ТестГен
ГЕНЕТИКА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
_____ А. Н. Тороповский
«24» июля 2018 г

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *EGFR* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-EGFR-ткань) по ТУ 21.20.23-005-97638376-2016

Версия 3 от 24.07.2018

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

1. Назначение 3
2.Характеристики набора.....6
3. Принцип действия 7
4 Аналитические и диагностические характеристики набора 8
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-EGFR-ткань» 11
6. Меры предосторожности при работе с набором 11
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором 13
8. Анализируемые пробы.....14
9. Подготовка компонентов набора для исследования 18
10. Проведение анализа.....18
11. Регистрация и интерпретация результатов 23
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора 25
13. Утилизация.....27
14. Гарантийные обязательства, контакты.....28

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

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Тест-EGFR-ткань» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их) гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

Область применения набора реагентов - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Тип анализируемого образца. Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

Принцип определения

Анализ проводится методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Продукты ПЦР исследуемого гена *EGFR* идентифицируются в 5′-экзонуклеазной реакции с помощью зондов, меченных FAM и HEX. Набор содержит реагенты для анализа мутации L858R и делеций в 19 экзоне (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их) исследуемого гена *EGFR*. ПЦР-смеси состоят из всех необходимых реагентов. Набор также включает положительный контрольный образец (ПКО), содержащий эквимолярную смесь мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне в концентрации 5% и отрицательный контрольный образец (ОКО).

Все ПЦР-смеси содержат праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Зонды к ВКО помечены HEX (см. раздел 11 «Регистрация и интерпретация результатов»). Это контроль эффективности экстракции ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

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

Описание целевого аналита, сведения о его научной обоснованности

Целевой аналит – ген *EGFR*, исследуемый при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR* для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

Научная обоснованность. Рак легкого — одна из наиболее распространенных форм злокачественных онкологических заболеваний. Ежегодно в России от рака легкого погибают около 60 тыс. человек, что составляет 20% от всех умерших от злокачественных заболеваний.

Идентификация и расшифровка механизма действия рецептора эпидермального фактора роста опухоли (*EGFR* — Epidermal Growth Factor Receptor) стала одним из многообещающих открытий в онкологии.

За последние несколько лет изучение рецептора эпидермального фактора роста стало одним из актуальных аспектов современной онкологии. Установлено, что высокая частота гиперэкспрессии EGFR характерна для немелкоклеточного рака легкого (40—70%), рака яичников (35—70%), толстой кишки (25—77%) и др. Известно, что выявление повышенной экспрессии *EGFR* является фактором неблагоприятного прогноза течения болезни. Активация механизмов с участием *EGFR* приводит к усилению пролиферативной активности опухолевых клеток, неоангиогенезу, замедлению апоптоза, более раннему появлению метастазов.

Большинство соматических мутаций гена *EGFR*, обнаруживаемых у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), локализованы в экзонах 18—21, кодирующих тирозинкиназный домен. Открытие этих мутаций немедленно связали с положительным ответом на терапию ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

Наиболее частыми являются делеции в экзоне 19 (45% от всех мутаций), за ними следует нуклеотидная замена T на G в положении 2573 экзона 21, что приводит к аминокислотной замене лейцина на аргинин в положении 858 аминокислотной последовательности (L858R, 41%), на вставки в экзоне 20 и нуклеотидные замены в

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

экзонах 18 и 20 приходится 14% мутаций. Данные мутации встречаются у 10% больных НМРЛ европеоидного происхождения и у 50% азиатов.

Назначение ингибиторов тирозинкиназы (ТК) больным НМРЛ с наличием делеций в 19 экзоне (Del19) или мутации L858R гена *EGFR*, связанных с чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназы (ТК), является эффективным методом лечения, приводящим к существенному сокращению размеров опухолевых очагов и контролю проявлений заболевания на достаточно продолжительный срок.

Специфическая патология, состояние или фактор риска, для обнаружения, определения или дифференцирования которого предназначено медицинское изделие для диагностики in vitro - набор реагентов предназначен для определения показаний к таргетной терапии при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их) гена *EGFR*.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань» рекомендуется при обследовании пациентов с диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» для качественного определения статуса мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их) гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани, для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR.

Противопоказания: отсутствуют.

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

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

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

2. Характеристики набора

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации – «Тест-EGFR-ткань». Каждый набор «Тест-EGFR-ткань» содержит реагенты, рассчитанные на проведение 24 определений.

Состав набора

Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань» включает:

Таблица 1 – Состав набора реагентов «Тест-EGFR-ткань»

№ пп	Название реагента	Маркировка на крышке пробирки	Описание	Количество пробирок, объём, мкл
1	ПЦР-смесь del	**del**	Прозрачная жидкость розового цвета	1 пробирка (120 мкл)
2	ПЦР-смесь L858R	**L858R**	Прозрачная жидкость розового цвета	1 пробирка (120 мкл)
3	ПКО	**К+**	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (120 мкл)
4	ОКО	**К-**	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (120 мкл)
5	Taq-полимераза	**Taq**	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, (580 мкл)

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Jurkat в концентрации 400 копий гена *EGFR* в 1 мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н., содержащей эквимолярную смесь мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR*, в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 20 копий плазмидной ДНК в 1 мкл. Содержит 5% мутантных и 95% нормальных копий ДНК.

В качестве ОКО используют воду деионизованную.

Все ПЦР-смеси содержат праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Зонды к ВКО помечены HEX (см. раздел 11 «Регистрация и интерпретация результатов»). Это контроль эффективности экстракции ДНК и возможного наличия

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

ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

3. Принцип действия

Качественное определение статуса мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их) гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани включает в себя три этапа:

1) подготовку ПЦР;

2) ПЦР-амплификацию ДНК и гибридизационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

3) интерпретацию результатов.

С пробами геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани проводятся реакции амплификации участков гена *EGFR* в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют аллель-специфичные флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

По каналу, соответствующему флуорофору **HEX**, детектируется продукт амплификации ДНК нормального варианта гена *EGFR*, по каналу, соответствующему флуорофору **FAM**, детектируется продукт амплификации ДНК мутантных вариантов гена *EGFR* и делеций в экзоне 19 (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их).

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

4 Аналитические и диагностические характеристики набора

4.1 Аналитические характеристики

Таблица 2 – Аналитические характеристики набора реагентов «Тест-EGFR-ткань»

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к мутации L858R и 27 делециям (del)* в 19 экзоне гена *EGFR*
Аналитическая чувствительность	10 копий гена *EGFR* в 1 мкл раствора ДНК

* обнаруживает наличие любой из 27 делеций, но не различает их

Список определяемых делеций с указанием ID делеции представлен в таблице 3 (набор реагентов обнаруживает наличие любой из 27 делеций, но не различает их).

Таблица 3 - Список определяемых делеций с указанием ID делеции

Набор делеций, определяемых с помощью набора реагентов «Тест-EGFR-ткань»	COSMIC ID**
2235_2249del15	6223
2235_2252>AAT (complex)	13551
2236_2253del18	12728
2237_2251del15	12678
2237_2254del18	12367
2237_2255>T (complex)	12384
2236_2250del15	6225
2238_2255del18	6220
2238_2248>GC (complex)	12422
2238_2252>GCA (complex)	12419

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

Набор делеций, определяемых с помощью набора реагентов «Тест-EGFR-ткань»	COSMIC ID**
2239_2247del9	6218
2239_2253del15	6254
2239_2256del18	6255
2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
2239_2258>CA (complex)	12387
2240_2251del12	6210
2240_2257del18	12370
2240_2254del15	12369
2239_2251>C (complex)	12383
2236_2252>AT (complex)	26680
2236_2251>T (complex)	26513
2238_2252del15	23571
2237_2252>T (complex)	12386
2235_2255>GGT (complex)	85797
c.2235_2246del12	28517
2235_2251>AG (complex)	13549
2236_2253>CAA (complex)	22999

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

4.2 Диагностические характеристики:

Диагностическая специфичность – 94,3 % с доверительной вероятностью 90%

Диагностическая чувствительность – 90,9 % с доверительной вероятностью 90%

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

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

Ограничения метода

Обнаружение мутаций зависит от целостности образца и количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце. Чистота выделенной ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280нм), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4. Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-100 нг/мкл.

Ткань опухоли не является гомогенной, в связи с этим результаты анализа, полученные из образца ткани, могут не совпадать с результатами других секций той же самой опухоли. Кроме того, образцы опухоли могут содержать и нормальную (неопухолевую ткань). При использовании пробы геномной ДНК, выделенной из ткани, не содержащей опухоль, набор «Тест-EGFR-ткань» не сможет выявить мутации гена *EGFR*.

Метод ПЦР крайне чувствителен к контаминации. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать контаминации образцов исследуемой ДНК и реакционных смесей содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР.

Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань» предназначен только для качественного определения статуса мутации L858R и делеций (del) в 19 экзоне (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их) гена *EGFR*.

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

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-EGFR-ткань»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатация в несоответствующих условиях,
- утилизация набора с нарушением соответствующих мер безопасности и дезактивации,
- перекрестная контаминация образцов;
- загрязнение материалов ингибирующими веществами;
- контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО, или продуктами ПЦР;
- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, в следствии работы с набором неквалифицированным персоналом.

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *EGFR* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-EGFR-ткань) по ТУ 21.20.23-005-97638376-2016», производства ООО «ТестГен» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «Тест-EGFR-ткань», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». Меры предосторожности против любых специальных, несвойственных экологических рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

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

Реагенты, входящие в набор «Тест-EGFR-ткань», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Тест-EGFR-ткань» не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4.28 СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечению срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против

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

любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Оборудование:

1. ПЦР-бокс (типа «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (типа «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (типа «Eppendorf», Германия).
4. Холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
5. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, Real-Time CFX96 Touch («BioRad», США), «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия) или эквивалентные.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером объемом до 200 мкл, до 100 мкл, до 20 и до 10 мкл. (например, «Axygen», США).
2. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок объемом на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
3. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
4. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:

а) объемом 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например «Axygen», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).

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

б) объемом 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Axygen», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «CFX96», «ДТ-Прайм»).

6. ПЦР-планшеты (могут использоваться вместо пробирок, указанных в пункте 5).

7. Оптически прозрачная пленка для заклеивания планшетов.

8. Анализируемые пробы

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

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

8.1 Процедура получения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани

Для выделения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани, необходимой для проведения ПЦР-анализа концентрации и чистоты, рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для экстракции ДНК из биологического материала и определения фрагментации ДНК (IsoFrag-DNA-FFPE) по ТУ 9398-001-7706721254-2011, ЗАО "Протеинсинтез", Россия. Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/12189 от 13.11.2017

или аналогичных, предназначенных для выделения ДНК из фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани и обеспечивающих следующее качество выделенной ДНК

- чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280нм), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4;

- концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-100 нг/мкл.

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Для выделения из клинического образца достаточного для проведения ПЦР-анализа количества ДНК, необходимой чистоты,

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

рекомендуется использовать наборы для выделения, указанные в п.8.1.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам, все ПЦР-смеси содержат праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Зонды к ВКО помечены HEX, чтобы отличить сигнал внутреннего контроля от сигнала FAM-меченных праймеров в реакциях мутантных вариантов гена *EGFR*. Прохождение реакции говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции результат следует считать недостоверным, и в этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется провести повторное выделение ДНК для проведения ПЦР-анализа. (см. раздел 11 «Регистрация и интерпретация результатов»).

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Тест-EGFR-ткань» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут остаться в пробе геномной ДНК человека после процедуры выделения ДНК, ингибировать ПЦР-реакцию и оказать влияние на способность набора реагентов «Тест-EGFR-ткань» различать мутантные и нормальные варианты гена *EGFR*.

Для того, чтобы оценить влияние потенциально интерферирующих веществ было выполнено исследование путем анализа воздействия каждого вещества на значения C_t и качественное определение статуса мутаций в анализируемом образце, в двух концентрациях (максимальной и минимальной), диапазон которых, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-EGFR-ткань». Потенциально интерферирующие вещества и их концентрации приведены в таблице 4.

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

Таблица 4 – Концентрация интерферирующих веществ, проверенных при исследовании влияния интерферирующих веществ

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)	Минимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)
Парафин (в ксилоле)	$2{,}00*10^{-4}$	$5{,}00*10^{-5}$
Ксилол	$2{,}00*10^{-4}$	$5{,}00*10^{-5}$
Этиловый спирт (95%)	$1{,}35*10^{-3}$	$3{,}38*10^{-4}$
Буфера для связывания ДНК	$5{,}40*10^{-4}$	$1{,}35*10^{-4}$
Протеиназа К	$1{,}32*10^{-5}$	$3{,}30*10^{-6}$
Элюент	$1{,}33*10^{-3}$	$3{,}33*10^{-5}$
Раствор для промывки №1	0,50	$1{,}25*10^{-1}$
Раствор для промывки №2	5,00	1,25

Ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «Тест-EGFR-ткань» различать мутантные и нормальные варианты гена *EGFR*.

В дополнение к исследованию интерферирующих веществ было оценено влияние некротической ткани в образцах опухолей на способность набора реагентов «Тест-EGFR-ткань» выдавать достоверные результаты. Исследование влияние некроза было проведено на 10 образцах, которые имели некроз на уровне> 50%, как определено в обзоре патологии. После проведения анализа с помощью набора реагентов «Тест-EGFR-ткань» и интерпретации результатов, полученные данные сравнивались с результатами двунаправленного секвенирования данных образцов по Сэнгеру. В ходе проведения исследования был выявлен 1 ложноотрицательный

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

результат, что может быть связано с недостаточным количеством ДНК.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание). Анализируемая ДНК должна храниться при температуре от 2 °С до 8 °С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20 °С.
- Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (А260/280нм), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4.
- Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования, должна составлять 1-100 нг/мкл.
- Не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.
- Для анализа необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенные из ткани опухоли, подтвержденной гистологически.

8.3 Условия возможного хранения анализируемых образцов

Условия хранения пробы геномной ДНК человека, выделенной из образцов фиксированной в парафине ткани:

Полученная ДНК должна храниться при температуре от 2 °С до 8 °С и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20 °С.

Условия хранения исходного клинического материала:

Наиболее доступным клиническим материалом для выделения ДНК является ткань, фиксированная в формалине и заключенная в парафин (FFPE-блоки). FFPE-блоки могут храниться при комнатной температуре.

Парафиновые срезы могут храниться при комнатной температуре в течение 4 недель до выделения ДНК.

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

Условия хранения биопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК[1]:

- при комнатной температуре - в течение 6 часов;
- при температуре 2–8 °С - в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С - в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С - длительно.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

Тщательно перемешать содержимое пробирок переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешать на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек, а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! Не встряхивать Taq-полимеразу (Taq) на вортексе, так как это может инактивировать фермент.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

А) Подготовка ПЦР;

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

В) Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!!!

---

[1] МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности

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

Непосредственно перед проведением анализа необходимо приготовить реакционные смеси (мастермиксы) для анализируемой ДНК, ПКО и ОКО. Для этого в отдельных стерильных пробирках смешать все компоненты исходя из того, что для проведения одной реакции необходимо взять 4 мкл ПЦР-смеси и 10 мкл Taq-полимеразы. Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

Готовить мастермиксы необходимо согласно таблице 4. В таблице учтен запас реактивов (+1 объём каждого вида) для компенсации возможных потерь при раскапывании.

ВНИМАНИЕ! При работе с Taq-полимеразой отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не взять избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

Таблица 4 - Приготовление мастермиксов (в расчете на количество анализируемых образцов).

Количество образцов	ПЦР-смесь, мкл	Taq, мкл	Итого, мкл
1	16	40	56
2	20	50	70
3	24	60	84
4	28	70	98
5	32	80	112
6	36	90	126
7	40	100	140
8	44	110	154
9	48	120	168
10	52	130	182
11	56	140	196
12	60	150	210
13	64	160	224

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

Количество образцов	ПЦР-смесь, мкл	Taq, мкл	Итого, мкл
14	68	170	238
15	72	180	252
16	76	190	266
17	80	200	280
18	84	210	294
19	88	220	308
20	92	230	322
21	96	240	336
22	100	250	350
23	104	260	364
24	108	270	378

1. Внести по 14 мкл каждого мастермикса в соответствующие пробирки согласно рекомендованному порядку расположения реакций (см. табл. 5).

2. Внести по 6 мкл ОКО в пробирки «ОКО».

3. Внести по 6 мкл ПКО в пробирки «ПКО».

4. Внести по 6 мкл образцов ДНК в пробирки «О».

5. Заклеить ПЦР-планшет/закрыть пробирки, убедиться, что все крышки или пленка прилегают плотно.

6. Открутить ПЦР-планшет/пробирки на центрифуге, чтобы собрать реакционную смесь на дне лунок, сохраняя правильную ориентацию планшета или серии пробирок.

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

Таблица 5 - Рекомендуемый порядок расположения реакций

96-луночный планшет												
Тест	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	**12**
del	ОКО	ПКО	О1	О2	О3	О4	О5	О6	О7	О8	О9	О10
L858 R	ОКО	ПКО	О1	О2	О3	О4	О5	О6	О7	О8	О9	О10
del	О11	О12	И т.д.									
L858R	О11	О12	И т.д.									

О1 – ДНК, выделенная из анализируемого образца №1 и т.д.

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Обратите внимание, что приборы для ПЦР в «реальном времени» должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 6, 7).

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

Таблица 6 - Программа амплификации для приборов производства «ДНК – Технология»

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 сек	50
3	64	15 сек	

Таблица 7 - Программа амплификации для других приборов

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 сек	50
3	62	15 сек	

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала на стадии 3.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

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

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

– по каналу **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК мутантных вариантов гена *EGFR* и делеций в экзоне 19 (обнаруживает наличие 27 делеций, но не различает их).

– по каналу **HEX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормальных вариантов гена *EGFR (выступает в качестве внутреннего контрольного образца – ВКО)*.

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции пороговой линии.

Принцип интерпретации результатов в исследуемых образцах и контрольных образцах представлен в табл. 8 и табл. 9 соответственно.

Таблица 8 - Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Пробирки	Мутантная ДНК гена *EGFR* обнаружена	Мутантная ДНК гена *EGFR* не обнаружена	Сомнительный	Невалидный
del, L858R	Канал **FAM:** Ct≤ 35 Канал **HEX:** подъём кривой амплификации (любой Ct) или отсутствие подъёма кривой.	Канал **FAM:** отсутствие кривой амплификации. Канал **HEX:** Ct≤ 35	Канал **FAM:** подъём кривой амплификации, Ct > 35 Канал **HEX:** Ct≤ 35	Отсутствие кривой амплификации по обоим каналам **HEX** и **FAM**

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

Таблица 9 - Интерпретация результатов в контрольных образцах

Пробирки	Правильный результат	Невалидный результат
ПКО	Канал **FAM** и **HEX**: Ct≤ 35	Отсутствие подъема кривой амплификации по **HEX** и/или **FAM**
ОКО	Канал **FAM** и **HEX**: отсутствие подъема кривой амплификации	Подъем кривой амплификации по каналу **FAM** и/или **HEX** (любой Ct)

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным при прохождении реакций «del», «L858R» в пробирках с соответствующими ПКО по каналам **FAM** и **HEX** не позднее 35 цикла и при отсутствии подъема кривой амплификации в реакциях «del» и «L858R» с ОКО по каналам **FAM** и **HEX**.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводят только при правильных результатах для ОКО и ПКО данной постановки.

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

Мутантная ДНК гена *EGFR* обнаружена, если кривая амплификации по каналу FAM поднимается выше установленной пороговой линии, и при этом Ct≤35. По каналу HEX подъём кривой амплификации (любой Ct) или отсутствие подъёма кривой.

Мутантная ДНК гена *EGFR* не обнаружена, если кривая амплификации по каналу FAM не поднимается выше установленной пороговой линии, а кривая амплификации по каналу HEX поднимается выше установленной пороговой линии, Ct≤ 35 (то есть проходит ВКО).

Результат анализа сомнительный, если кривая амплификации по каналу FAM поднимается выше установленной пороговой линии, но при этом Ct>35. Кривая амплификации по каналу HEX поднимается выше установленной пороговой линии и Ct≤35.

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

Результат анализа невалидный, если кривые амплификации не поднимаются ни по каналу FAM, ни по каналу HEX выше установленной пороговой линии. Это свидетельствует о том, что не прошли реакции ни на нормальную ДНК, ни на мутантную.

Если для пробы получен невалидный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца ткани или отвергнуть образец, как непригодный для данного вида анализа.

Если получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца ткани.

Набор непригоден к дальнейшему использованию, если кривые амплификации по каналам FAM и HEX в пробирках ПКО ниже установленной пороговой линии и этот результат устойчиво воспроизводится.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение.

Набор реагентов «Тест-EGFR-ткань» в упаковке предприятия-изготовителя должен храниться при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.

После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- ПЦР-смеси del, L858R следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование.

Транспортировать набор реагентов «Тест-EGFR-ткань» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

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

Набор реагентов транспортировать при температуре от 2°С до 8°С. Допускается транспортировка при комнатной температуре (15–25°С) не более пяти суток.

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

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности. Срок годности набора «Тест-EGFR-ткань» 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора. 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от 2 °С до 8 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора. 1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

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

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4.28 СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «Тест-EGFR-ткань» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

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

"ТестГен"

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью

28 (двадцать восемь) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.Н.

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