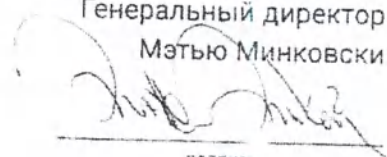


УТВЕРЖДАЮ
ЭнтроГен, Инк.
20950 Ворнер центр Лн.,
офис Б, Вудлэнд Хиллс,
Калифорния, 91367, США
Генеральный директор
Мэтью Минковски



подпись

September 12th, 2022

дата

Инструкция по применению медицинского изделия

“Набор реагентов для in vitro диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 52 реакции”

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 09/12/2022 before me, MITRA N. KATZ
 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



EGFR-RT52

Набор реагентов для in vitro диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 52 реакции

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
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 2.6

Примечание: Далее по тексту также: Набор для определения мутаций гена EGFR, Набор EGFR-RT52, Набор для анализа мутаций гена EGFR

Содержание

1. Назначение	4
2. Реагенты и приборы	5
2.1 Содержимое упаковки	5
2.2 Обращение и хранение	5
2.3 Стабильность изделия	6
2.4 Контроль качества	6
2.5 Предостережения и меры предосторожности	6
3. Необходимое оборудование и материалы	8
3.1 Реагенты	8
3.2 Оборудование	8
4. Описание набора	9
4.1 Введение	9
4.2 Информация о настоящем анализе	9
4.3 Ограничения анализа	10
5. Инструкция по применению	11
5.1 Выделение ДНК	11
5.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)	11
5.3 Настройки прибора	13
6. Анализ данных	17
6.1 Настройки прибора	17
6.2 Интерпретация результатов	19
7. Рабочие и диагностические характеристики изделия	22
8. Приложения	23
8.1 Мутации, определяемые этим набором	23
8.2 Устранение неисправностей	26
9. Справочная литература	29
10. Используемые символы	30
11. Примечание для покупателя	31
11.1 Условия гарантии	31
11.2 Ограничение гарантийных обязательств	31
11.3 Интеллектуальная собственность	32

1. Назначение

Изделие предназначено для определения соматических мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR в геномной ДНК человека, выделенной из образцов опухоли пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин.

Мутации, определяемые настоящим набором, перечислены в Приложении 8.1.

2. Реагенты и приборы

2.1 Содержимое упаковки

Данный набор содержит следующие компоненты в объеме, достаточном для проведения 52 реакций на основе смеси праймеров/проб, включая все контрольные пробы и образцы:

В наборе EGFR-RT52

Наименование	Количество пробирок (шт)	Объем пробирки (мкл)
Реакционная смесь для определения мутации (2х)	5	1300
Смесь праймеров/проб EGFR	8 [‡]	380
Смесь положительных контролей EGFR [§]	1	200

[§] Смесь положительных контролей содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором в фоновой геномной ДНК дикого типа (ДНК WT). и внутренним контролем. Отношение мутантных молекул и молекул дикого типа равно примерно 1:1

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

2.2 Обращение и хранение

Набор поставляется с холодоэлементами. Содержимое партии после получения следует хранить в низкотемпературном холодильнике с необмерзающим испарителем при температуре от -25 °С до -15 °С.

- Все невскрытые компоненты следует хранить в оригинальных упаковках.
- Смеси праймеров/проб следует защищать от воздействия света во избежание фотообесцвечивания флуоресцентных красителей. Постановку анализа следует проводить, выключив свет, в вытяжном шкафу, т.к. пробы могут подвергаться фотообесцвечиванию прямым воздействием света в момент аликвотирования в реакционную плашку.
- Перед открытием необходимо центрифугировать пробирки.
- 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. **Для пробирок без даты истечения срока годности необходимо использовать дату истечения срока годности, указанную на этикетке коробки.**

Краткое описание условий хранения и обращения, необходимых для обеспечения оптимальной стабильности набора:

Реакционный мастер-микс: хранить при температуре от -25°C до -15°C. За один раз рекомендуется размораживать одну пробирку и хранить ее при температуре от 4°C до 8°C не более 60 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность

фермента. Если ожидается, что одна пробирка реагента будет расходоваться больше 60 дней, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки.

Смесь праймеров/проб: хранить при температуре от 4°C до 8°C. После первой разморозки, смесь остается стабильной до 60 дней. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 60 дней, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования. Замораживать-размораживать не более 3 раз.

Смесь положительных контролей: хранить при температуре от 4°C до 8°C после первой разморозки. Компоненты смеси сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на упаковке.

СРОК ГОДНОСТИ ИЗДЕЛИЯ: 12 месяцев.

ГАРАНТИЙНЫЙ СРОК ХРАНЕНИЯ: 12 месяцев.

2.3 Стабильность изделия

При условии, что условия хранения и обращения, описанные выше, соблюдаются должным образом, данное изделие и его компоненты сохраняют свои характеристики в течение всего срока годности, указанного на этикетках каждой пробирки.

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.

Каждая серия испытана на приборах Life Technologies 7500 Fast, Roche LightCycler 480 и Qiagen RQ9. 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:

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

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

3.1 Реагенты

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 проведения данного анализа также требуется вода без нуклеаз (вода для ПЦР), которая не входит в комплектацию набора.

3.2 Оборудование

Оборудование, необходимое для выполнения анализа:

- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени
- Одноразовые неопудренные перчатки
- Пипетки переменного объема
- Стерильные наконечники пипеток с фильтром (без ДНКаз/РНКаз)
- Вортекс
- Микроцентрифуга 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
- 70 % этанол
- 20 % хлоросодержащий отбеливатель (или эквивалент)

4. Описание набора

4.1 Введение

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) представляет собой мембранный белок, который играет ключевую роль в передаче сигналов, которые способствуют клеточному росту и пролиферации. Его тирозинкиназный (ТК) домен активирует несколько нижележащих эффекторов, которые приводят к активации пути Ras-Raf-MAPK [1]. Гиперэкспрессия и онкогенные мутации, которые приводят к активации тирозинкиназного (ТК) домена гена EGFR, были обнаружены в различных солидных опухолях. Кроме того, было показано, что гиперактивация гена EGFR связана с прогрессирующими стадиями рака и неблагоприятным прогнозом [2].

4.2 Информация о настоящем анализе

Набор для определения мутаций гена EGFR является высокочувствительным анализом для определения соматических мутаций экзона 18, 19, 20 и 21 гена EGFR. В основе анализа лежит амплификация мутантно-специфических последовательностей в образцах, содержащих смесь мутантной ДНК и ДНК дикого типа, и полагается на флуоресцентные пробы для обнаружения. Подробное описание мутаций, обнаруженных этим набором, приведено в разделе 8 приложения 1.

В каждом анализе содержатся смеси праймеров и проб для обнаружения мутаций гена EGFR, а также амплификации внутреннего контрольного гена. Праймеры внутреннего контрольного гена амплифицируют несвязанный ген, который используется для определения состояния реагентов и содержания достаточного количества ДНК в реакции.

Краткий список мутаций, определяемых данным набором, приведен ниже.

Реакция	Мутация	Краситель
A	T790M	FAM
B	Exon 19 Deletions	
C	L858R	
D	L861Q	
E	S768I	
F	G719X	
G	Ex20InsGGT/CAC	
H	Ex20Ins9	

Все	Внутренний контроль	VIC
-----	---------------------	-----

Дополнительная информация об определяемых мутациях:

- Exon 19 Deletions – определяет 48 делеций, но не различает их
- G719X — определяет G719A, G719S, G719D и G719C, но не различает их
- Exon 20 Insertions – определяет 2319-2320 insCAC и 2310-2311 insGGT, но не различает их
- Exon 20 Insertion - определяет 2307-2308 insGCCAGCGTG (ins9)

4.3 Ограничения анализа

- Успешное обнаружение мутаций-мишеней зависит от качества образца и количества доступной амплифицируемой ДНК. Образцы с избыточной или недостаточной концентрацией необходимо анализировать повторно.
- Эффективность этого анализа не была установлена в присутствии редких полиморфизмов.
- Эффективность этого анализа не была установлена при наличии мутаций, не перечисленных в Приложении 8.1.
- Использование спектрофотометра для количественного определения образца может привести к завышению концентрации. Рекомендации по вводу в этом анализе основаны на флуориметрическом анализе. Эффективность этого анализа не была установлена с помощью спектрофотометрического количественного определения; начальные требования могут потребовать корректировки.
- Этот набор предназначен для использования только с FFPE и свежими/замороженными тканями. Неизвестно, подходят ли другие типы образцов для тестирования с помощью этого набора.
- FFPE фиксация может привести к чрезмерному фрагментированию образцов. Чрезмерная фрагментация может привести к сбою анализа. В результате данные по некоторым образцам могут не подлежать отчетности.
- Остатки реагентов для выделения в образце могут повлиять на эффективность амплификации. Для получения качественной ДНК необходимо использовать соответствующий метод выделения для FFPE тканей.
- Этот набор предназначен для использования персоналом лаборатории, обученном методам молекулярной биологии.
- Для достижения оптимальных результатов требуется соблюдение этого протокола. Отклонения от протокола могут привести к потере производительности.
- Комбинация реагентов из разных партий наборов не оценивалась. Тактико-технические характеристики данной модификации не установлены.

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” (PЗН 2021/15704).

Проведите процедуру 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). После выделения ДНК следует измерить концентрацию с помощью флуоресцентного анализа (например, Qubit) и довести концентрацию ДНК до 10 нг/мкл. Если концентрация ниже 10 нг/мкл, то её компенсируют объемом воды во время постановки реакции.

Для анализа требуется примерно 80 нг ДНК, 10 нг образца на реакцию. Однако качество ДНК, выделенной из FFPE блоков, может варьироваться из-за фрагментации. Таким образом, концентрация ДНК не отражает количество амплифицируемой ДНК, доступной для анализа.

Каждая лаборатория может также оценить оптимальную исходную концентрацию ДНК, сопоставив концентрацию ДНК с оптимальным диапазоном, определенным в разделе 6.2 для внутреннего контроля.

5.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)

- Разморозьте все смеси праймеров/проб, смесь для положительных контролей и 2X реакционный мастер-микс на льду.
- Перемешайте на вортексе и открутите все пробирки около 5 секунд при комнатной температуре.

Примечание: Рекомендуется хранить реагенты, контроли и образцы на льду в ходе выполнения исследования.

Общий объем реакционных смесей для ПЦР составляет 30 мкл/образец. Реакционные смеси для нескольких образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избытком объема, чтобы компенсировать ошибки пипетирования.

В качестве альтернативы можно приготовить индивидуальные мастер-миксы с каждой смесью праймер/проба, с добавлением образцов ДНК непосредственно в плашку. Для такой постановки рекомендуется развести образец ДНК и добавить не менее 5 мкл образца в реакционную лунку, чтобы минимизировать ошибку пипетирования.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Таблица 1.

Компоненты	Объем
Реакционная смесь для ПЦР 2х	15 мкл

Смесь праймеров	7 мкл
Образец ДНК (10 нг/мкл)	1 мкл*
Вода без нуклеаз	7 мкл**

*Объем образца может составлять от 1 мкл до 8 мкл.

**Объем воды следует отрегулировать в соответствии с объемом образца, чтобы общий объем на лунку составлял 30 мкл.

1. Разморозить необходимые пробирки смеси праймеров/проб, смеси положительных контролей и 2X реакционной смеси для запуска.
2. Перемешать каждую пробирку на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при комнатной температуре.
3. Подготовить мастер-микс для каждого образца в соответствии с таблицей ниже (рассчитано с 5 % избытком):

Таблица 2.

Реагенты	Конечная концентрация	Объем для каждого образца
Реакционная смесь для определения мутации (2X)	1X	126 мкл
Смесь положительных контролей ДНК, вода или образец ДНК при 10 нг/мкл	10 нг	8,4 мкл
Вода без нуклеаз		58,8 мкл

4. Добавить по 23 мкл мастер-микса на лунку одного вертикального ряда плашки (А-Н), как показано на рисунке ниже.
5. Добавить по 7 мкл каждой смеси праймера/пробы в соответствующую лунку, как показано на рисунке ниже.

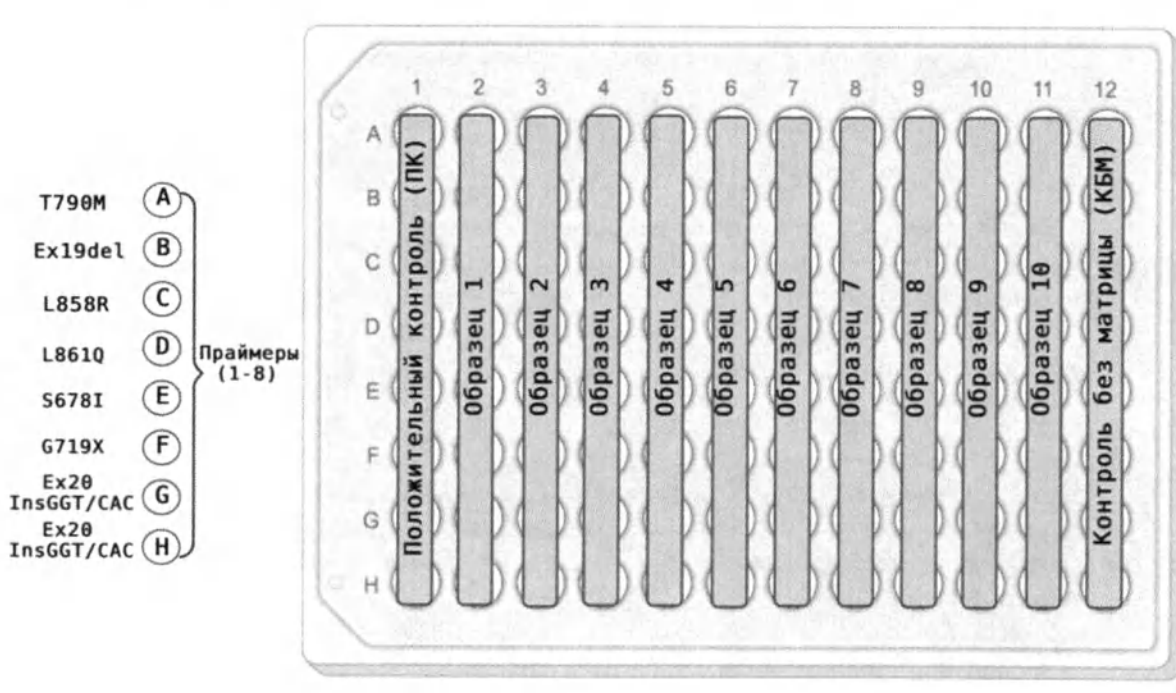


Рисунок 1. Разметка плашки для восьми реакций для каждого образца. Одна 96-луночная плашка может вмещать до 10 исследуемых образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ, NTC). Ротор на 72 лунки (не показан) может вмещать до 7 исследуемых образцов, одну смесь положительных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

6. Перемешать смесь пипетированием несколько раз.

7. Заклеить плашку оптической герметичной пленкой или закрыть крышками (для пробирок).
8. Необходимо быстро центрифугировать плашку для сбора капель со стенок лунок. (Дополнительно, только для плашек).

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).

В разделе «Свойства эксперимента» (Experiment Properties)

1. Введите имя эксперимента и выберите подходящий для эксперимента блок QuantStudio (384 лунок или 96 лунок).
2. Выберите Количественное определение (Quantitation) > - Сравнительный CT ($\Delta\Delta CT$) (Comparative CT ($\Delta\Delta CT$)) для типа эксперимента.
3. Выберите Реагенты TaqMan® (TaqMan® Reagents) и Стандарт (Standard) для реагентов и скорости нагрева, соответственно.
4. Нажать «Установка плашки» (Plate Setup) в левом меню навигации или «Определить» (Define) на QuantStudio.

В разделе «Определите мишени и образцы» (Define Targets and Samples)

5. Нажмите Добавить новую мишень (Add New Target) или Новый (New) для QuantStudio и установите следующие параметры, описанные в таблице ниже:

Таблица 3.

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

1. В разделе «Добавить образцы» (Define Samples): Добавьте ПК (положительный контроль, PC) для смеси положительных контролей, КБМ (контроль без матрицы, NTC) для контроля без матрицы (вода), и наименования/номера исследуемых образцов.
2. Выберите вкладку «Назначить мишени и образцы» (Assign Targets and Samples), добавьте образцы и детекторы в разметку плашки, как показано на Рисунке 1.
3. Установите Пассивный референсный краситель (Passive Reference Dye) как «Отсутствует» (NONE).
4. Установите настройки запуска (Run Method) в соответствии с параметрами, описанными в таблице ниже, и запустите эксперимент.

Таблица 4.

Температура	Время	Циклы	Сбор данных
95 °C	10 мин	1	
95 °C	15 сек.	40	
58 °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), нажать дважды на «Двухэтапный» (Two Step).
2. Выбрать 72-луночный ротор, отметить поле «Предохранительное кольцо присоединено» (Locking Ring Attached), затем нажмите Мастер пропуска (Skip Wizard).
3. Перейти к «Вид» (View) > «Настройки анализа» (Run Settings), ввести 30 мкл для объема реакционной смеси и нажать «ОК».
4. Перейдите в Вид (View)> Редактор профиля (Profile Editor). Здесь следует выбрать два шага, перечисленных в окне, - Инкубация (Hold) и Циклирование (Cycling).
5. Ввести следующие параметры этапа, нажав на каждый этап на панели справа:

Таблица 5.

Этап	Температура	Время	Сбор данных
Инкубация	95 °C	10 минут	Не производится
Установленный этап	95 °C	15 секунд	Не производится
Установленный этап 40 циклов	58 °C	30 секунд	Производится для Цикла А по «Зеленому» (Green), «Желтому» (Yellow)

6. Нажмите ОК. Также, вы можете сохранить такой шаблон для дальнейших запусков, нажав на кнопку «Сохранить как» вверху диалогового окна.
7. Перейдите в Вид (View)>Оптимизация уровня сигнала (Gain Optimization), выберите Оптимизация детектируемых (Optimize Acquiring) в раскрывающемся списке Настроек канала (Channel Settings), и задайте калибровку перед первым измерением (Perform Optimization Before 1st Acquisition). Примечание: Этот этап нужно выполнять только один раз при использовании новой партии реагентов. После определения Оптимизации уровня сигнала (Gain Optimization) используйте те же настройки для будущих запусков с реагентами с тем же номером партии.
8. Загрузить стрипы пробирок в ротор.
9. Перейти к «Анализ» (Run) > «Запустить анализ» (Start Run), затем нажать кнопку «Запуск» (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 обнаружения» (Detection Format).
3. Нажать «Настроить» (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
4. Изменить объем реакционной смеси на 30 мкл.
5. Добавьте следующие целевые значения программы и температуры:

Таблица 6.

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

Для этапа Денатурации:

Таблица 7.

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

Для этапа Циклирования:

Таблица 8.

Цель (°C)	Режим сбора данных	Длительность (чч:мм:сс)	Скорость линейного изменения (°C/сек.)
95	Нет	00:00:15	4.4
58	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 «Установка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры цикла.

Таблица 9.

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

3. 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 «Установка 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. Выберите строку A1-H1 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на Положительный контроль (Positive Control).
8. Выберите строку A2-H2 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на NTC (контроль без матрицы).
9. Выбрать оставшиеся лунки (A3-H12) на макете плашки и изменить «Тип образца» (Sample Type) на «Неизвестные» (Unknown).
10. Выделите каждую строку отдельно (начиная с A3-H3) и введите название образца в поле Наименование образца (Sample Name). Когда закончите, нажмите Enter на клавиатуре, чтобы записать название образца. Выполните этот шаг для каждого образца.
11. Нажать на «Настройки» (Settings) и выбрать тип используемой плашки (например, BR Белая (White) или BR Прозрачная (Clear)).

-
12. После этого нажать кнопку ОК, чтобы сохранить макет плашки.
 13. Нажать «Далее» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

6. Анализ данных

Важно: настройки пороговых значений могут потребовать корректировки в зависимости от чувствительности обнаружения флуоресценции каждого термоциклера. Используйте перечисленные ниже настройки в качестве отправной точки.

6.1 Настройки прибора

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

Manual threshold (Ручное пороговое значение):

- FAM - Реакция A: 80 000; Реакции B-H: 50 000
- VIC - 10 000

Auto baseline (Автоматические исходные данные) - опционально. Используйте рекомендованные пользовательские исходные данные 3-15, если фоновый шум превышает пороговое значение, вызывая ложные значения Ct.

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

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- "Dynamic Tube" (Динамическая пробирка): Вкл.
- "Slope Correct" (Поправка наклона): Вкл.
- "Green Channel Threshold" (Пороговое значение Зеленого канала): 0,06
- "Yellow Channel Threshold" (Пороговое значение желтого канала): 0,06

Удаление выбросов (Outlier Removal) может быть установлено на уровне 5% для удаления фоновых сигналов, которые могут препятствовать анализу.

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

Вариант A: Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

Детектор	Коэффициент
FAM (465-510)	45 (180 для G719X)
VIC (533-580)	30

1. Выберите "Subset editor" (Редактор подгруппы) и создайте подгруппы для FAM для каждой реакции от 1 до 8 и дополнительную подгруппу для VIC, включающую все реакции (итого 9 подгрупп).
- a. При анализе всех лунок будет учитываться фон всех лунок и автоматически вычитаться из него, что может привести к потенциально ложноположительным/отрицательным результатам.
2. Выберите Analysis (Анализ).
3. Выберите Abs Quant/Fit Points.
4. Выберите подгруппу VIC со всеми реакциями и нажмите Select (Выбрать).
5. Во вкладке Cycle Range (Диапазон циклов) выберите кнопку "Filter Comb".
6. Выберите VIC (533-580).

- a. First cycle (Первый цикл): 15
- b. Last Cycle (Последний цикл): 40
 7. Выберите вкладку Noise Band (Уровень шума).
 8. Выберите стрелку рядом с Noiseband (Auto).
 9. Выберите NoiseBand (STD Mult).
 10. В поле STD multiplier введите значение для VIC из колонки "Коэффициент" из таблицы выше.
 11. Нажмите Calculate (Рассчитать).
 12. Повторите эти шаги для всех созданных подгрупп FAM (Реакции 1-8).

Дополнительно: сохраните созданные настройки, выбрав стрелку рядом с Apply Template (Принять шаблон). Сохраните шаблон в папку для шаблонов. Во время будущих запусков просто выберите Apply Template (Принять шаблон).

Вариант Б: Альтернативный вариант анализа с использованием NoiseBand (Fluorescence)

1. Выберите "Subset editor" (Редактор подгруппы) и создайте подгруппы для FAM для каждой реакции от 1 до 8 и дополнительную подгруппу для VIC, включающую все реакции (итого 9 подгрупп).
- a. При анализе всех лунок будет учитываться фон всех лунок и автоматически вычитаться из него, что может привести к потенциально ложноположительным/отрицательным результатам.
2. Выберите Analysis (Анализ).
3. Выберите Abs Quant/Fit Points.
4. Выберите подгруппу VIC со всеми реакциями и нажмите Select (Выбрать).
5. Во вкладке Cycle Range (Диапазон циклов) выберите кнопку "Filter Comb".
6. Выберите VIC (533-580).
- a. First cycle (Первый цикл): 15
- b. Last Cycle (Последний цикл): 40
 7. Выберите вкладку Noise Band (Уровень шума).
 8. Выберите стрелку рядом с Noiseband (Auto).
 9. Выберите Noiseband (Fluoresc).
 10. В поле Noise Band введите значение, которое соответствует значениям Ct в допустимых диапазонах ПК. Свяжитесь с представителем, если требуется больше деталей.
 11. Нажмите Calculate (Рассчитать).
 12. Повторите эти шаги для всех созданных подгрупп FAM (Реакции 1-8).

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- "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).

6.2 Интерпретация результатов

Приведенные ниже инструкции применимы для всех приборов.

1. Проверьте график амплификации внутреннего контроля (IC/желтый/VIC) для каждого образца, выбрав все 8 реакционных лунок. Значение Ct должно быть одинаковым во всех 8 реакциях в каждом образце; однако это значение в значительной степени зависит от количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в реакции, и может отличаться между отдельными образцами FFPE из-за фрагментации ДНК. Нормальный диапазон значений Ct для IC составляет 24–32 для образцов FFPE (см. Исключение для G719X).
2. Выберите лунки с положительным контролем и проверьте каждый детектор FAM на наличие сигнала.
3. Выберите все 8 реакционных лунок каждого неизвестного образца и проверьте детекторы FAM на наличие сигнала. Если сигнал отсутствует, образец не содержит мутации, соответствующей выбранному детектору. Поскольку образцы FFPE могут содержать разное количество опухолевых клеток, значения Ct для мутантных реакций могут сильно различаться. Мутантные образцы с более высоким содержанием опухолевой ДНК будут иметь меньшие значения Ct, тогда как мутантные образцы с более низким содержанием опухолевой ДНК будут иметь более высокие значения Ct.

Все приборы, за исключением прибора Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, за исключением G719X:

Сt для FAM®/зеленый :	Сt для VIC/желтый	Статус мутации
≤ 38	$32 > Ct \geq 24$	Положительный
Любое	< 24	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).
$\geq 38,01$ или отсутствует	$32 \leq Ct < 24$	Отрицательный
Любое	> 32	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).

Все приборы, за исключением прибора Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, для G719X:

Сt для FAM®/зеленый :	Сt для VIC/желтый	Статус мутации
≤ 37	$32 > Ct \geq 25,8$	Положительный
Любое	$< 25,8$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством

		ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25,8-32).
$\geq 37,01$	$32 \leq Ct < 25,8$	Отрицательный
Любое	> 32	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25,8-32).

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, за исключением G719X:

Ст для FAM®/зеленый	Ст для VIC/желтый:	Статус мутации
≤ 38	$32 > Ct \geq 24$	Положительный
Любое	< 24	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).
$\geq 38,01$ или отсутствует	$32 \leq Ct < 24$	Отрицательный
Любое	> 32	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, для G719X:

Ст для FAM®/зеленый	Ст для VIC/желтый:	Статус мутации
≤ 37	$29 > Ct \geq 25,8$	Положительный
Любое	< 24	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-29).
$\geq 37,01$ или отсутствует	$29 \leq Ct < 24$	Отрицательный
Любое	> 29	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-29).

7. Рабочие и диагностические характеристики изделия

Рабочие характеристики

Характеристика	Реакция	Мутация	Репортер	Значение
Предел обнаружения	1	T790M	FAM	1,0 %
	2	Делеции в экзоне 19	FAM	1,0 %
	3	L858R	FAM	1,0 %
	4	L861Q	FAM	1,0 %
	5	S768I	FAM	1,5 %
	6	G719X	FAM	3,2 %
	7 и 8	Exon 20 ins	FAM	2,0 %
Характеристика	Реакция	Мутация	Значение	
Аналитическая специфичность	1	T790M	- NTC не должен быть обнаружен или $C_t > 38,5$ для всех каналов (VIC, FAM). - Образцы с мутациями должны иметь VIC C_t равный 24 - 32.	
	2	Делеции в экзоне 19		
	3	L858R		
	4	L861Q		
	5	S768I		
	6	G719X		
	7 и 8	Exon 20 ins		
Характеристика	Реакция	Мутация	Значение	
Прецизионность	1	T790M	Все образцы должны иметь корректное определение сигнала в $\geq 95\%$ случаев и меньше или равное 5% КВ (коэффициент вариации) для значений C_t каналов FAM и VIC	
	2	Делеции в экзоне 19		
	3	L858R		
	4	L861Q		
	5	S768I		
	6	G719X		
	7 и 8	Exon 20 ins		

Диагностические характеристики

Характеристика	Значение
Диагностическая чувствительность	100 % (15/15 $CI_{0,05\%}$ 79,61-100)

8. Приложения

8.1 Мутации, определяемые этим набором

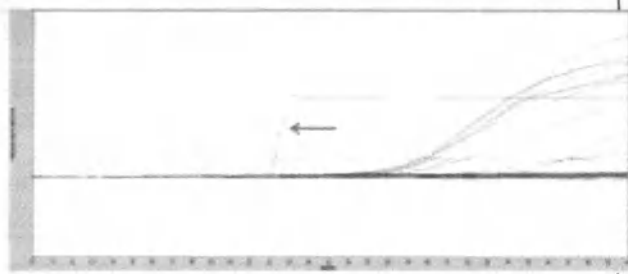
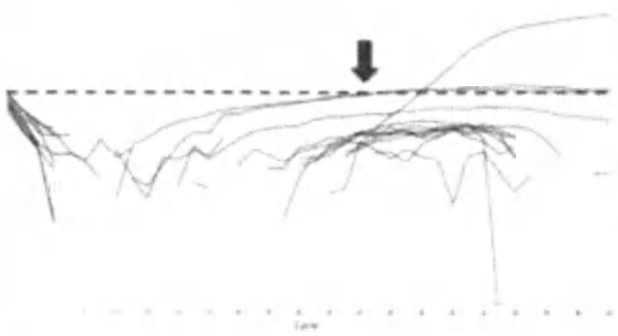
Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Cosmic ID	Нукл. зам. по HGVS	Ам.зам. по HGVS
Экзон 18				
c.2155G>A	p.G719S	6252	LRG_304t1:c.2155G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Ser)
c.2155G>T	p.G719C	6253	LRG_304t1:c.2155G>T	LRG_304p1:p.(Gly719Cys)
c.2156G>A	p.G719D	18425	LRG_304t1:c.2156G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Asp)
c.2156G>C	p.G719A	6239	LRG_304t1:c.2156G>C	LRG_304p1:p.(Gly719Ala)
Экзон 19				
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2234_2248del15	p.K745_A750delinsT	1190791	LRG_304t1:c.2234_2248del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Ala750delinsThr)
c.2235_2246del12	p.E746_E749delELRE	28517	LRG_304t1:c.2235_2246del12	LRG_304p1:p.(Glu746_Glu749del)
c.2235_2248delinsAATTC	p.E746_A750delinsIP	13550	LRG_304t1:c.2235_2248delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsIlePro)
c.2235_2249del15	p.E746_A750delELREA	6223	LRG_304t1:c.2235_2249del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2235_2251delinsAATTC	p.E746_T751delinsIP	13552	LRG_304t1:c.2235_2251delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIlePro)
c.2235_2252delinsAAT	p.E746_T751delinsI	13551	LRG_304t1:c.2235_2252delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIle)
c.2235_2255delinsAAT	p.E746_S752delinsI	12385	LRG_304t1:c.2235_2255delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsIle)
c.2236_2248delinsAGAC	p.E746_A750delinsRP	12413	LRG_304t1:c.2236_2248delinsAGAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsArgPro)
c.2236_2248delinsCAAC	p.E746_A750delinsQP	13557	LRG_304t1:c.2236_2248delinsCAAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsGlnPro)
c.2236_2250del15	p.E746_A750delELREA	6225	LRG_304t1:c.2236_2250del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2236_2253del18	p.E746_T751delELREAT	12728	LRG_304t1:c.2236_2253del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751del)
c.2236_2256del21	p.E746_S752delELREATS	133189	LRG_304t1:c.2236_2256del21	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752del)

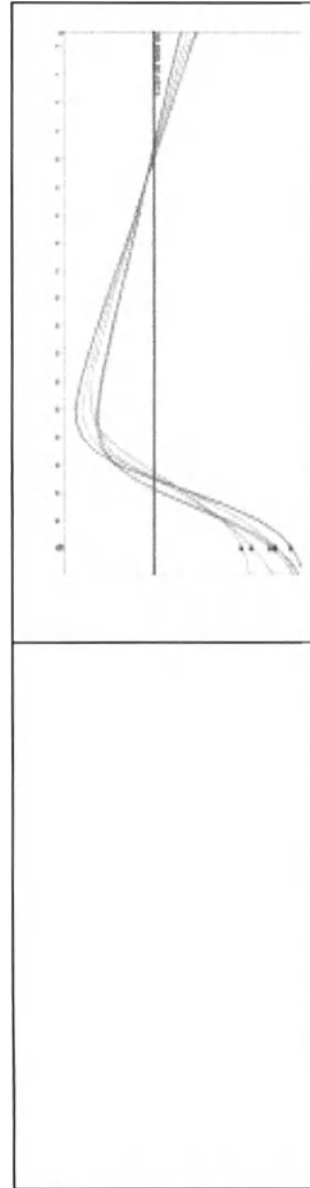
c.2237_2251delinsTTC	p.E746_T751delinsVP	18421	LRG_304t1:c.2237_2251delinsTTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)
c.2237_2251del15	p.E746_T751delinsA	12678	LRG_304t1:c.2237_2251del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsAla)
c.2237_2252delinsT	p.E746_T751delinsV	12386	LRG_304t1:c.2237_2252delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTC	p.E746_T751delinsV	133193	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTTCCT	p.E746_T751delinsVP	52935	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTCCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)
c.2237_2253delinsTTGCT	p.E746_T751delinsVA	12416	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTGCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValAla)
c.2237_2254del18	p.E746_S752delinsA	12367	LRG_304t1:c.2237_2254del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAla)
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384	LRG_304t1:c.2237_2255delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2256delinsTC	p.E746_S752delinsV	18426	LRG_304t1:c.2237_2256delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2257delinsTCT	p.E746_P753delinsVS	18427	LRG_304t1:c.2237_2257delinsTCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Pro753delinsValSer)
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2238_2248delinsGC	p.L747_A750delinsP	12422	LRG_304t1:c.2238_2248delinsGC	LRG_304p1:p.(Leu747_Alal750delinsPro)
c.2238_2252delinsGCA	p.L747_T751delinsQ	12419	LRG_304t1:c.2238_2252delinsGCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2240_2254del	p.L747_T751delLREAT	12369	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2238_2255del18	p.E746_S752delinsD	6220	LRG_304t1:c.2238_2255del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp)
c.2239_2247delTTAAGAGAA	p.L747_E749delLRE	6218	LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGAGAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Glu749del)
c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	p.L747_A750delinsP	12382	LRG_304t1:c.2239_2248delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Alal750delinsPro)
c.2239_2251delinsC	p.L747_T751delinsP	12383	LRG_304t1:c.2239_2251delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsPro)
c.2239_2252delinsCA	p.L747_T751delinsQ	12420	LRG_304t1:c.2239_2252delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2239_2256delinsCAA	p.L747_S752delinsQ	12403	LRG_304t1:c.2239_2256delinsCAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752delinsGln)
c.2239_2256del18	p.L747_S752delLREATS	6255	LRG_304t1:c.2239_2256del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)

c.2239_2258delinsCA	p.L747_P753delinsQ	12387	LRG_304t1:c.2239_2258delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsGln)
c.2239_2262del24	p.L747_K754delLREATSPK	24970	LRG_304t1:c.2239_2262del24	LRG_304p1:p.(Leu747_Lys754del)
c.2240_2251del12	p.L747_T751delinsS	6210	LRG_304t1:c.2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)
c.2240_2254del15	p.L747_T751delLREAT	12369	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2240_2257del18	p.L747_P753delinsS	12370	LRG_304t1:c.2240_2257del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer)
c.2248_2273delinsCC	p.A750_E758delinsP	26440	LRG_304t1:c.2248_2273delinsCC	LRG_304p1:p.(Ala750_Glu758delinsPro)
c.2250_2264del15	p.T751_A755del	26718	LRG_304t1:c.2250_2264del15	LRG_304p1:p.(Thr751_Ala755del)
c.2252_2275del24	p.T751_E758delTSPKANKE	23634	LRG_304t1:c.2252_2275del24	LRG_304p1:p.(Thr751_Glu758del)
c.2252_2276delinsA	p.T751_I759delinsN	96856	LRG_304t1:c.2252_2276delinsA	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2252_2277delinsAT	p.T751_I759delinsN	24270	LRG_304t1:c.2252_2277delinsAT	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2253_2276del24	p.S752_I759delISPKANKEI	13556	LRG_304t1:c.2253_2276del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)
c.2254_2277del24	p.S752_I759delISPKANKEI	6256	LRG_304t1:c.2254_2277del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)
Экзон 20				
c.2369C>T	p.T790M	6240	LRG_304t1:c.2369C>T	LRG_304p1:p.(Thr790Met)
c.2303G>T	p.S768I	6241	LRG_304t1:c.2303G>T	LRG_304p1:p.(Ser768Ile)
c.2300_2308dup	p.A767_V769dup	12376	LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGCGTGG	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)
c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG	12378	LRG_304t1:c.2310_2311insGGT	LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)
c.2317_2319insCAC	p.H773_V774insH	12377	LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC	LRG_304p1:p.(His773dup)
Экзон 21				
c.2573T>G	p.L858R	6224	LRG_304t1:c.2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)
c.2582T>A	p.L861Q	6213	LRG_304t1:c.2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)

8.2 Устранение неисправностей

Проблема:	Решение:
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение Ct выше, чем верхнее пороговое значение Ct, указанное в разделе 6.	· Если целевой сигнал появляется после порогового значения или не появляется вообще, реакция была недостаточно насыщена (недостаточно ДНК), повторите анализ образцов с большим количеством ДНК. · Если анализ образца, в котором, точно имеются ингибиторы ПЦР (например, образцы меланомы имеют меланин, который является ингибитором ПЦР), необходимо провести повторный анализ образца с меньшим количеством ДНК или разбавить образец водой в соотношении 1:5 и повторно провести анализ. · Если увеличение/уменьшение объема ДНК не решает проблему: 1. Выделить ДНК заново (при возможности) 2. Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. 3. Использовать коммерчески доступный концентрат ДНК.
Целевой и/или 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 настоящей инструкции.
Аномальный пик на графике амплификации образца с помощью прибора Life Technologies (ABI).	· Аномальная линия пика может быть результатом пузырьков в лунке, содержащей образец. Центрифугировать плашку перед повторным запуском 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.
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ при проведении анализа на приборе Life Technologies.  <i>Amplification Plot</i> <i>График амплификации</i> <i>Cycle</i> <i>Цикл</i>	- Обеспечить установку ручных пороговых значений, предложенных в настоящей инструкции. - Убедиться в том, что сигнал не является истинной амплификацией путем проверки сигнала на многокомпонентном графике (приборы Life Technologies). Если сигнал горизонтальный, то это не истинная амплификация. Если сигнал на многокомпонентном графике является линейным и сигнал пересекает пороговое значение, необходимо отрегулировать базовый конечный цикл. Установить начальный цикл на 3 и остановить: самый ранний цикл VIC St (если сигнал по-прежнему пересекает пороговое значение, увеличивать число циклов с шагом 3 до тех пор, пока сигнал не перестанет пересекать пороговое значение).
Образец дикого типа имеет значение Ct целевого сигнала, которое попадает в параметры для статуса положительной мутации.	- Если сигнал внутреннего контроля находится в пределах диапазона, тогда образец дикого типа имеет контаминацию положительным образцом, геномной ДНК или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа. - Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.
Кривые амплификации выглядят как на картинке ниже.	Указывает на неверные настройки исходных данных (baseline). Требуется корректировка настроек исходных данных на приборе для ПЦР в реальном времени.



9. Справочная литература

1. Бенвенути С. и соавт. Онкогенная активация сигнального пути RAS/RAF ухудшает реакцию метастатического колоректального рака на терапию анти-EGFA антителами. Исследования рака., март 2007 г. 15;67(6):2643-8 (Benvenuti S. et al., Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2643-8).
2. Саломон Д.С. и соавт. Пептиды, связанные с фактором эпидермального роста, и их рецепторы при злокачественных новообразованиях человека. *Критические обзоры по онкологии/гематологии.*, 1995 г.; 19:183-232 (Salomon DS. et al., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Haematology* 1995; 19:183-232).

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 EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 52 реакции

1. Реакционная смесь для определения мутации (2 шт.), 5 пробирок
2. Смесь праймеров / проб EGFR, 8 пробирок
3. Смесь положительного контроля EGFR, 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 производстве 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».

11.2 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.

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



«Антисел ЭсЭй» (Antisel SA)

Спектра-Билдинг, 12 клм Салоники-Халкидики, а/я 57001, Ферми,
Греция (Spectra Building, 12klm thessaloniki-Halkidiki PO 57001,
Thermi, Greece)

Тел.: +30 210 779 5980

Факс: +30 210 771 6932

Электронная почта: antisel@antisel.gr

Веб-сайт: www.antisel.gr

© Авторское право 2017-2019 гг., «ЭнтроГен, Инк.»

Все права защищены.

Приложение

Руководство пользователя

Набор реагентов для *in vitro* диагностики наличия мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 52 реакции

Набор валидирован для приборов:

Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени	РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 (бессрочно)
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q	ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 (бессрочно)
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 2.6

Примечание: Далее по тексту также: Набор для определения мутаций гена EGFR, Набор EGFR-RT32. Набор для анализа мутаций гена EGFR

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. Необходимое оборудование и материалы	5
2.1 Реагенты	5
2.2 Оборудование	5
3. Описание набора	6
3.1 Информация о настоящем анализе	6
3.2 Ограничения анализа	6
4. Инструкция по применению	8
4.1 Выделение ДНК	8
4.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)	8
4.3 Настройки прибора	10
5. Анализ данных	14
5.1 Настройки прибора	14
5.2 Интерпретация результатов	16
6. Приложения	19
6.1 Мутации, определяемые этим набором	19
6.2 Устранение неисправностей	22
7. Используемые символы	25
8. Примечание для покупателя	26
8.1 Условия гарантии	26
8.2 Ограничение гарантийных обязательств	26
8.3 Интеллектуальная собственность	26

1. Реагенты и приборы

1.1 Содержимое упаковки

Данный набор содержит следующие компоненты в объеме, достаточном для проведения 52 реакций на основе смеси праймеров/проб, включая все контрольные пробы и образцы:

В наборе EGFR-RT52

Наименование	Количество пробирок (шт)	Объем пробирки (мкл)
Реакционная смесь для определения мутации (2х)	5	1300
Смесь праймеров/проб EGFR	8 [‡]	380
Смесь положительных контролей EGFR [§]	1	200

[§] Смесь положительных контролей содержит смесь синтетических последовательностей ДНК, которые соответствуют каждой мутации, определяемой этим набором в фоновой геномной ДНК дикого типа (ДНК WT). и внутренним контролем. Отношение мутантных молекул и молекул дикого типа равно примерно 1:1

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

1.2 Обращение и хранение

Набор поставляется с хладоэлементами. Содержимое партии после получения следует хранить в низкотемпературном холодильнике с неомержающим испарителем при температуре от -25 °C до -15 °C.

- Все невскрытые компоненты следует хранить в оригинальных упаковках.
- Смеси праймеров/проб следует защищать от воздействия света во избежание фотообесцвечивания флуоресцентных красителей. Постановку анализа следует проводить, выключив свет, в вытяжном шкафу, т.к. пробы могут подвергаться фотообесцвечиванию прямым воздействием света в момент аликвотирования в реакционную плашку.
- Перед открытием необходимо центрифугировать пробирки.
- 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. **Для пробирок без даты истечения срока годности необходимо использовать дату истечения срока годности, указанную на этикетке коробки.**

Краткое описание условий хранения и обращения, необходимых для обеспечения оптимальной стабильности набора:

Реакционный мастер-микс: хранить при температуре от -25°C до -15°C. За один раз рекомендуется размораживать одну пробирку и хранить ее при температуре от 4°C до 8°C не более 60 дней. Не следует замораживать-размораживать реагент более 3 раз, поскольку повторное замораживание-размораживание отрицательно влияет на эффективность

фермента. Если ожидается, что одна пробирка реагента будет расходоваться больше 60 дней, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки.

Смесь праймеров/проб: хранить при температуре от 4°C до 8°C. После первой разморозки, смесь остается стабильной до 60 дней. Если ожидается, что реагенты будут расходоваться дольше 60 дней, рекомендуется аликвотировать небольшие объемы после первой разморозки для дальнейшего их хранения при температуре -25°C до -15°C до востребования. Замораживать-размораживать не более 3 раз.

Смесь положительных контролей: хранить при температуре от 4°C до 8°C после первой разморозки. Компоненты смеси сохраняют стабильность до истечения срока годности, указанного на упаковке.

Срок годности: 12 месяцев.

Гарантийный срок хранения: 12 месяцев.

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:

- Протирать рабочую зону, пипеточные дозаторы и оборудование, предназначенное для использования вблизи рабочей зоны, дезинфицирующим средством для очистки поверхностей (20%-отбеливатель или аналог), чтобы устранить ДНК и ДНКазы, с последующим использованием 70 % этилового спирта.
- Перед применением каждую пробирку следует перемешать на вортексе.
- Центрифугировать все пробирки перед открытием.
- После перемешивания/смешивания на вортексе каждую микроцентрифужную пробирку открывать осторожно, при этом следует избегать касания внутренней части крышки.
- Во избежание перекрестной контаминации для всех этапов пипетирования следует использовать аэрозоль-устойчивые (с фильтром) наконечники.
- Между всеми переносами жидкостей необходимо менять наконечники пипеток.
- При работе с ДНК/реагентами всегда следует надевать перчатки и менять перчатки между этапами, 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. Необходимое оборудование и материалы

2.1 Реагенты

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 проведения данного анализа также требуется вода без нуклеаз (вода для ПЦР), которая не входит в комплектацию набора.

2.2 Оборудование

Оборудование, необходимое для выполнения анализа:

- Прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени
- Одноразовые неопудренные перчатки
- Пипетки переменного объема
- Стерильные наконечники пипеток с фильтром (без ДНКаз/РНКаз)
- Вортекс
- Микроцентрифуга 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
- 70 % этанол
- 20 % хлоросодержащий отбеливатель (или эквивалент)

3. Описание набора

3.1 Информация о настоящем анализе

Набор для определения мутаций гена EGFR является высокочувствительным анализом для определения соматических мутаций экзона 18, 19, 20 и 21 гена EGFR. В основе анализа лежит амплификация мутантно-специфических последовательностей в образцах, содержащих смесь мутантной ДНК и ДНК дикого типа, и полагается на флуоресцентные пробы для обнаружения. Подробное описание мутаций, обнаруженных этим набором, приведено в разделе 6 приложения 1.

В каждом анализе содержатся смеси праймеров и проб для обнаружения мутаций гена EGFR, а также амплификации внутреннего контрольного гена. Праймеры внутреннего контрольного гена амплифицируют несвязанный ген, который используется для определения состояния реагентов и содержания достаточного количества ДНК в реакции.

Краткий список мутаций, определяемых данным набором, приведен ниже.

Реакция	Мутация	Краситель
A	T790M	FAM
B	Exon 19 Deletions	
C	L858R	
D	L861Q	
E	S768I	
F	G719X	
G	Ex20InsGGT/CAC	
H	Ex20Ins9	
Все	Внутренний контроль	VIC

Дополнительная информация об определяемых мутациях:

- Exon 19 Deletions – определяет 48 делеций, но не различает их
- G719X — определяет G719A, G719S, G719D и G719C, но не различает их
- Exon 20 Insertions – определяет 2319-2320 insCAC и 2310-2311 insGGT, но не различает их
- Exon 20 Insertion - определяет 2307-2308 insGCCAGCGTG (ins9)

3.2 Ограничения анализа

- Успешное обнаружение мутаций-мишеней зависит от качества образца и количества

доступной амплифицируемой ДНК. Образцы с избыточной или недостаточной концентрацией необходимо анализировать повторно.

- Эффективность этого анализа не была установлена в присутствии редких полиморфизмов.
- Эффективность этого анализа не была установлена при наличии мутаций, не перечисленных в Приложении 6.1.
- Использование спектрофотометра для количественного определения образца может привести к завышению концентрации. Рекомендации по вводу в этом анализе основаны на флуориметрическом анализе. Эффективность этого анализа не была установлена с помощью спектрофотометрического количественного определения; начальные требования могут потребовать корректировки.
- Этот набор предназначен для использования только с FFPE и свежими/замороженными тканями. Неизвестно, подходят ли другие типы образцов для тестирования с помощью этого набора.
- FFPE фиксация может привести к чрезмерному фрагментированию образцов. Чрезмерная фрагментация может привести к сбою анализа. В результате данные по некоторым образцам могут не подлежать отчетности.
- Остатки реагентов для выделения в образце могут повлиять на эффективность амплификации. Для получения качественной ДНК необходимо использовать соответствующий метод выделения для FFPE тканей.
- Этот набор предназначен для использования персоналом лаборатории, обученном методам молекулярной биологии.
- Для достижения оптимальных результатов требуется соблюдение этого протокола. Отклонения от протокола могут привести к потере производительности.
- Комбинация реагентов из разных партий наборов не оценивалась. Тактико-технические характеристики данной модификации не установлены.

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).

Проведите процедуру 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). После выделения ДНК следует измерить концентрацию с помощью флуоресцентного анализа (например, Qubit) и довести концентрацию ДНК до 10 нг/мкл. Если концентрация ниже 10 нг/мкл, то её компенсируют объемом воды во время постановки реакции.

Для анализа требуется примерно 80 нг ДНК, 10 нг образца на реакцию. Однако качество ДНК, выделенной из FFPE блоков, может варьироваться из-за фрагментации. Таким образом, концентрация ДНК не отражает количество амплифицируемой ДНК, доступной для анализа.

Каждая лаборатория может также оценить оптимальную исходную концентрацию ДНК, сопоставив концентрацию ДНК с оптимальным диапазоном, определенным в разделе 6.2 для внутреннего контроля.

4.2 Подготовка реагентов (для всех приборов)

- Разморозьте все смеси праймеров/проб, смесь для положительных контролей и 2X реакционный мастер-микс на льду.
- Перемешайте на вортексе и открутите все пробирки около 5 секунд при комнатной температуре.

Примечание: Рекомендуется хранить реагенты, контроли и образцы на льду в ходе выполнения исследования.

Общий объем реакционных смесей для ПЦР составляет 30 мкл/образец. Реакционные смеси для нескольких образцов (а также контрольных образцов) должны быть предварительно смешаны в мастер-микс с 5% избытком объема, чтобы компенсировать ошибки пипетирования.

В качестве альтернативы можно приготовить индивидуальные мастер-миксы с каждой смесью праймер/проба, с добавлением образцов ДНК непосредственно в плашку. Для такой постановки рекомендуется развести образец ДНК и добавить не менее 5 мкл образца в реакционную лунку, чтобы минимизировать ошибку пипетирования.

Следующие реагенты входят в каждую реакцию 30 мкл:

Таблица 1.

Компоненты	Объем
------------	-------

Реакционная смесь для ПЦР 2х	15 мкл
Смесь праймеров	7 мкл
Образец ДНК (10 нг/мкл)	1 мкл*
Вода без нуклеаз	7 мкл**

*Объем образца может составлять от 1 мкл до 8 мкл.

**Объем воды следует отрегулировать в соответствии с объемом образца, чтобы общий объем на лунку составлял 30 мкл.

1. Разморозить необходимые пробирки смеси праймеров/проб, смеси положительных контролей и 2X реакционной смеси для запуска.
2. Перемешать каждую пробирку на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при комнатной температуре.
3. Подготовить мастер-микс для каждого образца в соответствии с таблицей ниже (рассчитано с 5 % избытком):

Таблица 2.

Реагенты	Конечная концентрация	Объем для каждого образца
Реакционная смесь для определения мутации (2X)	1X	126 мкл
Смесь положительных контролей ДНК, вода или образец ДНК при 10 нг/мкл	10 нг	8,4 мкл
Вода без нуклеаз		58,8 мкл

4. Добавить по 23 мкл мастер-микса на лунку одного вертикального ряда плашки (А-Н), как показано на рисунке ниже.
5. Добавить по 7 мкл каждой смеси праймера/пробы в соответствующую лунку, как показано на рисунке ниже.

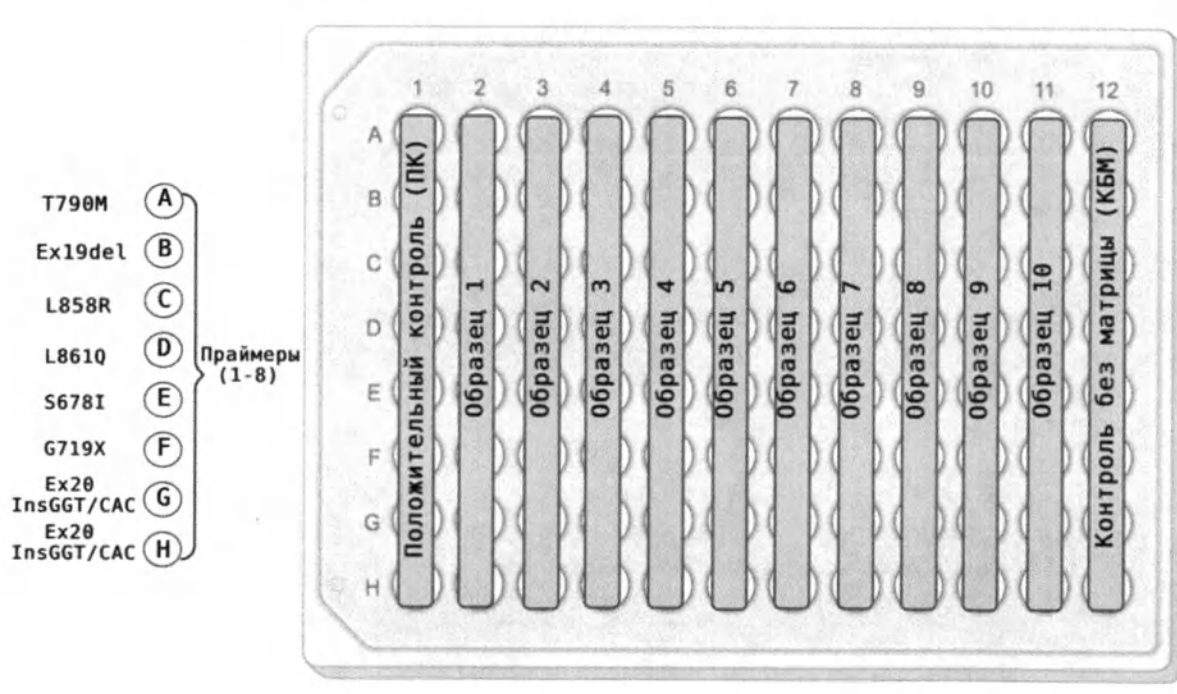


Рисунок 1. Разметка плашки для восьми реакций для каждого образца. Одна 96-луночная плашка может вмещать до 10 исследуемых образцов, одну смесь положительных контролей и один контроль без матрицы (КБМ, NTC). Ротор на 72 лунки (не показан) может вмещать

до 7 исследуемых образцов, одну смесь положительных контролей и один КБМ. Рекомендуемый макет плашки показан на рисунке выше.

6. Перемешать смесь пипетированием несколько раз.
7. Заклеить плашку оптической герметичной пленкой или закрыть крышками (для пробирок).
8. Необходимо быстро центрифугировать плашку для сбора капель со стенок лунок. (Дополнительно, только для плашек).

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).

В разделе «Свойства эксперимента» (Experiment Properties)

1. Введите имя эксперимента и выберите подходящий для эксперимента блок QuantStudio (384 лунок или 96 лунок).
2. Выберите Количественное определение (Quantitation) > - Сравнительный CT ($\Delta\Delta CT$) (Comparative CT ($\Delta\Delta CT$)) для типа эксперимента.
3. Выберите Реагенты TaqMan® (TaqMan® Reagents) и Стандарт (Standard) для реагентов и скорости нагрева, соответственно.
4. Нажать «Установка плашки» (Plate Setup) в левом меню навигации или «Определить» (Define) на QuantStudio.

В разделе «Определите мишени и образцы» (Define Targets and Samples)

5. Нажмите Добавить новую мишень (Add New Target) или Новый (New) для QuantStudio и установите следующие параметры, описанные в таблице ниже:

Таблица 3.

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

1. В разделе «Добавить образцы» (Define Samples): Добавьте ПК (положительный контроль, PC) для смеси положительных контролей, КБМ (контроль без матрицы, NTC) для контроля без матрицы (вода), и наименования/номера исследуемых образцов.
2. Выберите вкладку «Назначить мишени и образцы» (Assign Targets and Samples), добавьте образцы и детекторы в разметку плашки, как показано на Рисунке 1.
3. Установите Пассивный референсный краситель (Passive Reference Dye) как «Отсутствует» (NONE).
4. Установите настройки запуска (Run Method) в соответствии с параметрами, описанными в таблице ниже, и запустите эксперимент.

Таблица 4.

Температура	Время	Циклы	Сбор данных
95 °C	10 мин	1	

95 °C	15 сек.	40	
58 °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), нажать дважды на «Двухэтапный» (Two Step).
2. Выбрать 72-луночный ротор, отметить поле «Предохранительное кольцо присоединено» (Locking Ring Attached), затем нажмите Мастер пропуска (Skip Wizard).
3. Перейти к «Вид» (View) > «Настройки анализа» (Run Settings), ввести 30 мкл для объема реакционной смеси и нажать «ОК».
4. Перейдите в Вид (View)> Редактор профиля (Profile Editor). Здесь следует выбрать два шага, перечисленных в окне, - Инкубация (Hold) и Циклирование (Cycling).
5. Ввести следующие параметры этапа, нажав на каждый этап на панели справа:

Таблица 5.

Этап	Температура	Время	Сбор данных
Инкубация	95 °C	10 минут	Не производится
Установленный этап	95 °C	15 секунд	Не производится
Установленный этап 40 циклов	58 °C	30 секунд	Производится для Цикла А по «Зеленому» (Green), «Желтому» (Yellow)

6. Нажмите ОК. Также, вы можете сохранить такой шаблон для дальнейших запусков, нажав на кнопку «Сохранить как» сверху диалогового окна.
7. Перейдите в Вид (View)>Оптимизация уровня сигнала (Gain Optimization), выберите Оптимизация детектируемых (Optimize Acquiring) в раскрывающемся списке Настроек канала (Channel Settings), и задайте калибровку перед первым измерением (Perform Optimization Before 1st Acquisition). Примечание: Этот этап нужно выполнять только один раз при использовании новой партии реагентов. После определения Оптимизации уровня сигнала (Gain Optimization) используйте те же настройки для будущих запусков с реагентами с тем же номером партии.
8. Загрузить стрипы пробирок в ротор.
9. Перейти к «Анализ» (Run) > «Запустить анализ» (Start Run), затем нажать кнопку «Запуск» (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 обнаружения» (Detection Format).
3. Нажать «Настроить» (Customize), чтобы убедиться в том, что выбраны FAM (460-510) и VIC/HEX/Yellow555 (533-580).
4. Изменить объем реакционной смеси на 30 мкл.
5. Добавьте следующие целевые значения программы и температуры:

Таблица 6.

Наименование программы	Циклы	Режим анализа
------------------------	-------	---------------

Денатурация	1	Нет
Циклирование	40	Количественная оценка

Для этапа Денатурации:

Таблица 7.

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

Для этапа Циклирования:

Таблица 8.

Цель (°C)	Режим сбора данных	Длительность (чч:мм:сс)	Скорость линейного изменения (°C/сек.)
95	Нет	00:00:15	4.4
58	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 «Установка эксперимента» (Experiment Setup) выбрать «Создать новый» (Create New) и ввести следующие параметры цикла.

Таблица 9.

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

3. 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 «Установка 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. Выберите строку A1-H1 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на Положительный контроль (Positive Control).
 8. Выберите строку A2-H2 на макете плашки и измените Тип образца (Sample Type) на NTC (контроль без матрицы).
 9. Выбрать оставшиеся лунки (A3-H12) на макете плашки и изменить «Тип образца» (Sample Type) на «Неизвестные» (Unknown).
 10. Выделите каждую строку отдельно (начиная с A3-H3) и введите название образца в поле Наименование образца (Sample Name). Когда закончите, нажмите Enter на клавиатуре, чтобы записать название образца. Выполните этот шаг для каждого образца.
 11. Нажать на «Настройки» (Settings) и выбрать тип используемой плашки (например, BR Белая (White) или BR Прозрачная (Clear)).
 12. После этого нажать кнопку ОК, чтобы сохранить макет плашки.
 13. Нажать «Дальше» (Next), затем нажать «Запустить анализ» (Start Run), чтобы начать анализ.

5. Анализ данных

Важно: настройки пороговых значений могут потребовать корректировки в зависимости от чувствительности обнаружения флуоресценции каждого термоциклера. Используйте перечисленные ниже настройки в качестве отправной точки.

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

5.1 Настройки прибора

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

Manual threshold (Ручное пороговое значение):

- FAM - Реакция A: 80 000; Реакции B-H: 50 000
- VIC - 10 000

Auto baseline (Автоматические исходные данные) - опционально. Используйте рекомендованные пользовательские исходные данные 3-15, если фоновый шум превышает пороговое значение, вызывая ложные значения Ct.

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

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- "Dynamic Tube" (Динамическая пробирка): Вкл.
- "Slope Correct" (Поправка наклона): Вкл.
- "Green Channel Threshold" (Пороговое значение Зеленого канала): 0,06
- "Yellow Channel Threshold" (Пороговое значение желтого канала): 0,06

Удаление выбросов (Outlier Removal) может быть установлено на уровне 5% для удаления фоновых сигналов, которые могут препятствовать анализу.

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

Вариант A: Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

Детектор	Коэффициент
FAM (465-510)	45 (180 для G719X)
VIC (533-580)	30

1. Выберите "Subset editor" (Редактор подгруппы) и создайте подгруппы для FAM для каждой реакции от 1 до 8 и дополнительную подгруппу для VIC, включающую все реакции (итого 9 подгрупп).

- a. При анализе всех лунок будет учитываться фон всех лунок и автоматически вычитаться из него, что может привести к потенциально ложноположительным/отрицательным результатам.
 2. Выберите Analysis (Анализ).
 3. Выберите Abs Quant/Fit Points.
 4. Выберите подгруппу VIC со всеми реакциями и нажмите Select (Выбрать).
 5. Во вкладке Cycle Range (Диапазон циклов) выберите кнопку "Filter Comb".
 6. Выберите VIC (533-580).
 - a. First cycle (Первый цикл): 15
 - b. Last Cycle (Последний цикл): 40
 7. Выберите вкладку Noise Band (Уровень шума).
 8. Выберите стрелку рядом с Noiseband (Auto).
 9. Выберите NoiseBand (STD Mult).
 10. В поле STD multiplier введите значение для VIC из колонки "Коэффициент" из таблицы выше.
 11. Нажмите Calculate (Рассчитать).
 12. Повторите эти шаги для всех созданных подгрупп FAM (Реакции 1-8).

Дополнительно: сохраните созданные настройки, выбрав стрелку рядом с Apply Template (Принять шаблон). Сохраните шаблон в папку для шаблонов. Во время будущих запусков просто выберите Apply Template (Принять шаблон).

Вариант Б: Альтернативный вариант анализа с использованием NoiseBand (Fluorescence)

1. Выберите "Subset editor" (Редактор подгруппы) и создайте подгруппы для FAM для каждой реакции от 1 до 8 и дополнительную подгруппу для VIC, включающую все реакции (итого 9 подгрупп).
 - a. При анализе всех лунок будет учитываться фон всех лунок и автоматически вычитаться из него, что может привести к потенциально ложноположительным/отрицательным результатам.
 2. Выберите Analysis (Анализ).
 3. Выберите Abs Quant/Fit Points.
 4. Выберите подгруппу VIC со всеми реакциями и нажмите Select (Выбрать).
 5. Во вкладке Cycle Range (Диапазон циклов) выберите кнопку "Filter Comb".
 6. Выберите VIC (533-580).
 - a. First cycle (Первый цикл): 15
 - b. Last Cycle (Последний цикл): 40
 7. Выберите вкладку Noise Band (Уровень шума).
 8. Выберите стрелку рядом с Noiseband (Auto).
 9. Выберите Noiseband (Fluoresc).
 10. В поле Noise Band введите значение, которое соответствует значениям Ct в допустимых диапазонах ПК. Свяжитесь с представителем, если требуется больше деталей.
 11. Нажмите Calculate (Рассчитать).
 12. Повторите эти шаги для всех созданных подгрупп FAM (Реакции 1-8).

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с Модулем реакционным оптическим CFX96

Проводите анализ данных в программном обеспечении прибора ПЦР в реальном времени с использованием следующих критериев:

- "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).

5.2 Интерпретация результатов

Приведенные ниже инструкции применимы для всех приборов.

1. Проверьте график амплификации внутреннего контроля (IC/желтый/VIC) для каждого образца, выбрав все 8 реакционных лунок. Значение Ct должно быть одинаковым во всех 8 реакциях в каждом образце; однако это значение в значительной степени зависит от количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в реакции, и может отличаться между отдельными образцами FFPE из-за фрагментации ДНК. Нормальный диапазон значений Ct для IC составляет 24–32 для образцов FFPE (см. Исключение для G719X).
2. Выберите лунки с положительным контролем и проверьте каждый детектор FAM на наличие сигнала.
3. Выберите все 8 реакционных лунок каждого неизвестного образца и проверьте детекторы FAM на наличие сигнала. Если сигнал отсутствует, образец не содержит мутации, соответствующей выбранному детектору. Поскольку образцы FFPE могут содержать разное количество опухолевых клеток, значения Ct для мутантных реакций могут сильно различаться. Мутантные образцы с более высоким содержанием опухолевой ДНК будут иметь меньшие значения Ct, тогда как мутантные образцы с более низким содержанием опухолевой ДНК будут иметь более высокие значения Ct.

Все приборы, за исключением прибора Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, за исключением G719X:

Сt для FAM®/зеленый :	Сt для VIC/желтый	Статус мутации
≤ 38	$32 > Ct \geq 24$	Положительный
Любое	< 24	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).
$\geq 38,01$ или отсутствует	$32 \leq Ct < 24$	Отрицательный
Любое	> 32	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).

Все приборы, за исключением прибора Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, для G719X:

Сt для FAM®/зеленый :	Сt для VIC/желтый	Статус мутации
≤ 37	$32 > Ct \geq 25,8$	Положительный
Любое	$< 25,8$	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25,8-32).
$\geq 37,01$	$32 \leq Ct < 25,8$	Отрицательный
Любое	> 32	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (25,8-32).

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, за исключением G719X:

Сt для FAM®/зеленый	Сt для VIC/желтый:	Статус мутации
≤ 38	$32 > Ct \geq 24$	Положительный
Любое	< 24	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).
$\geq 38,01$ или отсутствует	$32 \leq Ct < 24$	Отрицательный
Любое	> 32	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-32).

Анализатор LightCycler 480-II для проведения ПЦР-анализа в режиме реального времени, для G719X:

Сt для FAM®/зеленый	Сt для VIC/желтый:	Статус мутации
≤ 37	$29 > Ct \geq 25,8$	Положительный
Любое	< 24	Избыточная начальная концентрация. Повторный анализ с меньшим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-29).
$\geq 37,01$ или отсутствует	$29 \leq Ct < 24$	Отрицательный

Любое	> 29	Недостаточная начальная концентрация. Повторный анализ с большим количеством ДНК, чтобы значение VIC находилось в допустимом диапазоне (24-29).
-------	------	---

6. Приложения

6.1 Мутации, определяемые этим набором

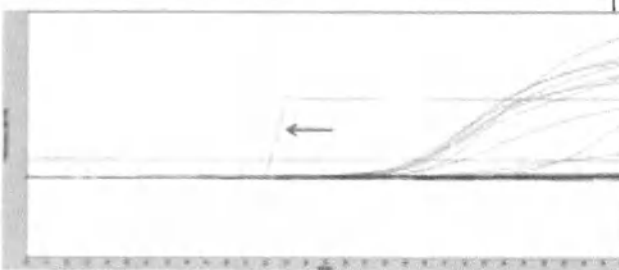
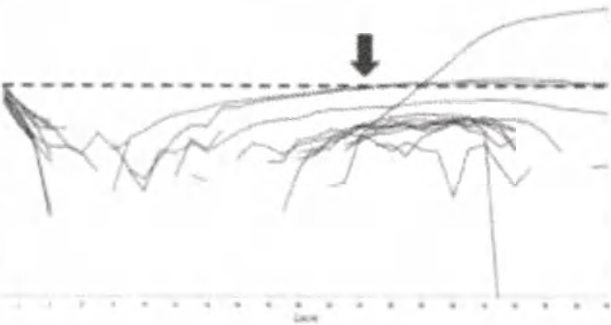
Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Cosmic ID	Нукл. зам. по HGVS	Ам.зам. по HGVS
Экзон 18				
c.2155G>A	p.G719S	6252	LRG_304t1:c.2155G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Ser)
c.2155G>T	p.G719C	6253	LRG_304t1:c.2155G>T	LRG_304p1:p.(Gly719Cys)
c.2156G>A	p.G719D	18425	LRG_304t1:c.2156G>A	LRG_304p1:p.(Gly719Asp)
c.2156G>C	p.G719A	6239	LRG_304t1:c.2156G>C	LRG_304p1:p.(Gly719Ala)
Экзон 19				
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2234_2248del15	p.K745_A750delinsT	1190791	LRG_304t1:c.2234_2248del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Ala750delinsThr)
c.2235_2246del12	p.E746_E749delELRE	28517	LRG_304t1:c.2235_2246del12	LRG_304p1:p.(Glu746_Glu749del)
c.2235_2248delinsAATTC	p.E746_A750delinsIP	13550	LRG_304t1:c.2235_2248delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsIlePro)
c.2235_2249del15	p.E746_A750delELREA	6223	LRG_304t1:c.2235_2249del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2235_2251delinsAATTC	p.E746_T751delinsIP	13552	LRG_304t1:c.2235_2251delinsAATTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIlePro)
c.2235_2252delinsAAT	p.E746_T751delinsI	13551	LRG_304t1:c.2235_2252delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIle)
c.2235_2255delinsAAT	p.E746_S752delinsI	12385	LRG_304t1:c.2235_2255delinsAAT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsIle)
c.2236_2248delinsAGAC	p.E746_A750delinsRP	12413	LRG_304t1:c.2236_2248delinsAGAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsArgPro)
c.2236_2248delinsCAAC	p.E746_A750delinsQP	13557	LRG_304t1:c.2236_2248delinsCAAC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsGlnPro)
c.2236_2250del15	p.E746_A750delELREA	6225	LRG_304t1:c.2236_2250del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)
c.2236_2253del18	p.E746_T751delELREAT	12728	LRG_304t1:c.2236_2253del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751del)
c.2236_2256del21	p.E746_S752delELREATS	133189	LRG_304t1:c.2236_2256del21	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752del)

c.2237_2251delinsTTC	p.E746_T751delinsVP	18421	LRG_304t1:c.2237_2251delinsTTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)
c.2237_2251del15	p.E746_T751delinsA	12678	LRG_304t1:c.2237_2251del15	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsAla)
c.2237_2252delinsT	p.E746_T751delinsV	12386	LRG_304t1:c.2237_2252delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTC	p.E746_T751delinsV	133193	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)
c.2237_2253delinsTTCCT	p.E746_T751delinsVP	52935	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTCCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValPro)
c.2237_2253delinsTTGCT	p.E746_T751delinsVA	12416	LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTGCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValAla)
c.2237_2254del18	p.E746_S752delinsA	12367	LRG_304t1:c.2237_2254del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAla)
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384	LRG_304t1:c.2237_2255delinsT	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2256delinsTC	p.E746_S752delinsV	18426	LRG_304t1:c.2237_2256delinsTC	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)
c.2237_2257delinsTCT	p.E746_P753delinsVS	18427	LRG_304t1:c.2237_2257delinsTCT	LRG_304p1:p.(Glu746_Pro753delinsValSer)
c.2233_2247del15	p.K745_E749delKFLRE	26038	LRG_304t1:c.2233_2247del15	LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)
c.2238_2248delinsGC	p.L747_A750delinsP	12422	LRG_304t1:c.2238_2248delinsGC	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)
c.2238_2252delinsGCA	p.L747_T751delinsQ	12419	LRG_304t1:c.2238_2252delinsGCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2240_2254del	p.L747_T751delLREAT	12369	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2238_2255del18	p.E746_S752delinsD	6220	LRG_304t1:c.2238_2255del18	LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp)
c.2239_2247delTTAAGAGAA	p.L747_E749delLRE	6218	LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGAGAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Glu749del)
c.2239_2248TTAAGA GAAG>C	p.L747_A750delinsP	12382	LRG_304t1:c.2239_2248delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)
c.2239_2251delinsC	p.L747_T751delinsP	12383	LRG_304t1:c.2239_2251delinsC	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsPro)
c.2239_2252delinsCA	p.L747_T751delinsQ	12420	LRG_304t1:c.2239_2252delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)
c.2239_2256delinsCAA	p.L747_S752delinsQ	12403	LRG_304t1:c.2239_2256delinsCAA	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752delinsGln)
c.2239_2256del18	p.L747_S752delLREATS	6255	LRG_304t1:c.2239_2256del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)

c.2239_2258delinsCA	p.L747_P753delinsQ	12387	LRG_304t1:c.2239_2258delinsCA	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsGln)
c.2239_2262del24	p.L747_K754delLREATSPK	24970	LRG_304t1:c.2239_2262del24	LRG_304p1:p.(Leu747_Lys754del)
c.2240_2251del12	p.L747_T751delinsS	6210	LRG_304t1:c.2240_2251del12	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)
c.2240_2254del15	p.L747_T751delLREAT	12369	LRG_304t1:c.2240_2254del15	LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)
c.2240_2257del18	p.L747_P753delinsS	12370	LRG_304t1:c.2240_2257del18	LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer)
c.2248_2273delinsCC	p.A750_E758delinsP	26440	LRG_304t1:c.2248_2273delinsCC	LRG_304p1:p.(Ala750_Glu758delinsPro)
c.2250_2264del15	p.T751_A755del	26718	LRG_304t1:c.2250_2264del15	LRG_304p1:p.(Thr751_Ala755del)
c.2252_2275del24	p.T751_E758delTSPKANKE	23634	LRG_304t1:c.2252_2275del24	LRG_304p1:p.(Thr751_Glu758del)
c.2252_2276delinsA	p.T751_I759delinsN	96856	LRG_304t1:c.2252_2276delinsA	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2252_2277delinsAT	p.T751_I759delinsN	24270	LRG_304t1:c.2252_2277delinsAT	LRG_304p1:p.(Thr751_Ile759delinsAsn)
c.2253_2276del24	p.S752_I759delSPKANKEI	13556	LRG_304t1:c.2253_2276del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)
c.2254_2277del24	p.S752_I759delSPKANKEI	6256	LRG_304t1:c.2254_2277del24	LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)
Экзон 20				
c.2369C>T	p.T790M	6240	LRG_304t1:c.2369C>T	LRG_304p1:p.(Thr790Met)
c.2303G>T	p.S768I	6241	LRG_304t1:c.2303G>T	LRG_304p1:p.(Ser768Ile)
c.2300_2308dup	p.A767_V769dup	12376	LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGCGTGG	LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)
c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG	12378	LRG_304t1:c.2310_2311insGGT	LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)
c.2317_2319insCAC	p.H773_V774insH	12377	LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC	LRG_304p1:p.(His773dup)
Экзон 21				
c.2573T>G	p.L858R	6224	LRG_304t1:c.2573T>G	LRG_304p1:p.(Leu858Arg)
c.2582T>A	p.L861Q	6213	LRG_304t1:c.2582T>A	LRG_304p1:p.(Leu861Gln)

6.2 Устранение неисправностей

Проблема:	Решение:
Сигнал внутреннего контроля (VIC) для образца имеет значение Ct выше, чем верхнее пороговое значение Ct, указанное в разделе 6.	· Если целевой сигнал появляется после порогового значения или не появляется вообще, реакция была недостаточно насыщена (недостаточно ДНК), повторите анализ образцов с большим количеством ДНК. · Если анализ образца, в котором, точно имеются ингибиторы ПЦР (например, образцы меланомы имеют меланин, который является ингибитором ПЦР), необходимо провести повторный анализ образца с меньшим количеством ДНК или разбавить образец водой в соотношении 1:5 и повторно провести анализ. · Если увеличение/уменьшение объема ДНК не решает проблему: 1. Выделить ДНК заново (при возможности) 2. Переосадить этанолом и вновь ресуспендировать в меньшем объеме растворителя. 3. Использовать коммерчески доступный концентрат ДНК.
Целевой и/или 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 настоящей инструкции.
Аномальный пик на графике амплификации образца с помощью прибора Life Technologies (ABI).	· Аномальная линия пика может быть результатом пузырьков в лунке, содержащей образец. Центрифугировать плашку перед повторным запуском 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.
Целевой сигнал пересекает пороговое значение для образцов КБМ при проведении анализа на приборе Life Technologies.  <i>Amplification Plot</i> <i>График амплификации</i> <i>Cycle</i> <i>Цикл</i>	- Обеспечить установку ручных пороговых значений, предложенных в настоящей инструкции. - Убедиться в том, что сигнал не является истинной амплификацией путем проверки сигнала на многокомпонентном графике (приборы Life Technologies). Если сигнал горизонтальный, то это не истинная амплификация. Если сигнал на многокомпонентном графике является линейным и сигнал пересекает пороговое значение, необходимо отрегулировать базовый конечный цикл. - Установить начальный цикл на 3 и остановить: самый ранний цикл VIC Ct (если сигнал по-прежнему пересекает пороговое значение, увеличивать число циклов с шагом 3 до тех пор, пока сигнал не перестанет пересекать пороговое значение).
Образец дикого типа имеет значение Ct целевого сигнала, которое попадает в параметры для статуса положительной мутации.	- Если сигнал внутреннего контроля находится в пределах диапазона, тогда образец дикого типа имеет контаминацию положительным образцом, геномной ДНК или положительным контролем. Провести анализ повторно с новым образцом дикого типа. - Также возможно, что образец дикого типа не является истинным диким типом.
Кривые амплификации выглядят как на картинке ниже.	Указывает на неверные настройки исходных данных (baseline). Требуется корректировка настроек исходных данных на приборе для ПЦР в реальном времени.

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 производстве 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 EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах пациентов, фиксированных в формалине и залитых в парафин, 52 реакции“», представленном на русском и английском языках.]

/подпись/

12 сентября 2022 г.

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)

12 сентября 2022 г., ко мне,
Дата

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

лично явился

Мэтью Минковски.
Имя (имена) подписывающего(-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

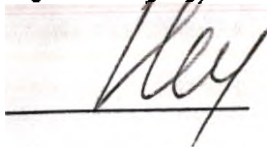
☐ Прочее: _____

☐ Прочее: _____

Подписавшее лицо представляет интересы: _____

Подписавшее лицо представляет интересы: _____

Перевод данного текста выполнен мной, переводчиком Нетепиной Анастасией Михайловной.



Российская Федерация

Город Москва

Двадцатого января две тысячи двадцать третьего года

Я, Квитко Федор Александрович, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Нетепиной Анастасии Михайловны.

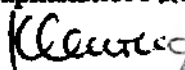
Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 62/137-н/77-2023- 7- 1436

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.

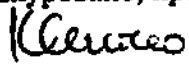






Ф.А. Квитко

Всего прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 34 листов

Нотариус 

Российская Федерация
Город Москва

Двадцатого января две тысячи двадцать третьего года
Я, Квитко Федор Александрович, нотариус города Москвы,
свидетельствую верность копии с представленного мне
документа.

Зарегистрировано в реестре: № 62/137-н/77-2023- 7-1438
Уплачено за совершение нотариального действия: 6500 руб.



Квитко



Всего прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 35 лист(а) (ов)

Нотариус Квитко

Ф.А. Квитко