



НОМОТЕК

«Утверждаю»

Генеральный директор

ООО «НОМОТЕК»

Панфилов Т.В.

«22» марта 2021 г.

Инсайдер

Набор реагентов для качественного определения мутаций в генах человека: *EGFR* (экзоны 18, 19, 20, 21), *KRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)), *NRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)) и *BRAF* (экзон 15 (с.600)) методом ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК, выделенной из FFPE-блоков, для диагностики *in vitro* («Инсайдер») по ТУ 21.20.23-018-11248074-2018

РУ № РЗН 2021/14479 от 01.06.2021

Инструкция по применению

Сокращения и обозначения

Cq (Cт)	Пороговый цикл
FAM	Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
VIC	Тип флуоресцентного красителя, используемого при детекции сигнала полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
USB-флеш-накопитель	Носитель «ПО Инсайдер», и подключаемое к компьютеру по интерфейсу USB
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
КО без ДНК	Контрольный образец без ДНК (NTC)
Мишень	Значения поля «Имя мишени» (Target Name)
Олиго-смесь М	Обобщенное название компонентов набора реагентов: Олиго-смесь М EGFR ex18 G719X, Олиго-смесь М EGFR ex19 delX, Олиго-смесь М EGFR ex20 T790M, Олиго-смесь М EGFR ex20 S768I, Олиго-смесь М EGFR ex20 C797X, Олиго-смесь М EGFR ex20 D770_N771insG, Олиго-смесь М EGFR ex21 L858R Олиго-смесь М EGFR ex21 L861Q, Олиго-смесь М KRAS ex2 c.12, 13, Олиго-смесь М KRAS ex3 c.59, 61, Олиго-смесь М KRAS ex4 c.117, Олиго-смесь М KRAS ex4 c.146, Олиго-смесь М NRAS ex2 c.12, 13, Олиго-смесь М NRAS ex3 c.59, 61, Олиго-смесь М NRAS ex4 c.117, Олиго-смесь М NRAS ex4 c.146, Олиго-смесь М BRAF c.600
ПКО	Положительный контрольный образец, компонент «ПКО EGFR» или компонент «ПКО FullRAS»
ПО	Программное обеспечение
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией накопления продукта амплификации ДНК в режиме реального времени
ТУ	Технические условия

Оглавление

Сокращения и обозначения.....	2
1. Название, варианты исполнения	4
2. Сведения, необходимые для эксплуатации	4
3. Назначение, область применения.....	4
4. Состав, форма выпуска	6
5. Количество анализируемых образцов, кратность применения	10
6. Принцип действия	10
7. Научная обоснованность анализа	10
8. Аналитические характеристики.....	12
9. Диагностические характеристики	12
10. Ограничения метода.....	17
11. Меры предосторожности. Риски применения медицинского изделия	20
12. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки.....	23
13. Биологический материал	26
14. Протокол анализа образца.....	26
15. Анализ данных	34
16. Условия транспортирования, хранения и использования	36
17. Срок годности	36
18. Критерии непригодности набора реагентов для применения	36
19. Гарантии изготовителя	37
20. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость.....	37
21. Порядок подачи рекламаций.....	37
22. Утилизация	38
Приложение 1 – Руководство по работе с программным обеспечением «ПО Инсайдер».....	39
23. Идентификация программного обеспечения	39
24. Описание программного обеспечения	39
25. Основные технические характеристики программного обеспечения.....	41
26. Ограничения программного обеспечения	42
27. Ввод в действие и работа с программным обеспечением	45
28. Сообщения об ошибках.....	45
Приложение 2 – Основные принципы работы ПЦР-лаборатории.....	48
Литература.....	51
Графические символы.....	53

1. Название, варианты исполнения

Набор реагентов для качественного определения мутаций в генах человека: *EGFR* (экзоны 18, 19, 20, 21), *KRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)), *NRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)) и *BRAF* (экзон 15 (с.600)) методом ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК, выделенной из FFPE-блоков, для диагностики *in vitro* («Инсайдер») по ТУ 21.20.23-018-11248074-2018.

Набор реагентов «Инсайдер» выпускается в одном варианте исполнения.

2. Сведения, необходимые для эксплуатации

Внимательно изучите инструкцию перед применением набора реагентов «Инсайдер». Все сведения, необходимые для применения (эксплуатации) набора реагентов, приведены в настоящей инструкции. Другие документы по эксплуатации, кроме инструкции, не предусмотрены.

3. Назначение, область применения

Набор реагентов для качественного определения мутаций в генах человека: *EGFR* (экзоны 18, 19, 20, 21), *KRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)), *NRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)) и *BRAF* (экзон 15 (с.600)) методом ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК, выделенной из FFPE-блоков тканей колоректального рака, неплазмноклеточного рака легкого, меланомы, для диагностики *in vitro*.

Набор реагентов позволяет определить мутации:

- *EGFR ex18 G719X* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55174010-55174018; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2156G>C, с.2155G>A, с.2155G>T);
- *EGFR ex19 delX* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55174769-55174781; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2236_2250del15, с.2240_2254del15, с.2239_2256del18, с.2238_2252del15, с.2239_2247delTTAAGAGAA, с.2236_2253del18, с.2237_2251del15, с.2237_2254del18, с.2237_2255>T, с.2238_2255del18, с.2238_2248>GC, с.2239_2258>CA, с.2240_2251del12, с.2240_2257del18, с.2239_2251>C, с.2239_2248TTAAGAGAAG>C);
- *EGFR ex20 S768I* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55181306-55181316; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2303G>T);
- *EGFR ex20 D770_N771 insG* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55181315-55181324; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2310_2311insGGT);

- *EGFR ex20 T790M* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55181372-55181381; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2369C>T);
- *EGFR ex20 C797X* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55181394-55181405; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2390G>A, с.2390G>C, с.2389T>A);
- *EGFR ex21 L858R* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55191817-55191825; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2573T>G);
- *EGFR ex21 L861Q* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:55191828-55191838; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.2582T>A);
- *KRAS ex2 c.12, 13* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr12:25245343-25245355; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.35G>A, с.35G>T, с.34G>T, с.35G>C, с.34G>A, с.34G>C, с.36T>C, с.36T>A, с.36T>G, с.38G>A, с.37G>T, с.37G>A, с.37G>C, с.38G>C, с.38G>T, с.39C>A, с.39C>T, с.39C>G);
- *KRAS ex3 c.59, 61* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr12:25227339-25227351; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.175G>A, с.176C>G, с.183A>C, с.182A>G, с.182A>T, с.183A>T, с.181C>A, с.182A>C);
- *KRAS ex4 c.117* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr12:25225705-25225721; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.351A>T, с.351A>C, с.349A>G, с.350A>G);
- *KRAS ex4 c.146* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr12:25225622-25225635; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.436G>A, с.437C>T, с.436G>C, с.436G>T);
- *NRAS ex2 c.12, 13* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr1:114716119-114716131; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.35G>A, с.34G>A, с.34G>T, с.35G>T, с.35G>C, с.34G>C, с.36T>C, с.38G>A, с.37G>C, с.38G>T, с.37G>T, с.37G>A, с.38G>C, с.39T>C);
- *NRAS ex3 c.59, 61* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr1:114713918-114713906; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.175G>A, с.176C>A, с.182A>G, с.181C>A, с.182A>T, с.183A>T, с.183A>C, с.182A>C, с.181C>G);
- *NRAS ex4 c.117* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr1:114709676-114709663; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.351G>C, с.351G>T);
- *NRAS ex4 c.146* (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr1:114709587-114709576; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.436G>A, с.437C>T);

- *BRAF* ex15 с.600 (координаты участка ДНК с мутацией по сборке GRCh38/hg38 - chr7:140753329-140753343; возможные варианты нуклеотидных замен мутации: с.1799Т>А, с.1798_1799GT>АА, с.1798_1799GT>АG, с.1799_1800TG>АА).

Для установления нуклеотидной последовательности выявленных мутаций необходимо провести секвенирование по методу Сэнгера полученного ПЦР-продукта (в ходе ПЦР происходит избирательная амплификация участков мутантной ДНК, в результате чего увеличивается их количество, что позволяет провести секвенирование по методу Сэнгера).

Функциональное назначение: вспомогательное средство в диагностике.

Область применения набора реагентов – профессиональное применение в клинической лабораторной диагностике. Для профессионального применения в медицинских учреждениях для диагностики *in vitro*.

Предназначенный пользователь набора – сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку и имеющие достаточную квалификацию для проведения исследований в области диагностики *in vitro* методом ПЦР в режиме реального времени.

4. Состав, форма выпуска

Исключен непосредственный или опосредованный контакт с организмом пациента или пользователя (телом человека) при соблюдении требований инструкции по применению.

Таблица 1 – состав и форма выпуска набора реагентов

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
Модуль EGFR				
ПЦР-смесь Insider	6.6 мл	6 пробирок по 1.1 мл	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит Taq-полимеразу, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg ²⁺ и реакционный буфер.
Вода деионизированная	21 мл	14 пробирок по 1.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная.	Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей.
Олиго-смесь M EGFR ex18 G719X	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55174010-55174018, ЭВК.

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
Олиго-смесь М EGFR ex19 delX	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55174769-55174781, ЭВК.
Олиго-смесь М EGFR ex20 T790M	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55181372-55181381, ЭВК.
Олиго-смесь М EGFR ex20 S768I	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55181306-55181316, ЭВК.
Олиго-смесь М EGFR ex20 C797X	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55181394-55181405, ЭВК.
Олиго-смесь М EGFR ex20 D770_N771insG	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55181315-55181324, ЭВК.
Олиго-смесь М EGFR ex21 L858R	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55191817-55191825, ЭВК.
Олиго-смесь М EGFR ex21 L861Q	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:55191828-55191838, ЭВК.
Олиго-смесь О	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка геномной ДНК независимо от мутационного статуса исследуемых участков ДНК, ЭВК.
Олиго-смесь К	1.3 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для оценки качества анализируемой ДНК, ЭВК.
Праймер для секвенирования	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная.	Содержит олигонуклеотид, необходимый для секвенирования по методу Сэнгера.

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
ПКО EGFR	1.1 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит ДНК с мутантными копиями исследуемых участков ДНК. Контроль прохождения ПЦР и верного определения мутационного статуса исследуемого региона.
Модуль FullRAS				
ПЦР-смесь Insider	6.6 мл	6 пробирок по 1.1 мл	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит Taq-полимеразу, смесь нуклеотид-трифосфатов, Mg ²⁺ и реакционный буфер.
Вода деионизированная	21 мл	14 пробирок по 1.5 мл	Жидкость прозрачная бесцветная.	Контрольный образец без ДНК для подтверждения отсутствия контаминации. Для приготовления реакционных смесей.
Олиго-смесь M KRAS ex2 c.12, 13	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25245343-25245355, ЭВК.
Олиго-смесь M KRAS ex3 c.59, 61	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25227339-25227351, ЭВК.
Олиго-смесь M KRAS ex4 c.117	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25225705-25225721, ЭВК.
Олиго-смесь M KRAS ex4 c.146	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr12:25225622-25225635, ЭВК.
Олиго-смесь M NRAS ex2 c.12, 13	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr1:114716119-114716131, ЭВК.

Компонент	Объем	Фасовка	Внешний вид	Функциональное назначение
Олиго-смесь M NRAS ex3 с.59, 61	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr1:114713918-114713906, ЭВК.
Олиго-смесь M NRAS ex4 с.117	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr1:114709676-114709663, ЭВК.
Олиго-смесь M NRAS ex4 с.146	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr1:114709587-114709576, ЭВК.
Олиго-смесь M BRAF с.600	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка ДНК chr7:140753329-140753343, ЭВК.
Олиго-смесь O	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для специфической амплификации участка геномной ДНК независимо от мутационного статуса исследуемых участков ДНК, ЭВК.
Олиго-смесь K	1.3 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бледно-розовая.	Содержит олигонуклеотиды для оценки качества анализируемой ДНК, ЭВК.
Праймер для секвенирования	0.55 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная.	Содержит олигонуклеотид, необходимый для секвенирования по методу Сэнгера.
ПКО FullRAS	1.3 мл	1 пробирка	Жидкость прозрачная бесцветная умеренной вязкости. Допускается вспенивание при встряхивании.	Содержит ДНК с мутантными копиями исследуемых участков ДНК. Контроль прохождения ПЦР и верного определения мутационного статуса исследуемого региона.
Программное обеспечение				
«ПО Инсайдер», версия 1.1	-	1 шт.	Файл «Insider.exe» записан на USB-флеш-накопитель	Анализ данных ПЦР-теста

5. Количество анализируемых образцов, кратность применения

Набор реагентов рассчитан на 100 реакций и позволяет проанализировать от 13 до 55 образцов (в двух повторах или без повторов соответственно). Набор реагентов рассчитан на однократное, в том числе дробное, применение.

6. Принцип действия

Анализ образца проходит в два этапа: оценка качества образца и наработка ПЦР-продукта с мутациями в экзонах 18, 19, 20, 21 гена человека *EGFR*, экзонах 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *KRAS*, экзонах 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека *NRAS* и экзоне 15 (с.600) гена человека *BRAF*.

В основе метода оценки качества образца – полимеразная цепная реакция с детекцией сигнала в режиме реального времени. По значениям *Sq* по каналу FAM позволяют оценить количество ДНК; по каналу VIC – качество ДНК.

Для наработки ПЦР-продукта с мутантной ДНК используется мутационно-специфическая полимеразная цепная реакция с детекцией сигнала в режиме реального времени (реакция «М»). В реакции «М» амплифицируется исследуемый регион, содержащий мутации. Специфическая амплификация участка ДНК с мутацией происходит за счет содержания в «Олиго-смеси М» модифицированного олигонуклеотида, имеющего высокое сродство к референсной последовательности. Т.е. при наличии хотя бы одной мутации не образуется дуплекс матрица – модифицированный олигонуклеотид. В результате освобождается место для посадки праймера, что обеспечивает прохождение ПЦР-реакции.

Таким образом, в ходе ПЦР происходит избирательная амплификация участков мутантной ДНК, в результате чего увеличивается их количество, что позволяет провести секвенирование ПЦР-продукта по методу Сэнгера с использованием праймера, входящего в состав набора реагентов «Инсайдер».

Для контроля качества прохождения ПЦР-реакций в состав олиго-смесей «К», «О» и «М» входит экзогенный внутренний контроль (ЭВК).

7. Научная обоснованность анализа

Ген *EGFR* расположен на 7 хромосоме и кодирует трансмембранный рецептор эпидермального фактора роста, обладающий тирозинкиназной активностью. В нативной конформации белка киназный домен обладает аутоингибирующей активностью, а аминокислотные замены, происходящие вследствие мутаций гена, нарушают ее и приводят к конститутивной активации белка [1]. Такая активация рецептора и нижележащих сигнальных каскадов ингибирует апоптоз и стимулирует клеточную пролиферацию, ангиогенез, метастазирование, развитие и малигнизацию опухоли [2,3]. Активирующие соматические мутации, ведущие к этим событиям, находятся в 18, 19, 20, 21 экзонах гена *EGFR*.

Гены *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* человека кодируют ферменты-компоненты сигнального каскада RTK-RAS-RAF-MEK. В этом каскаде ГТФазы *KRAS* и *NRAS* являются активаторами серин-треониновой киназы *BRAF*, и взаимодействие этих белков регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток. Дeregуляция работы каскада, в том числе в следствие мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* и последующей гиперактивации белков, приводит к формированию и малигнизации опухолей [4]. В генах *Ras* такими мутациями являются нарушения в экзонах 2 (с.12, с.13), 3 (с.59, с.61), 4 (с.117, с.146) [5]. В гене *BRAF* наиболее изученные и клинически значимые мутации происходят в экзоне 15 (с.600; мутация V600) [6] – они повышают активность фермента в 500-700 раз [7].

Таблица 2 – Популяционные и демографические аспекты частот встречаемости мутаций в 18-21 экзонах гена человека *EGFR*, в экзонах 2 (с.12, с.13), 3 (с.59, с.61), 4 (с.117, с.146) генов человека *KRAS*, *NRAS* и экзоне 15 гена человека *BRAF*

Мутации	Нозология	Частота встречаемости
<i>EGFR ex18 G719X</i>	неплоскоклеточный рак легкого	~1%
<i>EGFR ex19 delX</i>		48% [8]
<i>EGFR ex20 T790M</i>		<5% до терапии >50% после терапии [9,10]
<i>EGFR ex20 D770_N771 insG</i>		4-10% [8,11]
<i>EGFR ex20 S768I</i>		2-3% [12]
<i>EGFR ex20 C797X</i>		40% от опухолей с устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназы III поколения [13]
<i>EGFR ex21 L858R</i>		43% [8]
<i>EGFR ex21 L861Q</i>		2% [8]
<i>KRAS ex2 (с.12, с.13), ex3 (с.59, с.61), ex4 (с.117, с.146)</i>	колоректальный рак	30 – 50% [6, 14-16]
	меланома	<5% [6, 14-16]
	неплоскоклеточный рак легкого	32% [6, 14-16]
<i>NRAS ex2 (с.12, с.13), ex3 (с.59, с.61), ex4 (с.117, с.146)</i>	колоректальный рак	1-10% [6, 14-16]
	меланома	28% [6, 14-16]
	неплоскоклеточный рак легкого	<2% [6, 14-16]
<i>BRAF ex15 с.600</i>	колоректальный рак	3 – 47% [6, 14-16]
	меланома	40-50% [6, 14-16]
	неплоскоклеточный рак легкого	7% [6, 14-16]

При выявлении неплоскоклеточного (в том числе диморфного) рака легкого рекомендуется проведение молекулярно-генетического исследования мутаций в гене *EGFR* (18-21-й экзоны), *BRAF V600E* в биопсийном (операционном) материале (в том числе цитологическое). Исследования требуются для прогноза и определения тактики лечения болезни [17].

Молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *BRAF* обязательно (для III стадии, IV стадии меланомы кожи). Наличие или отсутствие мутации в гене *BRAF* (экзон 15) в биопсийном материале (или ранее удаленных лимфатических узлах, или первичной опухоли (если материал удовлетворяет требованиям лаборатории для достоверного определения наличия или отсутствия молекулярно-генетических изменений)) влияет на выбор таргетной терапии в лечении метастатического процесса. В случае отсутствия мутации в гене *BRAF* рекомендуется провести исследование мутаций в гене *NRAS* (экзон3), что может повлиять на выбор схемы таргетной терапии (в частности, назначение ингибиторов протеинкиназы или моноклональных антител) при лечении метастатического процесса [18].

Пациентам с колоректальным раком рекомендуется выполнять молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* биопсийном (операционном) материале методом ПЦР для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса [19,20].

8. Аналитические характеристики

Характеристика	Значение
Предел обнаружения Модуля EGFR и Модуля FullRAS	2 нг/мкл ДНК (10 нг в реакции) Доля мутантной ДНК - 5%
Аналитическая специфичность Модуля EGFR (под аналитической специфичностью понимается способность специфически амплифицировать участки ДНК, содержащие мутации, что обеспечивается с помощью специфически подобранных олигонуклеотидов, проверенных на контрольных образцах)	В реакциях с ПКО EGFR – проходит амплификация участков ДНК, содержащих мутации в экзонах 18, 19, 20, 21 гена человека <i>EGFR</i> . В реакциях с контрольным образцом без ДНК – ДНК не амплифицируется.
Аналитическая специфичность Модуля FullRAS (под аналитической специфичностью понимается способность специфически амплифицировать участки ДНК, содержащие мутации, что обеспечивается с помощью специфически подобранных олигонуклеотидов, проверенных на контрольных образцах)	В реакциях с ПКО FullRAS – проходит амплификация участков ДНК, содержащих мутации в экзонах 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека <i>KRAS</i> , экзонах 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) гена человека <i>NRAS</i> и экзоне 15 (с.600) гена человека <i>BRAF</i> . В реакциях с контрольным образцом без ДНК – ДНК не амплифицируется.

9. Диагностические характеристики

9.1 Расчет диагностических характеристик проведен по формулам:

Диагностическая чувствительность (ДЧ) определялась как доля, выраженная в %, истинно положительных результатов ко всем положительным, включая ложноотрицательные, по формуле:

$$ДЧ=100\% \times \frac{ИП}{ИП+ЛО}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, \quad 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times \text{ИП} + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times \text{ИП} \times \text{ЛО}}{\text{ИП} + \text{ЛО}}}$$

$$Q3 = 2(\text{ИП} + \text{ЛО} + 1,96^2)$$

Диагностическая специфичность (ДС) определялась как доля, выраженная в %, истинно отрицательных результатов ко всем отрицательным, включая ложно-положительные, по формуле:

$$\text{ДС} = 100\% \times \frac{\text{ИО}}{\text{ЛП} + \text{ИО}}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, \quad 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times \text{ИО} + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times \text{ЛП} \times \text{ИО}}{\text{ЛП} + \text{ИО}}}$$

$$Q3 = 2(\text{ЛП} + \text{ИО} + 1,96^2)$$

Положительная предсказательная ценность (PPV) рассчитана по формуле:

$$\text{PPV} = 100\% \times \frac{\text{ИП}}{\text{ИП} + \text{ЛП}}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, \quad 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times \text{ИП} + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times \text{ИП} \times \text{ЛП}}{\text{ИП} + \text{ЛП}}}$$

$$Q3 = 2(\text{ИП} + \text{ЛП} + 1,96^2)$$

Отрицательная предсказательная ценность (NPV) рассчитана по формуле:

$$\text{NPV} = 100\% \times \frac{\text{ИО}}{\text{ИО} + \text{ЛО}}$$

Для расчета границ интервала использовались следующие формулы:

$$\left[100\% \times \frac{Q1 - Q2}{Q3}, \quad 100\% \times \frac{Q1 + Q2}{Q3} \right]$$

где:

$$Q1 = 2 \times \text{ИО} + 1,96^2$$

$$Q2 = 1,96 \sqrt{1,96^2 + \frac{4 \times \text{ИО} \times \text{ЛО}}{\text{ИО} + \text{ЛО}}}$$

$$Q3 = 2(\text{ИО} + \text{ЛО} + 1,96^2)$$

Отношение правдоподобия положительного результата (PLR) рассчитывается по формуле:

$$PLR = \frac{ДЧ}{1 - ДС}$$

Отношение правдоподобия отрицательного результата (LNR) рассчитывается по формуле:

$$LNR = \frac{1 - ДЧ}{ДС}$$

9.2 Диагностические характеристики Модуля EGFR

Характеристика	Значение характеристики на проверенной выборке в количестве 134 образца	Значение характеристики при доверительной вероятности 95%
Диагностическая чувствительность	100%	94,64%-100,00%
Диагностическая специфичность	100%	94,64%-100,00%
Положительная предсказательная ценность	100%	94,64%-100,00%
Отрицательная предсказательная ценность	100%	94,64%-100,00%
Отношение правдоподобия положительного результата	Расчет произвести нельзя, т. к. на данной выборке не было установлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов.	
Отношение правдоподобия отрицательного результата		

Оценка диагностических характеристик Модуля EGFR проводилась на выборке остаточных клинических образцов (134 образца). Правильность определения генотипов подтверждена референтной методикой – цифровой капельной ПЦР (ddPCR).

Таблица 3 – Результаты генотипирования остаточных клинических образцов с помощью набора реагентов «Инсайдер» (Модуль EGFR) и цифровой каплевой ПЦР (ddPCR)

			Цифровая каплевая ПЦР (ddPCR)		
«Инсайдер» (Модуль EGFR)	Участок ДНК	Генотип*	H/O	M	Wt
	chr7:55174010-55174018	G719A/C/S	-	4	-
		Wt	-	-	8
	chr7:55174769-55174781	Делеции в экзоне 19	-	27	-
		Wt	-	-	8
	chr7:55181306-55181316	S768I	-	1	-
		Wt	-	-	8
	chr7:55181315-55181324	D770_N771insG	-	1	-
		Wt	-	-	10
	chr7:55181372-55181381	T790M	-	3	-
		Wt	-	-	8
	chr7:55181394-55181405	C797Y/S	-	1	-
		Wt	-	-	9
	chr7:55191817-55191825	L858R	-	28	-
		Wt	-	-	8
	chr7:55191828-55191838	L861Q	-	2	-
		Wt	-	-	8
	Всего		0	67	67

* H/O – генотип не определен, M – в анализируемом участке ДНК обнаружена мутация, Wt – в анализируемом участке ДНК нет мутаций

9.3 Диагностические характеристики Модуля FullRAS

Характеристика	Значение характеристики на проверенной выборке в количестве 122 образца	Значение характеристики при доверительной вероятности 95%
Диагностическая чувствительность	100%	94,13%-100,00%
Диагностическая специфичность	100%	94,13%-100,00%
Положительная предсказательная ценность	100%	94,13%-100,00%
Отрицательная предсказательная ценность	100%	94,13%-100,00%
Отношение правдоподобия положительного результата	Расчет произвести нельзя, т. к. на данной выборке не было установлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов.	
Отношение правдоподобия отрицательного результата		

Оценка диагностических характеристик Модуля FullRAS проводилась на выборке остаточных клинических образцов (122 образца). Правильность определения генотипов подтверждена референтной методикой – цифровой капельной ПЦР (ddPCR).

Таблица 4 – Результаты генотипирования остаточных клинических образцов с помощью набора реагентов «Инсайдер» (Модуль FullRAS) и цифровой капельной ПЦР (ddPCR)

			Цифровая капельная ПЦР (ddPCR)		
«Инсайдер» (Модуль FullRAS)	Участок ДНК	Генотип*	H/O	M	Wt
	chr12:25245343-25245355	KRAS ex2 c.12 или KRAS ex2 c.13	-	32	-
		Wt	-	-	5
	chr12:25227339-25227351	KRAS ex3 c.59 или KRAS ex3 c.61	-	2	-
		Wt	-	-	7
	chr12:25225705-25225721	KRAS ex4 c.117	-	1	-
		Wt	-	-	7
	chr12:25225622-25225635	KRAS ex4 c.146	-	3	-
		Wt	-	-	7
	chr1:114716119-114716131	NRAS ex2 c.12 или NRAS ex2 c.13	-	2	-
		Wt	-	-	7
	chr1:114713918-114713906	NRAS ex3 c.59 или NRAS ex3 c.61	-	7	-
		Wt	-	-	7
	chr1:114709676-114709663	NRAS ex4 c.117	-	2	-
		Wt	-	-	7
	chr1:114709587-114709576	NRAS ex4 c.146	-	3	-
		Wt	-	-	7
	chr7:140753329-140753343	BRAF ex15 c.600	-	9	-
		Wt	-	-	7
	Всего		0	61	61

* H/O – генотип не определен, M – в анализируемом участке ДНК обнаружена мутация, Wt – в анализируемом участке ДНК нет мутаций

10. Ограничения метода

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

Для оценки влияния потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Инсайдер» была проведена оценка влияния потенциально интерферирующих веществ, содержащихся в биоматериале: парафина и некротической ткани. Для испытаний были подобраны образцы, содержащие предусмотренное и непредусмотренное инструкцией по применению к набору реагентов «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, производства ООО «НОМОТЕК» (номер регистрационного удостоверения РЗН 2019/9172 от 14.04.2020) количество парафина, а также различное содержание некротической ткани в срезе с FFPE-блока.

Исследуемый интерферент	Количество интерферента в образце	Описание образца
Парафин	Площадь парафина – 7 см ² . Площадь ткани – 1 см ² .	Образец с заниженным содержанием ткани.
	Площадь парафина – 5 см ² . Площадь ткани – 2 см ² .	Образец с заниженным содержанием парафина
	Площадь парафина – 7 см ² . Площадь ткани – 2 см ² .	Образец с повышенным содержанием парафина.
	Площадь парафина – 8 см ² . Площадь ткани – 2 см ² .	Образец с повышенным содержанием парафина.
	Площадь парафина – 9 см ² . Площадь ткани – 2 см ² .	Образец с повышенным содержанием парафина.
	Площадь парафина – 6 см ² . Площадь ткани – 2 см ² .	Образец, отвечающим требованиям инструкции по применению.
Некротическая ткань	Площадь нормальной ткани – 2 см ² . Площадь некротической ткани – 0 см ² .	Образец, отвечающим требованиям инструкции по применению.
	Площадь нормальной ткани – 1.5 см ² . Площадь некротической ткани – 0.5 см ² .	Образец, содержащий ¼ некротической ткани.
	Площадь нормальной ткани – 1 см ² . Площадь некротической ткани – 1 см ² .	Образец, содержащий ½ некротической ткани.
	Площадь нормальной ткани – 0.5 см ² . Площадь некротической ткани – 1.5 см ² .	Образец, содержащий ¾ некротической ткани.

По результатам исследования установлено, что:

- парафин в количествах, предусмотренных инструкцией по применению к набору реагентов «ЭкстрактДНК FFPE», не влияет на способность набора реагентов «Инсайдер» выявлять мутации;
- некротическая ткань в количестве, не превышающем $\frac{1}{4}$ от общей площади ткани в срезе с FFPE-блока, не влияет на способность набора реагентов «Инсайдер» выявлять мутации;
- присутствие в биоматериале парафина в количестве от 7 см² оказывает влияние на способность набора реагентов «Инсайдер» выявлять мутации;
- присутствие в биоматериале некротической ткани в количестве более $\frac{1}{4}$ от общей площади ткани в срезе с FFPE-блока оказывает влияние на способность набора реагентов «Инсайдер» выявлять мутации.

10.2 Оценка неопределенности определения в условиях повторяемости и воспроизводимости

Для оценки неопределенности в условиях повторяемости были подобраны условия, при которых независимые результаты испытаний получаются одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Для оценки неопределенности в условиях воспроизводимости были подобраны условия, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

По результатам испытаний рассчитаны значения диагностических характеристик в условиях повторяемости и воспроизводимости.

Таблица 5 – Значения диагностических характеристик в условиях повторяемости и воспроизводимости

	Значение характеристики в условиях повторяемости (ДВ 95%)					Значение характеристики в условиях воспроизводимости (ДВ 95%)				
	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Положительная предсказательная ценность	Отрицательная предсказательная ценность	Отношение правдоподобия положительного результата	Отношение правдоподобия отрицательного результата	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Положительная предсказательная ценность	Отрицательная предсказательная ценность
EGFR ex18 G719X	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)	Расчет произвести нельзя, т. к. на данной выборке не было установлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)	Расчет произвести нельзя, т. к. на данной выборке не было установлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов	100% (ДИ 98,31% - 100,00%)	100% (ДИ 98,31% - 100,00%)	100% (ДИ 98,31% - 100,00%)	100% (ДИ 98,31% - 100,00%)	Расчет произвести нельзя, т. к. на данной выборке не было установлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов
EGFR ex19 delX	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
EGFR ex20 S768I	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
EGFR ex20 D770 _ N771insG	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
EGFR ex20 T790M	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
EGFR ex20 C797X	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
EGFR ex21 L858R	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
EGFR ex21 L861Q	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
KRAS ex2 c.12,13	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
KRAS ex3 c.59,61	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
KRAS ex4 c.117	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
KRAS ex4 c.146	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
NRAS ex2 c.12,13	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
NRAS ex3 c.59,61	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
NRAS ex4 c.117	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
NRAS ex4 c.146	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
BRAF ex15 c.600	100% (ДИ 95,01% - 100,00%)									
Данные для модуля EGFR	100% (ДИ 99,36%-100,00%)									
Данные для модуля FullRAS	100% (ДИ 99,43%-100,00%)									

10.3 Совместимость с приборами

Оба модуля набора реагентов совместимы с приборами:

1. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: C1000 Touch с реакционным оптическим модулем CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (Производитель: «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США; РУ: № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016).
2. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500 (Производитель: «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд», Сингапур; РУ: РЗН 2016/3932 от 06.04.2016).

11. Меры предосторожности. Риски применения медицинского изделия

11.1 Общие

- Потенциальный риск применения Набора – класс 2б (Приказ Минздрава Российской Федерации от № 4н).
- Код ОКПД2 – 21.20.23.110.
- Код вида медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией – 323770.
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять Набор реагентов строго по назначению, только для диагностики *in vitro*.
- Набор реагентов не содержит факторы инфекционной и микробной опасности.
- Набор содержит факторы токсикологической опасности, требующие обеспечение специальных мер безопасности. Компоненты с такими веществами имеют предупредительную маркировку:



Таблица 6 – Характеристика веществ, входящих в состав компонентов набора реагентов и имеющих фразы опасности

Компонент	Опасное вещество в составе компонента (название, пиктограмма)	Опасность	Описание опасности
ПЦР-смесь Insider	NaN_3 	H300 + H310 + H330	Токсично при проглатывании, контакте с кожей или при вдыхании
		H373	Может поражать органы в результате многократного или продолжительного воздействия при проглатывании
		H400	Краткосрочная (острая) опасность для водных организмов
		H410	Весьма токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями

11.2 Для оператора

- При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом, рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- При работе с Набором реагентов необходимо соблюдать МУ 1.3.2569-09 "Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности", СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к используемым электрическим приборам; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Для предотвращения контаминации этапы подготовки к амплификации (ПЦР) и проведения ПЦР следует проводить в раздельных помещениях или изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими необходимыми принадлежностями. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

Примечание: Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории описаны в Приложении 2 данной инструкции по применению.

- При работе с Набором соблюдать следующие правила: использовать одноразовые нитриловые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинического материала.
- Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Набор реагентов готов к применению согласно инструкции по применению. Применять Набор реагентов строго по назначению.
- Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).
- К работе с Набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- 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.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности Набор безопасен. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен.

11.3 При работе с программным обеспечением

- При работе с программным обеспечением необходимо использовать анти-вирусное программное обеспечение для снижения риска воздействия вредоносного программного кода на программное обеспечение «ПО Инсайдер», версия 1.1.
- Воздействие на носитель программного обеспечения внешних факторов может привести к повреждению носителя и невозможности запуска программного обеспечения. Для снижения риска повреждения носителя следует избегать воздействия: электромагнитных полей, электростатических разрядов, излучения (электромагнитного, ионизирующего, иного), повышенной влажности и температуры воздуха, воздействие прямых солнечных лучей, агрессивных сред (кислоты, щелочи, другие химически активные вещества).
- В случае повреждения носителя необходимо запросить новый носитель у изготовителя или самостоятельно скачать программное обеспечение с сайта www.nomotech.ru.
- В отношении программного обеспечения потребитель не имеет права:
 - пытаться обойти технические ограничения в программном обеспечении;
 - вносить изменения в состав исполняемых модулей;
 - вскрывать технологию, декомпилировать или деассемблировать программное обеспечение;
 - публиковать программное обеспечение, предоставляя другим лицам возможность его скопировать;
 - предоставлять программное обеспечение в прокат, в аренду или во временное пользование.

12. Необходимые материалы и реагенты, лабораторная посуда и оборудование, не входящие в комплект поставки

Каждая зона ПЦР-лаборатории должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов представлен в Таблице 7.

Замена амплификатора и пробирок для амплификации на оборудование и материалы с аналогичными характеристиками не допускается!

Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами (см. Приложение 2).

Таблица 7 – Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования

Перечень необходимых материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования необходимых для проведения исследования	Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов
Персональный компьютер	– процессор IntelCore i3-3240, 3400 МГц; – оперативная память 8 ГБайт RAM; – жесткий диск 120 ГБайт (> 1 ГБайт свободного пространства); – видеоадаптер Intel HD Graphics 2500; – монитор с разрешением 1920 x 1080 пикселей; – порт USB 2.0 – 1 шт.; – устройство ввода клавиатура и манипулятор типа «мышь»; – операционная система MS «Windows» версии 10; – программное обеспечение «Adobe Reader» версии 9.0 (для просмотра и чтения отчетов); – программное обеспечение «Dr. Web Enterprise Security Suite».
ПЦР-бокс для приготовления реакционной смеси	Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" по ТУ 9443-004-51495026-2004.
ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР	Производитель: ЗАО «Ламинарные системы», Россия. ФСР 2010/07114 от 18.03.2010 Модель: БАВ-ПЦР-"Ламинар-С" Кат. №: 1R-F.001-10.1/0.06.1
Комплект дозаторов переменного объема и наконечников с фильтром, позволяющих отбирать объемы жидкостей от 2 до 1000 мкл	Дозаторы Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема серии Pipetman: 3. Pipetman P20; 4. Pipetman P100; 5. Pipetman P200; 6. Pipetman P1000. Производитель: Gilson Pipetman, Франция. Модель: Дозатор 2–20 мкл: точность ± 0.2 мкл, Кат. № P20 F123600. Дозатор 20–100 мкл: точность ± 0.8 мкл, Кат. № P100 F123615. Дозатор 50–200 мкл: точность ± 1.6 мкл, Кат. № P200 F123601. Дозатор 200–1000 мкл: точность ± 8.0 мкл, Кат. № P1000 F123602. Наконечники Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований <i>in vitro</i>. 2. Наконечники универсальные с фильтром, для лабораторных дозаторов, объемом от 0.1 мкл до 10 мл, стерильные и нестерильные, упакованные в пакеты и штативы. Производитель: SSI, США. РУ ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017. Кат. № SSI-4237NAFS.

Перечень необходимых материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования необходимых для проведения исследования	Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов
Амплификатор детектирующий	1. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: C1000 Touch, в комплекте 5. Модуль реакционный оптический CFX96 (Optical Reaction Module CFX96). Производитель: «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США. РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016. 2. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с принадлежностями: I. Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, вариант исполнения 7500. Производитель: Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд, Сингапур. РУ: РЗН 2016/3932 от 06.04.2016.
Мини-центрифуга/ вортекс	Мини-центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400. Производитель: 000 «БИОСАН», Латвия.
Термостат	Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит" по ТУ 9452-004-46482062-2002. Производитель: 000 «НПО ДНК-Технология», Россия. ФСР 2012/14090 от 23.11.2012. Модель: ТТ-2 "Термит".
Штатив «рабочее место» для стрипов/ для хранения пробирок 0.2–2 мл	Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований <i>in vitro</i> 15. Штативы для хранения и транспортировки пробирок, криопробирок объемом от 0.2 мл до 50 мл. Производитель: SSI, США. РУ ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017. Кат. № RA-9602, Кат.№ SSI-5210-29.
Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5, 2.0 мл	Изделия медицинские полимерные лабораторные одноразовые для взятия и исследования биоматериалов 10. Пробирки (виды: 108710, 108740, 108750, 264440, 264460, 169800, 169870). Производитель: «Sarstedt AG & Ко. КГ», Германия. РУ ФСЗ 2009/04699 от 18.10.2017. Кат. № 72.690.001, Кат.№ 72.695.500.
Пробирки для амплификации объемом 0.2 мл	Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований <i>in vitro</i> 4. Пробирки объемом от 0.2 мл до 2.0 мл для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики), индивидуальные и в стрипах по 8 и 12 штук, с крышками и без крышек, стерильные и нестерильные, упакованные в пакеты. Производитель: SSI, США. РУ ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017. Кат. № SSI-3247-00.
Секундомер	Производитель: ОАО "ИНТЕГРАЛ", Республика Беларусь. Модель: Секундомер «Интеграл» С-01.

Перечень необходимых материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования необходимых для проведения исследования	Перечень материалов, реагентов, лабораторной посуды и оборудования, на которых валидирован набор реагентов
Морозильная камера, поддерживающая температуру от -28 до -10 °C	Производитель: Индезит, Италия. Модель: ES 20. Кат. № SB 185.027.
Перчатки медицинские	Перчатки медицинские диагностические (смотровые) стерильные и нестерильные по ТУ 9398-001-53733748-2008. Производитель: ООО «Ардейл-Импэкс», Россия, РУ ФСР 2008/03090 от 30.07.2008.

13. Биологический материал

ДНК, выделенная из FFPE-блока набором реагентов «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, производства ООО «НОМОТЕК», номер регистрационного удостоверения РЗН 2019/9172 от 14.04.2020.

Хранить и транспортировать препарат ДНК при температуре от -28 до -10 °C в течение 1 месяца, с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

14. Протокол анализа образца

Внимание!

На этапах анализа образца «Оценка качества ДНК» и «Наработка ПЦР-продукта с мутациями»:

– максимальное число образцов, которое возможно проанализировать Модулем EGFR, достигается при одновременной постановке 6 образцов (без повторов).

– максимальное число образцов, которое возможно проанализировать Модулем FullRAS, достигается при одновременной постановке 5 образцов (без повторов).

Компоненты Модуля EGFR использовать ТОЛЬКО для определения мутаций в гене человека *EGFR*.

Компоненты Модуля FullRAS использовать ТОЛЬКО для определения мутаций в генах человека *NRAS*, *KRAS*, *BRAF*.

Компоненты одного модуля заменять компонентами другого модуля запрещено.

14.1 Оценка качества ДНК

На этапе оценки качества ДНК проводится анализ образца с целью выбора разведения ДНК (4х, 8х или 16х) для использования его на этапе наработки ПЦР-продукта с мутациями.

14.1.1 Приготовление реакционной смеси

1. Разморозить при температуре от $+15$ до $+30$ °C компоненты: «ПЦР-смесь Insider», «Вода деионизированная», «Олиго-смесь К».

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортексе в течение 10 с, не допуская образования пены; сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

3. Рассчитать необходимый объем компонентов для реакционной смеси, исходя из числа исследуемых образцов (N) в зависимости от формата постановки:

- образцы анализируются без повторов;
- образцы анализируются в 2-х повторах.

Таблица 8 – Расчет количества компонентов (ПКО и контрольный образец без ДНК учтены в формуле)

Реакционная смесь	Образцы анализируются без повторов	Образцы анализируются в 2-х повторах
Вода деионизированная	$10.5 \times (N \times 3 + 4)$	$10.5 \times (N \times 6 + 4)$
ПЦР-смесь Insider	$5.25 \times (N \times 3 + 4)$	$5.25 \times (N \times 6 + 4)$
Олиго-смесь К	$5.25 \times (N \times 3 + 4)$	$5.25 \times (N \times 6 + 4)$

4. Приготовить реакционную смесь.

Менять наконечники между компонентами!

5. Тщательно перемешать реакционную смесь встряхиванием на вортексе в течение 10 с; сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 5 с.

6. Подготовить пробирки для ПЦР (стрипы; 1 стрип – 8 пробирок) в количестве $N \times 3 + 4$ или $N \times 6 + 4$ (в зависимости от выбранного формата постановки): установить в штатив, промаркировать.

Не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Маркировку наносить на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.

7. Внести по 20 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.

8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в 2 пробирки для ПЦР. Плотно закрыть крышки пробирок. При программировании амплификатора обозначить эти образцы, как «Контрольный образец без ДНК» (NTC).

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

9. Закрыть крышки других пробирок для ПЦР. Перенести все пробирки для ПЦР в ПЦР-бокс для внесения ДНК.

14.1.2 Подготовка образцов

10. В ПЦР-боксе для внесения ДНК разморозить ПКО при температуре от +15 до +30 °C.

11. Разморозить при температуре +50 °C исследуемые образцы ДНК.

12. После разморозки все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

13. Подготовить разведения исследуемых образцов:

- для каждого образца подготовить по 3 чистые пробирки;
- промаркировать пробирки, сохраняя название образца и степень разведения: 4х, 8х, 16х;
- внести «Воду деионизированную» в пробирки: 9 мкл в пробирку 4х, 6 мкл – в 8х, 6 мкл – в 16х;
- в пробирку для разведения 4х внести 3 мкл образца;

Закрывать пробирку, перемешать содержимое на вортексе в течение 5 с, сбросить капли центрифугированием. Повторять после приготовления всех разведений.

- в пробирку для разведения 8х внести 6 мкл разведения 4х;
- в пробирку для разведения 16х внести 6 мкл разведения 8х.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку!

Пробирку с «Водой деионизированной» при дальнейшем использовании не вносить в ПЦР-бокс для приготовления реакционных смесей. Использовать для приготовления других разведений ДНК.

14. Добавить по 5 мкл подготовленных разведений ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Плотнo закрыть крышки пробирок сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

15. Добавить по 5 мкл ПК0 в оставшиеся 2 пробирки для ПЦР. Плотнo закрыть крышки пробирок.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

16. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

17. Перемешать встряхиванием содержимое пробирок для ПЦР, не допуская образования пены.

18. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

14.1.3 Проведение ПЦР

19. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

20. Запустить программное обеспечение амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон или ввести параметры:

- программа амплификации:

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация	95	3 мин	–
Амплификация 50 циклов	95	10 с	–
	60	30 с	FAM, VIC
	72	30 с	–

- создать разметку плашки в соответствии с установленными пробирками в блок амплификатора:
- для всех образцов, включая контрольные, выбрать каналы детекции FAM и VIC;

Внимание!

Не использовать пассивный референсный краситель на амплификаторе 7500! Проверить, что в поле "Select the dye to use as the passive reference" выставлено "None".

- в поле «Имя пробы» (Sample Name) ввести названия и степень разведения исследуемых образцов, а также названия контрольных образцов (PKO и NTC);
- запустить программу амплификации.

14.1.4 Выбор образца надлежащего качества

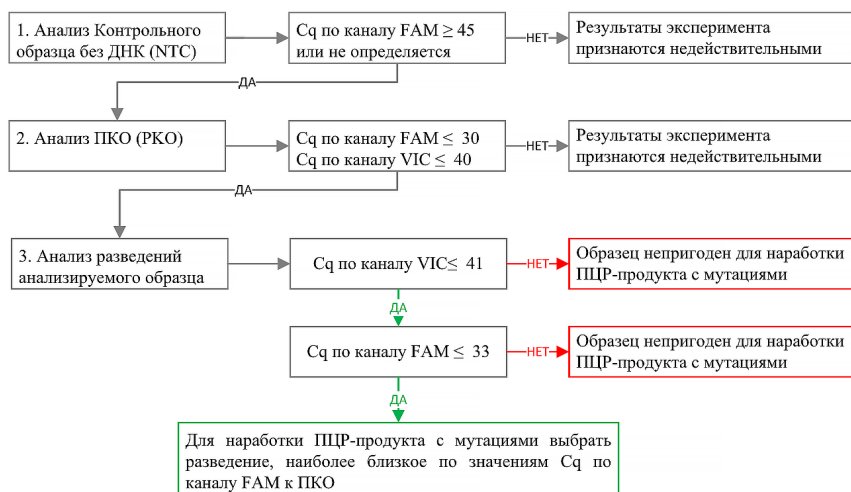
21. В программном обеспечении амплификатора открыть ПЦР-файл с результатами и изменить значения «Циклы базовой линии» (Baseline Cycles) так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат.

22. По каналам FAM и VIC установить «Threshold» на уровне начала экспоненциального роста сигнала (накопления ПЦР-продукта).

23. Выбрать разведение образца для наработки ПЦР-продукта с мутацией, используя Схему 1.

Для образцов, поставленных в повторах, значения C_q считать, как среднее (полученные значения округлять до целых).

Схема 1 – анализ разведений исследуемого образца



14.2 Нарботка ПЦР-продукта с мутациями

14.2.1 Приготовление реакционных смесей

1. В ПЦР-боксе для приготовления реакционных смесей разморозить при температуре от +15 до +30 °С компоненты: «ПЦР-смесь Insider», «Вода деионизированная», «Олиго-смесь О» и «Олиго-смесь М» (выбрать «Олиго-смесь М» в зависимости от анализируемого участка ДНК).

2. Содержимое пробирок тщательно перемешать четырехкратным переворачиванием, затем встряхиванием на вортке в течение 10 с, не допуская образования пены; сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

3. Рассчитать необходимый объем компонентов для реакционной смеси, исходя из числа исследуемых образцов (N) в зависимости от формата постановки:

- образцы анализируются без повторов;
- образцы анализируются в 2-х повторах.

Для каждой постановки ПЦР готовить одну реакционную смесь с олиго-смесью «О».

Для каждой «Олиго-смеси» реакционная смесь готовится отдельно.

Таблица 9 – расчет количества компонентов (ПКО и контрольный образец без ДНК учтены в формуле)

Реакционная смесь	Образцы анализируются без повторов	Образцы анализируются в 2-х повторах
Вода деионизированная	$10.5 \times (N + 4)$	$10.5 \times (N \times 2 + 4)$
ПЦР-смесь Insider	$5.25 \times (N + 4)$	$5.25 \times (N \times 2 + 4)$
Олиго-смесь	$5.25 \times (N + 4)$	$5.25 \times (N \times 2 + 4)$

4. Приготовить реакционную смесь.

Менять наконечники между компонентами!

5. Тщательно перемешать реакционную смесь встряхиванием на вортке в течение 10 с; сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 5 с.

6. Подготовить пробирки для ПЦР (стрипы; 1 стрип – 8 пробирок) в количестве $N + 4$ или $N \times 2 + 4$ (в зависимости от выбранного формата постановки): установить в штатив, промаркировать.

Не использовать маркер, который флуоресцирует при возбуждении светом. Маркировку наносить на участки пластика, не задействованные в детекции флуоресценции.

7. Внести по 20 мкл реакционной смеси в пробирки для ПЦР.

Менять наконечники между разными реакционными смесями!

На Рисунке 1 представлена рекомендуемая схема расположения ПЦР-пробирок на примере анализа 6 исследуемых образцов по мутациям в гене *EGFR*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	ИО1	NTC
B	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	ИО2	NTC
C	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	ИО3	
D	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	ИО4	
E	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	ИО5	
F	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	ИО6	
G	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	РКО	
H	ИО1	ИО2	ИО3	ИО4	ИО5	ИО6	РКО	РКО	NTC	NTC	РКО	

Рисунок 1 – схема, имитирующая расположение ПЦР-пробирок в блоке амплификатора.

Белым и серым цветами выделены разные «Олиго-смеси М», оранжевым цветом – «Олиго-смесь О». Обозначение образцов на схеме:

ИО1, ИО2, ИО3, ИО4, ИО5, ИО6	Исследуемые образцы
NTC	Контрольный образец без ДНК
РКО	РКО EGFR

8. Добавить по 5 мкл «Вода деионизированная», которая использовалась для приготовления реакционной смеси, в 2 пробирки для ПЦР (обозначены на Рисунке 1 как NTC). Плотно закрыть крышки пробирок.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

9. Закрыть крышки других пробирок для ПЦР. Перенести все пробирки для ПЦР в ПЦР-бокс для внесения ДНК.

14.2.2 Подготовка образцов

10. В ПЦР-боксе для внесения ДНК разморозить РКО при температуре от +15 до +30 °С.

11. Разморозить при температуре +50 °С исследуемые образцы ДНК.

12. После разморозки все образцы перемешать встряхиванием на вортексе, сбросить капли центрифугированием в течение 5 с.

13. Подготовить разведения исследуемых образцов, выбранные в п.14.1.4:

- для каждого образца подготовить 1 пробирку для разведения;
- промаркировать пробирку, сохраняя название образца и степень выбранного разведения;

- внести в пробирки сначала «Воду деионизированную», затем образец ДНК в количестве:

Степень разведения	Вода, мкл	ДНК, мкл
4х	$3,75 \times (Z+2) \times Y$	$1,25 \times (Z+2) \times Y$
8х	$4,375 \times (Z+2) \times Y$	$0,625 \times (Z+2) \times Y$
16х	$4,6875 \times (Z+2) \times Y$	$0,3125 \times (Z+2) \times Y$
Где: Z – количество только олиго-смесей М Y – количество повторов образца Допустимо округлять полученные значения, сохраняя пропорцию между количеством воды и ДНК		

Закрыть пробирку, перемещать содержимое на вортексе в течение 5 с, сбросить капли центрифугированием.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку!

Пробирку с «Водой деионизированной» при дальнейшем использовании не вносить в ПЦР-бокс для приготовления реакционных смесей. Использовать для приготовления других разведений ДНК.

14. Добавить по 5 мкл разведенной ДНК исследуемых образцов в соответствующие пробирки для ПЦР. Рекомендуемое расположение образцов представлено на Рисунке 1. Плотно закрыть крышку пробирки сразу после внесения образца, выполнить последовательно для всех образцов.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

15. Добавить по 5 мкл ПК0 в 2 пробирки для ПЦР (обозначены на Рисунке 1 как РК0). Плотно закрыть крышки пробирки сразу после внесения контрольного образца.

Менять наконечники после каждого внесения образца в пробирку для ПЦР!

16. Проверить плотность закрытия крышек пробирок.

17. Перемешать встряхиванием содержимое пробирок для ПЦР, не допуская образования пены.

18. Сбросить капли центрифугированием в течение 10 с.

14.2.3 Проведение ПЦР

19. Установить пробирки для ПЦР в блок амплификатора.

20. Запустить программное обеспечение амплификатора. Открыть созданный ранее шаблон или ввести параметры:

- программа амплификации:

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Считывание флуоресценции
Инкубация	95	3 мин	–
Амплификация 50 циклов	95	10 с	–
	60	30 с	FAM, VIC

- создать разметку плашки в соответствии с установленными пробирками в блок амплификатора:
- для всех образцов, включая контрольные, выбрать каналы детекции FAM и VIC;

Внимание!

Не использовать пассивный референсный краситель на амплификаторе 7500!
Проверить, что в поле "Select the dye to use as the passive reference" выставлено "None".

- в поле «Имя мишени» (Target Name) ввести названия мишеней:

	Имя мишени по каналу FAM (согласно используемой олиго-смеси)	Имя мишени по каналу VIC
Модуль EGFR	EGFR ex18 G719X	IPC
	EGFR ex19 delX	
	EGFR ex20 T790M	
	EGFR ex20 S768I	
	EGFR ex20 C797X	
	EGFR ex20 ins	
	EGFR ex21 L858R	
	EGFR ex21 L861Q	
	O EGFR	
Модуль FullRAS	KRAS c.12, 13	
	KRAS c.59, 61	
	KRAS c.117	
	KRAS c.146	
	NRAS c.12, 13	
	NRAS c.59, 61	
	NRAS c.117	
	NRAS c.146	
	BRAF c.600	
	O FullRAS	

- в поле «Имя пробы» (Sample Name) ввести названия контрольных образцов:

Контрольный образец	Название контрольного образца в плашке ПЦР
Контрольный образец без ДНК	NTC
ПКО EGFR	PKO
ПКО FullRAS	PKO

- в поле «Имя пробы» (Sample Name) ввести названия исследуемых образцов. Не вводить одинаковые названия для разных образцов;
- запустить программу амплификации.

15. Анализ данных

15.1 Настройки

1. Создать папку на компьютере для хранения данных, полученных в результате ПЦР-теста, и размещения программного обеспечения.
2. Скопировать «ПО Инсайдер», версия 1.1 с USB-флеш-накопителя в созданную папку.
3. В программном обеспечении амплификатора открыть ПЦР-файл с результатами и изменить значения «Циклы базовой линии» (Baseline Cycles) так, чтобы часть графика флуоресценции до начала экспоненциального роста сигнала стала параллельна оси абсцисс и близка к нулю по оси ординат.
4. Для каналов FAM и VIC установить «Пороговый уровень» (Threshold) на уровне начала экспоненциального роста сигнала (накопления ПЦР-продукта).

15.2 Экспорт данных

Экспорт из Bio-Rad	Экспорт из 7500
1. В открытом файле ПЦР открыть окно для экспорта данных: «Экспорт» (Export) -> «Выборочный экспорт» (Custom Export). 2. Выбрать формат экспортируемых данных: «Формат экспорта» (Export Format): Текст (Text) (*.txt). 3. Выбрать разделитель полей: «Разделитель» (Column Separator): «Табуляция» (Tab). 4. Снять галочку с поля «Включить заголовки информации о прогоне» (Include Run Information Header). 5. Отметить для экспортирования поля: - Лунка (Well) - Флуорофор (Fluorophore) - Имя мишени (Target Name) - Имя пробы (Sample Name) - Cq Внимание! Не менять названия экспортируемых параметров! 6. Нажать кнопку «Экспорт» (Export) и сохранить файл в ранее созданную папку для анализа данных. 7. Закрыть открывшийся файл и перейти к загрузке данных (п. 15.3). Внимание! Не вносить изменения в открывшийся файл!	1. В ПЦР-файле выделить лунки, в которых были размещены исследуемые и контрольные образцы, и провести экспорт данных: «Export» -> «Export». 2. В открывшемся окне выбрать вкладку «Customise Export». 3. Отметить для экспортирования поля: - Well - Reporter - Target Name - Sample Name - Ct 4. В этом же окне перейти на вкладку «Export Properties». 5. В поле «Export File Name» ввести наименование файла -> в «File Type» выбрать: «*.txt». 6. В поле «Export File Location» с помощью кнопки «Browse» выбрать созданную ранее папку -> экспортировать и сохранить файл нажав «Start Export». 7. В открывшемся окне выбрать кнопку «Export More Data». 8. Перейти к загрузке данных (п. 15.3).

15.3 Загрузка данных

1. Запустить программное обеспечение «ПО Инсайдер», версия 1.1 (подробное описание интерфейса «ПО Инсайдер», версия 1.1 – см. Приложение 1).
2. Выбрать пункт меню «Загрузить данные».
3. В открывшемся окне выбрать экспортированный ранее файл данных.

Внимание!

Убедитесь в корректном выборе файла для анализа данных!

4. Нажать кнопку «открыть».

15.4 Анализ данных

1. После загрузки файла анализ данных осуществляется автоматически.
2. В окне «1.1 Анализ данных ПЦР» отображается полный путь к загруженному файлу, а также возможные сообщения об ошибках (полный список ошибок – см. Приложение 1 п.28).
3. В окне «1.2 Анализ контрольных образцов» отображается результат контроля качества контрольных образцов.
4. В окне «1.3 Результат контроля качества ПЦР» отображается результат контроля качества ПЦР.

15.5 Вывод результатов

1. Заполнить поля «Оператор» и «Дата проведения исследования». Дату исследования необходимо ввести в формате ГГГГ-ММ-ДД (например, «2017-10-16»).
2. Для вывода результатов выбрать нужную опцию меню:
 - «Результаты по каждому образцу» – для вывода результатов по каждому образцу в отдельный файл формата PDF;
 - «Результаты по всем образцам» – для вывода результатов по всем образцам в формате общей таблицы в один файл PDF.
3. Выбрать папку, в которой будут сохранены результаты исследований в формате PDF.

15.6 Интерпретация результатов

1. Мутация выявлена.

Для установления нуклеотидной последовательности выявленных мутаций необходимо провести секвенирование по методу Сэнгера полученного ПЦР-продукта. Для секвенирования использовать:

- специфический праймер («Праймер для секвенирования» входит в состав набора реагентов) в количестве 1 мкл на реакцию;
- анализатор генетический Applied Biosystems 3500, с принадлежностями, вариант исполнения: Applied Biosystems 3500xl. Производитель: «Лайф Текнолоджис Корпорейшн», США.
РУ № ФСЗ 2010/07007 от 14.10.2016.

2. Мутация не выявлена.

Образцы, в которых не выявлены отличия от референсной последовательности генома человека (сборка GRCh38/hg38), не содержат мутаций в исследуемом регионе.

16. Условия транспортирования, хранения и использования

16.1 Набор реагентов разрешается транспортировать всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

16.2 Транспортирование набора реагентов осуществляется в пенопластовых термоконтейнерах с хладоэлементами в течение 5 суток при температуре от -28 до $+8$ °C.

16.3 Хранение набора реагентов до и после первого вскрытия осуществляется при температуре от -28 до -10 °C.

16.4 После транспортирования перед использованием «ПО Инсайдер», версия 1.1 дать прогреться USB-флеш-накопителю до комнатной температуры.

Хранение программного обеспечения осуществляется при температуре от $+15$ до $+30$ °C.

16.5 Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, использованию не подлежит.

17. Срок годности

Срок годности 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

18. Критерии непригодности набора реагентов для применения

Не использовать Набор реагентов, если применим хотя бы один критерий непригодности:

- повреждена фасовочная тара компонентов и USB-флеш-накопитель;
- нет возможности плотно закрыть фасовочную тару компонентов или обнаружены протечки;
- неполная комплектность, в том числе в результате применения;
- внешний вид компонентов не соответствует описанию;
- стартовый интерфейс программного обеспечения не соответствует Рисунку 2, представленному в Приложении 1;
- нарушены условия хранения;
- истек срок годности;
- компоненты загрязнены ДНК человека;
- изготовитель сообщил об отзыве производственной серии, к которой относится данный набор реагентов (посредством объявления на сайте www.nomotech.ru или иным способом).

19. Гарантии изготовителя

Предприятие-изготовитель ООО «НОМОТЕК» гарантирует:

- соответствие набора реагентов требованиям ТУ 21.20.23-018-11248074-2018 при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования;
- срок годности набора реагентов – 12 месяцев с даты изготовления, указанной на этикетке, при соблюдении условий транспортирования, хранения и использования.

20. Контроль качества, метрологическая прослеживаемость

20.1 Контроль качества Набора реагентов осуществляется ОТК предприятия-изготовителя согласно ТУ 21.20.23-018-11248074-2018.

Предприятие-изготовитель проводит приемо-сдаточные испытания для каждой производственной серии, осуществляя контроль основных аналитических характеристик, внешнего вида, комплектности, упаковки, маркировки, а также проводит контроль качества сырья и компонентов.

20.2 Метрологическая прослеживаемость «ПКО EGFR» и «ПКО FullRAS» обеспечена до контрольных образцов предприятия, верифицируемых секвенированием по методу Сэнгера.

21. Порядок подачи рекламаций

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться:

- ООО «НОМОТЕК» 119421 г. Москва, Ленинский проспект, дом 111, корпус 1, помещ. 34, эт. 3;
- md-support@nomotech.ru – техническая поддержка.

При подаче рекламации необходимо исключить низкое качество биоматериала, ошибку измерения, ошибку выполнения протокола, ошибку идентификации ПО, ошибку нарушения ограничений ПО, нарушение условий транспортирования, хранения и использования. Если все указанные факторы исключены, необходимо обратиться в службу технической поддержки.

22. Утилизация

22.1 Набор реагентов, пришедший в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежит утилизации.

22.2 Уничтожение набора реагентов осуществляется организациями, имеющими соответствующую лицензию, на специально оборудованных площадках, полигонах и в помещениях в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами, и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

22.3 После проведения тестирования все отходы необходимо утилизировать как отходы класса «Б» согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

22.4 Непригодный к использованию набор реагентов и его компоненты необходимо утилизировать как отходы класса «Б» согласно СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Приложение 1

Руководство по работе с программным обеспечением «ПО Инсайдер»

23. Идентификация программного обеспечения

Наименование программного обеспечения: «ПО Инсайдер».

Назначение программного обеспечения: «ПО Инсайдер» входит в состав набора реагентов и предназначено для совместного использования с ним. «ПО Инсайдер» выполняет автоматическую обработку данных, полученных в результате проведения ПЦР с помощью набора реагентов.

Все сведения, необходимые для применения (эксплуатации) «ПО Инсайдер», приведены в настоящей инструкции. Другие документы по эксплуатации, кроме настоящей инструкции, не предусмотрены.

24. Описание программного обеспечения

24.1 Общая информация

- Тип: программное обеспечение.
- Класс безопасности по ГОСТ Р МЭК 62304: «А».
- Версия: 1.1.
- Дата выпуска: 2021-03-22.
- Язык программирования: Python 3.7.
- Язык интерфейса: Русский
- Разработчик и изготовитель: ООО «Новые молекулярные технологии» (ООО «НОМОТЕК»)
- Поставляется на USB-флеш-накопителе и состоит из единственного исполняемого файла «Insider.exe».

24.2 Описание модулей программного обеспечения

Программа включает в себя программные модули:

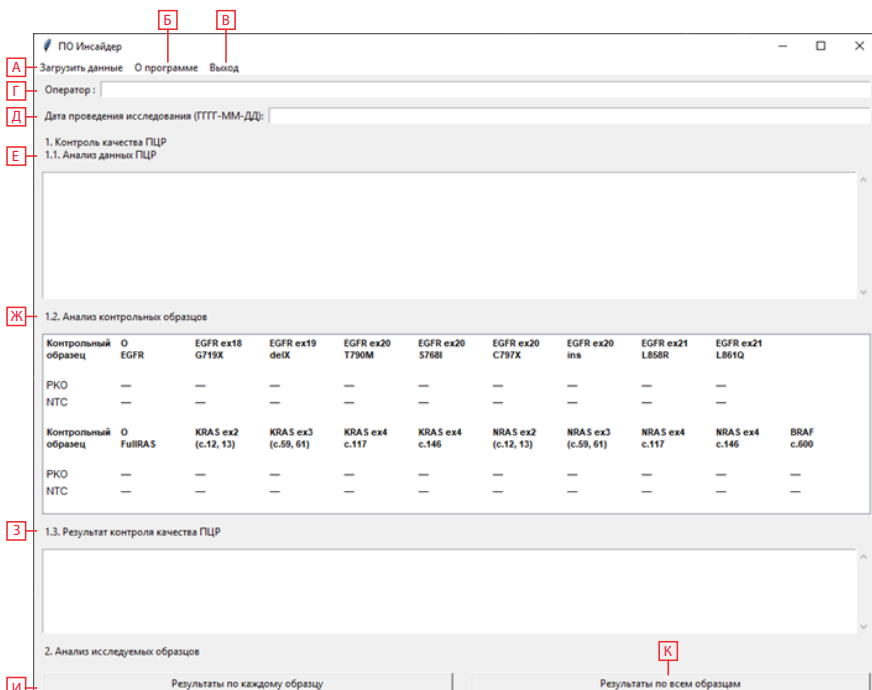
- Модуль загрузки данных.
Назначение: получает от пользователя файл с результатами ПЦР, проверяет формат файла и в случае успеха загружает из него данные ПЦР для последующего анализа.
- Модуль контроля качества.
Назначение: контроль качества ПЦР по результатам обработки данных контрольных образцов.

- Модуль анализа исследуемых образцов.
Назначение: выявление мутаций в генах человека: *EGFR* (экзоны 18, 19, 20, 21), *KRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)), *NRAS* (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)) и *BRAF* (экзон 15 (с.600)).
- Модуль формирования отчета.
Назначение: формирует отчеты о проведенном исследовании.

24.3 Стартовый интерфейс

Стартовый интерфейс «ПО Инсайдер» », версия 1.1 состоит из:

- главное меню: «Загрузить данные» (Рисунок 2-А), «О программе» (Рисунок 2-Б), «Выход» (Рисунок 2-В);
- поля для ввода данных оператора (Рисунок 2-Г), проводившего исследование, и даты проведения исследования (Рисунок 2-Д);
- окно данных об анализируемых образцах (Рисунок 2-Е);
- окно данных об анализе контрольных образцов (Рисунок 2-Ж);
- окно результата контроля качества ПЦР (Рисунок 2-З);
- кнопка для формирования отчетов по результатам анализа отдельно по каждому образцу (Рисунок 2-И) и по всем образцам (Рисунок 2-К).



25. Основные технические характеристики программного обеспечения

Характеристика	Значение
Формат данных на входе	Данные в формате Текст (файл *.txt), содержащие поля: «Лунка» (Well), «Флуорофор» (Fluorophore/Reporter), «Имя мишени» (Target Name), «Имя пробы» (Sample Name), «Cq»/«Ст»
Интерпретация данных ПЦР по контрольным образцам	Выполняется
Интерпретация данных ПЦР по исследуемым образцам	Выполняется
Прослеживаемость названий Мишеней и идентификаторов образцов от данных на входе в формате Текст (файл *.txt) до данных на выходе в формате PDF (таблица отчета в файле *.pdf)	Название Мишени остается неизменным и совпадает в данных на входе в формате Текст (файл *.txt) и в данных на выходе в формате PDF (таблица отчета в файле *.pdf) Идентификаторы исследуемых образцов остаются неизменными и совпадают в данных на входе в формате Текст (файл *.txt) и в данных на выходе в формате PDF (таблица отчета в файле *.pdf)
Регистрация оператора, проводящего анализ результатов и формирование отчета	Предусмотрена и обязательна для вывода отчета
Регистрация даты проведения исследования	Предусмотрена и обязательна для вывода отчета
Формат данных результата (определение мутационного статуса исследуемого участка ДНК)	Данные в формате PDF (файл *.pdf) для всех исследуемых образцов в 2-х видах: – в виде общей таблицы; – с разбиением по одному образцу на странице
Сообщения об ошибках входных данных, отрицательном результате контроля качества прохождения ПЦР или нарушения выполнения протокола анализа образца	Предусмотрены
Максимальное время загрузки ПО с жесткого диска компьютера (от запуска файла до открытия интерфейса ПО)	30 секунд
Максимальное время загрузки файла формата Текст (файл *.txt) с жесткого диска компьютера (от выбора файла до вывода данных прочтения файла в интерфейсе ПО)	5 секунд
Максимальное время выдачи отчета в формате PDF (в файле *.pdf) (от нажатия на кнопку выдачи результата в интерфейсе ПО до вывода данных в формате PDF (файл *.pdf))	10 секунд
Размер ПО	1 файл 11.2 Мбайт

26. Ограничения программного обеспечения

26.1 Ограничения

При применении программного обеспечения «ПО Инсайдер», версия 1.1 необходимо соблюдать следующие ограничения для входящих данных:

- данные ПЦР-теста, проведенного согласно протоколу анализа образца настоящей инструкции;
- данные получены на приборах:
 - «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями» исполнения: C1000 Touch, в комплекте с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96), производитель: «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США. РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016;
 - «Прибор для количественного обнаружения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с принадлежностями», вариант исполнения 7500, производитель: «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд», Сингапур. РУ: РЗН 2016/3932 от 06.04.2016.
- данные экспортированы в файл *.txt в формате Текст с помощью:
 - «Программа CFX менеджер (CFX Manager Software)», производитель: «Bio-Rad Laboratories, Inc.» США. РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016;
 - «Программное обеспечение для 7500 (SDS v1.4) (каталожный номер 4374432)» производитель: «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд», Сингапур. РУ: РЗН 2016/3932 от 06.04.2016.
- данные представлены файлом данных ПЦР-теста в формате Текст (файл *.txt).

26.2 Требования к составу данных

Анализируемый файл с данными должен содержать обязательные поля и соответствующие форматы значений:

Поле	Формат значения / Допустимые значения	Описание
Лунка (Well)	<Ахх>* * «А» – латинская буква от «А» до «Н» «хх» – двузначное число от 01 до 12	Лунка. Наименование лунки на плашке при проведении ПЦР-РВ
Флуорофор (Fluorophore/ Reporter)	«FAM» / «VIC»	Канал, по которому развивается сигнал накопления продукта амплификации ПЦР
Имя мишени (Target Name)	«EGFR ex18 G719X» или «ex18 G719X», или «ex18» / «EGFR ex19 delX» или «ex19 delX», или «ex19» / «EGFR ex20 T790M» или «ex20 T790M», или «T790M» / «EGFR ex20 S768I» или «ex20 S768I», или «S768I» / «EGFR ex20 C797X» или «ex20 C797X», или «C797X» / «EGFR ex20 ins» или «ex20 ins», или «ins» / «EGFR ex21 L858R» или «ex21 L858R», или «L858R» / «EGFR ex21 L861Q» или «ex21 L861Q», или «L861Q» / «0 EGFR» / «KRAS c.12, 13» или «KRAS ex2» / или «KRAS c.59, 61» или «KRAS ex3» / «KRAS c.117» или «KRAS ex4 117» / «KRAS c.146» или «KRAS ex4 146» / «NRAS c.12, 13» или «NRAS ex2» / «NRAS c.59, 61» или «NRAS ex3» / «NRAS c.117» или «NRAS ex4 117» / «NRAS c.146», или «NRAS ex4 146» / «BRAF c.600» или «BRAF», или «c.600» / «0 FullRAS» или «0 FR» / «IPC»	Имя мишени
Имя пробы (Sample Name)	«NTC» / «PK0» / <Ах- _>* * Допустимо использование комбинации из латинских букв, цифр, дефисов, нижних подчеркиваний. Общее количество знаков не более 15	Имя пробы
Сq / Ст	<х.х>* * Число, целая и дробная часть которого разделены точкой, количество знаков variabelно	Значение Сq / Ст

26.3 Требования к данным по контрольным образцам

Анализ исследуемых образцов возможен, только если контрольные образцы прошли контроль качества:

Контрольный образец	Результат контроля
РКО	КП*
НТС	КП*

*КП – контроль пройден

26.4 Интегрируемость

Программное обеспечение «ПО Инсайдер», версия 1.1 является самостоятельным программным продуктом и не может быть интегрировано в другие программные продукты или информационные системы.

26.5 Требования к техническим и программным средствам

Минимальные требования к техническим и программным средствам:

Элемент	Параметр
Операционная система	Windows 7, 8, 10 (32 или 64 бит)
Вспомогательное программное обеспечение	«Adobe Reader» версии 9.0
Процессор	Intel® Corei3 с частотой 1,4 ГГц
Оперативная память	1 Гбайт
Разрешение экрана	1024x768 пикселей
Свободное место на жестком диске	1 Гбайт
Видеокарта	VGA с разрешением 1024x768 пикселей
Интерфейс для подключения USB-флеш-накопителя (носитель ПО)	USB 2.0

26.6 Защита данных

В программе не предусмотрена защита личной информации пациентов, так как ПО не предусматривает использование личной информации пациентов.

26.7 Интернет, запросы

Программа не обрабатывает языковые запросы и не работает в пакетном режиме. Программа не требует подключения к сети Интернет.

27. Ввод в действие и работа с программным обеспечением

27.1 Ввод в действие

Программное обеспечение «ПО Инсайдер», версия 1.1 не требует специальной процедуры установки на компьютер (инсталляции). Перед запуском ПО файл «Insider.exe» переписать с носителя на жесткий диск компьютера в папку, созданную для хранения данных, полученных в результате ПЦР-теста, и размещения программного обеспечения.

27.2 Запуск ПО

Перейти в папку, куда был записан исполняемый файл ПО, запустить ПО «Insider.exe».

27.3 Работа с ПО

Работа с программным обеспечением «ПО Инсайдер», версия 1.1 изложена в п 15. «Анализ данных» данной инструкции по применению.

28. Сообщения об ошибках

№ п/п	Сообщение об ошибке	Причина ошибки
1	Ошибка чтения и/или разбора файла данных. Неверный формат файла данных.	Формат файла данных ПЦР не соответствует формату Текст (файл *.txt).
2	Неверно экспортированы данные или неверный формат файла. Отсутствуют данные по одному или нескольким обязательным полям: «Лунка» (Well), «Флуорофор» (Fluorophore/Reporter), «Имя мишени» (Target Name), «Имя пробы» (Sample Name), «Cq»/«Ст».	В файле данных ПЦР отсутствуют требуемые элементы данных («Лунка» (Well), «Флуорофор» (Fluorophore/Reporter), «Имя мишени» (Target Name), «Имя пробы» (Sample Name), «Cq»/«Ст»).
3	Ошибка чтения и/или разбора файла данных. Неверно экспортированы данные, повторить экспорт согласно инструкции по применению.	Не удалось интерпретировать элемент данных в файле данных ПЦР (значение элемента данных не соответствует допустимому значению или формату значения).
4	Данные об анализируемых образцах внесены некорректно: укажите каналы флуоресценции FAM и VIC в ПЦР-файле согласно инструкции по применению.	В файле данных ПЦР не выбран один из каналов флуоресценции.
5	Данные об анализируемых образцах внесены некорректно: внесите названия Мишеней в ПЦР-файле в поле «Имя мишени» (Target Name) согласно инструкции по применению.	В файле данных ПЦР отсутствуют данные в поле «Имя мишени» (Target Name) по каналам флуоресценции FAM и/или VIC.

№ п/п	Сообщение об ошибке	Причина ошибки
6	Данные об анализируемых образцах внесены некорректно: в поле «Имя мишени» (Target Name) не указано название Мишени <O EGFR> и/или <O FullRAS>, и/или <по анализируемому участку ДНК гена EGFR>, и/или <по анализируемому участку ДНК генов KRAS, NRAS, BRAF>.	В файле данных ПЦР отсутствуют данные в поле «Имя мишени» (Target Name), не указано название Мишени «O» или анализируемых участков ДНК.
7	Данные об анализируемых образцах внесены некорректно: в поле «Имя мишени» (Target Name) указано <Мишень> по одному из каналов. Внесите названия Мишеней в ПЦР-файле согласно инструкции по применению.	В файле данных ПЦР неверно внесены данные в поле «Имя мишени» (Target Name).
8	Данные об анализируемых образцах внесены некорректно: в поле «Имя мишени» (Target Name) для Мишени <NAME> выбран неверный канал флуоресценции. Внесите названия Мишеней в ПЦР-файле согласно инструкции по применению.	В файле данных ПЦР данные в поле «Имя мишени» (Target Name) перепутаны: по каналу FAM внесено значение «IPC», по каналу VIC внесены значения «O EGFR» или «O FullRAS», или названия анализируемых участков ДНК.
9	Данные об анализируемых образцах внесены некорректно: для Мишени <NAME> внесите названия анализируемых образцов в ПЦР-файле в поле «Имя пробы» (Sample Name) согласно инструкции по применению. Анализ исследуемых образцов по Мишени <NAME> невозможен.	В файле данных ПЦР отсутствуют данные в поле «Имя пробы» (Sample Name).
10	Данные о контрольном образце <NTC и/или РКО> внесены некорректно: внесите названия контрольных образцов в ПЦР-файле в поле «Имя пробы» (Sample Name) по Мишени <NAME> согласно инструкции по применению. Анализ исследуемых образцов по Мишени <NAME> невозможен.	В файле данных ПЦР отсутствуют данные в поле «Имя пробы» (Sample Name) по контрольным образцам NTC и/или РКО (для одной или нескольких Мишеней).
11	По Мишени <NAME> отсутствуют данные об исследуемом образце. Образец <NAME> проанализировать нельзя.	В файле данных ПЦР отсутствуют данные об исследуемом образце по Мишени «O» или по одному из анализируемых участков ДНК.
12	Контроль качества по Мишени <NAME> не пройден: контрольный образец <NTC и/или РКО> не соответствует норме по Мишени «IPC». Анализ исследуемых образцов по Мишени <NAME> невозможен.	Значения «Cq»/«Ст» контрольных образцов NTC и/или РКО по каналу VIC не соответствуют норме.
13	Контроль качества по Мишени <NAME> не пройден: отсутствуют повторы контрольных образцов <NTC и/или РКО>. Анализ исследуемых образцов по Мишени <NAME> невозможен.	В файле данных ПЦР отсутствуют повторы контрольных образцов NTC и/или РКО.

№ п/п	Сообщение об ошибке	Причина ошибки
14	Контрольный образец <NTC и/или PКО> не соответствует норме по Мишени <NAME>. Анализ исследуемых образцов по Мишени <NAME> невозможен.	Значения «Cq»/«Ст» контрольных образцов NTC и/или PКО по каналу FAM не соответствуют норме.
15	Контроль качества по Мишени <NAME> не пройден: исследуемый образец <NAME> не соответствует норме по Мишени «IPC». Допущена ошибка в разведении исследуемого образца или выполнении протокола. Анализ исследуемого образца <NAME> по Мишени <NAME> невозможен.	Значения «Cq»/«Ст» исследуемых образцов по каналу VIC не соответствуют норме.
16	Исследуемый образец <NAME> не соответствует норме по Мишени <O EGFR> и/или <O FullRAS>. Допущена ошибка в разведении исследуемого образца или выполнении протокола. Анализ исследуемого образца <NAME> по Мишени <NAME> невозможен.	Значения «Cq»/«Ст» исследуемых образцов по каналу FAM по Мишени «O EGFR» и/или «O FullRAS» не соответствуют норме.
17	Не заполнены поля «Оператор» и/или «Дата проведения исследования».	Поля «Дата проведения исследования» и «Оператор» не заполнены и запрошен вывод результатов.
18	Неверный формат поля «Дата проведения исследования». Введите дату в формате «ГГГГ-ММ-ДД».	Поле «Дата проведения исследования» заполнено неверно.
19	Не прошел контроль качества ПЦР или не анализировались данные. Вывести результаты невозможно.	Исследование не проводилось (не загружался файл данных ПЦР) или не пройден контроль качества ПЦР и запрошен вывод результатов.

Приложение 2

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории

Основные принципы работы в ПЦР-лаборатории

- Однонаправленность потока персонала и материалов.
- Технологическая одежда должна быть строго индивидуальна.
- Всегда использовать перчатки. Не прикасаться к поверхностям, оборудованию, ручкам дверей, холодильников и т.д. без перчаток.
- Не перемещать при работе, уборке помещений оборудование даже в пределах одной зоны.
- Не выходить за пределы зоны в технологической одежде.
- Маркировать используемые реактивы.
- Хранить используемые реактивы (вскрытые наборы реагентов) отдельно от не использовавшихся.
- Хранить материалы, содержащие ДНК отдельно от реактивов, использующихся для приготовления реакционной смеси.
- Выделение ДНК, приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
- При работе с дозаторами использовать наконечники с фильтром. Для каждой операции менять наконечник.
- Для хранения дозаторов использовать специальную стойку.
- После перемещения пробирок всегда осаждать капли со стенок на мини-центрифуге. Избегать касания внутренней поверхности пробирок и крышек наконечником.
- Перед и после работы проверить исправность оборудования, убрать рабочее место. Для уборки ПЦР-бокса в т.ч. использовать ультрафиолет.
- После работы утилизировать использованные материалы – наконечники, пробирки и т.д. согласно регламенту лаборатории.
- Пробирки с ПЦР-продуктом не открывать в зоне №4. Для утилизации пробирок с ПЦР-продуктом в зоне №4 поместить пробирки в пакет, пакет закрыть, утилизировать.

Зонирование.

ПЦР-лаборатория для ПЦР-РВ должна включать минимальный набор рабочих зон:

- Зона №1 – для работы с геномной ДНК (выделение ДНК, подготовка образцов)
- Зона №2 – для приготовления реакционных смесей (изолирована от источника ДНК)
- Зона №3 – для внесения ДНК в реакционную смесь
- Зона №4 – для проведения ПЦР (место нахождения амплификаторов)

При необходимости возможно размещение зон №2 и №3 в одном помещении при соблюдении разделения процессов приготовления реакционных смесей и внесения ДНК в разных ПЦР-боксах.

Для работы с большим потоком биологического материала следует создать дополнительную зону № 1а для его приемки, регистрации, разбора, первичной обработки.

Для работы с ПЦР-продуктом необходимо создать дополнительную зону №5 – для манипуляций с ПЦР-продуктом (электрофорез, подготовка образцов перед секвенированием).

Перед каждой зоной должен быть оборудован санпропускник – для смены одежды на технологическую, хранения уборочного инвентаря.

Направление потока материалов и персонала.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока материалов. В зону №2 не должны попадать материалы из других зон. Для других зон действует принцип: материалы, побывавшие в зонах с большим номером, не должны перемещаться в обратном направлении. Под материалами следует понимать: пробирки, штативы, пакеты, документы и т.п.

В ПЦР-лаборатории должна соблюдаться однонаправленность потока персонала, в т.ч. обслуживающего персонала. Люди, побывавшие в зонах с большим номером, могут перемещаться в обратном направлении только при соблюдении порядка подготовки персонала к работе (мытьё рук, смена комплекта одежды и т.д.). При работе в зоне №5 следует планировать рабочий процесс так, чтобы в этот день не возвращаться в другие зоны. Все находящиеся в лаборатории должны в каждой зоне менять одежду на технологическую: обувь, халат, шапочка, маска, перчатки, нарукавники. Технологическая одежда строго не должна перемещаться между зонами.

Размещение оборудования и уборочного инвентаря.

Каждая зона должна быть снабжена необходимым оборудованием и расходными материалами. Оборудование не должно перемещаться из одной зоны в другую и внутри зоны между рабочими местами. Минимальный список стационарного оборудования в зонах ПЦР-лаборатории:

- Зона №1а – центрифуга, штативы, вортекс, комплект дозаторов, комплект инструментов для работы с материалом, место для хранения материала;
- Зона №1 – ПЦР-бокс для выделения ДНК, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, термостат, штативы, морозильная камера, холодильная камера;
- Зона №2 – ПЦР-бокс для подготовки реакционной смеси, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №3 – ПЦР-бокс для внесения ДНК в пробирки для ПЦР, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, термостат, морозильная камера, холодильная камера, штативы;
- Зона №4 – амплификатор, центрифуга с ротором для стрипов и плашек;
- Зона №5 – ПЦР-бокс для работы с ПЦР-продуктом, комплект дозаторов, вортекс, миницентрифуга, центрифуга, штативы, прибор для проведения электрофореза, лабораторные весы, микроволновая печь, морозильная камера, холодильная камера.

Каждая зона должна быть снабжена индивидуальным уборочным инвентарем – ведро для мытья пола, швабра, тряпка для мытья пола, емкость и тряпки для мытья рабочих поверхностей, дезинфицирующие хлор- или перекись-содержащие средства. Уборочный инвентарь не должен перемещаться из одной зоны в другую.

Литература

1. Yun C.-H. et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell*. 2007. 11(3): 217–227.
2. Mosesson Y., Yarden Y. Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Semin Cancer Biol*. 2004. 14(4): 262–270.
3. Woodburn J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 82 (2-3): 241–250.
4. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. // *Nat. Rev. Cancer*. 2003. Vol. 3, № 1. P. 11–22.
5. Simanshu D.K., Nissley D. V., McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease // *Cell*. 2017. Vol. 170, № 1. P. 17–33.
6. Dankner M. et al. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. // *Oncogene*. 2018. Vol. 37, № 24. P. 3183–3199.
7. Wan P.T.C. et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signalling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. // *Cell*. 2004. Vol. 116, № 6. P. 855–867.
8. Mitsudomi T., Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer // *FEBS J*. 2010. Vol. 277, № 2. P. 301–308.
9. Pao W. et al. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain // *PLoS Med.* / ed. Liu E.T. 2005. Vol. 2, № 3. P. e73.
10. Inukai M. et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. // *Cancer Res*. 2006. Vol. 66, № 16. P. 7854–7858.
11. Arcila M.E. et al. Rebiopsy of Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Enhanced Detection of the T790M Mutation Using a Locked Nucleic Acid-Based Assay // *Clin. Cancer Res*. 2011. Vol. 17, № 5. P. 1169–1180.
12. Costa D.B. Kinase inhibitor-responsive genotypes in EGFR mutated lung adenocarcinomas: moving past common point mutations or indels into uncommon kinase domain duplications and rearrangements // *Transl. Lung Cancer Res*. 2016. Vol. 5, № 3. P. 331–337.
13. Thress K.S. et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. // *Nat. Med*. 2015. Vol. 21, № 6. P. 560–562.
14. Imperial R. et al. Comprehensive pancancer genomic analysis reveals (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key dysregulated pathway in cancer: Its clinical implications. // *Semin. Cancer Biol*. 2017.
15. Kodaz H. Frequency of RAS Mutations (KRAS, NRAS, HRAS) in Human Solid Cancer // *Eurasian J. Med. Oncol*. 2017.

16. Tao L. et al. Prognostic significance of K-ras mutations in pancreatic cancer: a meta-analysis // World J. Surg. Oncol. 2016. Vol. 14, № 1. P. 146.
17. Клинические рекомендации. Злокачественное новообразование бронхов и легкого.
URL: http://cr.rosminzdrav.ru/recomend/30_3
18. Клинические рекомендации. Меланома кожи и слизистых оболочек.
URL: http://cr.rosminzdrav.ru/recomend/546_1
19. Клинические рекомендации. Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела.
URL: http://cr.rosminzdrav.ru/recomend/396_1
20. Клинические рекомендации. Рак прямой кишки.
URL: http://cr.rosminzdrav.ru/recomend/554_2

Графические символы

	Только для диагностики <i>in vitro</i>
	Знак Общего количества тестов <i>in vitro</i> , которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе реагентов
	Номер по каталогу
	Номер серии набора реагентов
	Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать для приготовления реакционной смеси
	Изготовитель
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число
	Температурный диапазон
	Осторожно. Вредные для здоровья аллергические (раздражающие) вещества
	Токсично при проглатывании
	Опасно для здоровья
	Весьма токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями

Эта страница намеренно оставлена пустой

Техническая поддержка: md-support@nomotech.ru

Изготовитель:

Общество с ограниченной ответственностью
«Новые Молекулярные Технологии» (ООО «НОМОТЕК»)

Фирменное наименование:



г. Москва, 119421

Ленинский проспект, д. 111, корп. 1, пом. 34, эт. 3

Тел.: +7 (495) 988-4083

www.nomotech.ru

I0027