

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л.М. Халилова
(по доверенности №95/04 от 30 декабря 2022)
«10» апреля 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *EGFR* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) в пробе свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) из образцов плазмы крови человека
«Тест-EGFR-плазма»
по ТУ 21.20.23-053-97638376-2021**

Содержание

Список сокращений	3
Введение.....	4
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода	8
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	14
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.	21
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	22
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	24
8. Анализируемые образцы	26
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	29
10. Проведение анализа	30
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	33
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	37
13. Утилизация	39
14. Гарантийные обязательства, контакты	40
Приложение А	41

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
сцДНК	свободно циркулирующая ДНК
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (рецептор эпидермального фактора роста опухоли)
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КВМ	контроль взятия материала
ID	идентификационный номер
COSMIC	Catalog of Somatic Mutations in Cancer (международная база соматических мутаций при раковых заболеваниях)
ТК	тирозинкиназа
НМРЛ	немелкоклеточный рак лёгкого

Введение

Рак лёгкого – один из наиболее распространённых видов злокачественных онкологических заболеваний. Ежегодно в России от рака лёгкого погибают около 60 тыс. человек, что составляет 20% умерших от злокачественных опухолей. Гистопатологически рак легкого делится на два типа – мелкоклеточный (МКРЛ) и немелкоклеточный (НМРЛ). Патология у большинства пациентов диагностируется на поздних стадиях и имеет плохой прогноз с 5-летней общей выживаемостью (ОВ) 10–15%. НМРЛ составляет 85–90% всех случаев рака легких.¹

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

Установлено, что высокая частота гиперэкспрессии *EGFR* характерна для немелкоклеточного рака лёгкого (40 - 70%), рака яичников (35 - 70%), толстой кишки (25 - 77%) и др. Известно, что выявление повышенной экспрессии гена *EGFR* является фактором неблагоприятного прогноза течения болезни. Активация механизмов с участием *EGFR* приводит к усилению пролиферативной активности опухолевых клеток, неоангиогенезу, замедлению апоптоза, более раннему появлению метастаз.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «Тест-EGFR-плазма», являются мутации в гене *EGFR*: делеции (del) в 19 экзоне, T790M в 20 экзоне, L858R в 21 экзоне.

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности ДНК) в отношении соматических мутаций гена *EGFR*, обнаруживаемых у больных немелкоклеточным раком лёгкого (НМРЛ), локализованных в экзонах 19-21, кодирующих тирозинкиназный домен.

¹ Шнейдер О.В., Камилова Т.А., Голота А.С., Сарана А.М., Щербак С.Г. Биомаркеры и таргетная терапия при раке легких // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. – 2021. – Том 3. – № 1. – 2020. – С. 74-94

В соответствии с Клиническими рекомендациями «Злокачественное новообразование бронхов и легкого» (утв. Минздравом России, год утверждения 2021 г.):

«При проведении молекулярно-генетического исследования рекомендуется проводить анализ мутаций гена *EGFR* как в отношении распространенных генетических нарушений (делеции в 19-м экзоне; точечная замена p.L858R в 21-м экзоне), так и в отношении менее распространенных генетических нарушений в 18–21-х экзонах (в частности, вставки в 19-м экзоне, а также точечные замены p.L861Q, p.G719X, p.S768I)».

Наличие мутаций в гене *EGFR* делает активацию сигнального пути независимой от присутствия лиганда и провоцируют клеточное деление, выживаемость и антиапоптотические сигналы. Ингибирование *EGFR* вызывает усиление регуляции проапоптотических молекул, что в конечном итоге способствует активации внутреннего митохондриального апоптотического сигнального пути.²

Наиболее частыми и изученными являются мутации – L858R – замена лейцина аргинином в 858 кодоне 21 экзоне (41%) и делеции в 19 экзоне (45% от всех мутаций).

Назначение ингибиторов тирозинкиназы (ТК) больным НМРЛ с наличием мутаций Del19 или L858R гена *EGFR* является эффективным методом лечения, приводящим к существенному сокращению размеров опухолевых очагов. Определение этих мутаций в плазме крови в динамике позволяет оценивать ответ на проводимую терапию.

Мутация T790M связана с устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназы (ТК) и ответственна за резистентность к терапии ингибиторами ТК. Выявление мутации T790M позволяет оптимизировать тактику лечения, выявить опухоли, не чувствительные к проводимой терапии, и своевременно назначить пациенту другой режим химиотерапии, что является клинически и

² Насретдинов А.Ф., Султанбаев А.В., Меньшиков К.В. и др. Ландшафт мутаций генов эпидермального фактора роста у больных раком легкого в Республике Башкортостан // Эффективная фармакотерапия. – 2020. – Т. 16. – № 33. – С. 18-23.

экономически выгодным, учитывая необходимость длительного применения и высокую стоимость терапии.³

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика онкологических заболеваний.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: набор реагентов «Тест-EGFR-плазма» рекомендуется пациентам с диагнозом метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) III-IV стадии для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR и мониторинга ответа на них.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «Тест-EGFR-плазма» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

³ Real-time PCR and digital PCR approach for detecting EGFR status in plasma of patients with NSCLC / M. Gordiev [et al.] // Journal of Thoracic Oncology. - 2016. - V 11. - N 4. - p. 124-125. doi:10.1016/S1556-0864(16)30263-5.

1. Назначение

1.1. Назначение: набор реагентов предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического профиля при обследовании пациентов с диагнозом метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) III-IV стадии для качественного определения статуса мутаций L858R, T790M и делеции (del) в 19 экзоне гена *EGFR* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), содержащей опухолевую ДНК, выделенной из плазмы крови, для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR и мониторинга ответа на них.

Клиническая значимость теста, выполняемого с помощью набора реагентов, состоит в определении показаний к таргетной терапии (направленного лечения) и мониторинге ответа при патологии, метастатическом немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) III-IV стадии, с помощью выявления методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией активирующих мутаций L858R, T790M и делеции в экзоне 19 гена *EGFR*.

Анализ для установления статуса мутаций L858R, T790M и делеций (del) в 19 экзоне гена *EGFR* рекомендуется проводить на поздних стадиях (III-IV стадия) немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), так как на ранних стадиях опухолевой прогрессии циркулирующая опухолевая ДНК еще не попала в кровотоки.⁴

Функциональное назначение. Полученные результаты могут использоваться для определения показаний к таргетной терапии (направленного лечения) низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы EGFR и мониторинга ответа на них при патологии – метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) III-IV стадии.

⁴ Еникеев Р.Ф., Гордиев М.Г., Моммаева М.С. Тестирование EGFR-мутаций при раке легкого. Собственный опыт / Р.Ф. Еникеев, М.Г. Гордиев, М.С. Моммаева // Поволжский онкологический вестник. – 2012. - № 4. – С. 33-38.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы свободно циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы крови.

Принцип определения

Анализ проводится методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Продукты ПЦР исследуемого гена *EGFR* идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зонда, меченного FAM. Набор содержит реагенты для анализа мутаций L858R, T790M и делеций в экзоне 19 гена *EGFR* и реагенты для внутреннего эндогенного контроля (смесь *Норма*). Внутренний эндогенный контроль (смесь *Норма*) позволяет выявить наличие ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам. ПЦР-смеси состоят из всех необходимых реагентов. Набор также включает положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). В качестве положительных контрольных образцов (ПКО) используют 5% ПКО и 0,5% ПКО, представляющие собой смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 100 ГЭ/мкл для 5%, 1000 ГЭ/мкл для 0,5% и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 5 ГЭ/мкл, содержащей эквимольную смесь мутаций L858R, T790M и делеций.

Геномная ДНК из культуры клеток человека линии Raji, используемая для получения положительного контрольного образца, контрольного образца для определения чувствительности и внешнего контроля амплификации имеет отрицательный статус гена *EGFR* по мутациям L858R, T790M и делециям (del) в 19 экзоне.

В качестве ОКО используют воду деионизованную, свободную от примесей ДНК, ДНКаз и РНКаз.

Ограничения метода

Чистота выделенной ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей ($A_{260}/A_{280\text{nm}}$), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,8. Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-50 нг/мкл.

Обнаружение мутаций зависит от количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце. Внутренний эндогенный контроль (смесь *Норма*) позволяет выявить наличие ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции мультиплексной ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Набор реагентов «Тест-EGFR-плазма» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор реагентов «Тест-EGFR-плазма» предназначен только для качественного определения статуса мутаций в гене *EGFR*: делеций (del) в 19 экзоне, мутаций T790M в 20 экзоне и L858R в 21 экзоне.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истёкшим сроком годности или нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Общее время проведения анализа составляет примерно 2,5 ч.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «Тест-EGFR-плазма» выпускается в двух формах комплектации:

- 1) «Тест-EGFR-плазма-12» на 12 определений;
- 2) «Тест-EGFR-плазма-24» на 24 определения.

Количество анализируемых проб

Каждый набор «Тест-EGFR-плазма-12» на 12 определений содержит реагенты, рассчитанные на проведение анализа 12 образцов с учетом положительных и отрицательных контролей.

Каждый набор «Тест-EGFR-плазма-24» на 24 определения содержит реагенты, рассчитанные на проведение анализа 24 образцов с учетом положительных и отрицательных контролей.

Допускается одновременная постановка нескольких клинических образцов, в этом случае можно выполнить исследования большего количества образцов, т.к. сокращаются расходы реактивов на положительные и отрицательные контроли.

Состав набора реагентов

Таблица 1 – Состав набора реагентов «Тест-EGFR-плазма-12»

№ пп	Наименование реагента	Краткое наименование на крышке пробирки	Внешний вид	Количество, объём
1	ПЦР-смесь Норма	Норма	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 192 мкл
2	ПЦР-смесь del	del	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 288 мкл
3	ПЦР-смесь L858R	L858R	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 288 мкл
4	ПЦР-смесь T790M	T790M	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 288 мкл
5	ПКО 0,5%	ПКО 0,5%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 400 мкл

6	ПКО 5%	ПКО 5%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 400 мкл
7	ПКО-1к 0%	ПКО-1к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 150 мкл
8	ПКО-10к 0%	ПКО-10к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 150 мкл
9	ОКО	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 2000 мкл
10	Тақ-полимераза	Тақ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 110 мкл

Таблица 2 – Состав набора реагентов «Тест-EGFR-плазма-24»

№ пп	Наименование реагента	Краткое наименование на крышке пробирки	Внешний вид	Количество, объём
1	ПЦР-смесь Норма	Норма	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 384 мкл
2	ПЦР-смесь del	del	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 288 мкл
3	ПЦР-смесь L858R	L858R	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 288 мкл
4	ПЦР-смесь T790M	T790M	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 288 мкл
5	ПКО 0,5%	ПКО 0,5%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 400 мкл
6	ПКО 5%	ПКО 5%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 400 мкл
7	ПКО-1к 0%	ПКО-1к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 150 мкл
8	ПКО-10к 0%	ПКО-10к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 150 мкл
9	ОКО	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 2000 мкл
10	Тақ-полимераза	Тақ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 220 мкл

ПЦР-смеси Норма, del, L858R, T790M готовы к использованию и включают в состав: ПЦР-буфер, деионизованную воду, синтетические олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды.

Тақ-полимераза готова к использованию и представляет собой смесь высокоочищенного рекомбинантного фермента Тақ ДНК-полимеразы и специфических моноклональных антител к полимеразе.

В качестве положительных контрольных образцов содержания мутантной ДНК в предельных значениях геномики (ПКО) используют ПКО 5% и ПКО 0,5%.

Положительный контрольный образец (ПКО 5%) готов к использованию и представляет собой смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 100 ГЭ/мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 5 ГЭ/мкл, содержащей эквимольную смесь мутаций 858, 790 и делеций.

Положительный контрольный образец (ПКО 0,5%) используется в качестве контрольного образца для определения чувствительности, готовый к использованию и представляющий собой смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 1000 ГЭ/мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 5 ГЭ/мкл, содержащей эквимольную смесь мутаций 858, 790 и делеций.

Концентрация ПКО выбрана исходя из близких к лимитирующим для детекции набором реагентов содержаний мутантной ДНК в предельных для исследуемого образца значениях концентраций (от 1000 до 100 копий ДНК/мкл раствора) свободно циркулирующей ДНК с нормальной копией гена *EGFR*.

Положительный контрольный образец (ПКО-1к 0%) готов к использованию и представляет собой геномную ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 100 копий ГЭ в 1 мкл. Выступает в качестве внешнего контроля амплификации гена *EGFR*.

Положительный контрольный образец (ПКО-10к 0%) готов к использованию и представляет собой геномную ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 1000 копий ГЭ в 1 мкл. Выступает в качестве внешнего контроля амплификации гена *EGFR*.

Геномная ДНК из культуры клеток человека линии Raji имеет отрицательный статус гена *EGFR* по мутациям L858R, T790M и делеции (del) в 19 экзоне.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз и РНКаз.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «Тест-EGFR-плазма»

Наименование показателя		Характеристики и нормы		Пункт ТУ
1. Технические характеристики				
Наименование реагента	Краткое наименование на крышке пробирки	Внешний вид	Количество, объем, мкл (±5%)	
Форма комплектации «Тест-EGFR-плазма-12»				
ПЦР-смесь Норма	Норма	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 192 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПЦР-смесь del	del	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 288 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПЦР-смесь L858R	L858R	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 288 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПЦР-смесь T790M	T790M	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 288 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО 0,5%	ПКО 0,5%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 400 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО 5%	ПКО 5%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 400 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-1к 0%	ПКО-1к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 150 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-10к 0%	ПКО-10к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 150 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 2000 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Тaq-полимераза	Тaq	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 110 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Форма комплектации «Тест-EGFR-плазма-24»				
ПЦР-смесь Норма	Норма	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	1 пробирка, 384 мкл	Раздел 7, пункт 7.6

ПЦР-смесь del	del	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 288 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПЦР-смесь L858R	L858R	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 288 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПЦР-смесь T790M	T790M	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета	2 пробирки, по 288 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО 0,5%	ПКО 0,5%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 400 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО 5%	ПКО 5%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 400 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-1к 0%	ПКО-1к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 150 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО-10к 0%	ПКО-10к 0%	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 150 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки, по 2000 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Тақ-полимераза	Тақ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 220 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-053-97638376-2021			Раздел 7, пункт 7.9
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-053-97638376-2021			Раздел 7, пункт 7.9
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-053-97638376-2021			Раздел 7, пункт 7.9
2. Функциональные характеристики				
2.1. Положительный результат с ПКО	Результат ПЦР-исследования считается достоверным, при прохождении реакций с «ПКО-1к 0%» в смеси «Норма» не позднее 32 цикла ($Cp \leq 32$), «del», «L858R», «T790M» в пробирках с соответствующими ПКО не позднее 35 цикла ($Cp \leq 35$).			Раздел 7, пункт 7.7.3.1
2.2. Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналу FAM/Green Cp не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует).			Раздел 7, пункт 7.7.3.2
2.3. Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	Набор считают годным при значении стандартного отклонения в повторностях КОЧ не более 3%, при прохождении реакций «Норма», «del», «L858R», «T790M» в пробирках с КОЧ во всех повторностях (не менее 6) не позднее 38 цикла.			Раздел 7, пункт 7.7.3.3

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 14 Инструкции).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к мутациям L858R, T790M и делеции (del) в 19 экзоне гена *EGFR*

4.2.2 Аналитическая чувствительность

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций CLSI EP-17A2 предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений СОП (представляет собой геномную ДНК из культуры клеток человека линии Raji в концентрации 1000 копий гена *EGFR* в 1 мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 5 копий гена *EGFR* в 1 мкл, содержащей эквимольярную смесь мутаций 858, 790 и делеций) в диапазоне предполагаемого предела обнаружения: 1, 5, 30, 100, 200, 500, 1000 копии/мкл.

По результатам исследования предел обнаружения ДНК гена *EGFR* с частотой выявления 95 % для амплификатора:

- ДТпрайм – 529 копий/мл, (95%ДИ: 527,57 - 530,43);
- CFX 96 – 669 копий/мл, (95%ДИ: 667,57 - 670,43);
- Rotor-Gene Q – 623 копий/мл, (95%ДИ: 621,57 - 624,43);
- Quant Studio 5 – 623 копий/мл, (95%ДИ: 621,57 - 624,43).

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, отрицательный контрольный образец, контрольный образец специфичности были исследованы по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию,

среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%.

4.2.4. Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчёту прецизионности в условиях повторяемости, однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 5%.

4.2.5 Метрологическая прослеживаемость контрольных образцов ПКО 5%, ПКО 0,5%, ПКО-1к 0%, ПКО-10к 0%, КОЧ

Результаты исследования показывают, что контрольные образцы – ПКО 5%, ПКО 0,5%, ПКО-1к 0%, ПКО-10к 0%, КОЧ обеспечивают стабильную работу набора реагентов «Тест-EGFR-плазма».

Подтверждена метрологическая прослеживаемость контрольных образцов – ПКО 5%, ПКО 0,5%, ПКО-1к 0%, ПКО-10к 0%, КОЧ путем проведения проверки концентрации стокового раствора Raji, составляющего нормальный вариант копии ДНК и концентрации плазмид мутаций в гене EGFR с последующим проведением ПЦР в соответствии ТУ 21.20.23-053-97638376-2021 «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) в пробе свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) из образцов плазмы крови человека «Тест-EGFR-плазма» по ТУ 21.20.23-053-97638376-2021».

В соответствии с ГОСТ ISO 17511-2011 **положительные контрольные образцы** являются калибраторами продукта (product calibrator): Калибратор, изготовленный производителем и предназначенный для применения с конечным продуктом производителя.

- **Положительный контрольный образец (ПКО 5%)** - смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Raji в концентрации 100 ГЭ/мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 5 ГЭ/мкл, содержащей эквимольную смесь мутаций 858, 790 и делеций.

- **Положительный контрольный образец (ПКО 0,5%)** - смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Raji в концентрации 1000 ГЭ/мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 5 ГЭ/мкл, содержащей эквимольную смесь мутаций 858, 790 и делеций.

- **Положительный контрольный образец (ПКО-1к 0%)** - геномная ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 100 копий ГЭ в 1 мкл. Выступает в качестве внешнего контроля амплификации (ВКО) гена *EGFR*.

- **Положительный контрольный образец (ПКО-10к 0%)** - геномная ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 1000 копий ГЭ в 1 мкл. Выступает в качестве внешнего контроля амплификации (ВКО) гена *EGFR*.

Контрольный образец для определения чувствительности, в соответствии с ГОСТ ISO 17511-2011, является рабочим калибратором производителя: «Рабочий калибратор производителя может быть, например, материалом с матрицей, напоминающей пробы человеческого происхождения, которые должны быть измерены рутинными методиками выполнения измерений конечных потребителей.»

В качестве **контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ)** используется смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 400 копий гена *EGFR* в 1 мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н. в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 2 копии гена *EGFR* в 1 мкл, содержащей эквимольную смесь мутаций 858, 790 и делеций. Для реакции «Норма» используется смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Raji концентрацией 100 копий гена *EGFR* в 1 мкл.

4.2.6 Влияние интерферирующих веществ

Исследования по оценке влияния интерферирующих веществ представлены в разделе 8.4 Инструкции.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний использовалось 103 образца плазмы крови человека, от пациентов с установленным диагнозом метастатический немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) III-IV стадии, которые были получены из банка остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

В 52 предоставленных образцах мутантная ДНК гена EGFR не обнаружена и в 51 образце – обнаружена. Статус мутаций гена EGFR был установлен в ходе проведения клинических испытаний регистрируемого медицинского изделия в ходе лечебно-диагностического процесса с помощью зарегистрированного «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом ПЦР-РВ (Тест-EGFR) по ТУ 9398-004-97638376-2015», производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/6267 от 19 сентября 2017 года).

Для оценки перекрестной реактивности в клинических испытаниях испытуемым набором реагентов «Тест-EGFR-плазма» были исследованы 52 образца плазмы крови человека, не содержащих мутантную ДНК гена EGFR.

Отрицательный статус биологического материала установлен зарегистрированным набором реагентов «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом ПЦР-РВ (Тест-EGFR) по ТУ 9398-004-97638376-2015», производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/6267 от 19 сентября 2017 года).

Такое количество образцов выбрано с учетом требований **ГОСТ Р 51352-2013** и с учетом рекомендаций Международного руководства **CLSI EP09-A3**.

Испытания проводились по средствам проспективного исследования диагностических характеристик набора реагентов «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) в пробе

свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) из образцов плазмы крови человека «Тест-EGFR-плазма» по ТУ 21.20.23-053-97638376-2021» на основании сопоставления результатов тестирования одних и тех же проб клинического материала испытываемым набором реагентов «Тест-EGFR-плазма» с результатами полученными набором сравнения «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом ПЦР-РВ (Тест-EGFR) по ТУ 9398-004-97638376-2015», производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2017/6267 от 19 сентября 2017 года).

Для оценки межсерийной сходимости исследования клинических образцов проведены исследуемым медицинским изделием в двух сериях.

Выделение ДНК из клинических образцов осуществлялось с помощью, рекомендованных в инструкции по применению исследуемого набора «Тест-EGFR-плазма», наборов для экстракции ДНК:

- Набор реагентов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови (ДНК-Плазма-М-RT) по ТУ 21.20.23-010-97638376-2017 (ООО «ТестГен», Россия), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9185 от 07.11.2019;

- Набор QIAamp® DSP Circulating Nucleic Acid (NA) Kit (QIAGEN GmbH, Германия), регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15704 от 08.11.2021.

Для проведения ПЦР-исследования использованы амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100%.

Из 103 протестированных образцов плазмы крови испытываемым набором и набором сравнения - ложноположительных и ложноотрицательных результатов не выявлено.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-

Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2261/2331986).
 Диагностические характеристики испытуемого набора рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

4.3.1. Результаты изучения диагностических характеристик по образцам клинического материала

Мутация	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательным и пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
del	40	104	100% (95% ДИ:91,19%-100%)	100% (95% ДИ:96,52%-100%)
T790M	48	104	100% (95% ДИ:92,6%-100%)	100% (95% ДИ:96,52%-100%)
L858R	32	104	100% (95% ДИ:90,75%-100%)	100% (95% ДИ:96,52%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Перекрестная контаминация образцов;
3. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;
4. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами амплификации;
5. Проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
6. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
7. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набор реагентов для определения статуса мутаций гена EGFR методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) в пробе свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) из образцов плазмы крови человека «Тест-EGFR-плазма» по ТУ 21.20.23-053-97638376-2021 является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «Тест-EGFR-плазма», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

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

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

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил 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». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с 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»;

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

- лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;

- использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов;

- поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 минут;

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- набор реагентов по истечении срока годности или при нарушении упаковки применению не подлежит;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по

ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с набором реагентов осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16°C.

5. Амплификатор⁵ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналу, соответствующего флуорофору FAM/Green: CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016), «ДТпрайм» («ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, РУ №

⁵ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Ахуген», США);

2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 или 2,0 мл;

3. Планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой (например, «Ахуген», США) или тонкостенные одноразовые пробирки для ПЦР с оптически прозрачной плоской крышкой:

- пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл (с оптически прозрачными стенками в случае детекции через стенку пробирки),

- пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл в стрипах;

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

7. Набор для выделения сцДНК из клинического материала (см п 8.3).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы свободно циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы крови.

8.1. Процедура взятия цельной периферической крови человека

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

Для получения плазмы периферическую венозную кровь (не менее 8-10 мл) отбирают в пробирку с добавленной в качестве антикоагулянта CPDA или EDTA-K2. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

Условия транспортирования и хранения исходного клинического материала:

При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в лабораторию в течение 2 суток при температуре 4-8 °С. С момента взятия крови и получения плазмы, должно пройти не более 48 часов.

При использовании пробирок с EDTA-K2 в качестве антикоагулянта, кровь необходимо доставить в лабораторию в течение 1 часа. С момента взятия крови и получения плазмы должно пройти не более 2-3 часов.

ВНИМАНИЕ! Важно исключить замораживание и прогрев пробирки с кровью выше 25 °С.

Не брать в работу гемолизованную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты!

8.2 Процедура получения плазмы крови

Для получения плазмы пробирку с периферической венозной кровью центрифугируют 10-15 мин при 2000-3000g при комнатной температуре (от 18°С до 25°С).

Промаркировать необходимое количество пробирок типа эппендорф объемом 1,5-2,0 мл.

Аккуратно, не задевая клеточную фракцию, отобрать весь верхний слой плазмы автоматическим дозатором и перенести в отдельные одноразовые промаркированные пробирки объемом 1,5-2,0 мл. Категорически не допускается попадание в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами.

Полученные пробирки объемом 1,5-2,0 мл с плазмой центрифугировать второй раз 15 минут при 13 000 g или 10 минут при 16 000 g. Автоматическим дозатором отобрать плазму, не затрагивая осадка на дне пробирки, и перенести в новые промаркированные пробирки объемом 1,5-2,0 мл. Полученную плазму можно использовать для выделения ДНК или заморозить для дальнейшего использования.

Выделять ДНК следует из 4-5 мл плазмы и растворять в конечном объеме не более 110 мкл. При анализе образца только на одну мутацию рекомендуется сократить объем элюента до 50 мкл.

Условия хранения плазмы крови:

Полученную плазму после двукратного центрифугирования допускается хранить:

- при температуре не выше 4–8 °С — не более 5 суток;
- при температуре не выше минус 20°С — в течение месяца;
- при температуре минус 70 °С — длительно.

Перед началом выделения пробирки с плазмой необходимо разморозить при комнатной температуре. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

8.3 Процедура выделения ДНК из плазмы крови

Для экстракции ДНК из плазмы крови рекомендуется использовать комплект реагентов:

- Набор реагентов для выделения свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови (ДНК-Плазма-М-RT) по ТУ 21.20.23-010-97638376-2017 (ООО «ТестГен», Россия), регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9185 от 07.11.2019;

- Набор QIAamp® DSP Circulating Nucleic Acid (NA) Kit (QIAGEN GmbH, Германия), регистрационное удостоверение № РЗН 2021/15704 от 08.11.2021.

Для выполнения выделения ДНК необходимо соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

ВНИМАНИЕ! Для более достоверного результата, с полученной ДНК рекомендуется ставить ПЦР-РВ сразу после процедуры выделения.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

Полученные пробы свободно циркулирующей ДНК можно хранить при температуре от +2 до +8°C не более 12 часов до проведения анализа.

8.4 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Тест-EGFR-плазма» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

- 1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);
- 2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов в -данном случае, загрязнение клинического образца компонентами крови (гемоглобин, триглицериды) может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;
- 3) вещества, добавляемые во время подготовки образца - в данном случае, антикоагулянты.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ приведены в таблице 4.

Таблица 4

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Триглицериды	37 ммоль/л
Экзогенные интерферирующие вещества	
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Гефитиниб	0,05 мг/мл
Эрлотиниб	0,02 мг/мл
Этопозид	0,02 мг/мл
Паклитаксел	0,006 мг/мл
Гемцитабин	0,04 мг/мл
Цисплатин	0,002 мг/мл

По результатам серии ПЦР-реакций с контрольными образцами, к которым интерферирующее вещество не было добавлено, и контрольных образцов с добавлением потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-EGFR-плазма», не оказывают интерферирующего влияния на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- для исследования не пригодны образцы плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);
- не допускается использование образцов плазмы, загрязнённых сгустками лейкоцитов или эритроцитов в процессе отделения;
- не брать в работу гемолизированную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице 5.

1. До начала работы следует полностью разморозить при комнатной температуре все реагенты набора (необходимые в работе в текущее время).

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

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.

Перед проведением ПЦР необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём, с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20-30 минут.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

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

Общий объём реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции.

1. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельных стерильных пробирках смешать из расчета на одну реакцию все необходимые компоненты согласно расчетной таблице 5. Необходимо использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

2. При работе с малыми объемами вязких жидкостей (таких как Taq-полимераза) рекомендуется готовить микс для 5-10 реакций, чтобы отбирать автоматической пипеткой не менее 1 мкл жидкости. Отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не отобрать избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

Таблица 5 - Приготовление реакционных смесей (в расчете на одну пробирку для ПЦР)

Наименование мастермикса	Компоненты для приготовления мастермикса			Необходимое количество пробирок для ПЦР на один образец и КО
	ПЦР-смесь (мкл)	Тақ (мкл)	ОКО (мкл)	
<i>Норма</i>	4	0,4	5,6	4
<i>del</i>	4	0,4	5,6	6
<i>L858R</i>	4	0,4	5,6	6
<i>T790M</i>	4	0,4	5,6	6

Таблица 6 - Рекомендуемый порядок расположения реакций

96-луночный планшет												
Мастер-микс	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Норма</i>	ОКО	ПКО-1к 0%	ПКО-10к 0%	О1			О2			О3		
<i>del</i>	ОКО	ПКО-0,5%	ПКО-5%	О1	О1	О1	О2	О2	О2	О3	О3	О3
<i>L858R</i>	ОКО	ПКО-0,5%	ПКО-5%	О1	О1	О1	О2	О2	О2	О3	О3	О3
<i>T790M</i>	ОКО	ПКО-0,5%	ПКО-5%	О1	О1	О1	О2	О2	О2	О3	О3	О3
-												
-												
-												
-												

Примечание: О1 – ДНК, выделенная из исследуемого образца №1 и т.д.

3. Внести по 10 мкл каждого мастермикса в соответствующие пробирки (лунки) согласно рекомендованному порядку размещения реакций (см. табл. 6).

4. Внести по 10 мкл раствора ОКО в пробирки (лунки) для ОКО (см. табл. 6).

5. Внести по 10 мкл смеси стандартов ПКО в соответствующие пробирки (лунки) для ПКО (см. табл. 6).

6. Внести по 10 мкл выделенной ДНК в пробирки (лунки) для образца (см. табл. 6).

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

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

Б) ПЦР-амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

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

1. Установить ПЦР-планшет/пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Программы амплификации указаны в таблице 5 и 6.

3. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок/лунок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

Таблица 5 – Программа амплификации для приборов производства ООО «ДНК-Технология»

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	94	10 сек	60
3	62	60 сек	

Таблица 6 – Программа амплификации для приборов других производителей

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	94	10 сек	60
3	60	60 сек	

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействован один канал детекции FAM/Green.

5. Запустить программу с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения работы амплификатора приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

– по каналу **FAM/Green** в реакционной смеси *Норма* регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормального варианта гена *EGFR*.

– по каналу **FAM/Green** в реакционных смесях *del*, *L858R*, *T790M* регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК мутантных вариантов гена *EGFR* и делеций в экзоне 19.

Результаты интерпретируются на основании определенных значений C_p ("crossing point"), вычисленных программным обеспечением к амплификатору с помощью геометрического метода анализа оптических измерений.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным при прохождении реакций с ПКО-1к в смеси «Норма» не позднее 32 цикла ($C_p \leq 32$), ПКО 5% и ПКО 0,5% в смесях «del», «L858R», «T790M» – не позднее 35 цикла ($C_p \leq 35$).

В пробирках с ОКО по каналу FAM/Green отсутствует график накопления флуоресценции.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах с помощью программного обеспечения

Для автоматической обработки результатов рекомендуется использовать программное обеспечение, находящееся на специализированном сайте по адресу: <https://pcr24.ru/>.

Перед использованием требуется обязательная авторизация для ведения учетной записи.

Последовательность действий на сайте:

1. Перейти на вкладку Анализатора: <https://pcr24.ru/analyzer>;
2. Выбрать « добавить новый эксперимент»;
3. В вышедшее окно загрузить файл эксперимента и нажать «Далее»;
4. В следующей вкладке «Шаг 2: анализ заполнение теста» нажать на кнопку «Добавить тест» и в выпадающем списке выбрать «EGFR-плазма»;
5. Соотнести образцы, указанные в таблице слева, с их расположением на планшете или роторе амплификатора, которое показано справа.
Если проводился анализ нескольких клинических образцов, можно создать дополнительные поля слева нажатием на знак «добавить пациента». Нажать «Далее».
6. В следующей вкладке «Шаг 3: анализ данных» нажать «Анализировать», дождаться обработки данных, выбрать кнопку «Готово».

В качестве альтернативного метода интерпретации результатов можно использовать также метод, описанный ниже.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах с помощью ручного подсчета

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

Дальнейшие последовательные этапы интерпретации результатов по исследуемым образцам расписаны ниже. В таблице 8 представлены сводные данные по интерпретации результатов.

I. Значения пороговых циклов для всех реакционных смесей должны находиться в пределах значений, установленных в таблице 7.

Таблица 7 – Область допустимых значений C_p в образцах.

Пробирки	Канал	Диапазон C_p
<i>del, L858R, T790M</i>	FAM/Green	25-38
<i>Норма</i>	FAM/Green	$\geq 24^*$ (рекомендуется C_p , находящееся между значениями пороговых циклов ПКО-10к и ПКО-1к)

* Значения C_p выше 32 могут свидетельствовать о наличии ингибиторов в образце или недостаточном количестве ДНК.

При значениях C_p ниже 24 возможен ложноположительный результат из-за вероятности контаминации геномной ДНК из разрушенных клеток.

II. Если значение образца находится в области допустимых значений C_p , то далее по формуле можно вычислить приблизительное количество копий свободно циркулирующей нормальной ДНК ($N_{\text{норма}}$) с помощью значений C_p образца (C_p -норма образца) в реакционной смеси *Норма*:

$$N_{\text{норма}} = 1000 \bullet 2^{(C_p - \text{ПКО-1к} - C_p\text{-норма образца})}$$

Рекомендуемое значение $N_{\text{норма}}$ от 1 000 до 10 000.

III. Принцип аллель-специфичного определения мутаций в образце допускает наличие неспецифичного фонового сигнала при высокой концентрации ДНК дикого типа, поэтому для повышения надежности анализа в области низких концентраций мутантной ДНК необходимо вычислить предел обнаружения мутации (C_{lim}) для рассчитанного количества копий нормальной ДНК:

$$C_{\text{lim}} (\%) = 2000/N_{\text{норма}}$$

Полученное значение C_{lim} следует учитывать при интерпретации результатов каждой мутации и рассматривать результаты ниже предела обнаружения как отрицательные.

IV. Для вычисления содержания мутации по каждой реакционной смеси (*del, L858R, T790M*) для каждого образца берется минимальное значение C_p (C_p -мутация-минимум) из трех дублей и используется в формуле:

$$C_{\text{мутация}} (\%) = 100 \bullet 2^{(C_{\text{р-норма}} - C_{\text{р-мутация-минимум}})}$$

Таблица 8 - Интерпретация результатов в исследуемых образцах по каналу FAM/Green.

Результат анализа	Пробирки со смесью	
	<i>del / L858R / T790M</i>	<i>Норма</i>
Мутантная ДНК гена <i>EGFR</i> обнаружена	Сигнал образца в двух пробирках из трех или во всех имеет значение $C_{\text{р}} \leq 38$.	Значение $C_{\text{р}} \geq \text{ПКО-10к}$
Мутантная ДНК гена <i>EGFR</i> не обнаружена или ниже предела обнаружения	В трех пробирках образца сигнал имеет значение $C_{\text{р}} > 38$. Либо сигнал образца в двух или трех пробирках из трех имеет значение $C_{\text{р}} \leq 38$, но при этом $C_{\text{мутация}}$ для данного образца ниже вычисленного C_{lim} для мутации этого же образца.	Значение сигнала $C_{\text{р}}$ в пробирке <i>Норма</i> не выходит за пределы диапазона значений между $C_{\text{р}} \text{ ПКО-10к}$ и ПКО-1к .
Сомнительный	Сигнал только в одной пробирке из трех имеет значение $C_{\text{р}} \leq 38$.	Значение $C_{\text{р}} \geq \text{ПКО-10к}$
Невалидный	В трех пробирках образца сигнал имеет значение $C_{\text{р}} > 38$.	Сигнал в пробирке <i>Норма</i> имеет значение $C_{\text{р}} > 32$.

Если для пробы получен **невалидный** либо **сомнительный результат**, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца плазмы.

Получение **повторного сомнительного результата** может означать, что образец в выбранный момент времени непоказателен для данного вида анализа, так как содержит очень низкую концентрацию мутантной ДНК. В таком случае пациент требует дальнейшего контроля показателя наличия мутации в динамике (особенно при проявлении клинических признаков прогрессии онкологического заболевания).

Получение **повторного невалидного результата** обычно

означает, что взятый образец непригоден для данного вида анализа.

Набор непригоден к дальнейшему использованию, если сигнал по каналу FAM в реакционных смесях «Норма», «del», «L858R», «T790M» в пробирках с ПКО ниже установленного порогового значения, и этот результат устойчиво воспроизводится.

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный положительный или отрицательный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом-онкологом) с учётом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности для определения показаний к таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназы *EGFR* и мониторинга ответа на них при обследовании пациентов с диагнозом немелкоклеточный рак лёгкого (НМРЛ) III-IV стадии заболевания.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «Тест-EGFR-плазма» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 18 до минус 25°C в течение всего срока годности набора.

ПЦР-смеси Норма, del, L858R, T790M хранить в защищенном от света месте.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

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

Транспортирование

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

Набор реагентов транспортировать при температуре от минус 18 до минус 25°C. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8°C не более трех суток.

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

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

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

Срок годности

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

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 18 до минус 25°C.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом, в защищенном от света месте.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «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».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 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» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

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

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

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

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов «Тест-EGFR-плазма» в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования