ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
EGFR

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин

«02» марта 2021 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

С.П. Левичев

«02» марта 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения соматических мутаций в гене EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (EGFR)

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ООО «ДНК-Технология ТС»
САМАРИН
ПОДПИСЬ

2021 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
НИОКР	- научно-исследовательские и опытно- конструкторские работы
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
EGFR	- рецептор эпидермального фактора роста

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВВЕДЕНИЕ

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – это один из рецепторов, активация которого приводит к запуску сигнального пути EGFR-RAS-RAF-MEK-MAPK, вовлеченного в процессы пролиферации, апоптоза и ангиогенеза. Активирующие соматические мутации в гене EGFR могут привести к неконтролируемому делению и выживанию онкотрансформированных клеток.

Соматические мутации в гене EGFR характерны для немелкоклеточного рака легкого [1,2]. Чаще всего мутации возникают в 18-21 экзонах, кодирующих участок киназного домена рецептора. Приблизительно 90% активирующих мутаций составляют делеции в 19 экзоне и замена тимина на гуанин в 21 экзоне (L858R) [2].

Наличие активирующих мутаций является показанием для назначения таргетной противоопухолевой терапии ингибиторами EGFR-тирозинкиназы 1 (гефитиниб, эрлотиниб) или 2 поколения (афатиниб) [3].

Мутация T790M редко обнаруживается в первичных опухолях и чаще (41-62% случаев) возникает, как вторичная, при раке легкого у пациентов с активирующими мутациями в гене EGFR при развитии резистентности к гефитинибу [4]. Это диктует необходимость перехода на ингибиторы EGFR-тирозинкиназы следующего 3 поколения: осимертиниб.

Частота встречаемости других мутаций в гене EGFR, связанных с разной чувствительностью к таргетной терапии, ниже и составляет от 1% до 5%: L861Q, S768I, G719X, инсерции в 20 экзоне, и менее 1% - инсерции в 19 экзоне [5].

Для выбора специфичного, таргетного ингибитора тирозинкиназы (ИТК) необходимо определение соответствующих мутаций в гене EGFR.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Список литературы

1. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Гагарин И.М., Чуев Ю.В., Мочальникова В.В. Коломейцева А.А., Горбунова В.А. Мутации EGFR и KRAS, важные для таргетной терапии немелкоклеточного рака легкого. Молекулярная медицина. 2013; 6:55-59.

2. Водолажский Д.И., Кит О.И., Максимов А.Ю., Антонец А.В., Двадненко К.В., Владимирова Л.Ю., Лейман И.А., Лазутин Ю.Н. Связь мутаций гена EGFR с клинико-патологическими особенностями аденокарциномы легкого у пациентов юга России. Клиническая медицина. 2014; 7:57-62.

3. Marks J.L., Broderick S., Zhou Q., Chitale D., Li A.R., Zakowski M.F., Kris M.G., Rusch V.W., Azzoli C.G., Seshan V.E., Ladanyi M., Pao W. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol. 2008 Feb;3(2):111-6.

4. Russo A., Franchina T., Ricciardi G.R.R., Smiroldo V., Picciotto M., Zanghì M., Rolfo C., Adamo V. Third generation EGFR TKIs in EGFR-mutated NSCLC: Where are we now and where are we going. Crit Rev Oncol Hematol. 2017 Sep; 117:38-47.

5. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. Review. Cancer Sci. 2016 Sep;107(9):1179-86.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора:** Набор реагентов для определения соматических мутаций в гене EGFR методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (EGFR), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 **Назначение:** Набор реагентов предназначен для определения соматических мутаций в гене EGFR (делеций и инсерций в 19 экзоне, инсерций в 20 экзоне, мутаций L858R, T790M, L861Q, S768I и G719X) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в препаратах ДНК, полученных из фиксированных в формалине парафинизированных образцов опухолей больных немелкоклеточным раком легкого с целью отбора пациентов для назначения таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы.

Вариант исполнения EGFR 8 предназначен для определения всех указанных мутаций, вариант исполнения EGFR 4 является сокращённым вариантом исполнения и предназначен для определения делеций и инсерций в 19 экзоне, мутаций L858R, T790M.

1.3 **Функциональное назначение:** сопутствующая диагностика.

1.4 **Показания к проведению анализа:** необходимость подбора препаратов для таргетной терапии опухолей больным немелкоклеточным раком лёгкого. Противопоказаний к применению нет.

1.5 **Демографические и популяционные аспекты:** применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6 **Область применения:** Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

1.7 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

Набор реагентов EGFR выпускается в двух вариантах исполнения: EGFR 4 и EGFR 8.

Набор реагентов в варианте исполнения EGFR 8 позволяет выявить делеции и инсерции в 19 экзоне, инсерции в 20 экзоне, мутации L858R, T790M, L861Q, S768I и G719X;

Набор реагентов в варианте исполнения EGFR 4 позволяет выявить делеции и инсерции в 19 экзоне, мутации L858R, T790M.

REF R1-H806-S3/4, EGFR 4, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		
REF R1-H806-UA/4, EGFR 4, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации EGFR - 4.1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	300 мкл
Смесь для амплификации EGFR - 4.2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	300 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

REF R1-H807-S3/4, EGFR 8, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

REF R1-H807-UA/4, EGFR 8, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации EGFR – 8.1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	300 мкл
Смесь для амплификации EGFR – 8.2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	300 мкл
Смесь для амплификации EGFR – 8.3	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	300 мкл
Смесь для амплификации EGFR – 8.4	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	300 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	60 мкл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан на 48 определений, включая отрицательные и положительные контроли.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.3 Принцип действия набора реагентов

Метод: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с полуколичественным определением доли мутантных аллелей.

Принцип метода основан на использовании технологии аллель-специфичной амплификации ДНК, заключающейся в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. «Горячий» старт для фасовки S обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина. «Горячий» старт для фасовки U обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами. Активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94°С в течение 5 минут. Это исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для проведения ПЦР введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов, а, следовательно, и уровень флуоресценции пропорциональны количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряются на каждом цикле амплификации в режиме реального времени. Для анализа продуктов ПЦР используют детектирующий амплификатор.

Условия реакции и используемые олигонуклеотиды подобраны таким образом, чтобы наиболее эффективно обеспечить амплификацию на матрице мутантного аллеля. Значение порогового цикла Ср на матрице мутантного аллеля значительно опережает фоновую амплификацию на матрице нормального аллеля дикого типа – не менее 6-9 циклов в зависимости от количества матрицы.

Помимо аллель-специфичных олигонуклеотидов к мутантным аллелям гена EGFR в пробирки со смесями для амплификации добавлены праймеры и ДНК-зонды для определения фрагмента ДНК 5 экзона гена EGFR (КВМ), который используется для контроля прохождения полимеразной цепной реакции, а также для определения и полуколичественной оценки доли мутантных аллелей. Для определения мутации используется показатель разницы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

индикаторных циклов мутантного аллеля и КВМ (dCp): значение dCp менее 6-9 циклов в зависимости от значения КВМ свидетельствует о наличии мутации.

ДНК-зонды для детекции продуктов амплификации ДНК мутантных аллелей гена EGFR помечены флуоресцентными метками Fam, Hex и Rox, а для детекции фрагмента ДНК 5 экзона гена EGFR (КВМ) - Cy5. Использование нескольких каналов детекции позволяет определять несколько показателей в одной пробирке и сократить количество материала, необходимого для проведения исследования.

В определенную пробирку набора реагентов добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в планшете. После прохождения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора о несоответствии.

Для оценки валидности полученных результатов учитывают показатель контроля взятия материала (КВМ).

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка смесей для амплификации.

Таблица 1 – Характеристика смесей для амплификации: соответствие каналов детекции выявляемым мутациям и цветовая кодировка смесей для амплификации.

EGFR 4, Фасовка S					
№ пробирки стрипа со смесями для амплификации, запечатанными парафином	Канал детекции				Цвет смеси/парафина
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой/Белый
2	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный /Белый
3	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой/Белый
4	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный /Белый
5	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой/Белый
6	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный /Белый
7	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой/Белый
8	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный /Белый

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

EGFR 4, Фасовка U					
Пробирка со смесью для амплификации	Канал детекции				Цвет смеси
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
EGFR-4.1	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой
EGFR-4.2	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный

EGFR 8, , Фасовка S					
№ пробирки стрипа со смесями для амплификации, запечатанными парафином	Канал детекции				Цвет смеси/парафина
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой/Белый
2	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный /Белый
3	G719X	Ins20ex	-	КВМ	Бесцветный /Белый
4	L861Q	S768I	-	КВМ	Бесцветный /Белый
5	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой/Белый
6	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный /Белый
7	G719X	Ins20ex	-	КВМ	Бесцветный /Белый
8	L861Q	S768I	-	КВМ	Бесцветный /Белый

EGFR 8, , Фасовка U					
Пробирка со смесью для амплификации	Канал детекции				Цвет смеси
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
EGFR-8.1	T790M	L858R	маркер	КВМ	Голубой
EGFR-8.2	Del19ex, Ins19ex	-	Ins19ex	КВМ	Бесцветный
EGFR-8.3	G719X	Ins20ex	-	КВМ	Бесцветный
EGFR-8.4	L861Q	S768I	-	КВМ	Бесцветный

Дискриминация между делецией и инсерцией в 19 экзоне осуществляется с учетом сигнала по каналу Rox: при наличии сигнала по каналу Fam (Del19ex, Ins19ex) и отсутствии сигнала по каналу Rox (Ins19ex) делают заключение о делеции в 19 экзоне, при наличии сигнала по каналу Fam (Del19ex, Ins19ex) и наличии сигнала по каналу Rox (Ins19ex) делают заключение об инсерции в 19 экзоне.

Del19ex, Ins19ex	Ins19ex	Заключение
мутация	мутация	Инсерция в 19 экзоне
мутация	норма	Делеция в 19 экзоне
норма	норма	норма

Алгоритм анализа и интерпретации результатов представлен в Приложении А к данной инструкции.

2.4 Время проведения анализа – от 2 ч (без учёта пробоподготовки).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Специфичность анализа

В таблице 2 приведен перечень мутаций гена EGFR, выявляемых с помощью набора реагентов EGFR.

Таблица 2.1 – Перечень мутаций гена EGFR, выявляемых с помощью набора реагентов

Мутация	Экзон	Нуклеотидные замены, делеции и инсерции NM_005228.5	Cosmic ID или ClinVar RCV Id
p.T790M	20	c.2369C>T	COSM6240
p.L858R	21	c.2573T>G	COSM6224
		c.2573_2574delinsGT	COSM12429
Делеции в 19 экзоне del2235-2258 (без дифференцировки)			
p.L747_T751delinsS	19	c.2240_2251del	COSM6210
p.L747_E749del		c.2239_2247del	COSM6218
p.E746_S752delinsD		c.2238_2255del	COSM6220
p.E746_A750del		c.2235_2249del	COSM6223
p.E746_A750del		c.2236_2250del	COSM6225
p.L747_S752del		c.2239_2256del	COSM6255
p.E746_S752delinsA		c.2237_2254del	COSM12367
p.L747_T751del		c.2240_2254del	COSM12369
p.L747_P753delinsS		c.2240_2257del	COSM12370
p.L747_A750delinsP		c.2239_2248delinsC	COSM12382
p.L747_T751delinsP		c.2239_2251delinsC	COSM12383
p.E746_S752delinsV		c.2237_2255delinsT	COSM12384
p.E746_S752delinsI		c.2235_2255delinsAAT	COSM12385
p.E746_T751delinsV		c.2237_2252delinsT	COSM12386
p.L747_P753delinsQ		c.2239_2258delinsCA	COSM12387
p.L747_S752delinsQ		c.2239_2256delinsCAA	COSM12403
p.E746_T751delinsVA		c.2237_2253delinsTTGCT	COSM12416
p.L747_T751delinsQ		c.2238_2252delinsGCA	COSM12419
p.L747_A750delinsP		c.2238_2248delinsGC	COSM12422
p.E746_T751delinsA		c.2237_2251del	COSM12678
p.E746_T751del		c.2236_2253del	COSM12728
p.E746_A750delinsIP		c.2235_2248delinsAATTC	COSM13550
p.E746_T751delinsI		c.2235_2252delinsAAT	COSM13551
p.E746_T751delinsIP		c.2235_2251delinsAATTC	COSM13552
p.E746_A750delinsAP		c.2237_2248delinsCAC c.2237_2248delinsCCC	COSM144207 RCV000150618
p.E746_T751delinsVP		c.2237_2251delinsTTC	COSM18421
p.E746_S752delinsV		c.2237_2256delinsTC	COSM18426
p.E746_P753delinsVS		c.2237_2257delinsTCT	COSM18427
p.L747_T751delinsP		c.2238_2251delinsGC	COSM22944
p.K745_E749del		c.2233_2247del	COSM26038
p.E746_T751delinsI		c.2236_2252delinsAT	COSM26680
p.L747_A750delinsS		c.2240_2248del	COSM4170221
p.L747_E749del		c.2235_2243del	RCV000154252
p.L747_P753delinsT		c.2239_2257delinsA	RCV000154456

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Мутация	Экзон	Нуклеотидные замены, делеции и инсерции NM_005228.5	Cosmic ID или ClinVar RCV Id
p.L747_P753delinsQS		c.2239_2257delinsCAAT	RCV000154485
p.E746_E749delinsA		c.2237_2246delinsC	RCV000155025
Инсерции в 19 экзоне (без дифференцировки)			
p.I744_K745insKIPVAI	19	c.2214_2231dup	COSM53176
		c.2215_2232dup	
p.K745_E746insIPVAIK		c.2217_2234dup	нет данных
p.K745_E746insVPVAIK		c.2219_2236	нет данных
p.K745_E746insTPVAIK		c. 2234_2235ins AACTCCCGTCGCTATCAA	COSM53172
p.G719X (без дифференцировки)			
p.G719A	18	c.2156G>C	COSM6239
p.G719S		c.2155G>A	COSM6252
p.G719C		c.2155G>T	COSM6253
p.S768I	20	c.2303G>T	COSM6241
p.L861Q	21	c.2582T>A	COSM6213
Инсерции в 20 экзоне (без дифференцировки)			
p.A767_V769dup	20	c.2300_2308(dup)	COSM12376
p.H773dup		c.2317_2319dup	COSM12377
p.D770_N771insG		c.2310_2311insGGT	COSM12378

Таблица 2.2 – Перечень выявляемых мутаций в зависимости от варианта исполнения:

Выявляемая мутация в гене EGFR	Вариант исполнения EGFR 8	Вариант исполнения EGFR 4
T790M	v	v
L858R (без дифференцировки)	v	v
Инсерции в 19 экзоне (без дифференцировки)	v	v
Делеции в 19 экзоне (без дифференцировки)	v	v
G719X (без дифференцировки)	v	-
Инсерции в 20 экзоне (без дифференцировки)	v	-
L861Q	v	-
S768I	v	-

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК мутантного аллеля гена EGFR, после завершения реакции амплификации программное обеспечение для детектирующих амплификаторов определяет индикаторные циклы (Ср).

Для мутаций T790M, L858R, G719X, S768I, L861Q и инсерций в 20 экзоне возможна фоновая амплификация на матрице нормального аллеля. Поэтому при определении мутации учитывают не только наличие амплификации (Ср), но и разницу индикаторных циклов мутантного аллеля и КВМ (dCp): значение dCp менее 6-9 циклов в зависимости от значения Ср КВМ свидетельствует о наличии мутации (табл.3).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В связи с погрешностью метода ПЦР предусмотрено наличие «серой зоны» для показателя dCp: статус мутации не определен, результат выдается, как не достоверный.

При значении dCp за пределами «серой зоны» (более 6,5-9,5 циклов в зависимости от значения КВМ) результат выдается, как норма.

Алгоритмы определения статуса аллелей и полуколичественной оценки доли мутантных аллелей на основании значений индикаторных циклов (Ср) приведены в Приложении А.

Таблица 3 – Пороговые значения dCp мутантный аллель/КВМ для определения мутации

Мутация	Пороговое значение dCp для определения мутации		
	CpKBM≤28 (фасовка S) CpKBM ≤27 (фасовка U)	28< CpKBM ≤31,5 (фасовка S) 27< CpKBM ≤30,5 (фасовка U)	31,5 < CpKBM ≤34 (фасовка S) 30,5 < CpKBM ≤33 (фасовка U)
T790M	dCp < 9	dCp < 7	dCp < 6
L858R	dCp < 9	dCp < 7	dCp < 6
G719X	dCp < 9	dCp < 7	dCp < 6
S768I	dCp < 9	dCp < 7	dCp < 6
L861Q	dCp < 9	dCp < 7	dCp < 6
Ins20ex	dCp < 9	dCp < 7	dCp < 6

3.2 Влияние близкородственных генов

Было показано, что наличие ДНК близкородственных генов семейства тирозиновых киназ рецепторов эпидермального фактора роста, в частности ERBB2/HER2, ERBB3/HER3, ERBB4/HER4, не влияет на результаты исследования с использованием набора реагентов. Олигонуклеотиды, используемые в наборе, подобраны таким образом, чтобы исключить амплификацию на матрице близкородственных генов. В ходе исследования образцов геномной ДНК из крови 50 условно-здоровых пациентов (отрицательные контрольные образцы) ложно-положительные результаты не получены.

3.3 Влияние легочной микробиоты

Добавление культур клеток микроорганизмов, которые могут присутствовать в легочной ткани, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae в концентрации 10^6 КОЕ/мл к образцам, содержащим аллели мутантного и дикого типа на стадии выделения ДНК не повлияло на результаты исследования с использованием набора реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.4 Чувствительность анализа

Предел обнаружения доли мутантного аллеля определяется, как минимальное количество мутантного аллеля в пуле аллелей (дикий тип и мутация), определение которого возможно с воспроизводимостью 95% с трактовкой результата «мутация».

Предел обнаружения доли мутантного аллеля лимитирован количеством ДНК и составляет 0,3% (T790M, L858R, G719X, S768I, L861Q, инсерций в 20 экзоне) и 0,1% (делеций и инсерций в 19 экзоне) в образце при значении Ср КВМ ≤27-28 на канале детекции Cy5, 1% - при значении 27-28< Ср КВМ ≤30-31,5, 5% - при значении 30-31,5 < Ср КВМ ≤33-34 (табл.4).

Таблица 4 - Предел обнаружения доли мутантного аллеля в образце

Минимальное количество ДНК (копий пула аллелей на амплификационную пробирку)	10^4	10^3	200
Соответствующее значение Ср для КВМ			
Фасовка S	Ср≤28	28< Ср≤31,5	31,5 < Ср≤34
Фасовка U	Ср≤27	27< Ср≤30,5	30,5 < Ср≤33
Предел обнаружения доли мутантного аллеля в образце	0,1% 0,3% *	1%	5%

*0,1% для делеций и инсерций в 19 экзоне,

0,3% для мутаций T790M, L858R, G719X, S768I, L861Q, инсерций в 20 экзоне

При значении Ср КВМ больше 34 для фасовки S или больше 33 для фасовки U количество материала расценивается как недостаточное для корректного заключения, результат регистрируется как не валидный.

3.5 Диагностические характеристики

При проведении клинико-лабораторных испытаний набора реагентов EGFR получены следующие диагностические характеристики:

Аналит	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Количество исследованных образцов
Del19ex	100% (93,5-100)	99,2% (97,0-99,2)	179
Ins19ex	100% (65,7-100)	100% (97,1-100)	90
Ins20ex	100% (34,8-100)	99,2% (97,6-99,2)	124
L858R	100% (92,1-100)	99,3% (97,2-99,3)	179
T790M	83,3% (43,9-83,3)	100% (98,4-100)	158
L861Q	100% (22,7-100)	100% (98,7-100)	124
S768I	100% (22,7-100)	100% (98,7-100)	124
G719X	100% (47,3-100)	100% (98,2-100)	124
Итого	99,1% (95,6-100)	99,7% (99,3-99,8)	-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Диагностическая чувствительность испытываемого набора составляет 99,1% CI (95% доверительный интервал): 95,6%-100%.

Диагностическая специфичность составляет 99,7% CI (95% доверительный интервал): 99,3%-99,8%.

3.6 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (невалидных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является отсутствие амплификации КВМ по каналу Cy5 (Ср КВМ отсутствует).

К ингибиторам ПЦР, которые могут присутствовать в образце биоматериала, относится кровь, которая удаляется в ходе пробоподготовки.

По результатам анализа рисков ингибиторы ПЦР могут содержаться в образце ДНК, к ним относятся следующие вещества:

- гемоглобин, остаточные количества которого могут присутствовать в образце ДНК в результате неполного удаления примесей крови в ходе пробоподготовки,

- а также изопропиловый спирт и метилацетат, остаточные количества которых могут присутствовать в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца ДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца ДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца ДНК.

На результат исследования может оказать влияние наличие в образце большого количества здоровой и некротизированной ткани. В образцах должно присутствовать не менее 50% опухолевых клеток и не более 20 % некротизированной ткани (оба параметра оцениваются врачом патоморфологом при подготовке срезов при окраске гематоксилин-эозином).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.7 Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования определялась для вариантов исполнения EGFR 8, фасовки S и U набора реагентов, в экспериментах, выполненных в одной лаборатории разными операторами, на разных приборах, в различные дни путем тестирования положительных и отрицательных биологических образцов ДНК. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Воспроизводимость исследования

Тип образца	Повторяемость внутри постановки		Внутрилабораторная повторяемость между вариантами фасовки S и U	
	Количество	Совпадение результатов	Количество	Совпадение результатов
Делеции в 19 экзоне	8	8 из 8	14	14 из 14
L858R	4	4 из 4	6	6 из 6
Инсерции в 19 экзоне	3	3 из 3	4	4 из 4
Инсерции в 20 экзоне	1	1	1	1
T790M все в сочетании	1	1	4	4
L861Q	1	1	1	1
G719X	0	0	0	0
S768I	0	0	0	0
Норма	29	29 из 29	28	28 из 28
Итого	46	46 из 46 (100%)	54	54 из 54 (100%)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СП 1.3.2322-08.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер.

ВНИМАНИЕ! Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Содержание вредных веществ
Фасовка S	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ
Минеральное масло	Нет опасных веществ
Положительный контрольный образец	**Азид натрия менее 0,1%**
Фасовка U	
Смесь для амплификации	Нет опасных веществ
Полимераза ТехноТаq MAX	Нет опасных веществ
ПЦР-буфер	Нет опасных веществ
Минеральное масло	Нет опасных веществ
Положительный контрольный образец	**Азид натрия менее 0,1%**

В состав набора реагентов входят реагенты, которые содержат **азид натрия** – консервант, в концентрации менее 0,1 %, что является безопасным для конечного пользователя.

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуется следующее оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- детектирующий амплификатор «ДТпрайм» или «ДТлайт», ООО «НПО ДНК-Технология»,
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник (для фасовки U - с морозильной камерой);
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство;
- ini файл с параметрами анализа «EGFR.ini».

При работе с набором реагентов в фасовке U с использованием дозирующего устройства ДТстрим дополнительно требуется следующее оборудование и материалы:

- дозирующее устройство ДТстрим;
- герметизирующее устройство ДТпак;
- центрифуга для микропланшет ПЦР;
- полимерная термопленка для запечатывания микропланшет ПЦР;
- микропланшет ПЦР.

Для предобработки материала для исследования и выделения ДНК:

- бокс биологической безопасности II класса;
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 000 x g;
- термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичный,
  или термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 40 °С до 95 °С, и пробирки объёмом 1,5 мл с защёлкивающимися крышками, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- микроцентрифуга-вортекс;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- комплекты реагентов, предназначенные для выделения ДНК из образцов, фиксированных в формалине парафинизированных тканей (рекомендованы ПРОБА-ПК для предварительной обработки биоматериала и ПРОБА-НК-ПЛЮС для последующего выделения ДНК производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Для предобработки образцов фиксированных в формалине парафинизированных тканей дополнительно требуются*:

- де-лимонен (в зависимости от способа удаления парафина);
- 96% перегнанный этиловый спирт (в зависимости от способа удаления парафина).

* При использовании рекомендованных комплектов реагентов для предобработки биоматериала и выделения ДНК дополнительные реагенты не требуются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют образцы фиксированных в формалине парафинизированных тканей опухолей.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкциями к комплектам реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

Взятие образцов и требования к биоматериалу

Взятие материала осуществляется только врачом патоморфологом из очага опухоли. В образцах должно присутствовать не менее 50 % опухолевых клеток. Допускается присутствие в образце 10-20 % некротизированной ткани (оба параметра оцениваются врачом патоморфологом при подготовке срезов при окраске гематоксилин-эозином).

Фиксация в формалине должна осуществляться в течение 2 часов после получения материала. Время фиксации в формалине зависит от объема препарата и не должно превышать 48-72 часов. Более длительная фиксация приводит к деградации нуклеиновых кислот. При расчете времени фиксации биоматериала необходимо учитывать, что пропитка формалином 1 мм ткани осуществляется в течение 1 часа.

Для приготовления срезов используют одноразовое, острое лезвие микротома, отрезают 1-3 участка толщиной 5 мкн из предварительно обрезанного блока ткани, заключенной в парафин (приблизительная площадь среза до 0,5-1,5 $см^2$). Парафиновые срезы помещают в сухие пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл. Не следует превышать рекомендуемое количество ткани, т.к. избыток ткани, заключенной в парафин может снизить выход тотальной ДНК.

Хранят образцы при температуре от 18 °С до 25 °С. Транспортировать образцы до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 25 °С.

Выделение ДНК

Выделение ДНК из биологического материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты: ПРОБА-ПК для предварительной обработки биоматериала протеиназой К и ПРОБА-НК-ПЛЮС для последующего выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! При выделении ДНК из биоматериала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка и проведение ПЦР (фасовка S)

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации. При использовании набора реагентов строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов!

7.1.1 Промаркируйте необходимое количество стрипов или пробирок из стрипа: по 2 пробирки (комплектация EGFR4) или 4 (комплектация EGFR8) с запечатанной парафином смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца К+ и отрицательного контрольного образца К-

Пример: Необходимо проанализировать 4 образца.

В варианте исполнения EGFR4 необходимо промаркировать 8 пробирок для исследуемых образцов, две пробирки для «К-» и две пробирки для «К+». Общее количество пробирок – 12 или 1,5 стрипа.

В варианте исполнения EGFR8 необходимо промаркировать 16 пробирок для исследуемых образцов, четыре пробирки для «К-» и четыре пробирки для «К+». Общее количество пробирок – 24 или 3 стрипа.

7.1.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы, затем центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.1.3 Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

7.1.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов.

7.1.5 Встряхните пробирки с исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.6 Внесите в соответствующие стрипованные пробирки для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК В пробирки «К-», «К+» ДНК не вносится.

ВНИМАНИЕ! Для снижения рисков контаминации следует закрывать каждый стрип после внесения образцов. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.1.7 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца (п.6), прошедшего этап выделения ДНК в стрипованные пробирки, маркированные К-.

7.1.8 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипованные пробирки, маркированные К+.

7.1.9 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.1.10 Установите все стрипы в амплификатор детектирующий.

7.1.11 Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «EGFR_4s.ini» или «EGFR_8s.ini» в зависимости от используемой комплектации набора реагентов. При последующих постановках добавьте в протокол тест «EGFR_4s» или «EGFR_8s», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (объём реакционной смеси 35 мкл) и проведите ПЦР. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 6.

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТпрайм и ДТлайт.

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерения
		мин	с		
1	80,0	00	30	1	
	94,0	01	30		
3	94,0	00	30	20	
	71,1 инкремент по температуре Δt -0,3	00	20		√
4	94,0	00	10	25	
	65,0	00	20		√
5	80,0	00	01	1	
6	10,0	…	…	Хранение	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2 Подготовка и проведение ПЦР (фасовка U), ручное дозирование

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации. При использовании стрипованных пробирок строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов!

7.2.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца К+ и отрицательного контрольного образца К- необходимое количество одноразовых пробирок или стрипов для амплификации объёмом 0,2 мл (по две для смесей EGFR-4.1 и EGFR-4.2 при использовании комплектации EGFR 4 или по четыре для смесей EGFR-8.1, EGFR-8.2, EGFR-8.3 и EGFR-8.4 при использовании комплектации EGFR 8).

Пример: Необходимо проанализировать 4 образца.

В варианте исполнения EGFR4 необходимо промаркировать 8 пробирок для исследуемых образцов, две пробирки для «К-» и две пробирки для «К+». Общее количество пробирок – 12 или 1,5 стрипа.

В варианте исполнения EGFR8 необходимо промаркировать 16 пробирок для исследуемых образцов, четыре пробирки для «К-» и четыре пробирки для «К+». Общее количество пробирок – 24 или 3 стрипа.

7.2.2 Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1 – 3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в промаркированные пробирки по 6 мкл соответствующей смеси для амплификации (для каждой смеси отдельным наконечником).

7.2.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq MAX в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq MAX. Смешайте в отдельной пробирке:

6 х (N+1) мкл ПЦР-буфера,

0,3 х (N+1) мкл полимеразы ТехноТаq MAX,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом контрольных образцов.

Пример: Необходимо проанализировать 4 образца, «К-», «К+».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В варианте исполнения EGFR4 промаркированных пробирок – 12. Необходимо приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX для 13 (12+1) пробирок, т.е. 78 мкл ПЦР-буфера + 3,9 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

В варианте исполнения EGFR8 промаркированных пробирок – 24. Необходимо приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX для 25 (24+1) пробирок, т.е. 150 мкл ПЦР-буфера + 7,5 мкл полимеразы ТехноТаq MAX.

7.2.6 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX необходимо готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

7.2.7 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 6 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq MAX.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 7.2.8 – 7.2.14.

7.2.8 Встряхните пробирки с исследуемыми образцами и контрольными образцами в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.9 Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки «К-», «К+» ДНК не вносится.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.10 Внесите в пробирки, маркированные К-, по 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.6).

7.2.11 Внесите в соответствующие пробирки по 6,0 мкл положительного контрольного образца "К+".

7.2.12 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1 – 3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.13 Установите все стрипы в амплификатор детектирующий.

7.2.14 Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «EGFR_4u.ini» или «EGFR_8u.ini» в зависимости от используемой комплектации набора реагентов. При последующих постановках

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

добавьте в протокол тест «EGFR_4u» или «EGFR_8u», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (объём реакционной смеси 18 мкл) и проведите ПЦР. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 7.

Таблица 7 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТпрайм и ДТлайт.

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерения
		мин	с		
1	80,0	00	30	1	
	94,0	5	00		
3	94,0	00	30	20	
	71,1 инкремент по температуре Δt -0,3	00	20		√
4	94,0	00	10	25	
	65,0	00	20		√
5	80,0	00	01	1	
6	10,0	…	…	Хранение	

7.3 Подготовка и проведение ПЦР (фасовка U) с использованием дозирующего устройства ДТстрим

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации.

7.3.1 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq MAX в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.2 В отдельной пробирке приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq MAX согласно руководству по эксплуатации к дозирующему устройству.

7.3.3 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX необходимо готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

7.3.4 Установите пробирки: со смесями для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX, с препаратами ДНК, положительным контрольным образцом "К+" и отрицательным контрольным образцом, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации к дозирующему устройству.

7.3.5 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет ПЦР в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.3.6 Проведите процедуру запечатывания микропланшет ПЦР полимерной термопленка согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.7 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при 100 x g в течение 30 с.

7.3.8 Установите все стрипы в детектирующий амплификатор.

7.3.9 Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «EGFR_4u.ini» или «EGFR_8u.ini» в зависимости от используемой комплектации набора реагентов. При последующих постановках добавьте в протокол тест «EGFR_4u» или «EGFR_8u», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (объём реакционной смеси 18 мкл) и проведите ПЦР. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 7.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8 РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

8.2 Учёт результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих).

8.4 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблицах будут показаны идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл Ср.

8.5 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9 АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Анализ и интерпретацию результатов проводят в соответствии с Приложением А: определяют наличие или отсутствие мутации в анализируемых образцах, в случае наличия мутации определяют долю мутантного аллеля в образце.

Рекомендуется пройти обучение по проведению анализа и интерпретации результатов. Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 16 Инструкции по применению.

9.2 Для положительного контрольного образца должен регистрироваться экспоненциальный рост флуоресценции по соответствующим каналам Fam, Hex, Rox и Cy5 (указано значение индикаторного цикла). Доля мутантных аллелей должна находиться в диапазоне 10-100%.

При отсутствии экспоненциального роста флуоресценции (отсутствие индикаторного цикла) и несоответствии доли мутантных аллелей заданному диапазону результаты считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.3 В отрицательном контрольном образце должен отсутствовать экспоненциальный рост флуоресценции по каналу Fam, Hex и Rox (отсутствие индикаторного цикла). Значения Ср для КВМ по каналу Cy5 должны отсутствовать или более 38 цикла.

При наличии амплификации по каналам Fam, Hex, Rox, а также значении Ср по каналу Cy5 менее 38 цикла результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 25 °С внутри контейнера не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Компоненты набора реагентов за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.2 Полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Смеси для амплификации и смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С, в течение всего срока годности набора реагентов;
- смеси для амплификации и смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, относятся к классу А и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям настоящих технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных настоящими техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов и контрольных образцов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Только для in vitro диагностики		Дата производства
	Температурный диапазон		Содержит инструкцию по применению
	Количество определений	REF	Каталожный номер
	Годен до		Адрес производителя
LOT	Серия набора реагентов		Не допускается воздействие солнечного света
NON STERILE	Не стерильно		Одноразовое использование

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым документом).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»; ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов EGFR следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское ш., д.125Ж, корпус 6, этаж 5, комн.14, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Старший научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
д.б.н. О.В. Бурменская
«09» 03 2021 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ
«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России
д.м.н., проф. А.М. Беляев
«15» 03 2021 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Алгоритм анализа и интерпретации результатов, полученных с использованием набора реагентов EGFR

ШАГ 1. Оценка КВМ

1. Ср КВМ (вкладка Ср, канал Cy5) в каждой пробирке должен быть не более 33 (фасовка U) или 34 (фасовка S) цикла;
2. Разброс значений Ср КВМ для каждого образца (dCp) должен составлять не более 1,7 цикла.

Таблица А.1 – Интерпретация результата

Результат исследования		Интерпретация	
Фасовка U	Фасовка S	Результат валиден	
Ср КВМ ≤ 33 d Ср КВМ ≤1,7	Ср КВМ ≤ 34, d Ср КВМ ≤1,7		
Ср КВМ>33	Ср КВМ>34	Результат невалиден	Вероятна низкая концентрация ДНК. Требуется повторная подготовка биологического материала и выделение ДНК.
d Ср>1,7		Результат невалиден	Значение КВМ не определено. Требуется повторная постановка ПЦР или повторное выделение ДНК (выполняется последовательно).

ШАГ 2. Определение статуса аллелей гена EGFR (НОРМА или МУТАЦИЯ)

Для каждой мутации учитывают наличие амплификации.

- В случае отсутствия амплификации (отсутствие Ср), статус аллеля определяют как «норма».

- При наличии амплификации (наличие Ср) для мутаций Del19ex, Ins19ex статус аллеля определяют как «мутация».

- При наличии амплификации для мутаций T790M, L858R, G719X, S768I, L861Q и Ins20ex рассчитывают dCp = Ср показателя – Ср КВМ.

Полученный результат сравнивают с пороговым значением.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица А.2 – Алгоритм определения статуса аллелей T790M, L858R, G719X, S768I, L861Q и Ins20ex с помощью сравнения dCp с пороговым значением

Мутации	Расчёт dCp	Анализ dCp	Интерпретация dCp
Ср КВМ ≤28 (фасовка S), Ср КВМ ≤27 (фасовка U)			
T790M	dCp = Ср T790M – Ср КВМ	**dCp < 9**	МУТАЦИЯ
		9≤ dCp ≤9,5	? (серая зона)
		d Ср > 9,5	Норма
G719X	d Ср = Ср G719X – Ср КВМ	**d Ср < 9**	МУТАЦИЯ
		9≤ dCp ≤9,5	? (серая зона)
		d Ср > 9,5	Норма
L861Q	d Ср = Ср L861Q – Ср КВМ	**d Ср < 9**	МУТАЦИЯ
		9≤ dCp ≤9,5	? (серая зона)
		d Ср > 9,5	Норма
L858R	d Ср = Ср L858R – Ср КВМ	**d Ср < 9**	МУТАЦИЯ
		9≤ dCp ≤9,5	? (серая зона)
		d Ср > 9,5	Норма
Ins20ex	d Ср = Ср Ins20ex – Ср КВМ	**d Ср < 9**	МУТАЦИЯ
		9≤ dCp ≤9,5	? (серая зона)
		d Ср > 9,5	Норма
S768I	d Ср = Ср S768I – Ср КВМ	**d Ср < 9**	МУТАЦИЯ
		9≤ dCp ≤9,5	? (серая зона)
		d Ср > 9,5	Норма
28< Ср КВМ ≤31,5 (фасовка S), 27< Ср КВМ ≤30,5 (фасовка U)			
T790M	dCp = Ср T790M – Ср КВМ	**dCp < 7**	МУТАЦИЯ
		7≤ dCp ≤7,5	? (серая зона)
		d Ср > 7,5	Норма
G719X	d Ср = Ср G719X – Ср КВМ	**d Ср < 7**	МУТАЦИЯ
		7≤ dCp ≤7,5	? (серая зона)
		d Ср > 7,5	Норма
L861Q	d Ср = Ср L861Q – Ср КВМ	**d Ср < 7**	МУТАЦИЯ
		7≤ dCp ≤7,5	? (серая зона)
		d Ср >7,5	Норма

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Мутации	Расчёт dCp	Анализ dCp	Интерпретация dCp
L858R	d Cp = Cp L858R – Cp КВМ	**d Cp < 7**	МУТАЦИЯ
		7≤ dCp ≤7,5	? (серая зона)
		d Cp > 7,5	Норма
Ins20ex	d Cp = Cp Ins20ex – Cp КВМ	**d Cp < 7**	МУТАЦИЯ
		7≤ dCp ≤7,5	? (серая зона)
		d Cp > 7,5	Норма
S768I	d Cp = Cp S768I – Cp КВМ	**d Cp < 7**	МУТАЦИЯ
31,5 < Cp КВМ ≤34 (фасовка S), 30,5 < Cp КВМ ≤33 (фасовка U)			
T790M	dCp = Cp T790M – Cp КВМ	**dCp < 6**	МУТАЦИЯ
		6≤ dCp ≤6,5	? (серая зона)
		d Cp > 6,5	Норма
G719X	d Cp = Cp G719X – Cp КВМ	**d Cp < 6**	МУТАЦИЯ
		6≤ dCp ≤6,5	? (серая зона)
		d Cp > 6,5	Норма
L861Q	d Cp = Cp L861Q – Cp КВМ	**d Cp < 6**	МУТАЦИЯ
		6≤ dCp ≤6,5	? (серая зона)
		d Cp >6,5	Норма
L858R	d Cp = Cp L858R – Cp КВМ	**d Cp < 6**	МУТАЦИЯ
		6≤ dCp ≤6,5	? (серая зона)
		d Cp > 6,5	Норма
Ins20ex	d Cp = Cp Ins20ex – Cp КВМ	**d Cp < 6**	МУТАЦИЯ
		6≤ dCp ≤6,5	? (серая зона)
		d Cp > 6,5	Норма
S768I	d Cp = Cp S768I – Cp КВМ	**d Cp < 6**	МУТАЦИЯ
		6≤ dCp ≤6,5	? (серая зона)
		d Cp > 6,5	Норма

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МУТАЦИЯ – Определена мутация, можно вычислить долю мутантного аллеля (см.шаг 3)

? (серая зона): Статус мутации не определен. Требуется повторная постановка ПЦР или повторное выделение ДНК (выполняется последовательно). Если исследование по каким-то причинам (нет материала, нет возможности подготовить срезы) невозможно повторить результат следует интерпретировать как «норма».

НОРМА – Мутация не выявлена, статус аллеля «норма»

Дискриминацию между делецией и инсерцией в 19 экзоне (Del19ex или Ins19ex) осуществляют с учетом сигнала по каналу Rox:

- при наличии сигнала по каналу Fam (Del19ex, Ins19ex) и отсутствии сигнала по каналу Rox (Ins19ex) делают заключение о делеции в 19 экзоне,
- при наличии сигнала по каналу Fam (Del19ex, Ins19ex) и наличии сигнала по каналу Rox (Ins19ex) делают заключение об инсерции в 19 экзоне.

Del19ex, Ins19ex	Ins19ex	Заключение
мутация	мутация	Инсерция в 19 экзоне
мутация	норма	Делеция в 19 экзоне
норма	норма	норма

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ШАГ 3: Расчёт доли мутантного аллеля

Расчёт доли мутантного аллеля проводят по формуле

$\frac{[MA]}{[KBM]}\% = \frac{Екв{м^{Ср\ квм}}}{Ема^{Ср\ ма}}$ x 100%, где

$\frac{[MA]}{[KBM]}$ – доля мутантного аллеля,

Еквм, Ема – эффективность амплификации (прирост матрицы в цикле амплификации) КВМ и мутантного аллеля соответственно;

Ср квм, Ср ма – значения пороговых циклов КВМ и мутантного аллеля соответственно.

Эффективность амплификации КВМ и мутантного аллеля является величиной постоянной и представлена в таблице А.3.

Таблица А.3 – Эффективность амплификации КВМ и мутантных аллелей гена EGFR

Мутации	Эффективность амплификации
КВМ	1,97
T790M	1,97
Делеции, инсерции в 19 экзоне	1,92
G719X	2,00
L861Q	1,99
L858R	1,97
Инсерции в 20 экзоне	1,96
S768I	1,99

Таблица А.4 – Формулы расчёта доли мутантного аллеля

Мутации	**Расчёт доли мутантного аллеля по эффективности амплификации**
T790M	$= \frac{1{,}97^{Cp\ \text{KBM}}}{1{,}97^{Cp\ \text{T790M}}} * 100\%$
Del19ex, Ins19ex	$= \frac{1{,}97^{Cp\ \text{KBM}}}{1{,}92^{Cp\ \text{Del19ex,Ins19ex}}} * 100\%$
Ins19ex	
G719X	$= \frac{1{,}97^{Cp\ \text{KBM}}}{2^{Cp\ \text{G719X}}} * 100\%$
L861Q	$= \frac{1{,}97^{Cp\ \text{KBM}}}{1{,}99^{Cp\ \text{L861Q}}} * 100\%$
L858R	$= \frac{1{,}97^{Cp\ \text{KBM}}}{1{,}97^{Cp\ \text{L858R}}} * 100\%$
Ins20ex	$= \frac{1{,}97^{Cp\ \text{KBM}}}{1{,}96^{Cp\ \text{Ins20ex}}} * 100\%$
S768I	$= \frac{1{,}97^{Cp\ \text{KBM}}}{1{,}99^{Cp\ \text{S768I}}} * 100\%$

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ШАГ 4. Оценка доли мутантного аллеля (проводят для каждой мутации)

Результат, полученный на шаге 4 **Расчетная доля мутантного аллеля**	Интерпретация результата: **Диапазон полуколичественной оценки**
<0,7%	< 1%
≥ 0,7% и < 6%	1-10%
≥ 6% и < 16%	5-20%
≥ 16%	10-100%

При анализе результатов необходимо оценить результаты ПЦР в отрицательном и положительном контрольных образцах.

Отрицательный контрольный образец	
Ср по каналам Fam, Hex, Rox не указаны, Ср по каналу Cy5 более 38 цикла	Результаты постановки валидны
Наличие Ср по каналам Fam, Hex, Rox, а также значение Ср по каналу Cy5 менее 38 цикла.	Результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.
Положительный контрольный образец	
Наличие Ср каналам Fam, Hex, Rox и Cy5. Обнаружены все мутации, доли мутантных аллелей 10-100%	Результаты постановки валидны
Ср по каналам Fam, Hex, Rox не указаны и несоответствие доли мутантных аллелей заданному диапазону.	Результаты постановки считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПРИМЕР АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования выполнены с использованием фасовки S

ОБРАЗЕЦ №1 – Норма по всем показателям

Данные ПЦР для ОБРАЗЦА №1		АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ			
Показатель	**Ср**	**Показатель**	**Анализ КВМ**	**Расчёт dCp**	**Анализ dCp Интерпретация**
T790M	42,7	T790M		42,7-29,3=13,4	13,4 > 7,5 **Норма**
L858R	44,4	L858R		44,4-29,3=15,1	15,1 > 7,5 **Норма**
КВМ	29,3	КВМ	Менее 34, ОК		
Del19ex,Ins19ex	-	Del19ex,Ins19ex			**Норма**
Ins19ex	-	Ins19ex			
КВМ	29,1	КВМ	Менее 34, ОК		
G719X	39,4	G719X		39,4-29=10,4	10,4 > 7,5 **Норма**
Ins20ex	-	Ins20ex			**Норма**
КВМ	29	КВМ	Менее 34, ОК		
L861Q	-	L861Q			**Норма**
S768I	-	S768I			**Норма**
КВМ	29,4	КВМ	Менее 34, ОК		
			dCp КВМ=0,4 менее 1,7, ОК		28< Ср КВМ ≤31,5

БЛАНК ОТВЕТА ДЛЯ ОБРАЗЦА №1

Показатель	Результат
T790M	норма
L858R	норма
Del19ex	норма
Ins19ex	норма
G719X	норма
Ins20ex	норма
L861Q	норма
S768I	норма

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОБРАЗЕЦ №2 – Пример с одной мутацией

Данные ПЦР для ОБРАЗЦА №2		АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ			
Показатель	**Ср**	**Показатель**	**Анализ КВМ**	**Расчёт dCp**	**Анализ dCp Интерпретация**
T790M	45	T790M		45-27=18	18 > 9,5 **Норма**
L858R	28,9	L858R		28,9-27=1,8	1,8 < 9 **МУТАЦИЯ**
КВМ	27	КВМ	Менее 34, ОК		
Del19ex,Ins19ex	-	Del19ex,Ins19ex			**Норма**
Ins19ex	-	Ins19ex			
КВМ	26,8	КВМ	Менее 34, ОК		
G719X	39,6	G719X		39,6-26,8=12,8	12,8 > 9,5 **Норма**
Ins20ex	-	Ins20ex			**Норма**
КВМ	26,8	КВМ	Менее 34, ОК		
L861Q	-	L861Q			**Норма**
S768I	41,3	S768I		41,3-26,7=14,6	14,6 > 9,5 **Норма**
КВМ	26,7	КВМ	Менее 34, ОК		
			dCp КВМ=0,3 менее 1,7, ОК		Ср КВМ ≤28

Расчёт доли мутантного аллея L8585R	**Интерпретация результата**
$(1,97^{28}/1,97^{28,9})*100\% = 27,57\%$	27,57 > 16, соответствует диапазону полуколичественной оценки: **10-100%**

БЛАНК ОТВЕТА ДЛЯ ОБРАЗЦА №2

Показатель	**Результат**	**Доля мутантного аллеля**
T790M	норма	-
L858R	**мутация**	**10-100%**
Del19ex	норма	-
Ins19ex	норма	-
G719X	норма	-
Ins20ex	норма	-
L861Q	норма	-
S768I	норма	-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОБРАЗЕЦ №3 – Пример с показателем Del19ex,Ins19ex

Данные ПЦР для ОБРАЗЦА №2		АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ			
Показатель	**Ср**	**Показатель**	**Анализ КВМ**	**Расчёт dCp**	**Анализ dCp Интерпретация**
T790M	40,3	T790M		40,3-28,6=11,7	11,.7 > 7,5 **Норма**
L858R	44,2	L858R		44,2-28,6=15,6	15,6 > 7,5 **Норма**
КВМ	28,6	КВМ	Менее 34, ОК		
Del19ex,Ins19ex	32,9	Del19ex,Ins19ex		• Сигнал по параметру Del19ex, Ins19ex • **Сигнал по параметру Ins19ex**	**МУТАЦИЯ**
Ins19ex	32,7	Ins19ex			**МУТАЦИЯ**
КВМ	28,6	КВМ	Менее 34, ОК		
G719X	40,6	G719X		40,6-28,5=12,1	12,1 > 7,5 **Норма**
Ins20ex	40,2	Ins20ex		40,2-28,5=11,7	11,7 > 7,5 **Норма**
КВМ	28,5	КВМ	Менее 34, ОК		
L861Q	44,4	L861Q		44,4-28,5=15,9	15,9 > 7,5 **Норма**
S768I	45,3	S768I		45,3-28,5=16,8	16,8 > 7,5 **Норма**
КВМ	28,5	КВМ	Менее 34, ОК		
			dCp КВМ=0,1 менее 1,7, ОК		28< Ср КВМ ≤31,5

Расчёт доли мутантного аллея Ins19ex	**Интерпретация результата**
$(1,97^{28,6}/1,92^{32,9})*100\% = 12,62\%$	6 <12,62 < 16, соответствует диапазону полуколичественной оценки: **5-20%**

БЛАНК ОТВЕТА ДЛЯ ОБРАЗЦА №3

Показатель	**Результат**	**Доля мутантного аллеля**
T790M	норма	-
L858R	норма	-
Del19ex	норма	-
Ins19ex	**мутация**	**5-20%**
G719X	норма	-
Ins20ex	норма	-
L861Q	норма	-
S768I	норма	-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОБРАЗЕЦ №4 – Пример с двумя мутациями

Данные ПЦР для ОБРАЗЦА №2		АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ			
Показатель	**Ср**	**Показатель**	**Анализ КВМ**	**Расчёт dCp**	**Анализ dCp Интерпретация**
T790M	28,5	T790M		28,5-29,5=-1	-1 < 7 **МУТАЦИЯ**
L858R	41,7	L858R		41,7-29,5=12,2	12,2 > 7,5 **Норма**
КВМ	29,5	КВМ	Менее 34, ОК		
Del19ex,Ins19ex	29,4	Del19ex,Ins19ex		• Сигнал по параметру Del19ex, Ins19ex	**МУТАЦИЯ**
Ins19ex	-	Ins19ex		• **Отсутствует сигнал по параметру Ins19ex**	**норма**
КВМ	29,6	КВМ	Менее 34, ОК		
G719X	40,6	G719X		40,6-29,5=11,1	11,1 > 7,5 **Норма**
Ins20ex	45,3	Ins20ex		45,3-29,5=15,8	158 > 7,5 **Норма**
КВМ	29,5	КВМ	Менее 34, ОК		
L861Q	41,6	L861Q		41,6-29,5=12,1	12,1 > 7,5 **Норма**
S768I	41	S768I		41-29,5=11,5	11,5 > 7,5 **Норма**
КВМ	29,5	КВМ	Менее 34, ОК		
			dCp КВМ=0,1 менее 1,7, ОК		28< Ср КВМ ≤31,5

Расчёт доли мутантного аллея	Интерпретация результата
Del19ex $(1,97^{29,6}/1,92^{29,4})*100\% = 243,86\%$	243, 86 > 16, соответствует диапазону полуколичественной оценки: **10-100%**
T790M $(1,97^{29,5}/1,97^{28,5})*100\% = 197\%$	197 > 16, соответствует диапазону полуколичественной оценки: **10-100%**

БЛАНК ОТВЕТА ДЛЯ ОБРАЗЦА №4

Показатель	Результат	Доля мутантного аллеля
T790M	**мутация**	**10-100%**
L858R	норма	-
Del19ex	**мутация**	**10-100%**
Ins19ex	норма	-
G719X	норма	-
Ins20ex	норма	-
L861Q	норма	-
S768I	норма	-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru