зоны, дезинфицирующим средством для очистки поверхностей (20%-отбеливатель или аналог), с тем чтобы устранить ДНК и ДНКазы, с последующим использованием 70 % этилового спирта.
- Перед применением каждую пробирку следует перемешать на вортексе.

- Центрифугировать все пробирки перед открытием.
- После перемешивания/смешивания на вортексе каждую микроцентрифужную пробирку открывать осторожно, при этом следует избегать касания внутренней части крышки.
- Во избежание перекрестной контаминации для всех этапов пипетирования следует использовать аэрозоль-устойчивые (с фильтром) наконечники.
- Между всеми переносами жидкостей необходимо менять наконечники пипеток.
- При работе с ДНК/реагентами всегда следует надевать перчатки и менять перчатки между этапами предварительной амплификации и пост-амплификации.

Перемещение пробирок, штативов, пипеток и другого используемого оборудования должно быть от предварительной амплификации до пост-амплификации, а не наоборот.

2. Необходимое оборудование и материалы

2.1 Реагенты

Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК не содержит реагентов для ферментации белка (протеиназа К) или выделения внеклеточной ДНК. Внеклеточная ДНК может быть выделена с использованием Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit” (РЗН 2021/15704). Подробную информацию в отношении выделения вкДНК см. в разделе 4.1.

Для анализа требуется использование воды без нуклеазной активности (для ПЦР).

2.2. Оборудование

Оборудование, необходимое для выполнения анализа:

- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени,
- Центрифуга для ПЦР-плашек,
- Микроцентрифуга для микроцентрифужных пробирок 0,2 мл и 2,0 мл.

Вспомогательные материалы:

- Одноразовые неопудренные перчатки,
- Вортекс,
- Стерильные наконечники пипеток с фильтром,
- Пипетки переменной емкости,
- Оптическая герметизирующая пленка для ПЦР плашек,
- 96-луночные ПЦР плашки, 20 % хлоросодержащий отбеливатель (или эквивалент),
- 70 % этанол,
- Микроцентрифужные пробирки 0,2 мл (дополнительно) и 2,0 мл.

3. Принцип действия медицинского изделия

Набор для определения мутации гена EGFR в цодНК является высокочувствительным набором для определения соматических мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR с использованием 7 реакционных смесей. В основе метода выявления мутаций лежит амплификация мутант-специфичных последовательностей в образцах, которые содержат смесь мутантной ДНК и ДНК дикого типа, с использованием меченных флуорофорами проб. В таблице ниже показан краткий обзор мутаций, определяемых в каждой реакции.

Реакция	Мутация	Репортер
1	Ex19del	CY5
	T790M	FAM
	L858R	ROX
2	C797S	FAM
3	L861Q	FAM
4	S768I	FAM
5	G719X	FAM
6	Ex20InsGGT/CAC	FAM
7	Ex20Ins9 (с.2300 2308dup)	FAM
Все	Внутренний контроль	VIC

Дополнительная информация о выявленных мутациях:

- T790M с и без соседнего ОНП, (rs1050171 (с. G2361A, р. Q787Q), MAF: 0.43 [4])
- G719X — определяет G719A, G719S, G719D и G719C, но не различает их
- Вставки в экзоне 20 — определяет insCAC и insGGT, но не различает их
- C797S — определяет с.2389T>A и с.2390G>C, но не различает их

Этот набор содержит смеси праймеров для определения вышеупомянутых мутаций гена EGFR, а также ген внутреннего контроля. Внутренние контрольные праймеры усиливают бета-2-микроглобулин (B2M) и используются для определения состояния реагентов и содержания достаточного количества ДНК в реакции.

4. Проведение анализа

4.1. Выделение ДНК

Внеклеточная ДНК может быть выделена с использованием Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit” (P3H 2021/15704).

Следует придерживаться процедуры выделения вкДНК в соответствии с протоколом. Для настоящего анализа требуется приблизительно 1,5-15 нг вкДНК/реакцию.

Пробирка(-и) для сбора внеклеточной ДНК ВСТ компании «Штрек» (Streck): плазма из крови, собранной с помощью пробирки(-ок) для сбора внеклеточной ДНК ВСТ компании «Штрек» должна пройти обработку протеиназой К перед выделением внеклеточной ДНК, чтобы обеспечить оптимальный выход ДНК. Отказ от обработки протеиназой К может снизить выделение на 50%.

После выделения ДНК измерить концентрацию с помощью флуоресцентного анализатора (например, Qubit) или количественной ПЦР и, при необходимости, разбавить до 0,5-3 нг/мкл. При концентрации ниже 0,5 нг/мкл следует скорректировать объем воды во время постановки реакции. Выделение ДНК из плазмы дает низкий выход. Обычно при выделении ДНК из плазмы крови приводит к низким концентрациям в образце в пределах 0,2-3 нг/мкл. При выделении из больших объемов плазмы (> 5 мл) можно получить большее количество выделенной ДНК, однако высокие концентрации могут также свидетельствовать о загрязнении геномной ДНК.

Примечание: эта концентрация ДНК основана на флуоресцентном анализе выделенной вкДНК с помощью флуориметра Qubit. В некоторых наборах для выделения вкДНК используется РНК-носитель для усиления связывания нуклеиновых кислот с кремнеземной мембраной. РНК-носитель может способствовать поглощению УФ-излучения на спектрофотометрах, таких как Nanodrop. Поэтому каждая лаборатория должна оценивать оптимальную концентрацию ДНК для анализа. Дополнительную информацию можно получить в руководстве к набору для выделения.

4.2. Подготовка реагентов (для всех приборов)

- Разморозить пробирки смеси праймеров/проб, смеси положительных контролей и 2X реакционного мастер-микса для определения мутаций, на льду.

Каждая пробирка смеси праймеров/проб в наборе содержит достаточное количество реагентов для выполнения исследований на 48 образцах (включая контроли).

- Содержимое пробирки необходимо перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при комнатной температуре.

Примечание: рекомендуется хранить реагенты, контроли и образцы на льду.

Общий объем реакционных смесей для ПЦР составляет 30 мкл/образец. Реакционные смеси для нескольких образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избытком объема, чтобы компенсировать ошибки пипетирования. С каждой реакцией на каждой плашке следует исследовать по 5 мкл положительного контроля.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Компоненты	Объем (мкл)
Реакционная смесь 1 для определения мутаций цоДНК (2X) ИЛИ Реакционная смесь 2 для определения мутаций цоДНК (2X)	15
Смесь праймеров	3
Образец вкДНК (1,5–15 нг)	5*
Вода без нуклеаз	7**

*Объем образца может составлять от 1 до 12 мкл.

**Объем воды должен быть скорректирован в соответствии с объемом образца для конечного объема реакции 30 мкл.

1. Для расчета соответствующих объемов (с допустимым избытком 5%) необходимо приготовить следующие мастер-миксы, используя приведенные ниже формулы. Приготовить отдельный мастер-микс для положительных контролей и NTC (контроля без матрицы, КБМ), если объем образца не равен 5 мкл. Объем воды должен составлять 7 мкл для положительного контроля и КБМ, но должен быть доведен для завершения реакции 30 мкл, если объем образца не равен 5 мкл.

Для реакции 1:

Реагенты	Состав*
Реакционная смесь 1 для определения мутаций цоДНК (2X)	N x 15 мкл x 1,05
Смесь праймера для реакции 1	N x 3 мкл x 1,05
Вода без нуклеаз	N x 7 мкл* x 1,05

N = количество образцов для постановки (включая контроли).

* Объем воды в этой формуле рассчитывается на основе внесения 5 мкл образца на реакцию.

Для реакций 2-7:

Реагенты	Состав*
Реакционная смесь 2 для определения мутаций цоДНК (2X)	N x 15 мкл x 1,05
Смеси праймеров для реакций 2-7	N x 3 мкл x 1,05
Вода без нуклеаз	N x 7 мкл* x 1,05

N = количество образцов для постановки (включая контроли).

* Объем воды в этой формуле рассчитывается на основе внесения 5 мкл образца на реакцию.

2. Аккуратно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при комнатной температуре.
3. Распределить по 25 мкл мастер-микса в каждую лунку плашки. Скорректировать объем мастер-микса, если объем образца не составляет 5 мкл (пример макета плашки см. на рисунке 1).

Ex19del	}	Мастер миксы (1-7)	
T790M			(A)
L858R			
C797S			(B)
L861Q			(C)
S678I			(D)
G719X			(E)
Ex20	}		
InsGGT/CAC			(F)
Ex20			
InsGGT/CAC	(G)		

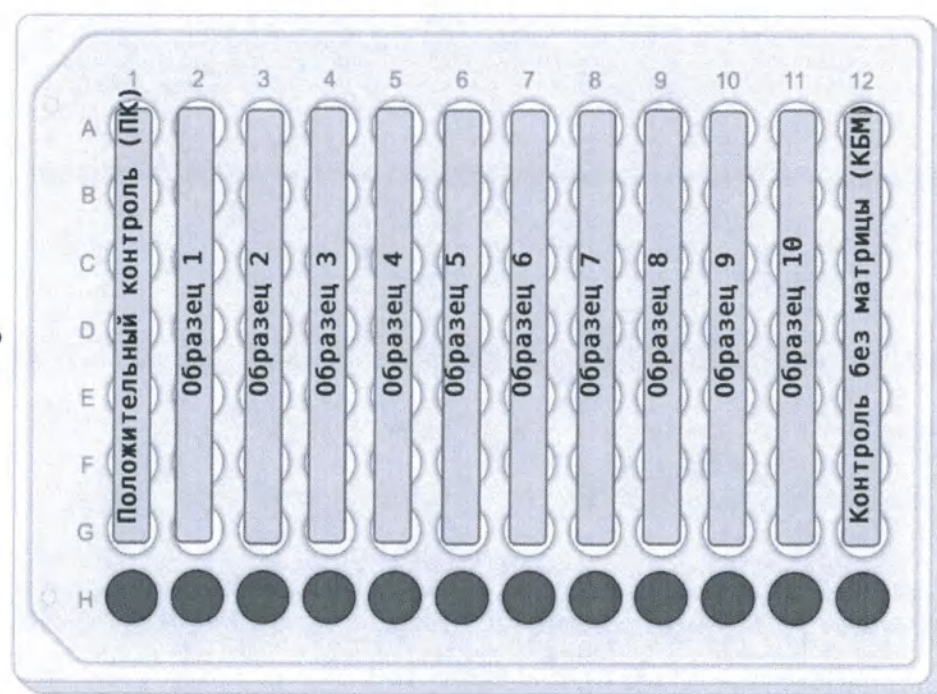


Рисунок 1. Разметка плашки для семи реакций для каждого образца. Одна 96-луночная плашка может вмещать до 10 исследуемых образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ, NTC). Ротор на 72 лунки (не показан) может вмещать до 7 исследуемых образцов, одну смесь положительных контролей и один КБМ. Рекомендуемый макет плашки показан на рисунке выше.

- Добавить 25 мкл мастер-микса для положительного контроля и КБМ в контрольные лунки.
- Добавить по 1–12 мкл образца вкДНК (в зависимости от концентрации) в каждую соответствующую лунку и перемешать пипетированием несколько раз.
- Добавить по 5 мкл положительного контроля и воды (КБМ) в соответствующие лунки и перемешать пипетированием несколько раз.
- Закрыть плашку оптической герметичной пленкой (для плашек) или крышками (для пробирок).
- Необходимо быстро центрифугировать плашку для сбора капель на дне лунок и убедиться в отсутствии пузырьков на дне лунок.

4.3. Настройки прибора

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

- В «Мастере запуска» (Startup Wizard) выбрать «Создать новый эксперимент» (Create New Experiment) и убедиться, что в раскрывающемся списке выбрано CFX96. Нажать ОК.

- Во вкладке «Протокол» (Protocol) окна «Установка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры цикла:

Этап	Температура	Время
1	95 °C	10 мин
2	95 °C	15 сек.
3	58 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
4	Повторить с шага 2 еще 39 раз	
	ЗАВЕРШЕНИЕ	

- После завершения нажать «ОК», чтобы сохранить шаблон протокола. Обратить внимание на расположение сохраненного файла шаблона, чтобы использовать его для последующих анализов. Нажать «Дальше» (Next), чтобы перейти к окну «Настройка» (Setup).
- Изменить объем образца на 30 мкл.
- Установить флуорофоры для всех каналов.
- Нажать «Дальше» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

- В программном обеспечении для проектирования и анализа QuantStudio необходимо выбрать создание нового эксперимента.
- Во вкладке «Свойства» (Properties):
 - Выбрать «96-луночный блок 0,2 мл» (96-Well 0.2 mL block) для «Блока»
 - Выбрать «Сравнительный Ct ($\Delta\Delta Ct$)» (Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)) для «Типа эксперимента»
 - Выбрать «Реагенты TaqMan®» (TaqMan® Reagents) для «Реагентов» (Chemistry)
 - Выбрать «Быстрый» (Fast) для «Режима анализа»
- Во вкладке «Метод» (Method):
 - Изменить объем на 30 мкл.
 - Изменить скорость охлаждения на 2,38°C/сек., а всех другие скорости изменений на 3°C/сек., как показано ниже.
 - Ввести следующие параметры цикла:

Этап	Температура	Время
------	-------------	-------

Этап инкубации		
	Скорость линейного изменения 3 °C/сек.	
1	95 °C	10 мин
Этап ПЦР		
	Скорость линейного изменения 3 °C/сек.	
1	95 °C	15 сек.
	Скорость линейного изменения 2,38 °C/сек.	
2	58 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
Повторить этап ПЦР 40х		
ЗАВЕРШЕНИЕ		

4. Во вкладке «Плашка» (Plate):

- а. Установить Пассивный стандарт на «Отсутствует» (None).
- б. Нажать вкладку «Расширенная настройка» (Advanced Setup) и добавить следующие цели в поле «Цели» (Targets).

Название цели	Краситель	Гаситель флуоресценции
Реакция 1 Ex19Del	CY5	NFQ-MGB
Реакция 1 T790M	FAM	NFQ-MGB
Реакция 1 L858R	ROX	NFQ-MGB
Реакция 1 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 2 C797S	FAM	NFQ-MGB
Реакция 2 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 3 L861Q	FAM	NFQ-MGB
Реакция 3 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 4 S768I	FAM	NFQ-MGB
Реакция 4 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 5 G719X	FAM	NFQ-MGB
Реакция 5 IC	VIC	NFQ-MGB
Реакция 6 Ex20InsGGT/CAC	FAM	NFQ-MGB
Реакция 6 IC	VIC	NFQ-MGB

Реакция 7 Ex20Ins9	FAM	NFQ-MGB
Реакция 7 IC	VIC	NFQ-MGB

5. В поле «Образцы» (Samples) присвоить идентификаторы образцов необходимым лункам.
6. Нажать «Сохранить» (Save), чтобы сохранить выполняемый файл.
7. Открыть файл запуска на приборе QuantStudio™ 5.
8. Убедиться в том, что объем реакционной смеси установлен на 30 мкл, а «Сбор данных» (Data Collection) включен на этапе при температуре 58 °C.
9. Загрузить плашку на прибор и нажать «ЗАПУСТИТЬ АНАЛИЗ» (START RUN).

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

1. Выбрать «Файл» (File) > «Новый» (New), в диалоговом окне нажать вкладку «Расширенные» (Advanced), выбрать «Два этапа» (Two Step) и нажать «Новый» (New).
2. Выбрать 72-луночный ротор, отметить поле «Запирающее кольцо присоединено» (Locking Ring Attached) и нажать «Далее» (Next), затем пропустить «Мастер» (Wizard).
3. Перейти к «Вид» (View) > «Настройки анализа» (Run Settings), ввести 30 мкл для объема реакционной смеси и нажать «ОК».
4. Перейти к «Вид» > «Редактор профиля».
5. Нажать на «Инкубация» (Hold) и ввести 95 °C для «температура инкубации» (Hold Temperature) и 10 минут для «Время инкубации» (Hold Time).
6. Нажать на кнопку «Циклирование» (Cycling), ввести «Этот цикл повторяется» (This cycle repeats) 40 раз, затем ввести следующие параметры «Установленный этап» (Timed Step), нажимая на каждый этап на панели справа:

Этап	Температура (°C)	Время	Сбор данных
Инкубация	95 °C	10 мин	Нет
Установленный этап	95 °C	15 сек.	Нет
Установленный этап	58 °C	30 сек.	Запрос данных для Цикла А по «Зеленому» (Green), «Желтому» (Yellow), «Красному» (Red), «Оранжевому» (Orange)

7. Нажать ОК.

Дополнительно: сохранить эти параметры запуска для последующего использования, выбрав кнопку «Сохранить как» (Save As) в верхней части диалогового окна.

8. Перейдите к «Увеличение» (Gain), ввести следующие параметры:

Примечание: предлагаемые параметры увеличения, возможно, потребуются скорректировать с учетом изменчивости показателей по приборам.

Детектор	Увеличение
----------	------------

Зеленый	6,67
Желтый	10
Оранжевый	5
Красный	5
Crimson	7
HRM	7

9. Загрузить стрипы пробирок в ротор.

10. Перейти к «Анализ» (Run) > «Запустить анализ» (Start Run), затем нажать кнопку «Запустить» (Start), чтобы начать анализ.

Примечание: диалоговое окно «Редактировать образцы» (Edit Samples) открывается сразу после запуска анализа. Введите информацию об образце во время работы прибора или после завершения анализа.

5. Анализ данных

Важно: для пороговых значений может потребоваться корректировка с учетом чувствительности флуоресцентной детекции каждого термоциклера. В качестве исходной точки необходимо использовать перечисленные ниже параметры.

5.1. Этапы анализа, специфические для прибора

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

Проанализировать данные программным обеспечением прибора для ПЦР в режиме реального времени, используя следующие критерии:

- "Ct (Cq) Determination Mode" (Режим определения Ct): "Single Threshold" (Одиночное пороговое значение).
- "Baseline Setting" (Настройки исходных данных): "Baseline Subtracted Curve Fit" (Подбор кривой с вычетом исходных условий).
- Baseline and Threshold (Исходные данные и пороговое значение): заданные пользователем в соответствии с таблицей ниже:

Целевое значение	Реакция	Исходные данные	Пороговое значение
HEX (VIC)	1, 2	3-22	700
	3, 4, 6, 7	3-22	450
	5	3-22	400
FAM	1	3-22	400
	2-7	3-22	300
ROX	1	3-22	400
CY5	1	3-22	300

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

Проанализировать данные программным обеспечением прибора для ПЦР в режиме реального времени, используя следующие критерии:

- Исходные данные и пороговое значение: заданные пользователем в соответствии с таблицей ниже:

Целевое значение	Реакция	Исходные данные	Пороговое значение
HEX (VIC)	1, 2	3-22	55 000
	3, 4, 6, 7	3-22	27 500
	5	3-22	20 000
FAM	1	3-22	65 000

	2-7	3-22	40 000
ROX	1	3-22	35 000
CY5	1	3-22	30 000

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

Проанализировать данные программным обеспечением прибора для ПЦР в режиме реального времени, используя следующие критерии:

- "Dynamic Tube" (Динамическая пробирка): Вкл.
- "Slope Correct" (Поправка наклона): Вкл.
- Удаление выбросов (Outlier Removal): 5 %

Установить следующие пороговые значения:

VIC -желтый	FAM — Зеленый	CY5 — Красный	ROX — Оранжевый
0,1	0,15	0,05	0,05

5.2. Интерпретация результатов

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

1. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый канал на наличие сигнала. ПК должен иметь аналогичные значения Ct для канала VIC для каждой реакции.
2. Выбрать лунки с отрицательным контролем и убедиться в отсутствии сигнала или в том, что значение Ct больше 38,5 для каждого канала.
3. Выбрать лунки с реакциями для каждого исследуемого образца и проверить сигнал для каждого канала. Для интерпретации результатов необходимо использовать таблицу Ct ниже.

Целевое Ct:	VIC (HEX) Ct:	Результат
Ct = любое	$0 < Ct \leq 28$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК.
$38,5 < Ct$; Ct = Н/П	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Отрицательный образец. Повторный анализ не требуется.
$Ct \leq 38,5$	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Положительный для целевого канала: Ex19Del (Cy5), L858R (ROX), все остальные (FAM).
Ct = любое	$Ct > 31,5$; Ct = Н/П	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК.

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени

1. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый детектор на наличие сигнала. ПК должен иметь аналогичные значения Ct для канала VIC для каждой реакции.
2. Выбрать лунки с отрицательным контролем и убедиться в отсутствии сигнала или в том, что значение Ct больше 38,5 для каждого детектора.
3. Выбрать лунки с реакциями для каждого исследуемого образца и проверить сигнал для каждого детектора. Для интерпретации результатов необходимо использовать таблицу Ct ниже.

Целевое Ct:	VIC (HEX) Ct:	Результат
Ct = любое	$0 < Ct < 28$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК.
$38,5 < Ct$; Ct = неопределено	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Отрицательный образец. Повторный анализ не требуется.
$Ct \leq 38,5$	$28 \leq Ct \leq 31,5$	Положительный для целевого канала: Ex19Del (Cy5), L858R (ROX), все остальные (FAM).
Ct = любое	$Ct > 31,5$; Ct = неопределено	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК.

Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q

1. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый канал на наличие сигнала. ПК должен иметь аналогичные значения Ct для канала VIC для каждой реакции.
2. Выбрать лунки с отрицательным контролем и убедиться в отсутствии сигнала или в том, что значение Ct больше 38,5 для каждого канала.
3. Выбрать лунки с реакциями для каждого исследуемого образца и проверить сигнал для каждого канала. Для интерпретации результатов необходимо использовать таблицу Ct ниже.

Целевое Ct:	VIC (желтый) Ct:	Результат
Ct = любое	$0 < Ct < 23,5$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК.
$38,5 < Ct$; Ct = 0	$23,5 \leq Ct \leq 27$	Отрицательный образец. Повторный анализ не требуется.
$Ct \leq 38,5$	$23,5 \leq Ct \leq 27$	Положительный для целевого канала: Ex19Del (Cy5-Red), L858R (ROX-Orange), все прочие (FAM-Green).

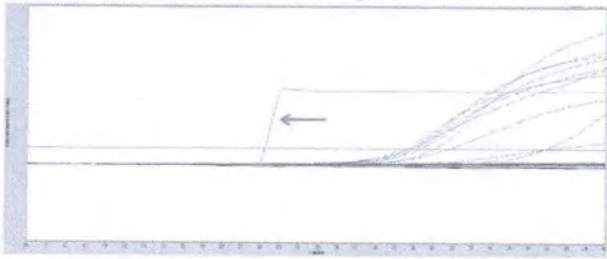
Ct = любое	Ct > 27; Ct = 0	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК.
------------	-----------------	--

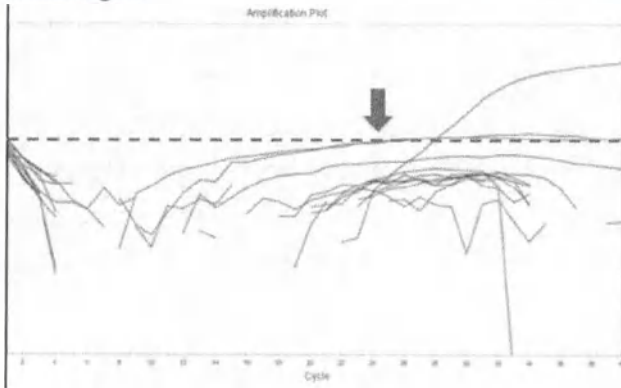
5.3. Ограничения анализа

- Успешное определение целевых мутаций зависит от качества образца и количества имеющейся в наличии амплифицируемой ДНК. Образцы, с избыточной или недостаточной начальной концентрацией должны быть пройти анализ повторно.
- Эффективность этого анализа не была установлена в присутствии редких полиморфизмов.
- Набор для определения мутации гена EGFR в цоДНК предназначен для использования только внеклеточной ДНК. Неизвестно, подходят ли другие типы образцов для исследований с помощью этого набора.
- Цельную кровь необходимо немедленно обработать для выделения внеклеточной ДНК. Хранение крови до выделения приведет к образованию тромбов, которые значительно снизят получение внеклеточной ДНК.
- Перенос реагента из выделения может снизить эффективность амплификации.
- Этот анализ предназначен для использования лабораторным персоналом, обученным методам молекулярной биологии.
- Соблюдение этого протокола необходимо для достижения оптимальных результатов. Отклонения от протокола могут привести к снижению производительности.
- Комбинация реагентов из различных партий наборов не оценивалась. Характеристики эффективности для данной модификации не были установлены.

6. Приложения

6.1 Устранение неисправностей

Проблема:	Решение:
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение C_t выше, чем верхнее пороговое значение C_t , указанное в разделе 8.2 настоящей инструкции.	Если внутренний контрольный сигнал возникает после порогового значения или не возникает, реакция была недостаточно насыщена (недостаточно ДНК), необходимо провести повторный анализ с большим количеством ДНК. Если анализ образца, в котором, точно имеются ингибиторы ПЦР (например, образцы меланомы имеют меланин, который является ингибитором ПЦР), необходимо провести повторный анализ образца с меньшим количеством ДНК или разбавить образец водой в соотношении 1:5 и повторно провести анализ. Если увеличение/уменьшение объема ДНК не решает проблему: 1. Выделить ДНК заново (при возможности). 2. Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. 3. Использовать коммерчески доступный концентрат ДНК.
Целевой и внутренний контрольные сигналы являются отрицательными для положительного контроля (ПК).	Реагенты могут деградировать. Для получения дополнительной информации необходимо связаться со своим поставщиком. Во избежание последующих сбоев в работе реагента необходимо выполнять инструкции по хранению и обращению, которые содержатся в разделе 11 настоящей инструкции.
Аномальный пик на графике усиления образца с помощью прибора Life Technologies.  Fluorescence Флуоресценция (465-510) Cycle Цикл	Аномальная линия пика может быть результатом пузырьков в лунке, содержащей образец. Центрифугировать плашку перед выполнением анализа образца. Аномальный пик может быть ошибкой детекции флуоресценции прибором. Провести повторный анализ другой плашки, чтобы убедиться в отсутствии воспроизводимости. Если пик воспроизводится, необходимо связаться с производителем прибора.
Сигнал в контроле КБМ.	Указывает контаминацию геномной ДНК. Оценить лабораторную процедуру. Предложения по сведению к минимуму загрязнения рабочей поверхности см. в разделе 1.4 настоящей инструкции. При наличии целевого сигнала и (или) сигнала внутреннего контроля, результаты могут давать

	ложно-положительный результат и требуется повторный анализ.
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ при проведении анализа на приборе Life Technologies.  <i>Amplification Plot</i> <i>График амплификации</i> <i>Cycle</i> <i>Цикл</i>	Обеспечить установку ручных пороговых значений, предложенных в настоящей инструкции. Убедиться в том, что сигнал не является истинной амплификацией путем проверки сигнала на многокомпонентном графике (приборы Life Technologies). Если сигнал горизонтальный, то это не истинная амплификация. Если сигнал на многокомпонентном графике является линейным и сигнал пересекает пороговое значение, необходимо отрегулировать базовый конечный цикл. Установить начальный цикл на 3 и остановить: самый ранний цикл VIC Ct (если сигнал по-прежнему пересекает пороговое значение, увеличивать число циклов с шагом 3 до тех пор, пока сигнал не перестанет пересекать пороговое значение).
Образец дикого типа имеет значение Ct целевого сигнала, которое попадает в параметры для статуса положительной мутации.	Если сигнал внутреннего контроля находится в пределах диапазона, тогда образец дикого типа имеет контаминацию положительным образцом, геномной ДНК или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа. Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.

6.2 Мутации, определяемые этим набором

Примечание: эти обозначения последний раз обновлялись в сентябре 2020 года на основе COSMIC v92.

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Cosmic ID	Нуклеотид по HGVS	Белок по HGVS
Exon 18				
c.2155G>A	p.G719S	6252	LRG_304t1:c.2155G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Ser)
c.2155G>T	p.G719C	6253	LRG_304t1:c.2155G>T	LRG_304p1:p.(Gly719Cys)
c.2156G>A	p.G719D	18425	LRG_304t1:c.2156G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Asp)
c.2156G>C	p.G719A	6239	LRG_304t1:c.2156G>C	LRG_304p1:p.(Gly719Ala)
Exon 19				
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2234_2248del15	p.K745_A750delinsT	1190791	LRG_304t1:c.2234_2248del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Ala750delinsThr)
c.2235_2246del12	p.E746_E749delELRE	28517	LRG_304t1:c.2235_2246del12	LRG_304p1:p.(Glu746_Glu749del)
c.2235_2248delinsAATTC	p.E746_A750delinsIP	13550	LRG_304t1:c.2235_2248delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsIlePro)
c.2235_2249del15	p.E746_A750delELREA	6223	LRG_304t1:c.2235_2249del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2235_2251delinsAATTC	p.E746_T751delinsIP	13552	LRG_304t1:c.2235_2251delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIlePro)
c.2235_2252delinsAAT	p.E746_T751delinsI	13551	LRG_304t1:c.2235_2252delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIle)
c.2235_2255delinsAAT	p.E746_S752delinsI	12385	LRG_304t1:c.2235_2255delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsIle)
c.2236_2248delinsAGAC	p.E746_A750delinsRP	12413	LRG_304t1:c.2236_2248delinsAGAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsArgPro)
c.2236_2248delinsCAAC	p.E746_A750delinsQP	13557	LRG_304t1:c.2236_2248delinsCAAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsGlnPro)

c.2236_2250del15	p.E746_A750delELREA	6225	LRG_304t1:c.2236_2250del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2236_2253del18	p.E746_T751delELREAT	12728	LRG_304t1:c.2236_2253del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751del)
c.2236_2256del21	p.E746_S752delELREATS	133189	LRG_304t1:c.2236_2256del21	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752del)
c.2237_2251delinsTTC	p.E746_T751delinsVP	18421	LRG_304t1:c.2237_2251delinsTTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)
c.2237_2251del15	p.E746_T751delinsA	12678	LRG_304t1:c.2237_2251del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsAla)
c.2237_2252delinsT	p.E746_T751delinsV	12386	LRG_304t1:c.2237_2252delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTC	p.E746_T751delinsV	133193	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTTCCT	p.E746_T751delinsVP	52935	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTCCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)

c.2237_2253delinsTTGCT	p.E746_T751delinsVA	12416	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTGCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValAla)
c.2237_2254del18	p.E746_S752delinsA	12367	LRG_304t1:c.2237_2254del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAla)
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384	LRG_304t1:c.2237_2255delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2256delinsTC	p.E746_S752delinsV	18426	LRG_304t1:c.2237_2256delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2257delinsTCT	p.E746_P753delinsVS	18427	LRG_304t1:c.2237_2257delinsTCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Pro753delinsValSer)
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2238_2248delinsGC	p.L747_A750delinsP	12422	LRG_304t1:c.2238_2248delinsGC	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)
c.2238_2252delinsGCA	p.L747_T751delinsQ	12419	LRG_304t1:c.2238_2252delinsGCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2240_2254del	p.L747_T751delLREAT	23571	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2238_2255del18	p.E746_S752delinsD	6220	LRG_304t1:c.2238_2255del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp)
c.2239_2247delTTAAGAGAA	p.L747_E749delLRE	6218	LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGAGAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Glu749del)

c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	p.L747_A750delinsP	12382	LRG_304t1:c.2239_2248delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)
c.2239_2251delinsC	p.L747_T751delinsP	12383	LRG_304t1:c.2239_2251delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsPro)
c.2239_2252delinsCA	p.L747_T751delinsQ	12420	LRG_304t1:c.2239_2252delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2239_2256delinsCAA	p.L747_S752delinsQ	12403	LRG_304t1:c.2239_2256delinsCAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752delinsGln)
c.2239_2256del18	p.L747_S752delLREATS	6255	LRG_304t1:c.2239_2256del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)
c.2239_2258delinsCA	p.L747_P753delinsQ	12387	LRG_304t1:c.2239_2258delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsGln)
c.2239_2262del24	p.L747_K754delLREATSPK	24970	LRG_304t1:c.2239_2262del24	LRG_304p1:p.(Leu747_Lys754del)
c.2240_2251del12	p.L747_T751delinsS	6210	LRG_304t1:c.2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)
c.2240_2254del15	p.L747_T751delLREAT	12369	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2240_2257del18	p.L747_P753delinsS	12370	LRG_304t1:c.2240_2257del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer)
c.2248_2273delinsCC	p.A750_E758delinsP	26440	LRG_304t1:c.2248_2273delinsCC	LRG_304p1:p.(Ala750_Glu758delinsPro)
c.2250_2264del15	p.T751_A755del	26718	LRG_304t1:c.2250_2264del15	LRG_304p1:p.(Thr751_Ala755del)
c.2252_2275del24	p.T751_E758delTSPKANKE	23634	LRG_304t1:c.2252_2275del24	LRG_304p1:p.(Thr751_Glu758del)
c.2252_2276delinsA	p.T751_I759delinsN	96856	LRG_304t1:c.2252_2276delinsA	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2252_2277delinsAT	p.T751_I759delinsN	24270	LRG_304t1:c.2252_2277delinsAT	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2253_2276del24	p.S752_I759delSPKANKEI	13556	LRG_304t1:c.2253_2276del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)
c.2254_2277del24	p.S752_I759delSPKANKEI	6256	LRG_304t1:c.2254_2277del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)
Exon 20				
c.2369C>T	p.T790M	6240	LRG_304t1:c.2369C>T	LRG_304p1:p.(Thr790Met)
c.2303G>T	p.S768I	6241	LRG_304t1:c.2303G>T	LRG_304p1:p.(Ser768Ile)

c.2300_2308dup	p.A767_V769dup	12376	LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGC G TGG	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)
c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG	12378	LRG_304t1:c.2310_2311insGGT	LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)
c.2317_2319insCAC	p.H773_V774insH	12377	LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC	LRG_304p1:p.(His773dup)
c.2361G>A	p.Q787Q	1451600	LRG_304t1:c.2361G>A	LRG_304(p1):p.(=)
c.2389T>A	p.C797S	6493937	NM_005228.5:c.2389T>A	NM_005228.5(NP_005219.2):p.(Cys797Ser)
c.2390G>C	p.C797S	5945664	NM_005228.5:c.2390G>C	NM_005228.5(NP_005219.2):p.(Cys797Ser)
Exon 21				
c.2573T>G	p.L858R	6224	LRG_304t1:c.2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)
c.2582T>A	p.L861Q	6213	LRG_304t1:c.2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)

[Перевод с английского языка на русский язык]

[Перевод надписей и нотариального заверения на документе «Инструкция по применению медицинского изделия „Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах плазмы крови человека, 48 реакций“», представленном на русском языке.]

13 декабря 2021 г.

/подпись/

НОТАРИАЛЬНОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ ШТАТА КАЛИФОРНИЯ

§ 1189 ГРАЖДАНСКОГО КОДЕКСА

Нотариус или иное должностное лицо, заполняющее данное удостоверение, подтверждает только личность лица, подписавшего документ, к которому прилагается настоящее удостоверение, и не удостоверяет верность, точность или действительность упомянутого документа.

Штат Калифорния)
Округ Лос-Анджелес)

13 декабря 2021 г. ко мне, _____
Дата

Митре Н. Катц, нотариусу,
Указать имя и должность должностного лица

лично явился _____

Мэтью Минковски,

Имя (имена) подписавшего(-их) лица (лиц)

который подтвердил мне на основании достаточных доказательств, что он является лицом, чья подпись проставлена на указанном документе, а также что он подписал указанный документ в качестве правомочного лица, и что его подпись на указанном документе означает, что указанный документ подписан физическим или юридическим лицом, от имени которого действовало указанное лицо.

[Печать:

Митра Н. Катц
Округ Лос-Анджелес, Калифорния
Нотариус
Лицензия № 2226229

Моя лицензия действительна до
23 декабря 2021 г.
NSP1]

Поставить нотариальную печать

Я удостоверяю под СТРАХОМ НАКАЗАНИЯ ЗА
ЛЖЕСВИДЕТЕЛЬСТВО в соответствии с
законодательством штата Калифорния, что изложенное
выше является точным и верным.

В СВИДЕТЕЛЬСТВО ЧЕГО я ставлю собственноручную
подпись и официальную печать.

Подпись /подпись/
Подпись нотариуса

СВЕДЕНИЯ, УКАЗЫВАЕМЫЕ ПО ВЫБОРУ

Указание данной информации может предотвратить изменение документа или попытки
повторного приложения данного бланка к другому документу в мошеннических целях.

Характеристика прилагаемого документа

Название или тип документа: _____ Инструкция по применению
медицинского изделия

Дата документа: _____, кол-во страниц: _____

Дополнительное(-ые) подписавшее(-ие) лицо(-а): _____

Должностное(-ые) положение(-я), указанное(-ые) подписавшим(-и) лицом(-ами)

Имя подписавшего лица: _____ Имя подписавшего лица: _____

☐ Должностное лицо корпорации — ☐ Должностное лицо корпорации —
должность(-и): _____ должность(-и): _____

☐ Партнер — ☐ с ограниченной ☐ Партнер — ☐ с ограниченной
ответственностью ☐ полный ответственностью ☐ полный

☐ Физическое лицо ☐ Физическое лицо

☐ Доверенное лицо ☐ Доверенное лицо

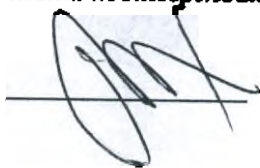
☐ Доверительный собственник ☐ Доверительный собственник

☐ Законный представитель или арбитражный ☐ Законный представитель или арбитражный
управляющий управляющий

☐ Прочее: _____ ☐ Прочее: _____

Подписавшее лицо представляет интересы: _____ Подписавшее лицо представляет интересы: _____

Текст данного документа перевёл переводчик Рахимкулов Эльдар Серкалиевич. Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является правильным, точным и полным.



Российская Федерация
Город Москва

Семнадцатого февраля две тысячи двадцать второго года

Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Рахимкулова Эльдара Серкалиевича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-д/77-2022

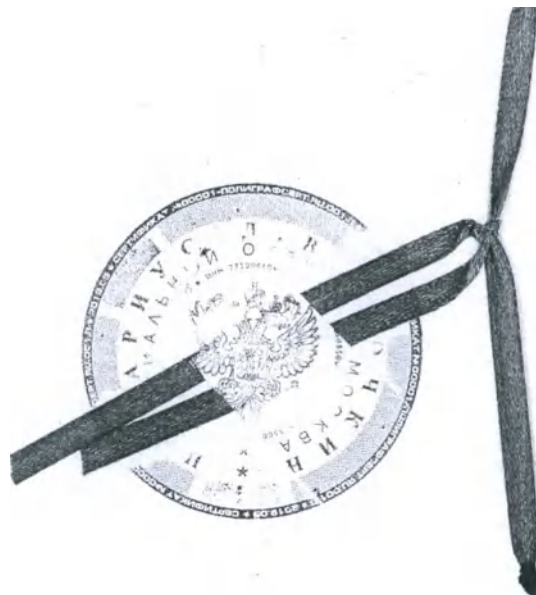
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.



Д.В. Точкин

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 67 лист(а)(ов)

Нотариус



Российская Федерация
Город Москва

Восемнадцатого февраля две тысячи двадцать второго года
Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы,
свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2022-
Уплачено за совершение нотариального действия: 4080 руб.



Д.В. Точкин

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью __68__ лист(а)(ов)

Нотариус

