

70
КОПИЯ

УТВЕРЖДАЮ

ЭнтроГен, Инк.

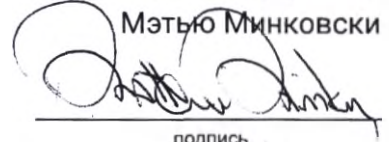
20950 Ворнер центр Лн.,

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 PIK3CA методом
полимеразной цепной реакции в режиме
реального времени в образцах пациентов
фиксированных в формалине и залитых в
парафин, 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

REF

PI3K-RT48

Набор реагентов для in vitro диагностики наличия мутаций гена PIK3CA методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 48 реакций

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-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)
Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени	ФСЗ 2009/03609 от 06.06.2016 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

Инструкция по применению — версия 1.2

Примечание: Далее по тексту также: Набор для определения соматических мутаций гена PIK3CA, Набор PIK3CA-RT48, Набор для анализа мутаций гена PIK3CA

Содержание

1. Назначение	3
2. Реагенты и приборы	4
2.1 Содержимое упаковки	4
2.2 Обращение и хранение	4
2.3 Стабильность изделия	5
2.4 Контроль качества	5
2.5 Предостережения и меры предосторожности	5
3. Необходимые реагенты и оборудование	6
3.1 Реагенты	6
3.2 Оборудование	6
4. Описание набора	7
4.1 Введение	7
4.2 Информация о настоящем анализе	7
5. Инструкция по применению	8
5.1 Выделение ДНК	8
5.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)	8
5.3 Настройки прибора	10
6. Анализ данных	13
6.1 Интерпретация результатов	13
7. Рабочие и диагностические характеристики изделия	16
8. Приложения	17
8.1 Диагностика и устранение неисправностей	17
9. Справочная литература	19
10. Используемые символы	20
12. Примечание для покупателя	22
12.1 Условия гарантии	22
12.2 Ограничение гарантийных обязательств	22
12.3 Интеллектуальная собственность	23
13. Контактные данные	24
Приложение	25

1. Назначение

Изделие предназначено для определения соматических мутаций гена PIK3CA в геномной ДНК человека E542K, E545K, E545Q, H1047R, H1047L.

Таблица 1. Перечень мутаций гена PIK3CA, определяемых настоящим набором

Мутация	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Cosmic ID	Номер праймера
E542K	c.1624G>A	Глутаминовая кислота (E) на лизин (K)	760	1
E545K	c.1633G>A	Глутаминовая кислота (E) на лизин (K)	763	2
E545Q	c.1633G>C	Глутаминовая кислота (E) на глутамин (Q)	27133	3
H1047R	c.3140A>G	Гистидин (H) на аргинин (R)	775	4
H1047L	c.3140A>T	Гистидин (H) на лейцин (L)	776	5

Предупреждение: Любое непредусмотренное применение данного набора и/или модификация компонентов аннулирует ответственность компании «ЭнтроГен» (EntroGen).

2. Реагенты и приборы

2.1 Содержимое упаковки

Данный набор содержит следующие компоненты, которые являются достаточными для проведения 48 реакций на основе смеси праймеров/проб, включая все контрольные пробы и образцы:

Наименование	Количество пробирок	Объем пробирки (мкл)
Реакционная смесь для определения мутации (2X)	3	1300
Смесь праймеров/проб* РІКЗСА	5	300
Смесь положительных контролей РІКЗСА**	1	200
Краткая инструкция (при необходимости)***		

*Смесь положительного контроля содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором на фоне геномной ДНК дикого типа. Соотношение мутации к дикому типу составляет примерно 1:1.

Каждая пробирка содержит особую смесь праймеров/проб для обнаружения предусмотренной мутации гена РІКЗСА. Содержимое этих пробирок **не следует смешивать.

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

2.2 Обращение и хранение

Срок годности изделия: 12 месяцев.

Гарантийный срок хранения равен сроку годности.

Набор поставляется с хладоэлементами. Содержимое партии после получения следует хранить в низкотемпературном холодильнике с неомержающим испарителем при температуре от -25 °С до -15 °С. Для длительного хранения (>3 недель) Реакционный мастер-микс (2 шт.) необходимо хранить при температуре от -25 °С до -15 °С. Хранить при температуре от 4 °С до 8 °С в случае неиспользования смеси в течение 3 недель. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания, т.к. это снижает эффективность фермента. Хранить все другие реагенты при температуре от -25 °С до -15 °С.

- Все невскрытые компоненты следует хранить в оригинальных контейнерах.
- Смеси праймеров/проб следует постоянно защищать от света во избежание обесцвечивания флуоресцентных красителей.
- Перед открытием пробирки необходимо центрифугировать.
- Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована.

Хранение и обращение с компонентами данного изделия в условиях, отличных от вышеописанных, могут повлиять на эффективность данного анализа и отрицательно повлиять на результаты.

2.3 Стабильность изделия

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.

2.4 Контроль качества

Компоненты настоящего изделия производятся в соответствии со стандартом cGMP (текущая надлежащая производственная практика). Для обеспечения наивысшего качества продукции cGMP требует обширной валидации и документирования производственных процедур.

Сертификат анализа для каждой серии предоставляется по запросу.

2.5 Предостережения и меры предосторожности

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:

- Протереть рабочую зону 70% этиловым спиртом.
- Обработать пипетки и оборудование, находящиеся в зоне использования, 70% этиловым спиртом.
- После перемешивания/смешивания на вортексе каждую микроцентрифужную пробирку открывать осторожно, следует избегать касания внутренней части крышки, т.к. внутри крышки могут быть капли или жидкость.
- 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, предшествующими амплификации, и пост-амплификации.
- Перемещение пробирок, штативов, пипеток и другого используемого оборудования должно идти в направлении от пре-амплификации до пост-амплификации, и никогда наоборот.

3. Необходимые реагенты и оборудование

3.1 Реагенты

Набор не содержит реагенты для выделения геномной ДНК из образцов опухоли. Геномная ДНК из замороженных или фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit” (РЗН 2021/15704).

Для анализа требуется использование воды без нуклеаз (вода для ПЦР).

3.2 Оборудование

Оборудование, необходимое для выполнения анализа:

- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени
- Одноразовые неопудренные перчатки
- Пипетки переменной емкости
- Стерильные наконечники пипеток с фильтром
- Вортекс
- Настольная центрифуга для микроцентрифужных пробирок 0,2 мл и 2,0 мл
- 96-луночные ПЦР плашки (совместимость плашек см. в руководстве к прибору для ПЦР)
- Оптическая герметизирующая пленка для ПЦР плашек
- Микроцентрифужные пробирки 0,2 мл (дополнительно) и 2,0 мл

4. Описание набора

4.1 Введение

Ген PIK3CA кодирует каталитическую субъединицу p110 α фосфатидилинозитол-3-киназы класса IA (PI3K). Было обнаружено, что различные типы рака характеризуются соматическими мутациями гена PIK3CA, которые приводят к конститутивной активации пути АКТ и способствуют клеточному росту. [1] Мутации гена PIK3CA также ассоциируются со сниженным ответом на терапию, плохой выживаемостью без прогрессирования и общей выживаемостью при метастатическом колоректальном раке с отсутствием мутации гена KRAS (дикий тип) при лечении моноклональными антителами анти-EGFR. [2] Мутации гена PIK3CA возникают в приблизительно 40% гормон-рецептор положительном раке молочной железы, раке молочной железы с отрицательным статусом рецепторов 2-го типа человеческого эпидермального фактора роста (HER2). Лечение специфичными ингибиторами PI3K α , такими как алпелисиб, показали длительную выживаемость без прогрессирования у пациентов распространенным раком молочной железы с мутацией гена PIK3CA, HR-положительном, отрицательном статусе HER2. [3]

4.2 Информация о настоящем анализе

Набор для анализа мутаций гена PIK3CA является высокочувствительным набором для обнаружения соматических мутаций. Анализ работает путем амплификации мутант-специфичных последовательностей в образцах, которые содержат смесь мутантной ДНК и ДНК дикого типа и использует флуоресцентные пробы для обнаружения. Мутации, определяемые настоящим набором, перечислены в Таблице 1 (страница 3). Ниже приводится краткий список мутаций, определяемых в каждой реакции.

- E542K
- E545K
- E545Q
- H1047R
- H1047L

В каждой реакции содержатся наборы праймеров и проб для определения мутаций гена PIK3CA, а также внутреннего контрольного гена. Внутренние контрольные праймеры амплифицируют несвязанный ген, который используется для определения состояния реагентов и содержания достаточного количества ДНК в реакции.

5. Инструкция по применению

5.1 Выделение ДНК

Геномная ДНК из замороженных или фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit” (P3H 2021/15704).

Следует придерживаться процедуры выделения геномной ДНК в соответствии с протоколом производителя. Достаточное количество ДНК может быть выделено из зафиксированных формалином и залитых в парафин блоков (FFPE) или свежих замороженных срезов (около 2-10 мкг). Для настоящего анализа требуется примерно 50 нг ДНК для каждого образца на анализ (10 нг/реакция).

После выделения концентрацию ДНК измеряют с помощью флуоресцентного анализатора (например, Qubit) и доводят до концентрации 10 нг/мкл. Если концентрация ниже 10 нг/мкл, то её компенсируют изменением объема воды во время постановки реакции.

5.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)

- Разморозить все смеси праймеров/проб, смесь положительного контроля и 2X реакционные смеси для ПЦР.
- Центрифугировать пробирки в течение 10 секунд со скоростью 10 000 об/мин. при комнатной температуре.

Общий объем реакционных смесей для ПЦР в лунке составляет 30 мкл/образец. Реакционные смеси для исследуемых образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избыточным объемом, чтобы компенсировать потери пипетирования.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Компоненты	Объем
2X Реакционная смесь для ПЦР	15 мкл
Смесь праймеров	6 мкл
Образец ДНК (10 нг/мкл)	1 мкл
Вода без нуклеаз	8 мкл

Примечание: может потребоваться больший объем ДНК, если концентрация меньше, чем 10 нг/мкл. В таких случаях можно скорректировать объем воды (уменьшить) с учетом поддержания требуемого общего объема.

- Приготовить мастер-микс для каждого образца следующим образом (расчет проведен с допустимым избытком 5 %):

Реагенты	Конечная концентрация	Объем для каждого образца
----------	-----------------------	---------------------------

2X Реакционный мастер-микс	1X	78,8 мкл
Смесь положительных контролей ДНК, вода или образец ДНК (10 нг/мкл)	10 нг	5,25 мкл
Вода без нуклеаз		42 мкл

2. Перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 10 секунд со скоростью 8 500 об/мин. при комнатной температуре.
3. Добавить по 24 мкл мастер-микса в каждую лунку, как показано ниже.
4. Добавить 6 мкл каждой смеси праймеров/проб в соответствующую лунку, как показано ниже.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC E542K	PC E545K	PC E545Q	PC H1047R	PC H1047L		S7 E542K	S7 E545K	S7 E545Q	S7 H1047R	S7 H1047L	
B	NTC E542K	NTC E545K	NTC E545Q	NTC H1047R	NTC H1047L		S8 E542K	S8 E545K	S8 E545Q	S8 H1047R	S8 H1047L	
C	S1 E542K	S1 E545K	S1 E545Q	S1 H1047R	S1 H1047L		S9 E542K	S9 E545K	S9 E545Q	S9 H1047R	S9 H1047L	
D	S2 E542K	S2 E545K	S2 E545Q	S2 H1047R	S2 H1047L		S10 E542K	S10 E545K	S10 E545Q	S10 H1047R	S10 H1047L	
E	S3 E542K	S3 E545K	S3 E545Q	S3 H1047R	S3 H1047L		S11 E542K	S11 E545K	S11 E545Q	S11 H1047R	S11 H1047L	
F	S4 E542K	S4 E545K	S4 E545Q	S4 H1047R	S4 H1047L		S12 E542K	S12 E545K	S12 E545Q	S12 H1047R	S12 H1047L	
G	S5 E542K	S5 E545K	S5 E545Q	S5 H1047R	S5 H1047L		S13 E542K	S13 E545K	S13 E545Q	S13 H1047R	S13 H1047L	
H	S6 E542K	S6 E545K	S6 E545Q	S6 H1047R	S6 H1047L		S14 E542K	S14 E545K	S14 E545Q	S14 H1047R	S14 H1047L	

Примечание: каждый образец исследуется в пяти реакциях. Одна 96-луночная ПЦР плашка может вместить до 14 неизвестных образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ). 72-луночный ротор (не показан) может вместить до 12 неизвестных образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ). Рекомендуемый макет плашки показан выше.

5. Перемешать смесь пипетированием несколько раз.
6. Заклеить плашку оптической герметичной пленкой.
7. Быстро центрифугировать плашку, чтобы капли на стенках стекла вниз.

5.3 Настройки прибора

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

Создать новый эксперимент: «Файл» (File) > «Новый эксперимент» (New Experiment) > «Расширенная настройка» (Advanced Setup).

Раздел «Свойства эксперимента»

- 1. Ввести название эксперимента и выбрать прибор (QuantStudio 5).
- 2. Выберите Количественное определение (Quantitation) > - Сравнительный СТ (ΔΔСТ) (Comparative CT (ΔΔСТ)) для типа эксперимента.
- 3. Выбрать реагенты TaqMan® и стандарт для типа реагентов и скорости нарастания (Ramp speed), соответственно.
- 4. Нажать «Настройка плашки» (Plate Setup) в левом меню навигации.

Раздел «Мишени и Образцы»

- 5. Нажать «Добавить новую мишень» (Add New Target) и установить следующие значения, показанные в таблице ниже:

Наименование	Флуорофор	Гаситель флуоресценции
IC	VIC	Без флуоресценции (NFQ)
PIK3CA	FAM	Без флуоресценции (NFQ)

- 1. Добавить «РС» (ПК) для смеси положительных контролей, «NTC» (КБМ) для контроля без матрицы (вода), а также наименования/номера неизвестных образцов.
- 2. Добавить образцы и детекторы к плашке, как показано на рисунке на предыдущей странице.
- 3. Установить Пассивный референсный краситель (только на некоторых приборах) на «ОТСУТСТВУЕТ».
- 4. Создать новый метод анализа со следующими параметрами и выполнить эксперимент.

Температура	Время	Циклы	Сбор данных
95 °C	10 мин	1	
95 °C	10 сек.	40	
60 °C	30 сек.		FAM, VIC

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». В поле должно быть указано два цикла; «Инкубация» (Hold) и «Циклирование» (Cycling).
5. Ввести следующие параметры этапа, нажав на каждый этап на панели справа:

Инкубация	95 °C	10 минут	Не требуется
Циклирование	95 °C	10 секунд	Не требуется
Циклирование 40 циклов	60 °C	30 секунд	Запрос данных для Цикла А по «Зеленой» (Green), «Желтой» (Yellow)

6. Нажать ОК. Также можно сохранить этот шаблон для дальнейшего использования с помощью кнопки «Сохранить как» (Save as) в верхней части диалогового окна.
7. Перейти к «Вид» (View) > «Оптимизация сигнала» (Gain Optimization), из раскрывающегося списка «Настройки каналов» (Channel Settings) выбрать «Все каналы» (All Channels) и отметить поле рядом с «Провести оптимизацию перед 1-м сбором данных» (Perform Optimization Before 1st Acquisition). Примечание: этот этап необходимо выполнять только один раз для каждой новой серии реагентов. После определения параметров увеличения необходимо использовать те же самые параметры для последующих анализов с реагентами с тем же номером серии.
8. Загрузить стрипы с пробирками в ротор.
9. 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. Информацию об образцах можно вводить во время работы прибора или после завершения анализа.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени

1. В «Навигации» (Navigator) необходимо нажать «Новый» (New), чтобы запустить новый эксперимент LightCycler® 480.
2. Выбрать «Двухцветная гидролизуемая проба/UPL проба» (Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe) для «Формата определения» (Detection Format).
3. Нажать «Настроить» (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
4. Изменить реакционный объем на 30 мкл.
5. Добавить следующую программу и целевые температуры:

Наименование программы	Циклы	Режим анализа
Денатурация	1	Нет
Цикл	40	Количественная оценка

Для этапа денатурации:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Длительность (чч:мм:сс)
95	Нет	00:10:00

Для этапа циклирование:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Длительность (чч:мм:сс)	Скорость линейного изменения (°C/сек.)
95	Нет	00:00:10	4.4
60	Однократное	00:00:30	2.2

6. Перейти к «Редактору образца» (Sample Editor) и выбрать «Относительный количественный анализ» (Rel Quant) в качестве «Рабочего процесса» (Workflow), затем назначить образцы для плашки.
7. Выбрать кнопку «Эксперимент» (Experiment) и нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы сохранить файл и начать анализ.

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 «Настройка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры программы.

Этап	Температура	Время
1	95 °C	10 мин
2	95 °C	10 сек.
3	60 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
4	Повторить с шага 2 еще 39 раз	
	КОНЕЦ	

3. Изменить объем образца на 30 мкл.
4. После завершения нажать «ОК», чтобы сохранить шаблон протокола. Обратить внимание на расположение сохраняемого файла шаблона, чтобы использовать его для последующих анализов. Нажать «Дальше» (Next), чтобы перейти к окну «Настройка плашки» (Plate Setup).
5. Во вкладке «Плашка» (Plate) нажать «Создать новый» (Create New), чтобы создать макет плашки.
6. Нажать на кнопку «Выбрать флуорофоры» (Select Fluorophores) и отметить поля рядом с FAM и VIC. Все другие поля должны остаться не отмеченными. Нажать ОК.
7. Ввести наименования образцов, как показано выше на макете плашки.
8. Выбрать каждый образец по отдельности (начиная с первого неизвестного образца) и напечатать наименование образца в поле «Имя образца» (Sample Name). После этого нажать клавишу «Ввод» (Enter) на клавиатуре, чтобы записать наименование образца. Выполнить этот этап для каждого образца.
9. Нажать на «Настройки» (Settings) и выбрать тип используемой плашки (например, BR Белая (White) или BR Прозрачная (Clear)).
10. После этого нажать кнопку ОК, чтобы сохранить макет плашки.
11. Нажать «Дальше» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

6. Анализ данных

6.1 Интерпретация результатов

Важно: пороговые значения могут корректироваться с учетом индивидуальных флуоресцентных характеристик амплификатора.

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

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

- Manual threshold (Ручное пороговое значение): FAM: 100 000; VIC: 20 000
- Auto baseline (Автоматические исходные данные)

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:

- Динамическое изменение кривизны (Dynamic Tube): вкл.
- Поправка наклона (Slope Correct): вкл.
- Пороговое значение зеленого канала (Green Channel Threshold): 0,06
- Пороговое значение желтого канала (Yellow Channel Threshold): 0,06

Компенсация шумов может быть установлена на уровне от 2% до 5% для удаления фоновых сигналов, которые могут препятствовать анализу.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени.

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

- Abs Quant/2nd Derivative Max (Абсолютное количественное определение/максимальная 2-я производная) для всех образцов

Примечание: использовать Abs Quant/Fit Point (Абсолютную количественную оценку/Базовые точки) для всех образцов для определения значения Ср сигналов выше 35.0.

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): Auto Calculated (Рассчитано автоматически).

Приведенные ниже инструкции применимы для всех приборов.

1. Проверьте график амплификации внутреннего контроля (IC/Yellow/VIC) каждого образца, выбрав все 5 лунок реакционной плашки. Ст должен быть аналогичным во всех 5 реакциях с каждым образцом. Однако данное значение в большей степени зависит от количества амплифицируемой ДНК в каждой реакции и может различаться в отдельных FFPE образцах в силу фрагментации ДНК. Нормальный диапазон для IC Ст для FFPE образцов перечислен в таблице ниже.

2. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый канал FAM на наличие сигнала.

3. Выбрать все 5 реакционных лунок с каждым неизвестным образцом поочередно и проверить каналы FAM на наличие сигнала. Отсутствие сигнала означает, что образец не содержит мутацию, соответствующую выбранному каналу. Поскольку FFPE образцы могут содержать разное количество опухолевых клеток, значения Ст для образцов с мутацией могут значительно различаться. Образец с мутацией с более высоким содержанием опухолевых ДНК будет иметь меньшие значения Ст, в то время как образцы с мутацией с более низким содержанием опухолевых ДНК будут иметь большие значения Ст.

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

FAM®/зеленый Ст:	VIC/желтый Ст:	Статус мутации
любой	$< 24,5$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24,5–27,5).
≤ 35	$24,5 \leq VIC \leq 27,5$	Положительный
> 35 или отсутствует		Отрицательный
любой	$> 27,5$	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24,5–27,5).

Для всех остальных приборов:

FAM®/зеленый Ст:	VIC/желтый Ст:	Статус мутации
≤ 38	≥ 25	Положительный
≤ 38	≤ 25	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25–31).
$\geq 38,01$ или отсутствует	≤ 31	Отрицательный
$\geq 38,01$ или отсутствует	≥ 31	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25–31).

7. Рабочие и диагностические характеристики изделия

Рабочие характеристики

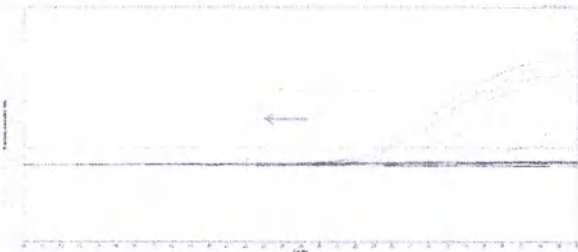
Характеристика	Реакция	Мутация	Репортер	Значение
Предел обнаружения	1	E542K	FAM	1,5 %
	2	E545K	FAM	1,2 %
	3	E545Q	FAM	1,5 %
	4	H1047R	FAM	1,7 %
	5	H1047L	FAM	1,5 %
Характеристика	Реакция	Мутация	Значение	
Аналитическая специфичность	1	E542K	Образцы считали положительный статус мутации, если соответствующая реакция давала значение Ct FAM ≤38.0 с диапазоном Ct VIC от 25.0 до 31.0. Значение VIC Ct ниже 25.0 считается избыточной начальной концентрацией, а значение выше 31.0 – недостаточной начальной концентрацией, и оба условия дают неверный результат.	
	2	E545K		
	3	E545Q		
	4	H1047R		
	5	H1047L		
Характеристика	Реакция	Мутация	Значение	
Прецизионность	1	E542K	Для всех приборов, кроме Rotor-Gene Q: FAM ≤ 38 и VIC ≥ 25	
	2	E545K		
	3	E545Q	Для Rotor-Gene Q: FAM ≤ 35 и 24,5 ≤ VIC ≤ 27,5 CV ≤ 5 %	
	4	H1047R		
	5	H1047L		

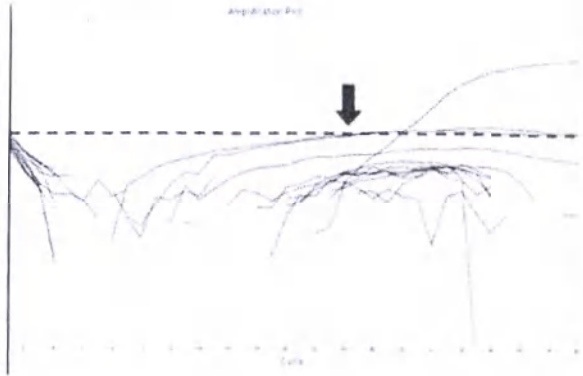
Диагностические характеристики

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

8. Приложения

8.1 Диагностика и устранение неисправностей

Проблема:	Раствор:
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение Ct выше, чем верхнее пороговое значение Ct, указанное в разделе 6.	- Если положительный целевой сигнал (например, FAM) возникает до порогового значения Ct, значит образец является мутантным (положительный статус). См. таблицу Ct в разделе 6. - Если целевой 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: - Выделить ДНК заново (при возможности). - Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. - 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 2.2 ИПП.
Аномальный пик на графике усиления образца с помощью прибора Life Technologies.  <i>Fluorescence (465-510) Флуоресценция (465-510)</i> <i>Cycle Цикл</i>	- 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.	- Отображается контаминация. Оценить лабораторную процедуру. Предложения по сведению к минимуму загрязнения рабочей поверхности см. в разделе 2.5 настоящей инструкции. - При наличии только сигнала внутреннего контроля и значении Ct > 36 результаты могут быть использованы для определения статуса мутации образца. - При наличии только целевого сигнала результаты могут давать ложно-положительный результат и требуется повторный анализ.

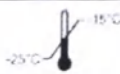
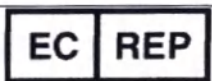
	При наличии целевого сигнала и сигнала внутреннего контроля результаты могут давать ложно-положительный результат и требуется повторный анализ.
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ при проведении анализа на приборе Life Technologies.  Amplification Plot Cycle График амплификации Цикл	- 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 мутантным образцом или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа. - Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.

9. Справочная литература

1. Самюэльс Я. и соавт. Мутировавший ген PIK3CA способствуют клеточному росту и инвазии раковых клеток человека. Раковая клетка. 2005 г.; 7:561–73 (Samuels Y. et al., Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. Cancer Cell. 2005;7:561–73).
2. Хуан Л. и соавт. Терапия метастатического колоректального рака анти — EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) моноклональными антителами: мета-анализ воздействия мутаций гена PIK3CA у пациентов с геном KRAS дикого типа. Архивы медицинской науки, 24 февраля 2014 г.; 10(1):1-9 (Huang L. et al., Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody-based therapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of the effect of PIK3CA mutations in KRAS wild-type patients. Arch Med Sci. 2014 Feb 24;10(1):1-9).
3. Андре Ф. и соавт. Алпелисиб в отношении гормон-рецептор-положительного распространенный рака молочной железы с мутировавшим геном *PIK3CA*, Медицинский журнал Новой Англии, 2019 г.; 380:1929-1940 (Andre F. et al., Alpelisib for *PIK3CA*-Mutated, Hormone Receptor Positive Advanced Breast Cancer. N Eng J Med. 2019; 380:1929-1940).

10. Используемые символы

Приведенные ниже символы, используемые на маркировке и упаковке данного изделия, отвечают требованиям гармонизированного стандарта EN980.

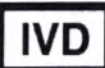
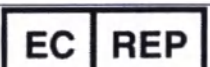
Символ	Значение
	Номер по каталогу
	Температурный диапазон
	Знак CE
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии
	Использовать до
	Изготовитель
	Дата производства
	Не использовать, если упаковка повреждена
	Беречь от солнечных лучей
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Беречь от влаги
	Уполномоченный представитель в Европейском Сообществе

11. Комплект поставки

Комплект поставки медицинского изделия:

10. Используемые символы

Приведенные ниже символы, используемые на маркировке и упаковке данного изделия, отвечают требованиям гармонизированного стандарта EN980.

Символ	Значение
	Номер по каталогу
	Температурный диапазон
	Знак CE
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии
	Использовать до
	Изготовитель
	Дата производства
	Не использовать, если упаковка повреждена
	Беречь от солнечных лучей
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Беречь от влаги
	Уполномоченный представитель в Европейском Сообществе

11. Комплект поставки

Комплект поставки медицинского изделия:

Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена PIK3CA методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 48 реакций, в составе:

1. Реакционная смесь для определения мутации (2X), 3 пробирки
2. Смесь праймеров/проб PIK3CA, 5 пробирок
3. Смесь положительных контролей PIK3CA, 1 пробирка
4. Краткая инструкция (при необходимости)

12. Примечание для покупателя

12.1 Условия гарантии

Компания «ЭнтроГен» гарантирует, что данные Изделия не имеют дефектов ни в компонентах, ни в производств и соответствуют спецификациям компании «ЭнтроГен» на момент отгрузки. В соответствии с результатами верификации, проведенной компанией «ЭнтроГен», и на основании письменного уведомления Заказчиком, если какое-либо Изделие не соответствует спецификациям, или обнаруживаются дефекты в компонентах или производстве в течение 30 дней с даты отгрузки, компания «ЭнтроГен» несет полную ответственность, а Заказчик получает исключительную компенсацию в виде проведения ремонта или замены дефектных Изделий, на усмотрение компании «ЭнтроГен»).

12.2 Ограничение гарантийных обязательств

Данная гарантия не покрывает какое-либо повреждение Изделий при неправильном применении, неправильном выборе места эксплуатации или использовании Изделий Заказчиком или другими лицами не в соответствии с рекомендуемой инструкцией по применению и параметрами конструкции Изделий. Данная гарантия не распространяется на повреждение или дефекты, вызванные в результате проведения ремонтных работ или перемещения Изделий лицами, не являющимися представителями компании «ЭнтроГен» более того, данное изделие предназначено для проведения реакций с указанной аналитической чувствительностью с учетом того, что используемая ДНК не является сильно фрагментированной и не содержит материалы, которые могут ингибировать реакцию амплификации. Данная гарантия не распространяется на повреждение, возникшее в результате несчастных случаев, актов вандализма, пожара, потопа и других факторов внешней среды, а также форс-мажора. Кроме того, данная гарантия не включает в себя изделия, поставляемые сторонними производителями, например, компьютеры и соответствующее программное обеспечение. По всем вопросам, касающимся гарантии, обращайтесь в Клиентскую службу компании «ЭнтроГен».

ДАННАЯ ГАРАНТИЯ СОСТАВЛЕНА ВЗАМЕН ВСЕХ ПРОЧИХ ГАРАНТИЙ, ЧЕТКО ВЫРАЖЕННЫХ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫХ, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, КОСВЕННУЮ ГАРАНТИЮ КОММЕРЧЕСКОЙ ПРИГОДНОСТИ ИЛИ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПО НАЗНАЧЕНИЮ, ЛЮБУЮ ГАРАНТИЮ, ПРОИСТЕКАЮЩУЮ ИЗ УСТАНОВИВШЕГОСЯ ПОРЯДКА ВЕДЕНИЯ ДЕЛ ИЛИ ЗАВЕДЕННОГО ПОРЯДКА, ОБЫЧАЯ ИЛИ УЗАНЦИЯ, А ТАКЖЕ КОСВЕННУЮ ГАРАНТИЮ О НЕНАРУШЕНИИ ПАТЕНТОВ. НИ ПРИ КАКИХ ОБСТОЯТЕЛЬСТВАХ КОМПАНИЯ «ЭНТРОГЕН» НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА УЩЕРБ ЛЮБОГО ХАРАКТЕРА, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, ПРЯМОЙ, КОСВЕННЫЙ, СЛУЧАЙНЫЙ, УМЫШЛЕННЫЙ ИЛИ СОПУТСТВУЮЩИЙ УЩЕРБ (ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, УПУЩЕННУЮ ВЫГОДУ, ПОТЕРЮ ВЫРУЧКИ ИЛИ БИЗНЕСА), ВОЗНИКАЮЩИЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИЗДЕЛИЙ ИЛИ СВЯЗАННЫЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ИЗДЕЛИЙ.

12.3 Интеллектуальная собственность

Данное Изделие является продуктом материальной и интеллектуальной собственности и ноу-хау, разработанными компанией «ЭнтроГен, Инк.» (EntroGen, Inc.) и предоставляется организации заказчика (Заказчик) исключительно для проведения молекулярного диагностического анализа с целью определения целевых мутаций с использованием технологии и методов компании «ЭнтроГен», перечисленных и описанных в прилагаемом Руководстве по эксплуатации изделия. Использование данного Изделия или его компонентов способом, не предусмотренным Руководством по эксплуатации изделия, категорически запрещено компанией «ЭнтроГен». Вскрывая контейнер с Изделием, Заказчик соглашается не раскрывать технологии любых поставляемых компонентов Изделия компании «ЭнтроГен», включая праймеры и пробы, а также не подвергать компоненты Изделия компании «ЭнтроГен» или полученные продукты какому-либо анализу с целью создания схожей технологии, независимо от ее целевого назначения. Кроме того, Заказчик соглашается не перепродавать данное Изделие или его компоненты третьим лицам без письменного разрешения компании «ЭнтроГен». Заказчик обязуется сохранить конфиденциальность информации, содержащейся в Руководстве по эксплуатации изделия, и относиться к ней, как к коммерческой тайне компании «ЭнтроГен». Если Заказчик не согласен с описанными выше условиями использования, он должен вернуть неиспользованное Изделие компании «ЭнтроГен» с возвратом денежных средств в полном объеме.

Патентные права на проведение Процедуры с нуклеазой 5' не передаются явным, косвенными или на основе правовой презумпции покупателю при приобретении данного Изделия. Дополнительные лицензии и (или) разрешения могут потребоваться для проведения определенных этапов количественного анализа. Ответственность за получение таких лицензий у держателя патента возлагается на покупателя/конечного пользователя.

13. Контактные данные



«ЭнтроГен, Инк.»

20950 Уорнер Сентер Лейн, Сьют Би Вудленд Хиллс, Калифорния
91367, США (20950 Warner Center Lane, Suite B Woodland Hills, CA
91367, USA)

Тел.: +1 818 716 1070

Факс: +1 818 716 1077

Электронная почта: info@entrogen.com; support@entrogen.com

Веб-сайт: www.entrogen.com

© Авторское право 2020 г., «ЭнтроГен, Инк.»

Все права защищены.

Руководство пользователя (краткая инструкция)

Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена PIK3CA методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 48 реакций

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-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)
Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени	ФСЗ 2009/03609 от 06.06.2016 (бессрочно)
Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000	ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 (бессрочно)

Инструкция по применению — версия 1.2

Примечание: Далее по тексту также: Набор для определения соматических мутаций гена PIK3CA, Набор PIK3CA-RT48, Набор для анализа мутаций гена PIK3CA

Содержание

1. Реагенты и приборы	3
1.1 Содержимое упаковки	3
1.2 Обращение и хранение	3
1.3 Предостережения и меры предосторожности	4
2. Необходимые реагенты и оборудование	5
2.1 Реагенты	5
2.2 Оборудование	5
3. Описание набора	6
3.1 Информация о настоящем анализе	6
4. Инструкция по применению	7
4.1 Выделение ДНК	7
4.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)	7
4.3 Настройки прибора	9
5. Анализ данных	13
5.1 Интерпретация результатов	13
6. Приложения	16
6.1 Диагностика и устранение неисправностей	16
7. Используемые символы	18
8. Примечание для покупателя	19
8.1 Условия гарантии	19
8.2 Ограничение гарантийных обязательств	19
8.3 Интеллектуальная собственность	19

1. Реагенты и приборы

1.1 Содержимое упаковки

Данный набор содержит следующие компоненты, которые являются достаточными для проведения 48 реакций на основе смеси праймеров/проб, включая все контрольные пробы и образцы:

Наименование	Количество пробирок	Объем пробирки (мкл)
Реакционная смесь для определения мутации (2X)	3	1300
Смесь праймеров/проб* РІКЗСА	5	300
Смесь положительных контролей РІКЗСА**	1	200
Краткая инструкция (при необходимости)***		

*Смесь положительного контроля содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором на фоне геномной ДНК дикого типа. Соотношение мутации к дикому типу составляет примерно 1:1.

**Каждая пробирка содержит особую смесь праймеров/проб для обнаружения предусмотренной мутации гена РІКЗСА. Содержимое этих пробирок не следует смешивать.

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

1.2 Обращение и хранение

Срок годности изделия: 12 месяцев.

Гарантийный срок хранения равен сроку годности.

Набор поставляется с хладоэлементами. Содержимое партии после получения следует хранить в низкотемпературном холодильнике с необмерзающим испарителем при температуре от -25 °С до -15 °С. Для длительного хранения (>3 недель) Реакционный мастер-микс (2 шт.) необходимо хранить при температуре от -25 °С до -15 °С. Хранить при температуре от 4 °С до 8 °С в случае неиспользования смеси в течение 3 недель. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания, т.к. это снижает эффективность фермента. Хранить все другие реагенты при температуре от -25 °С до -15 °С.

- Все не вскрытые компоненты следует хранить в оригинальных контейнерах.
- Смеси праймеров/проб следует постоянно защищать от света во избежание обесцвечивания флуоресцентных красителей.
- Перед открытием пробирки необходимо центрифугировать.
- Дата истечения срока годности каждого компонента напечатана на этикетке каждой пробирки. Это изделие сохраняет свою эффективность до окончания этого срока. По истечении срока годности эффективность продукта не может быть гарантирована.

Хранение и обращение с компонентами данного изделия в условиях, отличных от вышеописанных, могут повлиять на эффективность данного анализа и отрицательно повлиять на результаты.

1.3 Предостережения и меры предосторожности

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:

- Протереть рабочую зону 70% этиловым спиртом.
- Обработать пипетки и оборудование, находящиеся в зоне использования, 70% этиловым спиртом.
- После перемешивания/смешивания на вортексе каждую микроцентрифужную пробирку открывать осторожно, следует избегать касания внутренней части крышки, т.к. внутри крышки могут быть капли или жидкость.
- 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, предшествующими амплификации, и пост-амплификации.
- Перемещение пробирок, штативов, пипеток и другого используемого оборудования должно идти в направлении от пре-амплификации до пост-амплификации, и никогда наоборот.

2. Необходимые реагенты и оборудование

2.1 Реагенты

Набор не содержит реагенты для выделения геномной ДНК из образцов опухоли. Геномная ДНК из замороженных или фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit” (РЗН 2021/15704).

Для анализа требуется использование воды без нуклеаз (вода для ПЦР).

2.2 Оборудование

Оборудование, необходимое для выполнения анализа:

- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени
- Одноразовые неопудренные перчатки
- Пипетки переменной емкости
- Стерильные наконечники пипеток с фильтром
- Вортекс
- Настольная центрифуга для микроцентрифужных пробирок 0,2 мл и 2,0 мл
- 96-луночные ПЦР плашки (совместимость плашек см. в руководстве к прибору для ПЦР)
- Оптическая герметизирующая пленка для ПЦР плашек
- Микроцентрифужные пробирки 0,2 мл (дополнительно) и 2,0 мл

3. Описание набора

3.1 Информация о настоящем анализе

Набор для анализа мутаций гена PIK3CA является высокочувствительным набором для обнаружения соматических мутаций. Анализ работает путем амплификации мутант-специфичных последовательностей в образцах, которые содержат смесь мутантной ДНК и ДНК дикого типа и использует флуоресцентные пробы для обнаружения. Мутации, определяемые настоящим набором, перечислены в Таблице 1.

Таблица 1. Перечень мутаций гена PIK3CA, определяемых настоящим набором

Мутац ия	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Cosmic ID	Номер праймера
E 5 4 2 K	c.1624G >A	Глутаминовая кислота (E) на лизин (K)	76 0	1
E 5 4 5 K	c.1633G >A	Глутаминовая кислота (E) на лизин (K)	76 3	2
E 5 4 5 Q	c.1633G >C	Глутаминовая кислота (E) на глутамин (Q)	27 13 3	3
H 1 0 4 7 R	c.3140A >G	Гистидин (H) на аргинин (R)	77 5	4
H 1 0 4 7 L	c.3140A >T	Гистидин (H) на лейцин (L)	77 6	5

В каждой реакции содержатся наборы праймеров и проб для определения мутаций гена PIK3CA, а также внутреннего контрольного гена. Внутренние контрольные праймеры амплифицируют несвязанный ген, который используется для определения состояния реагентов и содержания достаточного количества ДНК в реакции.

4. Инструкция по применению

4.1 Выделение ДНК

Геномная ДНК из замороженных или фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканей, может быть выделена с помощью Набора для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения: “Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit” (РЗН 2021/15704).

Следует придерживаться процедуры выделения геномной ДНК в соответствии с протоколом производителя. Достаточное количество ДНК может быть выделено из зафиксированных формалином и залитых в парафин блоков (FFPE) или свежих замороженных срезов (около 2-10 мкг). Для настоящего анализа требуется примерно 50 нг ДНК для каждого образца на анализ (10 нг/реакция).

После выделения концентрацию ДНК измеряют с помощью флуоресцентного анализатора (например, Qubit) и доводят до концентрации 10 нг/мкл. Если концентрация ниже 10 нг/мкл, то её компенсируют изменением объема воды во время постановки реакции.

4.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)

- Разморозить все смеси праймеров/проб, смесь положительного контроля и 2X реакционные смеси для ПЦР.
- Центрифугировать пробирки в течение 10 секунд со скоростью 10 000 об/мин. при комнатной температуре.

Общий объем реакционных смесей для ПЦР в лунке составляет 30 мкл/образец. Реакционные смеси для исследуемых образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избыточным объемом, чтобы компенсировать потери пипетирования.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Компоненты	Объем
2X Реакционная смесь для ПЦР	15 мкл
Смесь праймеров	6 мкл
Образец ДНК (10 нг/мкл)	1 мкл
Вода без нуклеаз	8 мкл

Примечание: может потребоваться больший объем ДНК, если концентрация меньше, чем 10 нг/мкл. В таких случаях можно скорректировать объем воды (уменьшить) с учетом поддержания требуемого общего объема.

1. Приготовить мастер-микс для каждого образца следующим образом (расчет проведен с допустимым избытком 5 %):

Реагенты	Конечная концентрация	Объем для каждого образца
2X Реакционный мастер-микс	1X	78,8 мкл
Смесь положительных контролей ДНК, вода или образец ДНК (10 нг/мкл)	10 нг	5,25 мкл
Вода без нуклеаз		42 мкл

2. Перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 10 секунд со скоростью 8 500 об/мин. при комнатной температуре.
3. Добавить по 24 мкл мастер-микса в каждую лунку, как показано ниже.
4. Добавить 6 мкл каждой смеси праймеров/проб в соответствующую лунку, как показано ниже.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC E542K	PC E545K	PC E545Q	PC H1047R	PC H1047L		S7 E542K	S7 E545K	S7 E545Q	S7 H1047R	S7 H1047L	
B	NTC E542K	NTC E545K	NTC E545Q	NTC H1047R	NTC H1047L		S8 E542K	S8 E545K	S8 E545Q	S8 H1047R	S8 H1047L	
C	S1 E542K	S1 E545K	S1 E545Q	S1 H1047R	S1 H1047L		S9 E542K	S9 E545K	S9 E545Q	S9 H1047R	S9 H1047L	
D	S2 E542K	S2 E545K	S2 E545Q	S2 H1047R	S2 H1047L		S10 E542K	S10 E545K	S10 E545Q	S10 H1047R	S10 H1047L	
E	S3 E542K	S3 E545K	S3 E545Q	S3 H1047R	S3 H1047L		S11 E542K	S11 E545K	S11 E545Q	S11 H1047R	S11 H1047L	
F	S4 E542K	S4 E545K	S4 E545Q	S4 H1047R	S4 H1047L		S12 E542K	S12 E545K	S12 E545Q	S12 H1047R	S12 H1047L	
G	S5 E542K	S5 E545K	S5 E545Q	S5 H1047R	S5 H1047L		S13 E542K	S13 E545K	S13 E545Q	S13 H1047R	S13 H1047L	
H	S6 E542K	S6 E545K	S6 E545Q	S6 H1047R	S6 H1047L		S14 E542K	S14 E545K	S14 E545Q	S14 H1047R	S14 H1047L	

Примечание: каждый образец исследуется в пяти реакциях. Одна 96-луночная ПЦР плашка может вместить до 14 неизвестных образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ). 72-луночный ротор (не показан) может вместить до 12 неизвестных образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ). Рекомендуемый макет плашки показан выше.

5. Перемешать смесь пипетированием несколько раз.
6. Заклеить плашку оптической герметичной пленкой.
7. Быстро центрифугировать плашку, чтобы капли на стенках стекли вниз.

4.3 Настройки прибора

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

Создать новый эксперимент: «Файл» (File) > «Новый эксперимент» (New Experiment) > «Расширенная настройка» (Advanced Setup).

Раздел «Свойства эксперимента»

- 1. Ввести название эксперимента и выбрать прибор (QuantStudio 5).
- 2. Выберите Количественное определение (Quantitation) > - Сравнительный СТ (ΔΔСТ) (Comparative CT (ΔΔСТ)) для типа эксперимента.
- 3. Выбрать реагенты TaqMan® и стандарт для типа реагентов и скорости нарастания (Ramp speed), соответственно.
- 4. Нажать «Настройка плашки» (Plate Setup) в левом меню навигации.

Раздел «Мишени и Образцы»

- 5. Нажать «Добавить новую мишень» (Add New Target) и установить следующие значения, показанные в таблице ниже:

Наименование	Флуорофор	Гаситель флуоресценции
IC	VIC	Без флуоресценции (NFQ)
PIK3CA	FAM	Без флуоресценции (NFQ)

- 1. Добавить «РС» (ПК) для смеси положительных контролей, «NTC» (КБМ) для контроля без матрицы (вода), а также наименования/номера неизвестных образцов.
- 2. Добавить образцы и детекторы к плашке, как показано на рисунке на предыдущей странице.
- 3. Установить Пассивный референсный краситель (только на некоторых приборах) на «ОТСУТСТВУЕТ».
- 4. Создать новый метод анализа со следующими параметрами и выполнить эксперимент.

Температура	Время	Циклы	Сбор данных
95 °C	10 мин	1	
95 °C	10 сек.	40	
60 °C	30 сек.		FAM, VIC

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». В поле должно быть указано два цикла; «Инкубация» (Hold) и «Циклирование» (Cycling).
5. Ввести следующие параметры этапа, нажав на каждый этап на панели справа:

Инкубация	9 5 ° C	10 минут	Не требуется
Циклирование	9 5 ° C	10 секунд	Не требуется
Циклирование 40 циклов	6 0 ° C	30 секунд	Запрос данных для Цикла А по «Зеленой» (Green), «Желтой» (Yellow)

6. Нажать ОК. Также можно сохранить этот шаблон для дальнейшего использования с помощью кнопки «Сохранить как» (Save as) в верхней части диалогового окна.
7. Перейти к «Вид» (View) > «Оптимизация сигнала» (Gain Optimization), из раскрывающегося списка «Настройки каналов» (Channel Settings) выбрать «Все каналы» (All Channels) и отметить поле рядом с «Провести оптимизацию перед 1-м сбором данных» (Perform Optimization Before 1st Acquisition). Примечание: этот этап необходимо выполнять только один раз для каждой новой серии реагентов. После определения параметров увеличения необходимо использовать те же самые параметры для последующих анализов с реагентами с тем же номером серии.
8. Загрузить стрипы с пробирками в ротор.
9. 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. Информацию об образцах можно вводить во время работы прибора или после завершения анализа.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени

1. В «Навигации» (Navigator) необходимо нажать «Новый» (New), чтобы запустить новый эксперимент LightCycler® 480.
2. Выбрать «Двухцветная гидролизующая проба/UPL проба» (Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe) для «Формата определения» (Detection Format).

3. Нажать «Настроить» (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
4. Изменить реакционный объем на 30 мкл.
5. Добавить следующую программу и целевые температуры:

Наименование программы	Циклы	Режим анализа
Денатурация	1	Нет
Цикл	40	Количественная оценка

Для этапа денатурации:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Длительность (чч:мм:сс)
95	Нет	00:10:00

Для этапа циклирование:

Цель (°C)	Режим сбора данных	Длительность (чч:мм:сс)	Скорость линейного изменения (°C/сек.)
95	Нет	00:00:10	4.4
60	Однократное	00:00:30	2.2

6. Перейти к «Редактору образца» (Sample Editor) и выбрать «Относительный количественный анализ» (Rel Quant) в качестве «Рабочего процесса» (Workflow), затем назначить образцы для плашки.
7. Выбрать кнопку «Эксперимент» (Experiment) и нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы сохранить файл и начать анализ.

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 «Настройка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры программы.

Этап	Температура	Время
1	95 °C	10 мин
2	95 °C	10 сек.
3	60 °C	30 сек.
	+ чтение плашки	
4	Повторить с шага 2 еще 39 раз	

3. Изменить объем образца на 30 мкл.
4. После завершения нажать «ОК», чтобы сохранить шаблон протокола. Обратить внимание на расположение сохраняемого файла шаблона, чтобы использовать его для последующих анализов. Нажать «Дальше» (Next), чтобы перейти к окну «Настройка плашки» (Plate Setup).
5. Во вкладке «Плашка» (Plate) нажать «Создать новый» (Create New), чтобы создать макет плашки.
6. Нажать на кнопку «Выбрать флуорофоры» (Select Fluorophores) и отметить поля рядом с FAM и VIC. Все другие поля должны остаться не отмеченными. Нажать ОК.
7. Ввести наименования образцов, как показано выше на макете плашки.
8. Выбрать каждый образец по отдельности (начиная с первого неизвестного образца) и напечатать наименование образца в поле «Имя образца» (Sample Name). После этого нажать клавишу «Ввод» (Enter) на клавиатуре, чтобы записать наименование образца. Выполнить этот этап для каждого образца.
9. Нажать на «Настройки» (Settings) и выбрать тип используемой плашки (например, BR Белая (White) или BR Прозрачная (Clear)).
10. После этого нажать кнопку ОК, чтобы сохранить макет плашки.
11. Нажать «Дальше» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

5. Анализ данных

5.1 Интерпретация результатов

Важно: пороговые значения могут корректироваться с учетом индивидуальных флуоресцентных характеристик амплификатора.

Канал VIC/HEX отражает амплификацию внутреннего контрольного гена, который используется для определения состояния реагентов и содержания достаточного количества ДНК в реакции.

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:

- Manual threshold (Ручное пороговое значение): FAM: 100 000; VIC: 20 000
- Auto baseline (Автоматические исходные данные)

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:

- Динамическое изменение кривизны (Dynamic Tube): вкл.
- Поправка наклона (Slope Correct): вкл.
- Пороговое значение зеленого канала (Green Channel Threshold): 0,06
- Пороговое значение желтого канала (Yellow Channel Threshold): 0,06

Компенсация шумов может быть установлена на уровне от 2% до 5% для удаления фоновых сигналов, которые могут препятствовать анализу.

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени.

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

- Abs Quant/2nd Derivative Max (Абсолютное количественное определение/максимальная 2-я производная) для всех образцов

Примечание: использовать Abs Quant/Fit Point (Абсолютную количественную оценку/Базовые точки) для всех образцов для определения значения C_p сигналов выше 35.0.

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): Auto Calculated (Рассчитано автоматически).

Приведенные ниже инструкции применимы для всех приборов.

1. Проверьте график амплификации внутреннего контроля (IC/Yellow/VIC) каждого образца, выбрав все 5 лунок реакционной плашки. Ст должен быть аналогичным во всех 5 реакциях с каждым образцом. Однако данное значение в большей степени зависит от количества амплифицируемой ДНК в каждой реакции и может различаться в отдельных FFPE образцах в силу фрагментации ДНК. Нормальный диапазон для IC Ст для FFPE образцов перечислен в таблице ниже.

2. Выбрать лунки с положительным контролем и проверить каждый канал FAM на наличие сигнала.

3. Выбрать все 5 реакционных лунок с каждым неизвестным образцом поочередно и проверить каналы FAM на наличие сигнала. Отсутствие сигнала означает, что образец не содержит мутацию, соответствующую выбранному каналу. Поскольку FFPE образцы могут содержать разное количество опухолевых клеток, значения Ст для образцов с мутацией могут значительно различаться. Образец с мутацией с более высоким содержанием опухолевых ДНК будет иметь меньшие значения Ст, в то время как образцы с мутацией с более низким содержанием опухолевых ДНК будут иметь большие значения Ст.

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

FAM®/зеленый Ст:	VIC/желтый Ст:	Статус мутации
любой	< 24,5	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24,5–27,5).
≤ 35	24,5 ≤ VIC ≤ 27,5	Положительный
> 35 или отсутствует		Отрицательный
любой	> 27,5	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24,5–27,5).

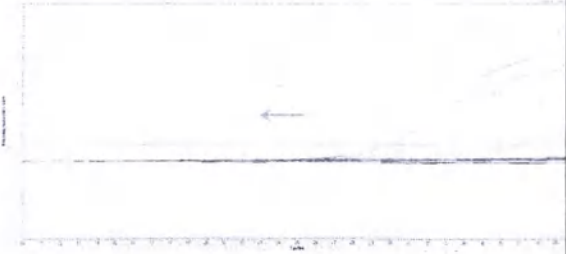
Для всех остальных приборов:

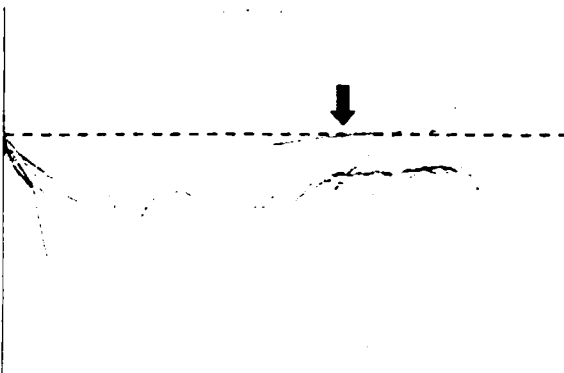
FAM®/зеленый Ст:	VIC/желтый Ст:	Статус мутации
≤ 38	≥ 25	Положительный

≤ 38	≤ 25	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25–31).
$\geq 38,01$ или отсутствует	≤ 31	Отрицательный
$\geq 38,01$ или отсутствует	≥ 31	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25–31).

6. Приложения

6.1 Диагностика и устранение неисправностей

Проблема:	Раствор:
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение C_t выше, чем верхнее пороговое значение C_t , указанное в разделе 6.	- Если положительный целевой сигнал (например, FAM) возникает до порогового значения C_t, значит образец является мутантным (положительный статус). См. таблицу C_t в разделе 6. - Если целевой 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: - Выделить ДНК заново (при возможности). - Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. - 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 2.2 ИПП.
Аномальный пик на графике усиления образца с помощью прибора Life Technologies.  Fluorescence (465-510) 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.	- Отображается контаминация. Оценить лабораторную процедуру. Предложения по сведению к минимуму загрязнения рабочей поверхности см. в разделе 2.5 настоящей инструкции. - При наличии только сигнала внутреннего контроля и значении $C_t > 36$ результаты могут быть использованы для определения статуса мутации образца.

	- При наличии только целевого сигнала результаты могут давать ложно-положительный результат и требуется повторный анализ. - При наличии целевого сигнала и 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> Cycle <i>График амплификации</i> Цикл	- 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 мутантным образцом или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа. - Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.

7. Используемые символы

Приведенные ниже символы, используемые на маркировке и упаковке данного изделия, отвечают требованиям гармонизированного стандарта EN980.

Символ	Значение
	Номер по каталогу
	Температурный диапазон
	Знак CE
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии
	Использовать до
	Изготовитель
	Дата производства
	Не использовать, если упаковка повреждена
	Беречь от солнечных лучей
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Беречь от влаги
	Уполномоченный представитель в Европейском Сообществе

8. Примечание для покупателя

8.1 Условия гарантии

Компания «ЭнтроГен» гарантирует, что данные Изделия не имеют дефектов ни в компонентах, ни в производств и соответствуют спецификациям компании «ЭнтроГен» на момент отгрузки. В соответствии с результатами верификации, проведенной компанией «ЭнтроГен», и на основании письменного уведомления Заказчиком, если какое-либо Изделие не соответствует спецификациям, или обнаруживаются дефекты в компонентах или производстве в течение 30 дней с даты отгрузки, компания «ЭнтроГен» несет полную ответственность, а Заказчик получает исключительную компенсацию в виде проведения ремонта или замены дефектных Изделий, на усмотрение компании «ЭнтроГен»).

8.2 Ограничение гарантийных обязательств

Данная гарантия не покрывает какое-либо повреждение Изделий при неправильном применении, неправильном выборе места эксплуатации или использовании Изделий Заказчиком или другими лицами не в соответствии с рекомендуемой инструкцией по применению и параметрами конструкции Изделий. Данная гарантия не распространяется на повреждение или дефекты, вызванные в результате проведения ремонтных работ или перемещения Изделий лицами, не являющимися представителями компании «ЭнтроГен» более того, данное изделие предназначено для проведения реакций с указанной аналитической чувствительностью с учетом того, что используемая ДНК не является сильно фрагментированной и не содержит материалы, которые могут ингибировать реакцию амплификации. Данная гарантия не распространяется на повреждение, возникшее в результате несчастных случаев, актов вандализма, пожара, потопа и других факторов внешней среды, а также форс-мажора. Кроме того, данная гарантия не включает в себя изделия, поставляемые сторонними производителями, например, компьютеры и соответствующее программное обеспечение. По всем вопросам, касающимся гарантии, обращайтесь в Клиентскую службу компании «ЭнтроГен».

ДАННАЯ ГАРАНТИЯ СОСТАВЛЕНА ВЗАМЕН ВСЕХ ПРОЧИХ ГАРАНТИЙ, ЧЕТКО ВЫРАЖЕННЫХ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫХ, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, КОСВЕННУЮ ГАРАНТИЮ КОММЕРЧЕСКОЙ ПРИГОДНОСТИ ИЛИ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПО НАЗНАЧЕНИЮ, ЛЮБУЮ ГАРАНТИЮ, ПРОИСТЕКАЮЩУЮ ИЗ УСТАНОВИВШЕГОСЯ ПОРЯДКА ВЕДЕНИЯ ДЕЛ ИЛИ ЗАВЕДЕННОГО ПОРЯДКА, ОБЫЧАЯ ИЛИ УЗАНИЯ, А ТАКЖЕ КОСВЕННУЮ ГАРАНТИЮ О НЕНАРУШЕНИИ ПАТЕНТОВ. НИ ПРИ КАКИХ ОБСТОЯТЕЛЬСТВАХ КОМПАНИЯ «ЭНТРОГЕН» НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА УЩЕРБ ЛЮБОГО ХАРАКТЕРА, ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, ПРЯМОЙ, КОСВЕННЫЙ, СЛУЧАЙНЫЙ, УМЫШЛЕННЫЙ ИЛИ СОПУТСТВУЮЩИЙ УЩЕРБ (ВКЛЮЧАЯ, ПОМИМО ПРОЧЕГО, УПУЩЕННУЮ ВЫГОДУ, ПОТЕРЮ ВЫРУЧКИ ИЛИ БИЗНЕСА), ВОЗНИКАЮЩИЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИЗДЕЛИЙ ИЛИ СВЯЗАННЫЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ИЗДЕЛИЙ.

8.3 Интеллектуальная собственность

Данное Изделие является продуктом материальной и интеллектуальной собственности и ноу-хау, разработанными компанией «ЭнтроГен, Инк.» (EntroGen, Inc.) и предоставляется организации заказчика (Заказчик) исключительно для проведения молекулярного диагностического анализа с целью определения целевых мутаций с использованием технологии и методов компании «ЭнтроГен», перечисленных и описанных в прилагаемом Руководстве по эксплуатации изделия. Использование данного Изделия или его компонентов способом, не предусмотренным Руководством по эксплуатации изделия, категорически запрещено компанией «ЭнтроГен». Вскрывая контейнер с Изделием, Заказчик соглашается не раскрывать технологии любых поставляемых компонентов Изделия компании «ЭнтроГен», включая праймеры и пробы, а также не подвергать компоненты Изделия компании «ЭнтроГен» или полученные продукты какому-либо анализу с целью создания схожей технологии, независимо от ее целевого назначения. Кроме того, Заказчик соглашается не перепродавать данное Изделие или его компоненты третьим лицам без письменного разрешения компании «ЭнтроГен». Заказчик обязуется сохранить конфиденциальность информации, содержащейся в Руководстве по эксплуатации изделия, и относиться к ней, как к коммерческой тайне компании «ЭнтроГен». Если Заказчик не согласен с описанными выше условиями использования, он должен вернуть неиспользованное Изделие компании «ЭнтроГен» с возвратом денежных средств в полном объеме.

Патентные права на проведение Процедуры с нуклеазой 5' не передаются явным, косвенными или на основе правовой презумпции покупателю при приобретении данного Изделия. Дополнительные лицензии и (или) разрешения могут потребоваться для проведения определенных этапов количественного анализа. Ответственность за получение таких лицензий у держателя патента возлагается на покупателя/конечного пользователя.

[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 *PIK3CA* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов фиксированных в формалине и залитых в парафин, 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.

[Штамп:

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 —
должность(-и):

☐ Должностное лицо корпорации —
должность(-и):

☐ Партнер — ☐ с ограниченной
ответственностью ☐ полный

☐ Партнер — ☐ с ограниченной
ответственностью ☐ полный

☐ Физическое лицо

☐ Физическое лицо

☐ Доверенное лицо

☐ Доверенное лицо

☐ Доверительный собственник

☐ Доверительный собственник

☐ Законный представитель или арбитражный
управляющий

☐ Законный представитель или арбитражный
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.

ПОДПИСЬ

Российская Федерация

Город Москва

Двадцать седьмого января 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-н/77-2022- *1-1688*

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.

ПОДПИСЬ

Гербовая печать
нотариуса г.Москвы
Точкина Д.В

Д.В. Точкин

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 48 лист(а)(ов)

Нотариус

ПОДПИСЬ

Российская Федерация
Город Москва

Двадцать седьмого января 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- *1-1685*
Уплачено за совершение нотариального действия : 2940 руб.



Д.В. Точкин

Всего прочито, пронумеровано, скреплено
печатью 48 лист(а) (ов)

Нотариус