

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»



М. Е. Сенина

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНОВ KRAS, NRAS,
BRAF, EGFR, PIK3CA ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ МЕТОДОМ
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ «АМПЛИПРАЙМ® ПРОФИЛЬ МУТАЦИЙ
ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ» ПО ТУ 21.20.23-091-09286667-2020

Инструкция по применению версии 15.03.24-3

Лист утверждения



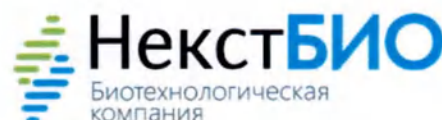
Набор реагентов для детекции точечных мутаций генов KRAS, NRAS,
BRAF, EGFR, PIK3CA при колоректальном раке
методом масс-спектрометрии
«АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке»
по ТУ 21.20.23-091-09286667-2020

АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел.: (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ПРИНЦИП МЕТОДА	5
3. КОМПЛЕКТАЦИЯ	6
4. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
5.1. Эффективность экстракции ДНК	8
5.2. Аналитическая специфичность и аналитическая чувствительность (предел обнаружения)	8
5.3. Воспроизводимость и повторяемость	10
5.4. Интерферирующие вещества	10
6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	11
7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	11
8. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	15
8.1. Предварительная подготовка исследуемого материала	15
8.2. Депарафинизация и экстракция ДНК из исследуемых образцов	15
8.3. Количественная оценка ДНК и оценка качества	16
8.4. Этапы: ПЦР, SAP, анализ и интерпретация результатов	16
9. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	17
10. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	19
10.1. Взятие исследуемого материала	19
10.2. Хранение и транспортировка исследуемого материала	19
10.3. Предварительная подготовка исследуемого материала	19
11. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ	19
11.1. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.	19
11.1.1. Депарафинизация.	19
11.1.2. Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК	20
11.1.3. Процедура экстракции ДНК	20
11.1.4. Хранение очищенной ДНК	21
11.2. Количественная и качественная оценка выделенной ДНК	21
11.2.1. Точка остановки	22
11.3. Этап ПЦР	22
11.3.8. Точка остановки	23
11.4. Выполнение стадии SAP	23
11.4.9. Точка остановки	24
11.5. Этап iPLEX	24
11.6. Подготовка программного комплекса MassArray. Модуль PlateEditor	26
11.7. Привязка виртуального планшета к микрочипу. Модуль Chip Linker	27
11.8. Подготовка программного комплекса MassArray. Модуль SpectroAQUIRE	27
11.9. Анализ результатов исследования	28
12. РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ	30
13. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	30
13.1. Срок годности	30
13.2. Транспортирование	30
13.3. Хранение	31
14. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	31
15. СВЕДЕНИЯ О СТЕРИЛЬНОСТИ	31
16. СВЕДЕНИЯ О СОДЕРЖАНИИ МАТЕРИАЛОВ ЖИВОТНОГО И (ИЛИ) ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	31
17. СВЕДЕНИЯ О СОДЕРЖАНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ	32
18. СВЕДЕНИЯ О СТАБИЛЬНОСТИ	32
19. СВЕДЕНИЯ О МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ	32
20. ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	33
21. ЛИТЕРАТУРНЫЕ ССЫЛКИ	34
22. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	35
Приложение 1	36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксинуклеотидтрифосфат
МКБ	- международная классификация болезней
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
СОП	- стандартный образец предприятия
SNR	- Signal to noise ratio, отношение сигнал-шум
KPP	- колоректальный рак
SAP	- shrimp alkaline phosphatase, щелочная фосфатаза креветки
Вода HPLC-grade	- High pure liquid chromatography, деионизированная вода для хроматографии
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
РУ	- регистрационное удостоверение
Образец FFPE	- гистологический парафиновый блок – биоматериал, фиксированный формалином и заключенный в парафин (formalin-fixed paraffin embedded tissue)
ООО «НекстБио»	- Общество с ограниченной ответственностью «НекстБио»

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для детекции точечных мутаций генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA при колоректальном раке методом масс-спектрометрии «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» по ТУ 21.20.23-091-09286667-2020.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке», а также сокращение Набор реагентов.

СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

ООО «НекстБио»,

Адрес: Россия, 111394 г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2.

тел.: (495) 620-08-73.

e-mail: info@nextbio.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» предназначен для экстракции ДНК из опухолевой ткани, фиксированной формалином и заключенной в парафин, и детекции 86 точечных мутаций генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA в образцах экстрагированной ДНК с помощью системы масс-спектрометрического анализа MassARRAY® Dx Analyzer 4 с модулем подготовки чипов (Agena Bioscience, Inc., США). Набор реагентов предназначен для использования в лабораторной генетической диагностике профиля мутаций при колоректальном раке. Полный перечень выявляемых набором мутаций при колоректальном раке приведен в приложении 1 инструкции по применению набора реагентов.

1.2. Описание целевого анализата: Набор реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» применяется для детекции 86 точечных мутаций генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA с помощью системы масс-спектрометрического анализа MassARRAY® Dx Analyzer 4 с модулем подготовки чипов (Agena Bioscience, Inc., США) в ДНК, экстрагированной из опухолевой ткани, заключенной в парафиновый блок.

Профиль определяемых мутаций набора реагентов включает мутации генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA, рекомендованные к исследованию в национальных рекомендациях ассоциации онкологов России и Российского общества клинической онкологии¹: «Рекомендуется выполнить анализ биоптата опухоли на мутацию RAS (экзоны 2-4 генов KRAS и NRAS), BRAF и на микросателлитную нестабильность, если диагностированы или заподозрены отдаленные метастазы аденокарциномы, это может повлиять на выбор таргетного агента в лечении метастатического процесса».

1.3. Специфическая патология: злокачественное новообразование прямой кишки (МКБ-10: C20), злокачественное новообразование ободочной кишки (МКБ-10: C18) и злокачественное новообразование ректосигмоидного соединения (МКБ-10: C19).

1.4. Тип анализируемого образца: материалом для исследования являются фиксированные формалином и заключённые в парафин ткани (FFPE), подготовленные в формате срезов с FFPE-блоков (биоматериал срезов с FFPE-блоков).

1.5. Область применения: клиническая лабораторная диагностика. Набор реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» является вспомогательным средством в клинической лабораторной диагностике.

1.6. Показания и противопоказания к применению набора реагентов. Набор реагентов используется в лабораторной генетической диагностике профиля мутаций при колоректальном раке. Специфическая патология – злокачественное новообразование прямой кишки (МКБ-10: C20), злокачественное новообразование ободочной кишки (МКБ-10: C18) и злокачественное новообразование ректосигмоидного соединения (МКБ-10: C19).

Профиль определяемых мутаций набора реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» включает мутации генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA, рекомендованные к исследованию в национальных рекомендациях ассоциации онкологов России и Российского общества клинической онкологии¹.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

¹«Клинические рекомендации. Рак прямой кишки МКБ 10: C20», Москва, 2018, «Клинические рекомендации. Рак ободочной кишки и ректосигмоидного отдела МКБ 10: C18/C19», Москва, 2018.

1.7. Ограничения использования.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.

1.8. Потенциальные пользователи медицинского изделия. К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»).

Набор реагентов предназначен для эксплуатации такими профессиональными пользователями, как врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам.

1.9. Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия. Набор реагентов используется в диагностике всех групп населения.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследуемые образцы проходят процедуру депарафинизации, после чего обрабатываются лизирующим раствором в присутствии частиц силики – сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, а также осаждается раствором для преципитации, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывке. При добавлении ТЕ-буфера для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

Принцип тестирования основан на проведении реакции амплификации участков ДНК исследуемых генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента ПЦР.

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термоллабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

После удаления свободных нуклеотидов на стадии SAP на этапе iPlex зонд к специфической мутации удлиняется на 1 нуклеотид по матрице продукта ПЦР (Рисунок 1). Для этого используют смесь дидезоксинуклеотидов. Повышенная чувствительность к реакции iPlex достигается путем изменения соотношения нуклеотидной смеси в реакции удлинения в пользу мутантных аллелей. В зависимости

от включенного нуклеотида продукты будут иметь различную молекулярную массу и при разделении в масс-спектрометре будут визуализированы в виде отдельных пиков. Продукты удлинения (аналит) обессоливают, переносят на микрочип SpectroCHIP (кремниевый чип с предварительно нанесенным матричным кристаллом) и затем загружают в анализатор MassARRAY (масс-спектрометр MALDI-TOF). Сокристаллы аналита и матрицы ионизируют с помощью лазера. Положительно заряженные молекулы ускоряются в магнитном поле прибора по направлению к детектору. Разделение происходит по времени пролета, которое пропорционально массе и заряду отдельных молекул. После обработки данных создается спектрограмма с относительной интенсивностью по оси Y и массой / зарядом по оси X.

Рисунок 1. Схема исследования мутации с заменой G>A в опухолевой ДНК с помощью набора «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке».



Система MassARRAY, использующая методологию iPLEX, обеспечивает целенаправленный мультиплексный метод обнаружения мутантного аллеля, при этом наименьшая частота мутантного аллеля в регионах генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA, которую способно выявлять изделие, составляет 2,5 %.

Таблица 1

Локализация исследуемых мутаций в генах.

Ген	Область гена	Количество исследуемых мутаций
BRAF	Экзон 11: кодон 469; Экзон 15: кодон 594 и 600	3
KRAS	Экзон 2: кодон 12,13; Экзон 3: кодон 59, 61; Экзон 4: кодон 117, 146	47
NRAS	Экзон 2: кодон 12,13; Экзон 3: кодон 61; Экзон 4: кодон 146	30
EGFR	Экзон 12: кодон 492	2
PIK3CA	Экзон 9: кодон 542, 545; Экзон 20: кодон 1047	4

3. КОМПЛЕКТАЦИЯ

Набор выпускается в четырех формах. Параметры форм выпуска указаны в таблице 2. Все формы выпуска состоят из трех комплектов. Состав комплектов указан в таблице 3.

Инструкция предоставляется в электронном виде на официальном сайте Производителя по адресу: <http://www.nextbio.ru/reagents/>.

Паспорт качества находится в электронном виде на официальном сайте Производителя по адресу: www.nextbio.ru.

Таблица 2

Параметры форм выпуска набора

Форма выпуска	Количество образцов, на которое рассчитан набор	Наличие в составе Ионообменной смолы
Форма выпуска 1	60	Нет
Форма выпуска 2	60	Да
Форма выпуска 3	36	Нет
Форма выпуска 4	36	Да

Состав набора и характеристики его компонентов

Компонент	Внешний вид и агрегатное состояние	Формы выпуска 1, 2. Объем* реагента × количество шт.	Формы выпуска 3, 4. Объем* реагента × количество шт.
Комплект 1 из 3. Комплект для выделения ДНК из парафиновых блоков			
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость (возможно образование осадка в виде кристаллов)	20 мл × 1 шт.	12 мл × 1 шт.
Раствор для преципитации	Прозрачная жидкость	120 мл × 1 шт.	75 мл × 1 шт.
Раствор для отмывки 3	Прозрачная жидкость	35 мл × 1 шт.	20 мл × 1 шт.
Раствор для отмывки 4	Прозрачная жидкость	15 мл × 1 шт.	10 мл × 1 шт.
Лизирующий реагент	Прозрачная жидкость	5 мл × 1 шт.	3 мл × 1 шт.
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,3 мл × 1 шт.	0,8 мл × 1 шт.
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная жидкость	10 мл × 1 шт.	6 мл × 1 шт.
Комплект 2 из 3. Комплект для детекции точечных мутаций			
Фермент ПЦР	Прозрачная жидкость	0,125 мл × 1 шт.	0,065 мл × 1 шт.
MgCl ₂	Прозрачная жидкость	0,32 мл × 1 шт.	0,16 мл × 1 шт.
Буфер ПЦР	Прозрачная жидкость	0,4 мл × 1 шт.	0,2 мл × 1 шт.
Фермент УДГ	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь дНТФ	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,04 мл × 1 шт.
Смесь праймеров (KPP)	Прозрачная жидкость	0,84 мл × 1 шт.	0,4 мл × 1 шт.
Вода (HPLC-grade)	Прозрачная жидкость	1,1 мл × 3 шт.	0,75 мл × 3 шт.
Буфер SAP	Прозрачная жидкость	0,14 мл × 1 шт.	0,07 мл × 1 шт.
Фермент SAP	Прозрачная жидкость	0,24 мл × 1 шт.	0,12 мл × 1 шт.
Буфер iPLEX	Прозрачная жидкость	0,125 мл × 1 шт.	0,065 мл × 1 шт.
Фермент iPLEX Pro	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,013 мл × 1 шт.
Смесь E1	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь E2	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь E3	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь E4	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь E5	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь E6	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь E7	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь E8	Прозрачная жидкость	0,08 мл × 1 шт.	0,037 мл × 1 шт.
Смесь T1	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь T2	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь T3	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь T4	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь T5	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь T6	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь T7	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Смесь T8	Прозрачная жидкость	0,025 мл × 1 шт.	0,01 мл × 1 шт.
Калибратор	Прозрачная жидкость	0,5 мл × 1 шт.	0,4 мл × 1 шт.
Комплект 3 из 3. Вспомогательные материалы для детекции точечных мутаций			
Компонент	Внешний вид и агрегатное состояние	Формы выпуска 1, 2. Количество микрочипов × количество упаковок с микрочипами в наборе шт.	Формы выпуска 3, 4. Количество микрочипов × количество упаковок с микрочипами в наборе шт.
Микрочип SpectroCHIP	кремниевая пластинка с предварительно нанесенным матричным кристаллом	1 × 5 шт.	1 × 3 шт.

Компонент	Внешний вид и агрегатное состояние	Форма выпуска 2. Масса* реагента × количество шт.	Форма выпуска 4. Масса* реагента × количество шт.
Ионообменная смола ²	порошок слегка бежевого цвета	28 г × 1 шт.	28 г × 1 шт.
*- допустимая погрешность может составлять ±5 %			

4. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Технические характеристики набора приведены в таблице 3.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы характеристики, приведенные ниже. В случае изменения аналитических характеристик изделия следует обратиться к производителю ООО «НекстБио» по адресу 111394, г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2, e-mail: info@nextbio.ru.

5.1. Эффективность экстракции ДНК

Эффективность экстракции ДНК оценивалась для компонента набора «Комплект для выделения ДНК из парафиновых блоков» при использовании искусственно-синтезированной последовательности ВКО-FL, внесенной в исследуемый образец (СОП).

При проведении ПЦР в режиме «реального времени» последовательность ВКО-FL обнаружена.

Результаты исследования контрольных образцов соответствовали всем критериям оценки результатов, указанным в инструкции к набору для амплификации.

5.2. Аналитическая специфичность и аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Чувствительность и специфичность для каждого анализа были определены с использованием стандартных образцов, состоящих из смеси синтетических двухцепочечных ДНК-фрагментов исследуемых генов: 2,5 % копий мутантного аллеля и 97,5 % копий нормального аллеля.

За предел обнаружения принимали минимальную концентрацию мутантного аллеля в смеси с нормальным аллелем или минимальный процент нахождения мутантного аллеля в смеси с нормальным аллелем, так как в норме принято считать, что у здорового человека количество не мутированных генов -100 %.

Специфичность набора составила 94-100 %. Чувствительность и специфичность набора определяли с использованием программного обеспечения Somatic Variant Report с Z-score 3 и отношением сигнал/шум (SNR) равным 5. Результаты анализа чувствительности и специфичности представлены в таблице 4. Предел обнаружения набора составил 0,025 нг/мкл или 2,5 %.

Таблица 4

Чувствительность и специфичность набора реагентов

№	Ген	Мутация	Мутация (по базе данных Cosmic)	Специфичность*	Предел обнаружения**, нг/мкл	Предел обнаружения*** (%)
1.	BRAF	c.1406G>A, p.G469E	461	98 %	0,025	2,5
2.	BRAF	c.1781A>G, p.D594G	467	98 %	0,025	2,5

² Входит в состав форм выпуска 2 и 4.

№	Ген	Мутация	Мутация (по базе данных Cosmic)	Специфичность*	Предел обнару- жения**, нг/мкл	Предел обнару- жения*** (%)
3.	BRAF	c.1799T>A, p.V600E	476	100 %	0,025	2,5
4.	EGFR	c.1476C>A/G, p.S492R	236670	99 %	0,025	2,5
5.	EGFR	c.1474A>C, p.G12F	236671	98 %	0,025	2,5
6.	KRAS	c.34_35GG>TT, p.G12F	512	98 %	0,025	2,5
7.	KRAS	c.34_35GG>CT, p.G12L	514	99 %	0,025	2,5
8.	KRAS	c.35_36GT>TC, p.G12V	515	99 %	0,025	2,5
9.	KRAS	c.175G>A, p.A59T	546	99 %	0,025	2,5
10.	KRAS	c.175G>T, p.A59S	1235389	100 %	0,025	2,5
11.	KRAS	c.176C>A, p.A59E	547	100 %	0,025	2,5
12.	KRAS	c.176C>G, p.A59G	28518	100 %	0,025	2,5
13.	KRAS	c.181C>A, p.Q61K	549	100 %	0,025	2,5
14.	KRAS	c.181C>G, p.Q61E	550	100 %	0,025	2,5
15.	KRAS	c.182A>C, p.Q61P	551	100 %	0,025	2,5
16.	KRAS	c.182A>G, p.Q61R	552	100 %	0,025	2,5
17.	KRAS	c.182A>T, p.Q61L	553	100 %	0,025	2,5
18.	KRAS	c.183A>C, p.Q61H	554	100 %	0,025	2,5
19.	KRAS	c.183A>T, p.Q61H	555	100 %	0,025	2,5
20.	KRAS	c.35_36GT>AC, p.G12D	14209	99 %	0,025	2,5
21.	KRAS	c.34_35GG>TA, p.G12Y	25081	99 %	0,025	2,5
22.	KRAS	c.35_36GT>AG, p.G12E	30566	99 %	0,025	2,5
23.	KRAS	c.34_35GG>AT, p.G12I	34144	99 %	0,025	2,5
24.	KRAS	c.34_36GGT>TGG, p.G12W	36281	99 %	0,025	2,5
25.	KRAS	c.34_36GGT>AGA, p.G12R	249888	99 %	0,025	2,5
26.	KRAS	c.35_36GT>CA, p.G12A	5413585	99 %	0,025	2,5
27.	KRAS	c.34G> A, p.G12S	517	100 %	0,025	2,5
28.	KRAS	c.34G> C, p.G12R	518	100 %	0,025	2,5
29.	KRAS	c.34G> T, p.G12C	516	99 %	0,025	2,5
30.	KRAS	c.35G> A, p.G12D	521	100 %	0,025	2,5
31.	KRAS	c.35G> C, p.G12A	522	99 %	0,025	2,5
32.	KRAS	c.35G> T, p.G12V	520	100 %	0,025	2,5
33.	KRAS	c.37G> A, p.G13S	528	100 %	0,025	2,5
34.	KRAS	c.37_39GGC>CGT, p.G13R	526	99 %	0,025	2,5
35.	KRAS	c.37G> C, p.G13R	529	100 %	0,025	2,5
36.	KRAS	c.37G> T, p.G13C	527	100 %	0,025	2,5
37.	KRAS	c.38G> A, p.G13D	532	100 %	0,025	2,5
38.	KRAS	c.38_39GC>AT, p.G13D	531	99 %	0,025	2,5
39.	KRAS	c.38G> C, p.G13A	533	100 %	0,025	2,5
40.	KRAS	c.38G> T, p.G13V	534	100 %	0,025	2,5
41.	KRAS	c.38_39GC>TT, p.G13V	12721	99 %	0,025	2,5
42.	KRAS	c.38_39GC>AG, p.G13E	30567	99 %	0,025	2,5
43.	KRAS	c.38_39GC>AA, p.G13E	87280	99 %	0,025	2,5
44.	KRAS	c.37_38GG>TT, p.G13F	1685355	99 %	0,025	2,5
45.	NRAS	c.182A> C, p.Q61P	582	100 %	0,025	2,5
46.	KRAS	c.350A> G, p.K117R	4696722	100 %	0,025	2,5
47.	KRAS	c.351A> C, p.K117N	19940	100 %	0,025	2,5
48.	KRAS	c.351A> T, p.K117N	28519	100 %	0,025	2,5
49.	KRAS	c.436G> A, p.A146T	19404	100 %	0,025	2,5
50.	KRAS	c.436G> C, p.A146P	19905	100 %	0,025	2,5
51.	KRAS	c.437C> T, p.A146V	19900	98 %	0,025	2,5
52.	KRAS	c.437C>G, p.A146G	NA	99 %	0,025	2,5
53.	NRAS	c.38G>C, p.G13A	575	99 %	0,025	2,5
54.	NRAS	c.175G>A, p.A59T	578	99 %	0,025	2,5
55.	NRAS	c.176C>G, p.A59G	5878737	99 %	0,025	2,5
56.	NRAS	c.182A>G, p.Q61R	584	100 %	0,025	2,5
57.	NRAS	c.182A>T, p.Q61L	583	98 %	0,025	2,5
58.	NRAS	c.183A>C, p.Q61H	586	94 %	0,025	2,5
59.	NRAS	c.183A>T, p.Q61H	585	100 %	0,025	2,5
60.	NRAS	c.182_183AA>GT, p.Q61R	1168052	99 %	0,025	2,5
61.	NRAS	c.181C>A, p.Q61K	580	100 %	0,025	2,5

№	Ген	Мутация	Мутация (по базе данных Cosmic)	Специфичность*	Предел обнару- жения**, нг/мкл	Предел обнару- жения*** (%)
62.	NRAS	c.181C>G, p.Q61E	581	98 %	0,025	2,5
63.	NRAS	c.349A>G, p.K117E	NA	98 %	0,025	2,5
64.	NRAS	c.350A>G, p.K117R	NA	98 %	0,025	2,5
65.	NRAS	c.351G>C, p.K117N	NA	98 %	0,025	2,5
66.	NRAS	c.351G>T, p.K117N	NA	98 %	0,025	2,5
67.	NRAS	c.34G> A, p.G12S	563	100 %	0,025	2,5
68.	NRAS	c.34G> C, p.G12R	561	100 %	0,025	2,5
69.	NRAS	c.34G> T, p.G12C	562	100 %	0,025	2,5
70.	NRAS	c.35G> A, p.G12D	564	100 %	0,025	2,5
71.	NRAS	c.35G> C, p.G12A	565	100 %	0,025	2,5
72.	NRAS	c.35G> T, p.G12V	566	100 %	0,025	2,5
73.	NRAS	c.37G> A, p.G13S	571	100 %	0,025	2,5
74.	NRAS	c.37G> C, p.G13R	569	100 %	0,025	2,5
75.	NRAS	c.37G> T, p.G13C	570	100 %	0,025	2,5
76.	NRAS	c.38G> A, p.G13D	573	98 %	0,025	2,5
77.	NRAS	c.38G> T, p.G13V	574	100 %	0,025	2,5
78.	NRAS	c.437C> T, p.A146V	4170228	98 %	0,025	2,5
79.	NRAS	c.436G>C, p.A146P	4172577	98 %	0,025	2,5
80.	NRAS	c.436G>T, p.A146S	NA	98 %	0,025	2,5
81.	NRAS	c.437C>G, p.A146G	NA	98 %	0,025	2,5
82.	NRAS	c.436G>A, p.A146T	27174	100 %	0,025	2,5
83.	PIK3CA	c.1624G> A, p.E542K	760	100 %	0,025	2,5
84.	PIK3CA	c.1633G> A, p.E545K	763	100 %	0,025	2,5
85.	PIK3CA	c.3140A> G, p.H1047R	775	100 %	0,025	2,5
86.	PIK3CA	c.3140A> T, p.H1047L	776	100 %	0,025	2,5

* - специфичность набора определена с использованием программного обеспечения Somatic Variant Report с Z-score 3 и отношением сигнал/шум (SNR) равным 5.
** - предел обнаружения - минимальная концентрация мутантного аллеля в смеси с нормальным аллелем.
*** - предел обнаружения - минимальный процент нахождения мутантного аллеля в смеси с нормальным аллелем.

5.3. Воспроизводимость и повторяемость

Проверку воспроизводимости (с использованием двух серий набора реагентов в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах) и повторяемости (с использованием одной серии набора реагентов в одной лаборатории, одним оператором, на одном и том же приборе, в течение 1 дня) проводили путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Оценку процента точных определений (PCC; Percent Correct Call) для всех мутантных образцов и образцов дикого типа проводили путем сравнения результата определения с помощью набора реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» с ожидаемым результатом определения мутации (обнаружена или не обнаружена ожидаемая мутация) в каждом образце. Процент точных определений рассчитывали, как 100 % количество верных определений, деленное на количество предпринятых определений.

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием Набора реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» составили не менее 95 %.

5.4. Интерферирующие вещества

Для того, чтобы оценить влияние потенциально интерферирующих веществ, было выполнено исследование путем анализа воздействия каждого вещества на результаты исследования.

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора реагентов

Экзогенные потенциально интерферирующие вещества	Концентрация (мкл/25 мкл элюата)
Парафиновый воск (в ксилоле)	$2,50 \times 10^{-05}$
Ксилол	$2,50 \times 10^{-05}$
Протеиназа К	$3,30 \times 10^{-06}$
Эндогенные потенциально интерферирующие вещества	Концентрация
Гемоглобин	до 2 мг/мл
Некротизированные ткани (до 80 % некротизированных тканей в образце)	до 80 % некротизированных тканей в образце

Ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» проводить детекцию точечных мутаций генов.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

По результатам проведения клинических испытаний было определено:

Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность МИ «Набор реагентов для детекции точечных мутаций генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA при колоректальном раке методом масс-спектрометрии «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» по ТУ 21.20.23-091-09286667-2020», производства ООО «НекстБио», Россия составили:

Таблица 6

Диагностические характеристики набора реагентов

Код диагноза по МКБ-10	ИП	ЛП	ЛО	ИО	Всего	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
C20	75	0	0	55	130	100,0 % (95,20 % - 100,0 %)	100,0 % (93,51 % - 100,0 %)
C18	74	0	0	55	129	100,0 % (95,14 % - 100,0 %)	100,0 % (93,51 % - 100,0 %)
C19	74	0	0	54	128	100,0 % (95,14 % - 100,0 %)	100,0 % (93,40 % - 100,0 %)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Исследования должны проводиться с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Исследования проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточной и вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса.
- Температура в помещениях лаборатории от 19 до 25 °С, относительная влажность от 40 до 75 %.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне 2 - экстракции, продолжать в Зоне 3 - приготовление смесей ПЦР, и 4 - Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Помещение лаборатории должно включать 4 отдельные (несмежные) рабочие зоны, чтобы предотвратить контаминацию. Рекомендуется придерживаться зональности при работе с набором согласно таблице 7 в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

Таблица 7

Рекомендации по зональности при работе с набором.

Рабочая зона лаборатории	Этап
1	Прием, регистрация, разбор и первичная обработка материала
2	Выделение, очистка и количественная оценка выделенной ДНК
3	Приготовление ПЦР / SAP / iPLEX-смесей и добавление ДНК в ПЦР-смесь
4	Добавление смеси SAP к продуктам ПЦР, добавление iPLEX- смеси к продуктам SAP-ПЦР, термоциклирование, добавление воды к продуктам iPlex.

- Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Это важно, так как только этап ПЦР имеет активную защиту от контаминации (урацил-ДНК-гликозилаза ПЦР-смеси удаляет продукты ПЦР перед началом реакции). Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения анализа указанного количества образцов (см. раздел «Комплектация»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- Входящие в состав набора Раствор для лизиса, Раствор для преципитации, Раствор для отмывки 3, Раствор для отмывки 4 и Лизирующий реагент содержат опасные вещества, указанные в таблице 8. Заявления об опасности и меры предосторожности, требуемые при работе с данным реагентом, описаны в таблице 8.

Таблица 8

Заявления об опасности и меры предосторожности при работе с набором

Реагент	Заявления об опасности	Меры предосторожности
Раствор для лизиса	H302, H312, H315, H319, H332, H412, EUH032	P260, P264, P270, P271, P273, P280, P301+P312, P302+P352, P501
Раствор для преципитации	H225, H319, H336	P210, P233, P241, P242, P261, P264, P271, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P337+P313, P370+P378, P403+P235, P501
Раствор для отмывки 3		
Раствор для отмывки 4		
Лизирующий реагент	H315, H319, H334, H335	P261, P280, P284, P337+P313, P342+P311, P501

Расшифровка заявлений об опасности	
H225: Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. H302: Вредно при проглатывании. H312: Вредно при контакте с кожей. H315: Вызывает раздражение кожи. H319: Вызывает серьезное раздражение глаз. H332: Вредно при вдыхании. H334: При вдыхании может вызывать аллергические или астматические симптомы или затруднение дыхания	H335: Может вызывать раздражение дыхательных путей. H336: Может вызвать вялость или сонливость. H412: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. EUN032: При контакте с кислотами освобождаются очень токсичные газы.
Расшифровка мер предосторожности	
P210: Хранить вдали от источников тепла, горячих поверхностей, искр, открытого пламени и других источников воспламенения. Не курить. P233: Хранить в плотно закрытой таре. P241: Использовать взрывобезопасное электрическое оборудование. P242: Используйте только не искрящие инструменты. P260: Не вдыхать пары. P261: Избегать вдыхания паров. P264: Вымойте руки после работы тщательно. P270: Не есть, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P271: Используйте только на открытом воздухе или в хорошо вентилируемом помещении. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Пользоваться защитными перчатками и средствами защиты глаз. P284: В случае недостаточной вентиляции пользоваться средствами защиты органов дыхания. P301 + 312: При проглатывании: обратиться к врачу при плохом самочувствии. P302 + 352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды. P303 + 361 + 353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой / принять душ.	P305+P351+P338: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если Вы ими пользуетесь и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P337+P313: Если раздражение глаз не проходит, обратиться за медицинской консультацией. P342+P311: При появлении респираторных симптомов: обратиться к врачу. P370+P378: В случае пожара: Использовать огнетушитель для тушения. P403+P235: Хранить в прохладном, хорошо вентилируемом месте. P501: Утилизировать содержимое в соответствии с национальными правилами СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»

- Листы безопасности реагентов набора (Раствор для лизиса, Раствор для преципитации, Раствор для отмывки 3, Раствор для отмывки 4, Лизирующий реагент) доступны по запросу.

- Входящие в состав набора Сорбент универсальный и ТЕ-буфер для элюции ДНК содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека. При аварийных ситуациях возможно причинение вреда при попадании на кожу и слизистую оболочку глаз, при вдыхании и при проглатывании.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

8. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

8.1. Предварительная подготовка исследуемого материала

8.1.1. Микротом (например, Микротом ротационный CUT 4062 с принадлежностями, производства "СЛИИ Медикал ГмБХ", Германия, РУ № ФСЗ 2012/12059).

8.1.2. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, Пробирки объемом 1,5 мл для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), производства «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтэд (ЭсЭсАй)», США, РУ ФСЗ 2011/10287).

8.2. Депарафинизация и экстракция ДНК из исследуемых образцов

8.2.1. Ламинарный бокс (например, Бокс абактериальной воздушной среды для защиты оператора при работе с патогенными агентами и микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем БАВп-01-«Ламинар-С.» по ТУ 9443-003-51495026-2004, производства ЗАО «Ламинарные системы», Россия, № РУ ФСР 2010/07111, класс биологической безопасности II тип А).

8.2.2. Бокс с принудительной вентиляцией при использовании ксилола (например, Шкафы лабораторные вытяжные «ЛАБРОМЕД-3» по ТУ 9452-011-13305037-2008, производства ООО «ЛАБРОМЕД», Россия, РУ № ФСР 2008/02658).

8.2.3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит» по ТУ 9452-004-46482062-2002, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, № РУ ФСР 2012/14090).

8.2.4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 13000 g (например, Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, производства ООО «Биосан», Латвия, № РУ ФСЗ 2008/01792).

8.2.5. Вортекс (например, Встряхиватель медицинский вибрационный типа «Vortex» («Вортекс») V-3, производства «СИА «ЭЛМИ», Латвия, РУ № РЗН 2017/5466).

8.2.6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, Отсасыватель медицинский ОМ-1 по ТУ 1-720-0033-92, производства АО «Ульяновское конструкторское бюро приборостроения», Россия, РУ № ФСР 2010/08928).

8.2.7. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Лайт» по ТУ 9443-007-33189998-2007, производства АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия, РУ № ФСР 2007/01095).

8.2.8. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, Пробирки объемом 1,5 мл для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), производства «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорэйтэд (ЭсЭсАй)», США, РУ ФСЗ 2011/10287).

8.2.9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, Наконечники универсальные для дозаторов, производства «ШАНЬЮ ЮИТ ПЛАСТИК ЛИМИТЕД», Китай, РУ № РЗН 2016/3670).

8.2.10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, Наконечники универсальные для дозаторов, производства «ШАНЬЮ ЮИТ ПЛАСТИК ЛИМИТЕД», Китай, РУ № РЗН 2016/3670).

8.2.11. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл и наконечников (например, Штативы для хранения и транспортировки пробирок, объемом от 0,2 мл до 50 мл, производства «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорейтед (ЭсЭсАй)», США, РУ ФСЗ 2011/10287).

8.2.12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 10 °С (например, Холодильник комбинированный лабораторный ХЛ-250 "POZIS" по ТУ 9452-203-07503307-2012, производства АО "ПОЗИС", Россия, РУ № РЗН 2016/4043).

8.2.13. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

8.2.14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов (например, Контейнеры для сбора острого инструментария и органических отходов класса Б, одноразовые по ТУ 9398-002-84354588-2009, производства ООО «МедПак», Россия, РУ № ФСР 2009/06509).

8.2.15. О-ксилол (ЧДА, CAS: 95-47-6), (например, Орто-ксилол ГИСТОПОИНТ, объем упаковки 1 л, производства ООО "МедТехникаПоинт", Россия, в составе РУ РЗН 2017/5912).

8.3. Количественная оценка ДНК и оценка качества

8.3.1. Набор реагентов для определения ДНК *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» (ООО «НекстБио», Россия, РУ РЗН № 2015/3164), или аналогичный, зарегистрированный в РФ, позволяющий амплифицировать ДНК человека с размером ампликона 150 - 250 п.н.

8.4. Этапы: ПЦР, SAP, анализ и интерпретация результатов

8.4.1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, Бокс абактериальной воздушной среды для защиты оператора при работе с патогенными агентами и микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем БАВп-01-«Ламинар-С.» по ТУ 9443-003-51495026-2004, производства ЗАО «Ламинарные системы», Россия, № РУ ФСР 2010/07111).

8.4.2. Амплификатор планшетного типа (например, Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010, модификация DTprime 5M3, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229).

8.4.3. Система масс-спектрометрического анализа MassARRAY® Dx Analyzer 4 с модулем подготовки чипов для in vitro диагностики (Agena Bioscience, Inc., США, РУ № РЗН 2024/22205 от 14.03.2024).

8.4.4. Шейкер для планшетов (например, Термошейкер PST-60HL-4, производства ООО «Биосан», Латвия, № РУ ФСЗ 2008/01398).

8.4.5. Центрифуга с ротором R-2 для планшетов (например, Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, производства ООО «Биосан», Латвия, № РУ ФСЗ 2008/01792).

8.4.6. 12-канальная автоматическая пипетка 5-50 мкл или 1-канальная 5-50 мкл (например, Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Лайт» по ТУ 9443-007-33189998-2007, производства АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия, РУ № ФСР 2007/01095).

8.4.7. Одноканальные пипетки и наконечники с фильтром на объемы 0,1-2 мкл; 0,5-10 мкл; 10- 100 мкл; 100-1000 мкл (например, Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Лайт» по ТУ 9443-007-33189998-2007, производства АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия, РУ № ФСР 2007/01095).

8.4.8. Микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, градуированные, стерильные, свободные от ДНК-аз, РНК-аз и пирогенов. (например, Пробирки объемом 1,5 мл для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), производства «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорейтед (ЭсЭсАй)», США, РУ ФСЗ 2011/10287).

8.4.9. Тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской/выпуклой крышкой объемом 0,2 мл, производства «Корнинг Инкорпорейтед», США, РУ № ФСЗ 2009/05024).

8.4.10. Пробирки в стрипах для ПЦР, объемом 0,2 мл для калибратора (при инсталляции системы MassARRAY возможен выбор типа пластика) (например, Пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 штук, в том числе с крышками, производства «Корнинг Инкорпорейтед», США, РУ № ФСЗ 2009/05024).

8.4.11. Штативы для пробирок (например, Штативы для хранения и транспортировки пробирок, объемом от 0,2 мл до 50 мл, производства «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорейтед (ЭсЭсАй)», США, РУ ФСЗ 2011/10287).

8.4.12. Деионизованная вода высокой степени очистки (HPLC-grade), автоклавируемая.

8.4.13. 96-луночный планшет для ПЦР без юбки или 96-луночный планшет для ПЦР с юбкой (при инсталляции системы MassARRAY возможен выбор типа пластика) (например, Планшеты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики) на 96 лунок с объемом лунки 0,2 мл, производства «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорейтед (ЭсЭсАй)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287).

8.4.14. Пленка для хранения планшетов для ПЦР полимерная, прозрачная, термостойкая, клейкая (например, Пленки адгезивные для заклеивания ПЦР-планшетов, производства «Сайентифик Спешиалтис Инкорпорейтед (ЭсЭсАй)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287).

8.4.15. Пинцет для извлечения микрочипа SpectroCHIP из футляра.

8.4.16. Емкость для сброса наконечников (например, Контейнеры для сбора острого инструментария и органических отходов класса Б, одноразовые по ТУ 9398-002-84354588-2009, производства ООО «МедПак», Россия, РУ № ФСЗ 2009/06509).

9. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Важно, при работе с набором «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке»:

- Соблюдать надлежащую лабораторную практику.
- При работе со всем оборудованием, компонентами и реагентами проявлять осторожность, чтобы не загрязнить образцы, реагенты, смеси или наконечники пипеток.
- При приготовлении ПЦР-смеси добавлять реагенты в порядке, указанном в таблице ниже:

Таблица 9

Порядок добавления реагентов при приготовлении ПЦР-смеси

Этап	Компонент
ПЦР	Фермент ПЦР
	MgCl ₂
	Буфер ПЦР
	Фермент УДГ
	Смесь дНТФ
	Смесь праймеров (KPP)
	Вода (HPLC-grade)

Этап	Компонент
SAP	Буфер SAP
	Фермент SAP
	Вода (HPLC-grade)
iPlex	Буфер iPLEX
	Фермент iPLEX Pro
	Смесь E1
	Смесь E2
	Смесь E3
	Смесь E4
	Смесь E5
	Смесь E6
	Смесь E7
	Смесь E8
	Смесь T1
	Смесь T2
	Смесь T3
	Смесь T4
	Смесь T5
	Смесь T6
	Смесь T7
	Смесь T8
	Вода (HPLC-grade)

- При проведении более чем одного исследования рассчитать соответствующие объемы реагентов.
- Запечатывать планшеты с помощью пленки для хранения, когда они не используются.
- При первом программировании термоциклера назвать программы в соответствии с этапом (например, PCR, SAP, iPlex), что удобно для будущих постановок.
- Очищенные образцы ДНК хранить при температуре минус 20 °С до 1 года. Избегать повторного замораживания и оттаивания ДНК.
- Хранить реагенты в соответствии с маркировкой, когда они не используются.
- В точках остановки пробы можно хранить при 4 °С не более суток, при минус 20 °С - не более 2 недель.
- После постановки ПЦР / SAP / iPLEX очистить все рабочие поверхности с помощью раствора для дезактивации нуклеиновых кислот «Олигатор» (ООО «НекстБио») или аналогичным раствором, либо обработать ультрафиолетом в течение 30 минут. После экспонирования раствор «Олигатор» тщательно удалить с поверхности влажной салфеткой.
- При работе в лаборатории носить индивидуальную защитную одежду, такую как одноразовые перчатки, лабораторный халат.

10. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования является фиксированная формалином и заключённая в парафин опухолевая ткань (FFPE).

10.1. Взятие исследуемого материала

Взятие биоматериала должно проводиться высококвалифицированным специалистом. Взятие и фиксацию образцов проводить согласно руководству по лабораторной технике в гистологии «Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике: руководство / под ред. П.Г. Малькова, Г.А. Франка. Для фиксации тканевого материала (биопсийного и операционного) предпочтительно использовать забуференный раствор формальдегида 4 % (раствор формалина, забуференный, при pH 6,8-7,0).

10.2. Хранение и транспортировка исследуемого материала

Парафиновые блоки опухолевого материала хранятся в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше +40 °С. Транспортировка при температуре не выше +40 °С в индивидуальном контейнере или пакете.

10.3. Предварительная подготовка исследуемого материала

С помощью микротомы готовятся 3-5 серийных срезов парафинового блока опухоли толщиной 10 мкм или 2-3 среза толщиной 20 мкм. Срезы помещаются в одну пробирку объемом 1,5 мл. После депарафинизации выполняется экстракция ДНК в соответствии с протоколом ниже.

11. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

11.1.1. Депарафинизация.

ВНИМАНИЕ! Стадии, включающие использование ксилола проводить в боксе с принудительной вентиляцией.

ВНИМАНИЕ! Все исследуемые образцы должны пройти предварительную подготовку в соответствии с рекомендуемой ниже процедурой.

11.1.1.1. В промаркированные пробирки объемом 1,5 мл поместить до пяти срезов, подготовленных согласно п.10.3.

11.1.1.2. Добавить в пробирки **800 мкл ксилола**, перемешать на вортексе, инкубировать 5 мин при комнатной температуре, тщательно (10 с) перемешивая на вортексе раз в 2 минуты.

11.1.1.3. Добавить в пробирки **400 мкл Раствора для преципитации**, перемешать на вортексе, центрифугировать при 13000 g 2 мин, удалить супернатант, не задевая осадок.

11.1.1.4. Добавить в пробирки **1000 мкл Раствора для преципитации**, перемешать на вортексе, центрифугировать при 13000 g 2 мин, удалить супернатант, не задевая осадок.

11.1.1.5. Перевернуть открытые пробирки на бумажное полотенце и дать раствору для преципитации стечь (осадок должен быть фиксирован на дне пробирки).

11.1.1.6. Для сушки осадка открытые пробирки инкубировать при **56 °С в течение 10 мин** до полного испарения спирта, после чего убедиться в отсутствии спирта.

11.1.1.7. В каждую пробирку с образцами добавить 70 мкл Лизирующего реагента и 30 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, перемешать на вортексе и поместить пробирки в термостат с температурой 56 °С на 1 час, перемешивая на вортексе раз в 20 мин.

11.1.1.8. При неполном лизисе ткани продлить инкубацию.

11.1.1.9. Для удаления формалиновых сшивок ДНК инкубировать при 90 °С 30 мин, центрифугировать при 13000 g 2 мин. Охладить пробирки с образцами до температуры 20 °С.

11.1.2. Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК

11.1.2.1. При выпадении осадка в Растворе для лизиса прогреть реагент при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.

11.1.2.2. Перемешать взбалтыванием Раствор для лизиса, Раствор для отмывки 3, Раствор для отмывки 4 и ТЕ-буфер для элюции ДНК.

11.1.2.3. Полностью ресуспендировать содержимое пробирки с Сорбентом универсальным на вортексе. Сбросить капли с крышки пробирки вручную (без центрифугирования), затем открыть пробирку и дополнительно перемешать пипетированием с помощью дозатора.

11.1.3. Процедура экстракции ДНК

11.1.3.1. Внести в каждую пробирку с образцами по 20 мкл Сорбента универсального и по 300 мкл Раствора для лизиса.

11.1.3.2. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.

11.1.3.3. Добавить в пробирки по 400 мкл Раствора для преципитации, перемешать на вортексе.

11.1.3.4. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13000 g.

11.1.3.5. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

11.1.3.6. Добавить в пробирки по 500 мкл Раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.

11.1.3.7. Центрифугировать при 13000 g в течение 1 мин на микроцентрифуге.

11.1.3.8. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

11.1.3.9. Добавить в пробирки по 200 мкл Раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

11.1.3.10. Центрифугировать при 13000 g в течение 1 мин на микроцентрифуге.

11.1.3.11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

11.1.3.12. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

11.1.3.13. Добавить в пробирки по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

11.1.3.14. Центрифугировать пробирки при **13000 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР. Надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл.

11.1.4. Хранение очищенной ДНК

Очищенная ДНК может храниться при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 месяцев и при температуре не выше минус 70 °С в течение года.

11.2. Количественная и качественная оценка выделенной ДНК

ВНИМАНИЕ! Количественная и качественная оценка выделенной ДНК является обязательным этапом исследования. Необходимо выполнять эту процедуру в лабораторной зоне 2.

Для исследования мутаций с помощью набора требуется 10 нг ДНК каждого образца (3000 - 5000 копий исследуемых аллелей генов в реакцию) для обеспечения оптимальных условий ПЦР. Для количественного определения концентрации ДНК рекомендуется использовать набор Quant-iT™ PicoGreen™ (ThermoFisher, США) и флуориметр Qubit (ThermoFisher, США) для определения содержания двуцепочечной ДНК в образце или аналогичный набор. Процедуру проводить согласно инструкциям по применению набора Quant-iT™ PicoGreen™ и флуориметра Qubit.

ВНИМАНИЕ! При использовании спектрофотометрических методов измерения проводится измерение любых нуклеотидов/полинуклеотидов, присутствующих в образце, включая РНК, ДНК (двух- и одноцепочечную) и свободные нуклеотиды, что приводит к неточному определению концентрации ДНК.

Кроме того, для ДНК, экстрагированной из FFPE-образцов, характерно наличие ингибиторов ПЦР и значительная фрагментация, таким образом, рекомендуется оценить пригодность ДНК для последующих этапов анализа методом ПЦР с использованием набора реагентов для определения ДНК *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики *in vitro* «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» (ООО «НекстБио», Россия, РУ РЗН № 2015/3164), или аналогичного, зарегистрированного в России, позволяющего амплифицировать ДНК человека с размером ампликона 150 - 250 п.н.

Набор «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» позволяет амплифицировать участок β-глобинового гена человека с размером ампликона 210 п.н., что позволяет оценить количество и общую фрагментацию геномной ДНК.

Количественная оценка ДНК проводится путем сравнения исследуемого образца ДНК (10 мкл) с образцом, содержащим ДНК человека с известной концентрацией (в разведениях 100 нг, 50 нг, 10 нг на реакцию) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Амплификация и детекция продуктов амплификации проводится согласно инструкции к набору реагентов для определения ДНК *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики *in vitro* «АмплиПрайм® ФЛОРОСКРИН®-Микоплазмы» (ООО «НекстБио», Россия, РУ РЗН № 2015/3164). В качестве образца, содержащего ДНК человека с известной концентрацией, можно использовать стандарты.

Концентрация ДНК исследуемого образца оценивается путем сравнения циклов начала экспоненциального роста кривой ПЦР (Ct), полученных при амплификации разведений стандарта и исследуемого образца ДНК по каналу Cy5/Red. Для точного расчета концентрации требуется построение калибровочной прямой.

При получении неудовлетворительных результатов оценки качества и количества ДНК, требуется повторить процедуру экстракции ДНК из исследуемого образца, используя большее количество срезов ткани.

11.2.1. Точка остановки

Очищенную геномную ДНК можно хранить при 4 °С до 24 часов, при минус 20 °С - до года. Избегайте повторного замораживания и оттаивания ДНК.

11.3. Этап ПЦР

ВНИМАНИЕ! Приготовьте ПЦР-смесь и добавьте в нее ДНК в лабораторной Зоне 3. Амплификацию на стадии ПЦР проводить в Зоне 4 лаборатории. Убедитесь, что все реагенты оттаяли полностью при комнатной температуре и ферменты хранятся на льду.

ВНИМАНИЕ! Для проведения ПЦР не рекомендуется использовать стрипованные пробирки во избежание контаминации смежных пробирок при открывании крышек.

11.3.1. Приготовить ПЦР-смесь в пробирке объемом 1,5 мл, помещенной на лед или холодный блок путем добавления реагентов в том порядке и в тех количествах, в которых они перечислены в таблице 10. Приготовьте ПЦР-смесь с запасом на одну дополнительную реакцию.

Таблица 10

Расчет объемов компонентов ПЦР-смеси

Реагент	Объем реагента на реакцию, мкл	Объем реагента на 13* реакций, мкл
Вода (HPLC-grade)	18,2	236,6
Буфер ПЦР	5,0	65
MgCl ₂	4,0	52
Смесь дНТФ	1,0	13
Смесь праймеров (KPP)	10,0	130
Фермент ПЦР	1,6	20,8
Фермент УДГ	0,2	2,6
Объем ПЦР смеси, мкл	40,0	520
ДНК (10 нг на реакцию)	10,0 (при концентрации 1 нг/мкл)	-
Объем реакционной смеси, мкл	50,0	-

*- пример расчета ПЦР-смеси на 12 образцов с запасом в 1 реакцию.

11.3.2. Перемешать на вортексе и осадить капли коротким центрифугированием.

11.3.3. Внести 40 мкл ПЦР-смеси в отдельные (нестрипованные) пробирки объемом 0,2 мл.

11.3.4. Внести в пробирки 10 мкл образца ДНК до конечного объема реакции ПЦР 50 мкл.

11.3.5. Перемешать содержимое пробирок на шейкере, затем центрифугировать при 1000 g в течение 15 секунд.

11.3.6. Осмотреть дно пробирок и убедиться, что в каждой пробирке присутствует одинаковый объем смеси.

11.3.7. Провести амплификацию, предварительно запрограммировав прибор в соответствии с программой:

30 °C	10 минут	45 циклов
95 °C	5 минут	
95 °C	30 секунд	
56 °C	30 секунд	
72 °C	1 минута	
72 °C	5 минут	
10 °C	Хранение	

При скорости нагрева/охлаждения приблизительно 3-4 °C/с продолжительность ПЦР составляет около 2 часов 30 минут.

11.3.8. Точка остановки

Если не переходить непосредственно к следующему этапу, планшет следует заклеить пленкой для хранения при 4 °C до 24 часов или при минус 20 °C до 2 недель. Хранение более 2-х недель не допускается.

11.4. Выполнение стадии SAP

ВНИМАНИЕ! Приготовьте смесь SAP в лабораторной зоне 3. Убедитесь, что все реагенты полностью оттаяли. Убедитесь, что все реагенты перемешаны, прежде чем аликвотировать. Добавьте смесь SAP в планшет с продуктами ПЦР в лабораторной зоне 4. Ферменты в ходе постановки SAP необходимо хранить на льду.

11.4.1. Приготовить смесь SAP в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл на льду или в холодном блоке в соответствии с таблицей 11, с запасом в одну дополнительную реакцию.

Таблица 11

Расчет объемов компонентов SAP-смеси

Реагент	Объем реагента на 1 реакцию, мкл	Объем реагента на 13* реакций, мкл
Вода (HPLC-grade)	15,3	198,9
Буфер SAP	1,7	22,1
Фермент SAP	3,0	39
общий объем SAP-смеси	20,0	260

*- пример расчета SAP-смеси на 12 образцов с запасом в 1 реакцию.

11.4.2. Перемешать на вортексе и осадить капли коротким центрифугированием.

11.4.3. Центрифугировать пробирки с продуктами ПЦР при 1000 g в течение 15 секунд.

11.4.4. Перенести 20 мкл SAP-смеси в каждую пробирку с продуктами ПЦР.

11.4.5. Перемешать содержимое пробирок на шейкере, затем центрифугировать при 1000 g в течение 15 секунд.

11.4.6. Осмотреть дно пробирок и убедиться, что в каждой пробирке присутствует одинаковый объем смеси.

11.4.7. Выполнить термоциклирование, используя следующие условия:

37 °C	40 минут
85 °C	5 минут
10 °C	Хранение

При скорости нагрева/охлаждения приблизительно 3-4 °С/с, длительность программы для SAP составляет приблизительно 45-50 минут.

11.4.8. Перенести 7 мкл продукта ПЦР/SAP в 96-луночный планшет в соответствии со схемой, представленной на рисунке 2.

11.4.9. Точка остановки

Если не переходить непосредственно к следующему этапу, реакционный планшет следует заклеить пленкой для хранения при 4 °С до 24 часов или при минус 20 °С до 2 недель. Хранение более 2-х недель не допускается.

11.5. Этап iPlex

Этап iPlex включает последовательное приготовление общей смеси iPlex (таблица 12) и далее 8 реакционных смесей iPlex (таблица 13) набора в чистой лабораторной зоне 3.

11.5.1. Приготовить общую смесь iPlex по прописи (таблица 12). Необходимо добавить в расчет 1 дополнительную реакцию.

Таблица 12

Расчет объемов компонентов общей смеси iPlex

Реагент	Объем смеси iPlex, мкл	
	На 1 реакцию	На 12 образцов 97* реакций
Вода (HPLC-grade)	0,62	66,15
Буфер iPLEX	0,2	21,34
Фермент iPLEX Pro	0,04	4,27
Общий объем	0,86	91,76

*- расчет с 1 дополнительной реакцией.

11.5.2. Перемешать содержимое пробирки с общей смесью iPlex на вортексе и сбросить капли.

11.5.3. Промаркировать 8 пробирок для реакционных смесей.

11.5.4. Приготовить реакционные смеси iPlex в соответствии с таблицей 13.

Таблица 13

Расчет объемов компонентов реакционных смесей iPlex

Компонент смеси	Объем смеси iPlex, мкл	
	На 1 реакцию	На 12,5 образцов**
Общая смесь iPlex	0.86	10.75
Смесь En*	0.94	11.75
Смесь Tn	0.20	2.50
Общий объем смеси, мкл	2.00	25

* п от 1 до 8 для каждой реакционной смеси iPlex.

** - пример расчета с запасом.

11.5.5. Перемешать на вортексе, сбросить капли.

11.5.6. Реакционную смесь iPlex по 2 мкл внести в лунки соответствующего ряда 96-луночного планшета в соответствии с рисунком 2 – номер реакционной смеси iPlex соответствуют букве (А-1, В-2, С-3, D-4, Е-5, F-6, G-7, H-8) ряда планшета.

Рисунок 2. Схема расположения смесей iPLEX и ДНК образцов на 96-луночном планшете.

		ДНК пациентов (1-12)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Реакционная смесь iPlex1-8	A	1: iPlex 1	2: iPlex 1	3: iPlex 1	4: iPlex 1	5: iPlex 1	6: iPlex 1	7: iPlex 1	8: iPlex 1	9: iPlex 1	10: iPlex 1	11: iPlex 1	12: iPlex 1
	B	1: iPlex2	2: iPlex2	3: iPlex2	4: iPlex2	5: iPlex2	6: iPlex2	7: iPlex2	8: iPlex2	9: iPlex2	10: iPlex2	11: iPlex2	12: iPlex2
	C	1: iPlex3	2: iPlex3	3: iPlex3	4: iPlex3	5: iPlex3	6: iPlex3	7: iPlex3	8: iPlex3	9: iPlex3	10: iPlex3	11: iPlex3	12: iPlex3
	D	1: iPlex4	2: iPlex4	3: iPlex4	4: iPlex4	5: iPlex4	6: iPlex4	7: iPlex4	8: iPlex4	9: iPlex4	10: iPlex4	11: iPlex4	12: iPlex4
	E	1: iPlex5	2: iPlex5	3: iPlex5	4: iPlex5	5: iPlex5	6: iPlex5	7: iPlex5	8: iPlex5	9: iPlex5	10: iPlex5	11: iPlex5	12: iPlex5
	F	1: iPlex6	2: iPlex6	3: iPlex6	4: iPlex6	5: iPlex6	6: iPlex6	7: iPlex6	8: iPlex6	9: iPlex6	10: iPlex6	11: iPlex6	12: iPlex6
	G	1: iPlex7	2: iPlex7	3: iPlex7	4: iPlex7	5: iPlex7	6: iPlex7	7: iPlex7	8: iPlex7	9: iPlex7	10: iPlex7	11: iPlex7	12: iPlex7
	H	1: iPlex8	2: iPlex8	3: iPlex8	4: iPlex8	5: iPlex8	6: iPlex8	7: iPlex8	8: iPlex8	9: iPlex8	10: iPlex8	11: iPlex8	12: iPlex8

11.5.7. Заклеить планшет пленкой для ПЦР и перемешать на шейкере для планшетов, осадить капли на центрифуге для планшетов.

11.5.8. Выполнить амплификацию проб в соответствии со схемой, представленной ниже:

95 °C	30 секунд	40 циклов
95 °C	5 секунд	
52 °C	5 секунд	
80 °C*	5 секунд	
72 °C	3 минуты	5 циклов
10 °C	Хранение	

*рекомендуемая скорость изменения температуры 3-4 °C в секунду.

ВНИМАНИЕ! До проведения исследования необходимо ознакомиться с инструкцией по использованию прибора MassARRAY® Dx Analyzer 4 (Agena Bioscience, Inc., США, РУ № РЗН 2024/22205 от 14.03.2024).

11.5.9. Поместить микрочип SpectroCHIP и планшет с образцами в анализатор MassARRAY.

ВНИМАНИЕ! Микрочип SpectroCHIP следует осторожно извлекать из футляра с помощью пинцета, за боковые грани, не касаясь руками и не допуская выпадения.

11.5.10. Разморозить калибратор. В отдельную пробирку (без крышки) объемом 0,2 мл внести 80 мкл⁴ калибратора. Поместить пробирку с калибратором в прибор.

ВНИМАНИЕ! Для калибратора необходимо использовать откалиброванные при инсталляции системы MassARRAY пробирки.

⁴ Данного объема калибратора достаточно для проведения анализа 24 образцов.

11.6. Подготовка программного комплекса MassArray. Модуль PlateEditor

Все этапы подготовки программ системы MassArray (Agena Bioscience, Inc., США) к проведению исследования требуют подключения к сети интернет.

11.6.1. Запуск программы управления прибором MassARRAY Analyzer 4.

11.6.2. Запуск программы MassARRAY Typer требует введения пароля, серийного номера прибора (при первом запуске программы) и пароля для доступа к базе данных.

11.6.3. В компоненте PlateEditor программы MassARRAY Typer требуется создать виртуальный планшет, сочетающий описание образцов и выполняемых с ними исследований.

Для этого во вкладке Plate:

- **New Customer** (название нового пользователя), в нем создать **New Project** (новый эксперимент), в нем создать **New Plate** (название нового планшета). Вход во вложенные папки возможен с помощью нажатия левой кнопки мыши на элементе более высокого уровня (например, для создания нового планшета нужно нажать на название нового эксперимента правой кнопкой мыши и выбрать из контекстного меню **New Plate**). Далее нажать на название созданного планшета для активации виртуального планшета (появляется в окне **Plate Layout**).

Перейти во вкладку Sample:

- Прикрепить образцы к планшету. Для этого в созданном ранее Пользователе (например, пользователь 1) правой кнопкой мыши необходимо открыть контекстное меню и выбрать **Add New Sample Project** (добавить в название группы экспериментальные образцы).

- Выбрать созданную группу образцов эксперимента и нажать правой кнопкой мыши для присоединения списка образцов **Add New Sample Group** (для этого требуется список образцов латиницей без пробелов и специальных символов кроме «_», «.»).

Пример фрагмента списка образцов в файле, например, patient_list.txt:

```
Petrov  
Ivanov  
1245.2020  
Sidorov_block_31.12.2020
```

- В окне **Plate Layout** в соответствии с расположением образцов на планшете выделить на виртуальном планшете колонку, соответствующую образцу.

- В окне **Sample** выбрать текущую **Sample Group** с образцами проекта, выбрать соответствующий колонке планшета образец и нажать на нем левой кнопкой мыши и добавить на планшет. Аналогично для всех 12 образцов планшета.

Перейти во вкладку Assay:

- В окне **Assay** проверить наличие исследования «HS-Colon-Panel-v1-0-0» у пользователя Agena (при отсутствии исследования порядок загрузки исследования обсудите с региональным представителем).

- В окне **Plate Layout** выделить на виртуальном планшете каждый ряд поочередно, и присвоить его соответствующей iPLEX-смеси (add plex 1 – 8) во вкладке исследования HS-Colon-Panel-v1-0-0: строка A для iPLEX-смеси 1. Аналогично для остальных 7 iPLEX-смесей.

- Для привязки методики исследования 9 (add plex 9) HS-Colon-Panel-v1-0-0 следует выделить весь виртуальный планшет.

11.6.4. Проверить правильность созданного виртуального планшета, выбирая отдельные ячейки, при этом описание содержимого отображается в окне **Plate Table**.

11.7. Привязка виртуального планшета к микрочипу. Модуль Chip Linker

Для выполнения данного этапа используется программа **Chip Linker**. После запуска программы **Chip Linker** в окне **Customer** требуется выбрать текущий эксперимент и созданный виртуальный планшет. Справа необходимо задать параметры исследования:

- Параметр Terminator Chemistry задать «iPlex».
- Параметр Process Method задать «Genotype + Area».
- Параметр Dispenser задать «Nanodispenser 96 to 96».
- Задать имя текущего исследования.
- Chip Barcode - ввести серийный номер, указанный в левом нижнем углу микрочипа.

ВНИМАНИЕ! Один микрочип SpectroCHIP используется для анализа 12 образцов (один 96-луночный планшет). При постановке необходимо использовать 2 микрочипа для правильной балансировки платформы для чипов.

Нажать кнопку «ADD», при этом в нижнем окне появляется запись о виртуальной плашке с названием исследования. Далее нажать кнопку «Create». Исследование прикреплено к микрочипу.

11.8. Подготовка программного комплекса MassArray. Модуль SpectroAQUIRE

Для запуска станции пробоподготовки используется программа **MassArray Analyzer 4 SpectroAQUIRE**. Данное окно содержит в правом нижнем углу три вкладки, среди которых **Run Setup**. Для запуска исследования требуется указать следующие параметры в соответствии с рисунком 3:

- Для планшета, помещенного в одну из двух позиций модуля пробоподготовки (MTP1 или MTP2), выбрать позицию, где расположен планшет с исследуемыми образцами в станции пробоподготовки.
- Параметр Experiment Name - выбрать файл .xls, созданный программой Chip Linker с описанием прикрепленного к микрочипу исследования на виртуальном планшете.
- Параметр Well to process - выбрать automatic.
- Параметр Start dispense condition - выбрать 500.
- Параметр Resin Volume - выбрать 13.

Рисунок 3. Настройки модуля SpectroAQUIRE

The screenshot shows the 'Run Setup' tab of the SpectroAQUIRE software. It is divided into several sections:

- Automatic Run | Manual Mass Spec. Control | Run Setup** (Tabs)
- Experiment Setup**:
 - MTP 1: Experiment Name (None), Wells to Process (Automatic), Start Dispense Condition (500), Use Autotune (unchecked).
 - MTP 2: Experiment Name (None), Wells to Process (Automatic), Resin Volume (13), Sample Volume (nl) (30).
- Analyzer Setup**:
 - Shots [n]: 30
 - Maximum Acquisitions: 9
 - Minimum Good Spectra: 5
 - Maximum Good Spectra: 5
 - Turn Off HV After Analysis: checked
 - Analyze Calibrant Pads: checked
 - Filter Saturated Shots: unchecked
 - Chip Type: SpectroCHIP CPM-96
- Chip prep module Setup**:
 - Normal Operation (All Options On): checked
 - Dispense Calibrant onto Chips: checked
 - Transfer Resin to MTP 1: checked
 - Transfer Resin to MTP 2: unchecked
 - Dispense Samples onto Chips: checked
 - Transfer Chips to Analyzer: checked
 - Analyze Chips: checked
 - MTP Barcodes Required: unchecked
 - MTP Cool Setpoint: 14
 - Chip Heat Setpoint: 30
 - Chemistry: IPLEX
- Status**:
 - Waste Tank: Okay (green), Full (black)
 - System Fluid: Okay (green), Empty (black)
 - Resin: Okay (green), Low (black), Empty (black)
- Send email to:** (Text field)
- when Chip prep module is finished** (checkbox)
- when MA4 is finished** (checkbox)
- Refill/Maintain Resin Tray** (button)
- Remove Old Chips From MA4** (button)
- Version C0086**

Группа параметров **Analyzer Setup**, **Chip prep module Setup** заполняется в соответствии с рисунком 3.

Важно отметить, что индикаторы **Status** должны быть активированными (аналогично рисунку 3) для старта исследования.

11.9. Анализ результатов исследования

Для анализа масс-спектрометрических данных запускается компонент **TyperAnalyzer** программы **MassARRAY Typer**.

В окне **Project Explorer** необходимо открыть выполненное исследование, далее выбрать микрочип исследования.

В окне **Traffic Light** появится планшет с цветовой индикацией ячеек (красный соответствует низкому качеству проведенного исследования, зеленый – оптимальному; желтый – промежуточный по качеству).

Для просмотра сырых данных нажать на интересующую ячейку планшета, при этом в окне **Details** отображается масс-спектрометрический профиль данного образца, в окне **Assay** приводится список анализируемых мутаций в данной реакционной смеси **iPlex**.

При выборе отдельных анализируемых мутаций в окне **Details** появятся сырые данные спектра.

Для подготовки автоматического отчета используется программа **Somatic Variant Report (HS Colon)**. Для подготовки отчета нажать левую кнопку мыши на баркоде микрочипа исследования и выбрать отчет **iPlex HS Report** (пример отчета о постановке программы представлен на рисунке 4, пример интерпретации результатов – в таблице 14).

Можно включить в отчет несколько микрочипов для этого необходимо установить галочку напротив выбранного микрочипа.

Отчет открывается в отдельном окне web-браузера и поддерживает переходы между вкладками.

Во вкладке **Summary View** приводятся результаты отдельных образцов.

Зеленая галочка (**Quality Control**) соответствует прохождению внутреннего контроля исследования, при ее отсутствии результат определения мутации недостоверен.

Рисунок 4. Пример отчета о постановке программы Somatic Variant Report (HS Colon).

Agena iPLEX HS Report

Home	Summary View	Search	
Change Zscore (Default Value : 3)		Export CSV	
3			
Sample	QC	Mutation(s)	
10_KRAS_K117N	❌		
11_N	✅		
12_MIX_5_1_2	✅	KRAS#p.G13D c.38G>A	
1_KRAS_G13D	✅	KRAS#p.G13D c.38G>A	
2_PIK3CA_E542_K	✅	PIK3CA#p.E542K c.1624G>A	
3_PIK3CA_E545_K	✅	PIK3CA#p.E545K c.1633G>A	
4_KRAS_Q61P	✅	KRAS#p.K117R c.350A>G, KRAS#p.Q61P c.182A>C	
5_BRAF_V600E	✅	BRAF#p.V600E c.1799T>A	
6_PIK3CA_H1047L	✅	PIK3CA#p.H1047L c.3140A>T	
7_KRAS_A146T	✅	KRAS#p.A146T c.436G>A	
8_NRAS_G12A	✅	NRAS#p.G12A c.35G>C	
9_KRAS_G12A	✅	KRAS#p.G12A c.35G>C	

Таблица 14

Пример интерпретации отчета о результатах исследования

Результат	Описание	Интерпретация
В столбце QC (Quality Control) присутствует зеленая галочка	Внутренний контроль подтверждает наличие ДНК образца	Результат образца валиден.
В столбце QC (Quality Control) отсутствует зеленая галочка, например, образец 10_KRAS_K117N.	Внутренний контроль не сработал. Недостаточное количество или низкое качество ДНК образца	Результат образца невалиден. Рекомендуется решить вопрос с качеством и количеством ДНК или повторить анализ, начиная с этапа экстракции.
Для образца 11_N. QC – подтвержден, в колонке Mutation (s) пусто.	Внутренний контроль подтверждает наличие ДНК образца. В колонке Mutation(s) отсутствуют выявленные мутации.	В образце 11_N мутаций в 86 SNP-локусах генов EGFR, KRAS, NRAS, PIK3CA не выявлено.
Для образца 12_MIX_5_1_2. QC – подтвержден, в колонке Mutation (s) – определена мутация.	Внутренний контроль подтверждает наличие ДНК образца. В колонке Mutation(s) присутствуют выявленные мутации.	В образце 12_MIX_5_1_2 выявлена мутация в 12 кодоне гена KRAS (G12D).

12. РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н (в редакции приказа Минздрава России от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий»).

Все реагенты, входящие в состав набора реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

В пограничную зону рисков, связанных с применением набора реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,
- утилизация набора с нарушением соответствующих мер безопасности и дезактивации,
- перекрестная контаминация образцов;
- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, в следствии работы с набором неквалифицированным персоналом.

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для детекции точечных мутаций генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA при колоректальном раке методом масс-спектрометрии «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» по ТУ 21.20.23-091-09286667-2020», производства ООО «НекстБио» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

13. СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

13.1. Срок годности.

10 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

13.2. Транспортирование.

Набор реагентов транспортировать при указанной ниже температуре в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (для комплектов 1 из 3 и 2 из 3), всеми видами крытых транспортных средств.

Комплект 1 из 3 «Комплект для выделения ДНК из парафиновых блоков» транспортировать при температуре от +2 до + 8 °С.

Комплект 2 из 3 «Комплект для детекции точечных мутаций» транспортировать при температуре от минус 25 до минус 10 °С.

Комплект 3 из 3 «Вспомогательные материалы для детекции точечных мутаций» транспортировать при температуре от +15 до +25 °С.

При получении Набор реагентов разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

13.3. Хранение.

Комплект 1 из 3 «Комплект для выделения ДНК из парафиновых блоков» хранить при температуре от +2 до +8 °С.

Комплект 2 из 3 «Комплект для детекции точечных мутаций» хранить при температуре от минус 25 до минус 10 °С. Не рекомендуется повторное замораживание-оттаивание реагентов комплекта.

Комплект 3 из 3 «Вспомогательные материалы для детекции точечных мутаций» хранить при температуре от +15 до +25° С.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

14. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111394, г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2, e-mail: info@nextbio.ru

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

15. СВЕДЕНИЯ О СТЕРИЛЬНОСТИ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» поставляется нестерильным. Изделие для однократного применения.

16. СВЕДЕНИЯ О СОДЕРЖАНИИ МАТЕРИАЛОВ ЖИВОТНОГО И (ИЛИ) ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» не содержит материалов животного и (или) человеческого происхождения.

17. СВЕДЕНИЯ О СОДЕРЖАНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» не содержит лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций.

18. СВЕДЕНИЯ О СТАБИЛЬНОСТИ

Срок годности набора реагентов «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке», определенный при помощи эксперимента по оценке стабильности составляет 10 месяцев.

19. СВЕДЕНИЯ О МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ

Прослеживаемость значений, приписанных калибраторам, обеспечивается посредством соблюдения референтной методики выполнения измерений и/или использования эталонных материалов высшего порядка в соответствии с ГОСТ Р ИСО 17511-2022.

Метрологическая прослеживаемость измерений «Набор реагентов для детекции точечных мутаций генов KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, PIK3CA при колоректальном раке методом масс-спектрометрии «АмплиПрайм® Профиль мутаций при колоректальном раке» по ТУ 21.20.23-091-09286667-2020» зависит от уровней в стандартах, поэтому она может быть связана с установленными категориями, национальными или международными стандартами посредством непрерывной последовательности сравнений всех установленных погрешностей.

Измерение значений концентрации калибратора производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибратора составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

20. ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

Обозначение	Наименование
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ 31340-2022	Предупредительная маркировка химической продукции в ТУ и в ЛБ. Общие требования.
ГОСТ Р ИСО 17511-2022	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Требования к установлению метрологической прослеживаемости значений, приписанных калибраторам, контрольным материалам правильности и образцам биологического материала человека.
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
ГОСТ Р 56894-2016/GHTF/SG1/N063:2011	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н	в редакции приказа Минздрава России от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий»
СанПиН 2.1.3684-21	Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий
МУ 1.3.2569-09	Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности
СанПиН 3.3686-21	Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней
ГОСТ 12.1.007	ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

21. ЛИТЕРАТУРНЫЕ ССЫЛКИ

1. «Клинические рекомендации. Рак прямой кишки МКБ 10: C20», Москва, 2018, «Клинические рекомендации. Рак ободочной кишки и ректосигмоидного отдела МКБ 10: C18/C19», Москва, 2018.
2. Bradić M., Costa J., Chelo I.M. Genotyping with Sequenom. *Methods in Molecular Biology*. 2011; 772:193-210.
3. Shanmuganathan N., Branford S. Multiplex technologies for the assessment of minimal residual disease and low-level mutation detection in leukaemia: mass spectrometry versus next-generation sequencing. *British Journal of Haematology*. 2022 Jan; 196(1):19-30.
4. Федянин М. Ю., Гладков О. А., Гордеев С. С., Рыков И. В., Трякин А. А. и соавт. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2, 2021 (том 11). 22
5. Федянин М. Ю., Гладков О. А., Гордеев С. С., Трякин А. А., Черных М. В. и соавт. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака прямой кишки. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2, 2021 (том 11). 23
6. Fleitas T., Ibarrola-Villava M., Ribas G., Cervantes A. MassARRAY determination of somatic oncogenic mutations in solid tumors: Moving forward to personalized medicine. *Cancer Treatment Reviews*. 2016 Sep; 49:57-64.

22. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



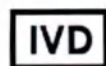
Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Изготовитель



Дата изготовления



Не допускать воздействия влаги



Хрупкое, обращаться осторожно



Верх



Долгосрочная водная опасность (категория 3)
(для Раствора для лизиса)



Разъедание/раздражение кожи (категория 2), Серьезное повреждение глаз/раздражение глаз (категория 2), Токсичность для конкретного органа - единичное воздействие (категория 3)

(для Раствора для лизиса, Лизирующего реагента)

Серьезное повреждение глаз/раздражение глаз (категория 2), Токсичность для конкретного органа - единичное воздействие (категория 3)

(для Раствора для преципитации, Раствора для отмывки 3, Раствора для отмывки 4)

Легковоспламеняющаяся жидкость и пар (категория 2)

(для Раствора для преципитации, Раствора для отмывки 3, Раствора для отмывки 4)



Респираторная сенсibilизация (категория 1)
(для Лизирующего реагента)



Острая токсичность, оральная (категория 4),
Острая токсичность, кожная (категория 4),
(для Раствора для лизиса)

Полный перечень выявляемых набором мутаций при колоректальном раке

Ген	Нуклеотидная мутация	Аминокислотная мутация	Мутация (по базе данных Cosmic*)	Исследуемый кодон	Область гена
BRAF	c.1406G>A	p.G469E	461	469	экзон 11
BRAF	c.1781A>G	p.D594G	467	594	экзон 15
BRAF	c.1799T>A	p.V600E	476	600	
EGFR	c.1476C>A/G	p.S492R	236670	492	экзон 12
EGFR	c.1474A>C	p.S492R	236671		
KRAS	c.34_35GG>TT	p.G12F	512	12	экзон 2
KRAS	c.34_35GG>CT	p.G12L	514		
KRAS	c.35_36GT>TC	p.G12V	515		
KRAS	c.34G>T	p.G12C	516		
KRAS	c.34G>A	p.G12S	517		
KRAS	c.34G>C	p.G12R	518		
KRAS	c.35G>T	p.G12V	520		
KRAS	c.35G>A	p.G12D	521		
KRAS	c.35G>C	p.G12A	522		
KRAS	c.35_36GT>AC	p.G12D	14209		
KRAS	c.34_35GG>TA	p.G12Y	25081		
KRAS	c.35_36GT>AG	p.G12E	30566		
KRAS	c.34_35GG>AT	p.G12I	34144		
KRAS	c.34_36GGT>TGG	p.G12W	36281		
KRAS	c.34_36GGT>AGA	p.G12R	249888		
KRAS	c.35_36GT>CA	p.G12A	5413585		
KRAS	c.37_39GGC>CGT	p.G13R	526	13	
KRAS	c.37G>T	p.G13C	527		
KRAS	c.37G>A	p.G13S	528		
KRAS	c.37G>C	p.G13R	529		
KRAS	c.38_39GC>AT	p.G13D	531		
KRAS	c.38G>A	p.G13D	532		
KRAS	c.38G>C	p.G13A	533		
KRAS	c.38G>T	p.G13V	534		
KRAS	c.38_39GC>TT	p.G13V	12721		
KRAS	c.38_39GC>AG	p.G13E	30567		
KRAS	c.38_39GC>AA	p.G13E	87280		
KRAS	c.37_38GG>TT	p.G13F	1685355		
KRAS	c.175G>A	p.A59T	546	59	экзон 3
KRAS	c.176C>A	p.A59E	547		
KRAS	c.176C>G	p.A59G	28518		
KRAS	c.175G>T	p.A59S	1235389		
KRAS	c.181C>A	p.Q61K	549	61	
KRAS	c.181C>G	p.Q61E	550		
KRAS	c.182A>C	p.Q61P	551		
KRAS	c.182A>G	p.Q61R	552		
KRAS	c.182A>T	p.Q61L	553		
KRAS	c.183A>C	p.Q61H	554		

Ген	Нуклеотидная мутация	Аминокислотная мутация	Мутация (по базе данных Cosmic*)	Исследуемый кодон	Область гена	
KRAS	c.183A>T	p.Q61H	555			
KRAS	c.182_183AA>GT	p.Q61R	1168052			
KRAS	c.351A>C	p.K117N	19940	117	экзон 4	
KRAS	c.351A>T	p.K117N	28519			
KRAS	c.350A>G	p.K117R	4696721			
KRAS	c.436G>A	p.A146T	19404	146		
KRAS	c.437C>T	p.A146V	19900			
KRAS	c.436G>C	p.A146P	19905			
KRAS	c.437C>G	p.A146G	NA			
NRAS	c.34G>C	p.G12R	561	12		экзон 2
NRAS	c.34G>T	p.G12C	562			
NRAS	c.34G>A	p.G12S	563			
NRAS	c.35G>A	p.G12D	564			
NRAS	c.35G>C	p.G12A	565			
NRAS	c.35G>T	p.G12V	566			
NRAS	c.37G>C	p.G13R	569	13		
NRAS	c.37G>T	p.G13C	570			
NRAS	c.37G>A	p.G13S	571			
NRAS	c.38G>A	p.G13D	573			
NRAS	c.38G>T	p.G13V	574			
NRAS	c.38G>C	p.G13A	575			
NRAS	c.175G>A	p.A59T	578	59	экзон 3	
NRAS	c.176C>G	p.A59G	5878737			
NRAS	c.181C>A	p.Q61K	580	61		
NRAS	c.181C>G	p.Q61E	581			
NRAS	c.182A>C	p.Q61P	582			
NRAS	c.182A>T	p.Q61L	583			
NRAS	c.182A>G	p.Q61R	584			
NRAS	c.183A>T	p.Q61H	585			
NRAS	c.183A>C	p.Q61H	586	117		экзон 4
NRAS	c.349A>G	p.K117E	NA			
NRAS	c.350A>G	p.K117R	NA			
NRAS	c.351G>C	p.K117N	NA			
NRAS	c.351G>T	p.K117N	NA			
NRAS	c.436G>A	p.A146T	27174	146		
NRAS	c.437C>T	p.A146V	4170228			
NRAS	c.436G>C	p.A146P	4172577			
NRAS	c.436G>T	p.A146S	NA			
NRAS	c.437C>G	p.A146G	NA			
PIK3CA	c.1624G>A	p.E542K	760	542	экзон 9	
PIK3CA	c.1633G>A	p.E545K	763	545		
PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R	775	1047	экзон 20	
PIK3CA	c.3140A>T	p.H1047L	776			

*COSMIC - генетическая база данных о соматических мутациях, выявленных при различных видах рака.

*COSMIC - генетическая база данных о соматических мутациях, выявленных при различных видах рака.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито
39 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБю»

М.Е. Сенина

