

unzugängliche
Abschrift



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

(INSTRUCTION FOR USE)

НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800
производства Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany

РАЗРАБОТЧИК:

Roche Diagnostics GmbH, "Рош Диагностика ГмбХ", Германия.
Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany

Approved by

Roche Diagnostics GmbH

Date: July 6, 2017

Andrea Weber
Project Manager Global Regulatory
Affairs

Stamp

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim

2017

Roche Diagnostics GmbH; Sandhofer Strasse 116; D-68305 Mannheim, Germany; Telefon +49-621-759-0; Telefax +49-621-759-2890

Sitz der Gesellschaft: Mannheim - Registergericht: AG Mannheim HRB 3962 - Geschäftsführung: Dr. Ursula Redeker, Sprecherin; Edgar Vieth -
Aufsichtsratsvorsitzender: Dr. Severin Schwan

Тест cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

cobas®

Для диагностики *IN VITRO*.

Набор реагентов для выделения ДНК
cobas® DNA Sample Preparation Kit

DNA SP

на 24 образца

P/N: 05985536190

Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600
cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

BRAF

24 теста

P/N: 05985595190

ВНИМАНИЕ: Приобретение данного продукта позволяет покупателю использовать его для амплификации и детекции последовательностей нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ассоциированных процессов для диагностики *in vitro* для решения задач, описанных в данной инструкции. Общий патент или какая-либо лицензия, за исключением указанного права на использование данного продукта, не передаются при приобретении данного продукта.

НАЗНАЧЕНИЕ

Основное назначение теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation** - выявление мутаций BRAF V600 в ДНК, выделенной из фиксированных в формалине образцов ткани меланомы человека в парафиновых блоках.

РЕЗЮМЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Активирующие мутации в проонкогене BRAF встречаются при многих видах рака человека, включая злокачественную меланому, колоректальный рак, рак яичника и щитовидной железы.¹

² Мутации в гене BRAF выявляют в 40%-60% случаев злокачественной меланомы.³ Мутации BRAF встречаются также в доброкачественных невусах,⁴ что свидетельствует о возникновении мутаций на ранних этапах онкогенеза. Открытие соматических мутаций в гене BRAF при меланоме и раках других типов позволило определить ключевую роль киназы BRAF в сигнальной системе, контролирующей клеточную пролиферацию, дифференциацию и гибель клеток. В нормальной клетке BRAF является элементом строго регулируемой сигнальной системы, передающей сигнал от рецепторов фактора роста (таких как EGFR) через RAS, RAF, MEK и ERK. Онкогенные мутации в BRAF приводят к активации функции киназы, стимулируя активность сигнальной системы RAF-MEK-ERK в отсутствие типичных факторов роста.

Большинство мутаций в гене BRAF при меланоме и других опухолях человека происходит в кодоне 600.⁵ Основной мутацией в кодоне 600 является замена V600E (GTG>GAG). Ряд мутаций, затрагивающих два нуклеотида в кодоне 600 [V600K (GTG>AAG), V600R (GTG>AGG), V600E2 (GTG>GAA), и V600D (GTG>GAT)], также описаны, но встречаются реже, обычно при меланоме и гораздо реже при других типах рака, например, колоректальном.

Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** является тестом, основанным на ПЦР в реальном времени, и предназначен для выявления мутации V600E (T1799A).

ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** основан на двух процессах: (1) пробоподготовка вручную для получения геномной ДНК из фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET); (2) ПЦР-амплификация и детекция ДНК-мишени с помощью пары комплементарных праймеров и двух олигонуклеотидных зондов, меченных разными флуоресцентными красителями. Один зонд предназначен для выявления последовательности BRAF V600 дикого типа, второй зонд – мутантной последовательности V600E. В постановку включаются два внешних контроля, а аллель дикого типа служит внутренним контролем на всей протяженности постановки.

Пробоподготовка

Обработка образцов FFPEТ и выделение геномной ДНК проводится с помощью набора **cobas®** DNA Sample Preparation Kit, данный метод ручной пробоподготовки основан на связывании нуклеиновых кислот со стеклянным волокном. Депарафинизированные секции образцов FFPEТ толщиной 5 мкм лизируют в ходе инкубации с протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером при повышенной температуре, в результате происходит освобождение нуклеиновых кислот и разрушение ДНКаз. Далее в лизирующую смесь вносится изопропанол, и смесь центрифугируется через колонку с фильтром из стеклянного волокна. Во время центрифугирования геномная ДНК связывается с поверхностью стеклянного волокна фильтра. Несвязавшиеся вещества, такие как соли, белки и прочие компоненты клетки удаляются при центрифугировании. Связавшиеся нуклеиновые кислоты промываются и затем элюируются водным раствором. Концентрацию геномной ДНК определяют с помощью спектрофотометра и приводят к значению, необходимому для проведения амплификации и детекции. ДНК мишени затем подвергается амплификации и детекции в анализаторе **cobas z 480** с помощью реагентов набора **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**.

ПЦР-амплификация и детекция

Выбор мишени

В тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** используются праймеры, позволяющие амплифицировать участок величиной 116 пар оснований геномной ДНК, в котором находится кодон 600 экзона 15 гена BRAF. Весь ген BRAF не амплифицируется. Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** разработан для выявления нуклеотидной замены 1799 T>A в гене BRAF, которая приводит к аминокислотной замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E). Зонды TaqMan, меченные флуоресцентными красителями, специфичные для мишеней BRAF дикого типа и V600E, связываются с последовательностями дикого типа и мутантными последовательностями, соответственно. Детекция последовательностей дикого типа и V600E происходит в отдельных оптических каналах.

Амплификация мишени

Для амплификации мишени используется ДНК-полимераза Z05 *Thermus species*. Сначала реакционная смесь ПЦР нагревается для денатурации геномной ДНК, чтобы открылись сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси прямой и обратный праймеры связываются с последовательностями ДНК-мишени. ДНК-полимераза Z05 в присутствии ионов двухвалентного металла и при избытке dNTP удлинит каждый связавшийся праймер, в результате образуется вторая цепь ДНК. На этом первый цикл ПЦР завершается, и образуется двухцепочечная копия ДНК-мишени, т.е. фрагмента гена BRAF длиной 116 пар оснований. Данный процесс повторяется заданное число раз, в каждом цикле количество копий ДНК ампликона удваивается. Амплифицируется только участок гена BRAF, расположенный между праймерами.

Автоматизированная детекция в режиме реального времени

В тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** используется метод ПЦР в реальном времени. Каждый специфичный для мишени олигонуклеотидный зонд в реакционной смеси мечен флуоресцентным красителем, функционирующим как репортерный краситель, а также молекулой гасителя, которая в интактном зонде абсорбирует (гасит) флуоресцентный сигнал репортерного красителя. Во время каждого цикла амплификации зонд, комплементарный последовательности одноцепочечной ДНК ампликона, связывается с ней, после чего разрушается ДНК-полимеразой Z05, обладающей нуклеазной активностью 5'-3'. В результате этого репортерный краситель освобождается от гасителя, и при возбуждении репортерного красителя светом соответствующего спектра можно измерить флуоресцентный сигнал определенной длины волны. Чтобы специфично пометить зонды для мишени BRAF дикого типа (WT; V600) и для мутации BRAF V600E, используются два разных репортерных красителя. Амплификацию этих двух последовательностей BRAF можно детектировать независимо в одной реакции благодаря измерению флуоресцентного сигнала двух разных длин волн в соответствующих оптических каналах.

Избирательная амплификация

Избирательность амплификации нуклеиновой кислоты – мишени достигается в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** за счет применения фермента AmpErase (урацил-N-гликозилазы) и трифосфата дезоксиуридина (dUTP)⁶. Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси dNTPs в реагенте Мастермикс. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом AmpErase до начала амплификации ДНК-мишени. Фермент AmpErase, входящий в состав реагента Мастермикс, катализирует расщепление содержащей дезоксиуридин ДНК по дезоксиуридиновому основанию, открывая дезоксирибозную цепь в позиции C1. При нагревании на первом этапе цикла цепь ДНК ампликона разрывается в позиции дезоксиуридина и, следовательно, она не может в дальнейшем быть амплифицированной. Фермент AmpErase инактивируется при нагревании выше 55°C, т.е. на протяжении температурных циклов, и поэтому не разрушает ампликоны мишени.

РЕАГЕНТЫ

Набор для пробоподготовки
cobas® DNA Sample Preparation Kit
(P/N: 05985536190)

DNA SP

24 теста

DNA TLB

(Лизирующий буфер для тканей DNA Tissue Lysis Buffer)

1 x 10 мл

Буфер Tris-HCl

Хлорид калия

0.04% ЭДТА

0.1% Тритон X-100

0.09% азид натрия

PK

(Протеиназа К)

1 x 100 мг

Протеиназа К (лиофилизованная)



Xn протеиназа К

опасно

DNA PBV

(Связывающий парафин буфер DNA Paraffin Binding Buffer)

1 x 10 мл

Буфер Tris-HCl

49.6% гуанидин гидрохлорид

0.05% мочевины

17.3% тритон X-100



Xn 49.6% (в/в) гуанидин HCl

опасно

WB I

(Промывочный буфер DNA Wash Buffer I)

1 x 25 мл

Буфер Tris-HCl

64% гуанидин гидрохлорид



Xn 64% (в/в) гуанидин HCl

опасно

WB II

(Промывочный буфер DNA Wash Buffer II)

1 x 12.5 мл

Буфер Tris-HCl	
Хлорид натрия	
DNA EB	
(Буфер для элюции ДНК)	1 x 6 мл
Буфер Tris-HCl	
0.09% азид натрия	
FT	
(пробирки с фильтром, с крышкой)	1 x 25 шт.
СТ	
(пробирки для сбора)	3 x 25 шт.
Набор cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test	24 теста
(P/N: 05985595190)	
RXNMIX	
(Реакционная смесь)	3 x 0.16 mL
Трициновый буфер	
Ацетат калия	
Гидроксид калия	
Глицерин	
Твин 20	
ЭДТА	
5% диметил сульфоксид	
< 0.09% dNTP	
< 0.10% ДНК-полимераза Z05 (бактериальная)	
< 0.10% фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза)	
(бактериальная)	
<0.003% олигонуклеотидный аптамер	
0.08% азид натрия	
MGAC	
(Ацетат магния)	3 x 0.15 mL
Ацетат магния	
0.09% азид натрия	
BRAF OM	
(BRAF смесь олигонуклеотидов)	3 x 0.13 mL
Буфер Tris-HCl	
ЭДТА	
0.09% азид натрия	
Поли-гА РНК (синтетическая)	
< 0.01% Прямой и обратный праймеры BRAF	
< 0.01% Меченные флуоресцентными красителями зонды	
BRAF	
BRAF MUT	
(BRAF мутантный контроль)	2 x 0.13 mL
Буфер Tris-HCl	
ЭДТА	
0.09% азид натрия	
< 0.001% плазмидная ДНК (бактериальная), несущая	
мутантную последовательность BRAF	
< 0.001% плазмидная ДНК (бактериальная), несущая	
последовательность BRAF дикого типа	
BRAF WT	
(BRAF контроль «дикий тип»)	2 x 0.13 mL
Буфер Tris-HCl	

BRAF

ЭДТА

0.09% азид натрия

< 0.001% плазмидная ДНК (бактериальная), несущая последовательность BRAF дикого типа

DNA SD

(буфер для разведения образцов ДНК)

2 x 1 mL

Буфер Tris-HCl

0.09% азид натрия

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

A. ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*.

- B. Данный тест предназначен для анализа фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках.
- C. Не пипетировать ртом.
- D. Не есть, не пить и не курить в рабочих зонах лаборатории.
- E. Не допускайте контаминации реагентов микроорганизмами и ДНК.
- F. Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с федеральными и местными правилами.
- G. Не используйте наборы после истечения срока годности.
- H. Не объединяйте реагенты из разных наборов или серий наборов.
- I. Сведения о безопасности материалов (MSDS) можно получить по запросу в Вашем представительстве Roche.
- J. Для предотвращения контаминации необходимо работать в перчатках и менять их при работе с образцами и с реагентами **cobas® 4800**.
- K. Для предотвращения контаминации рабочего мастермикса образцами ДНК, амплификацию и детекцию необходимо проводить в зоне, отделенной от зоны в которой проводится выделение ДНК. Рабочая зона для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед приготовлением рабочего мастермикса. Для выполнения качественной очистки все поверхности, включая штативы и дозаторы, необходимо протереть 0.5% раствором гипохлорита натрия* и затем протереть 70% этанолом.
- L. **DNA PBB, WB I и WB II** содержат гуанидин гидрохлорид. При разливе жидкостей, содержащий данный реагент, проведите очистку подходящим лабораторным детергентом и затем водой. При разливе потенциально инфекционного материала, очистите поверхность сначала лабораторным детергентом и водой, и затем 0.5% раствором гипохлорита натрия. Если разлив произошел в анализаторе **cobas z 480**, следуйте инструкциям, приведенным в Руководстве пользователя системы **cobas® 4800**.

Примечание: Коммерческое жидкое бытовое моющее средство обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5.25%. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0.5% раствор гипохлорита натрия.

- M. Все образцы необходимо рассматривать как инфекционные и соблюдать при работе с ними правила безопасной работы в лаборатории, указанные в документах *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁹ и CLSI Document M29-A3.¹⁰
- N. **DNA TLB** и **DNA PBB** содержат Тритон X-100, вызывающий раздражение слизистых. Избегайте попадания в глаза, на кожу и слизистые.
- O. **DNA TLB, DNA PBB, DNA EB, RXNMIX, MGAC, BRAF MUT, BRAF WT** и **DNA SD** содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб, образуя взрывоопасные азиды металлов. Выливая содержащие азид натрия растворы в лабораторную раковину, смывайте большим объемом воды для предотвращения образования азидов.

- P. Ксилен является опасным реагентом, работа с ним должна проводиться в укрытии. Утилизация проводится с химическими отходами в соответствии с федеральными и местными правилами.
- Q. При работе с любыми реагентами пользуйтесь одноразовыми перчатками, лабораторными халатами и защитой для глаз. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами и слизистой. В случае такого контакта немедленно смойте большим количеством воды, в противном случае могут возникнуть ожоги. Разлитые реагенты смойте водой и вытрите насухо.
- R. Все расходные материалы предназначены для однократного применения.
- S. Не используйте расходные материалы после истечения их срока годности.
- T. Не используйте раствор гипохлорита натрия (бытового моющего средства) для очистки анализатора **cobas z 480**. Проводите очистку анализатора **cobas z 480** в соответствии с Руководством пользователя системы **cobas® 4800**.
- U. Дополнительные меры предосторожности, безопасности и процедуры для снижения риска контаминации при работе с анализатором **cobas z 480** приведены в Руководстве пользователя системы **cobas® 4800**.
- V. Рекомендуется использовать одноразовые дозаторы и свободные от ДНКаз наконечники для пипеток.

ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И РАБОТЫ

- A. Не замораживайте реагенты.
- B. Храните реагенты **DNA TLB**, **DNA PBB**, **WB I**, **WB II**, **DNA EB**, **FT** и **CT** при 15-30°C. После открытия эти реагенты могут быть использованы 8 раз или стабильны в течение 90 дней.
- C. Храните **PK** при 15-30°C. После внесения стерильной свободной от нуклеаз воды в **PK**, храните растворенную **PK** в аликвотах по 450 мкл при -20°C. После растворения **PK** необходимо использовать в течение 90 дней, или до истечения срока годности набора.
- D. После внесения абсолютного этанола, храните буферы **WB I** и **WB II** при 15-30°C. Данные рабочие растворы могут быть использованы 8 раз или стабильны в течение 90 дней.
- E. Храните **RXNMIX**, **MGAC**, **BRAF OM**, **BRAF MUT**, **BRAF WT** и **DNA SD** при 2-8°C. После открытия эти реагенты могут быть использованы до 4 раз в течение 60 дней, или до истечения срока годности набора.
- F. **BRAF OM** и рабочий мастермикс (получаемый при добавлении **BRAF OM** и **MGAC** в **RXNMIX**) необходимо защищать от длительного воздействия света.
- G. Рабочий мастермикс (получаемый при добавлении **BRAF OM** и **MGAC** в **RXNMIX**) необходимо хранить при 2-8°C в темноте. Выделенные образцы и контроли необходимо внести в рабочий мастермикс (MMX) в течение 1 часа после его приготовления.
- H. Выделенные образцы стабильны до 24 часов при 15-30°C, до 14 дней при 2-8°C и до 60 дней замороженными при -20°C. Подготовленные образцы (выделенная ДНК) стабильны после 4 циклов замораживания/оттаивания.
- I. Амплификацию необходимо начать в течение 1 часа после внесения выделенных образцов в рабочий мастермикс (полученный в результате внесения **BRAF OM** и **MGAC** в **RXNMIX**).

ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- A. Набор для пробоподготовки **cobas® DNA Sample Preparation**

DNA SP

24 теста
 Kit
 (P/N: 05985536190)
DNA TLB
 (Лизирующий буфер для тканей)
PK

(Протеиназа К)

DNA PBB

(Буфер для связывания парафина)

WB I

(Промывочный буфер I)

WB II

(Промывочный буфер II)

DNA EB

(Буфер для элюции ДНК)

FT

(Пробирки с фильтром, с крышкой)

CT

(Пробирки для сбора)

В. Набор **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**

(P/N: 05985595190)

RXNMIX

(Реакционная смесь) (Крышка с прозрачным ярлыком)

MGAC

(Ацетат магния) (Крышка с желтым ярлыком)

BRAF OM

(BRAF смесь олигонуклеотидов) (Черная крышка с белым ярлыком)

BRAF MUT

(BRAF мутантный контроль) (Крышка с красным ярлыком)

BRAF WT

(BRAF контроль дикого типа) (Крышка с синим ярлыком)

DNA SD

(Раствор для разведения образцов ДНК) (Крышка с фиолетовым ярлыком)

BRAF

24 теста

НЕОБХОДИМЫЕ НЕПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Ксилол (ACS, $\geq 98,5\%$ ксилола)
- Абсолютный этанол (для молекулярной биологии)
- Изопропанол (ACS, $\geq 99,5\%$)
- Стерильная свободная от ДНКаз вода (для молекулярной биологии)
- Стерильные одноразовые серологические пипетки: 5 и 25 мл
- Микроплашка **cobas® 4800 System** (AD-плашка) и заклеивающая пленка (Roche P/N 05232724001)
- Дозаторы с переменным объемом*: (объемом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл) со свободными от ДНКаз наконечниками с аэрозольным барьером
- Дозатор (Drummond P/N: 4-000-100 или эквивалент)
- Настольная центрифуга, рассчитанная на 20000 x g

- Два (2) термоблока, рассчитанных на нагревание микроцентрифужных пробирок до 56°C и 90°C**
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл, стерильные, свободные от ДНКаз/РНКаз, для ПЦР (Eppendorf, Cat# 022363212)
- Спектрофотометр NanoDrop UV-Vis (Thermo Scientific ND-1000 или ND-2000)**
- Вортекс**
- Штативы для микроцентрифужных пробирок
- Одноразовые перчатки, без талька
- Калиброванные термометры для термоблока**
- Водяная баня** рассчитанная на 37°C
- Бритва с одной острой стороной

* Работа с дозаторами должна проводиться в соответствии с инструкциями производителя, их точность должна составлять 3% от указанного объема. Свободные от ДНКаз наконечники с аэрозольным барьером должны использоваться везде, где это указано в инструкции, для предотвращения деградации образцов и перекрестной контаминации.

**Эксплуатация всего оборудования должна осуществляться в соответствии с инструкциями производителя.

Приборы и программное обеспечение

- Анализатор **cobas z 480**
- Контрольный блок **cobas® 4800 SR2 System** с образом OSXP
- Программа **cobas® 4800 SR2 System** версия 2.0
- Программа **BRAF Analysis Package Software** версия 1.0
- Сканер штрих-кода (Roche P/N 05339910001)
- Принтер HP P2055d (Roche P/N 05704375001)

СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Примечание: Обращайтесь со всеми образцами как с содержащими инфекционные агенты.

А. Сбор образцов

Набор **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** валидирован для работы с образцами FFPET.

В. Транспортировка образцов

Образцы FFPET можно транспортировать при температуре 15-30°C. Транспортировка образцов FFPET должна выполняться в соответствии с федеральными и местными правилами перевозки этиологических агентов.¹¹

С. Хранение образцов

Образцы FFPET при хранении при 15-30°C стабильны в течение 9 месяцев после получения. Секции толщиной 5 мкм, нанесенные на предметные стекла, могут храниться при 15-30°C до 60 дней.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА

Примечание: Все реагенты, за исключением RXNMIX, MGAC, и BRAF OM, должны быть комнатной температуры перед началом работы. Реагенты RXN MIX, MGAC и BRAF OM можно вынимать из хранения при 2-8°C непосредственно перед приготовлением рабочего мастермикса.

Примечание: Для теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test используются только образцы FFPEТ ткани меланомы в секциях толщиной 5 мкм, в которых доля опухолевой ткани составляет не менее 50%. Образцы, в которых содержится менее 50% опухолевой ткани должны подвергаться макродиссекции перед депарафинизацией.

Примечание: Подробные инструкции по работе с анализатором cobas z 480 приведены в Руководстве пользователя системы cobas® 4800.

Примечание: Термоблоки для инкубации микроцентрифужных пробирок необходимо включить и выставить на 56°C и 90°C.

Объем постановки

Минимальный объем постановки с помощью набора cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test составляет 3 образца плюс контроли, максимальный - 24 образца плюс контроли. Можно анализировать и менее 3 образцов плюс контроли, однако это приведет к нехватке реагентов для тестирования 24 образцов плюс контроли, на которое рассчитан набор. Набор cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test содержит реагенты, достаточные для проведения 8 постановок по 3 образца плюс контроли. В каждую постановку необходимо включать по одному мутантному контролю cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test Mutant Control [BRAF MUT] и одному контролю дикого типа cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test Wild-type Control [BRAF WT] (см. Раздел "Контроль качества").

Организация постановки

Примечание: В тесте cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test могут анализироваться одновременно в одной постановке до 24 образцов.

Примечание: Для оптимального расхода реактивов постановка теста должна включать как минимум три (3) клинических образца плюс контроли.

Тест cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test состоит из этапа пробоподготовки с набором cobas® DNA Sample Preparation Kit с последующей амплификацией/детекцией в анализаторе cobas z 480 с набором реагентов cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test kit. Объем постановки может составлять от одного образца плюс контроли до 24 образцов плюс контроли.

Подготовка реагентов

1. Растворите протеиназу К (РК), добавив 4.5 мл стерильной (степень очистки для ПЦР) воды в пробирку с помощью стерильной одноразовой серологической пипетки объемом 5 мл. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Сделайте аликвоты растворенной РК по 450 мкл в микроцентрифужных пробирках объемом 1.5 мл и храните при -20°C. Если протеиназа К была растворена ранее и хранилась замороженной, оттайте необходимое количество аликвот до начала депарафинизации (70 мкл растворенной РК необходимо для обработки одного образца).
2. Все растворы, хранящиеся при 15-30°C, должны быть прозрачными. Если в каком-либо реагенте присутствует преципитат, нагрейте реагент на водяной бане при 37°C до полного растворения преципитата. Не используйте реагент, если преципитат растворен не полностью.

3. Приготовьте промывочный буфер DNA Wash Buffer I (**WB I**), добавив 15 мл абсолютного этанола во флакон **WB I**. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер **WB I** при 15°C - 30°C.
4. Приготовьте промывочный буфер DNA Wash Buffer II (**WB II**), добавив 50 мл абсолютного этанола во флакон **WB II**. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер **WB II** при 15°C - 30°C.

Депарафинизация секций FFPEТ на предметных стеклах

Примечание: Ксилол является опасным реагентом. Все этапы депарафинизации должны проводиться под вытяжкой. См. Раздел Меры предосторожности

- A. Поместите предметное стекло с секцией FFPEТ толщиной 5 мкм в контейнер с достаточным объемом ксилена, закрывающим предметное стекло полностью. Инкубируйте 5 минут.
- B. Перенесите предметное стекло в контейнер с достаточным объемом абсолютного этанола, закрывающим предметное стекло полностью. Инкубируйте 5 минут.
- C. Выньте предметное стекло и дайте секции высохнуть на воздухе полностью (5 - 10 минут).
- D. Выполните макродиссекцию, если образец содержит <50% опухолевой ткани.
- E. Промаркируйте по одной микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 мл для каждого образца.
- F. Внесите по 180 мкл **DNA TLB** в каждую маркированную микроцентрифужную пробирку.
- G. Внесите по 70 мкл растворенной **РК** в каждую пробирку с **DNA TLB**
- H. Соскоблите ткань с предметного стекла и поместите в смесь **DNA TLB** и **РК**.
- I. Перейдите к этапу A процедуры **Выделение ДНК**.

Депарафинизация секций FFPEТ не на предметных стеклах

Примечание: Ксилол является опасным реагентом. Все этапы депарафинизации должны проводиться под вытяжкой. См. Раздел Меры предосторожности

- A. Выполните макродиссекцию, если образец содержит <50% опухолевой ткани. Поместите секцию FFPEТ толщиной 5 мкм в промаркированную микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.
- B. Внесите 500 мкл ксилена в пробирку с секцией FFPEТ.
- C. Тщательно перемешайте на вортексе 10 секунд.
- D. Оставьте на 5 минут при 15°C-30°C.
- E. Внесите 500 мкл абсолютного этанола и перемешайте на вортексе 10 секунд.
- F. Оставьте на 5 минут при 15°C-30°C.
- G. Центрифугируйте при 16,000 x g - 20,000 x g в течение 2 минут и удалите супернатант, не задев осадок. Удалите супернатант в химический отходы.
- H. Внесите 1 мл абсолютного этанола и перемешайте на вортексе 10 секунд.
- I. Центрифугируйте при 16,000 x g - 20,000 x g в течение 2 минут и удалите супернатант, не задев осадок. Удалите супернатант в химический отходы.

Примечание: Если осадок плавает в супернатанте, откройте снова 1 минуту при 16,000 x g-20,000 x g. Удалите остатки супернатанта.

- J. Высушите осадок ткани в течение 10 минут при 56°C в термоблоке в открытой пробирке.

Примечание: Прежде чем перейти к следующему этапу, убедитесь, что этанол испарился полностью, осадок должен быть сухим.

Примечание: При необходимости осадки можно хранить 24 часа при 2-8°C.

- K. Растворите осадок ткани в 180 мкл буфера для лизирования тканей (**DNA TLB**).
- L. Внесите 70 мкл растворенной **РК**.
- M. Перейдите к этапу A процедуры **Выделение ДНК**.

Выделение ДНК

A. Перемешайте на вортексе пробирку с образцом/смесью **DNA TLB/ПК** в течение 30 секунд.

Примечание: Ткань должна быть полностью погружена в смесь DNA TLB/ПК.

B. Поместите пробирку в термоблок на 56°C и инкубируйте 60 минут.

C. Перемешайте на вортексе 10 секунд.

Примечание: Ткань должна быть полностью погружена в смесь DNA TLB/ПК.

D. Поместите пробирку в термоблок на 90°C и инкубируйте 60 минут.

Примечание: Во время инкубации подготовьте необходимое количество пробирок с фильтром (FT) поместив картридж в пробирки для сбора (СТ) и промаркируйте каждую пробирку FT/СТ на крышке FT.

Примечание: Для каждого образца потребуется 1 FT, 3 СТ и одна пробирка для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл).

Примечание: Во время инкубации промаркируйте необходимое число пробирок для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл).

E. Дайте пробирке остыть до 15°C-30°C. После охлаждения открутите в центрифуге пробирку, чтобы собрать все ее содержимое на дне.

F. Внесите 200 мкл **DNA PBВ** и перемешайте пипетированием 3 раза.

G. Инкубируйте пробирку при 15°C-30°C в течение 10 минут.

H. Добавьте 100 мкл изопропанола и перемешайте лизат пипетированием 3 раза.

I. Перенесите лизат целиком в маркированную пробирку **FT/СТ**.

J. Центрифугируйте **FT/СТ** при 8,000 x g в течение 1 минуты.

K. Поместите **FT** в новую пробирку **СТ**. Выбросьте содержимое использованной пробирки **СТ** в химические отходы. И использованную пробирку **СТ** утилизируйте надлежащим образом.

L. Внесите 500 мкл рабочего буфера **WB I** в **FT**.

Примечание: Приготовление рабочего раствора WB I описано в разделе Подготовка реагентов.

M. Центрифугируйте **FT/СТ** при 8,000 x g в течение 1 минуты.

N. Выбрасывайте содержимое всех пробирок **СТ** в химические отходы. Поместите **FT** назад в ту же пробирку **СТ**.

O. Внесите 500 мкл рабочего буфера **WB II** в **FT**.

Примечание: Приготовление рабочего раствора WB II описано в разделе Подготовка реагентов.

P. Центрифугируйте **FT/СТ** при 8,000 x g в течение 1 минуты.

Q. Поместите **FT** в новую пробирку **СТ**. Выбросьте содержимое использованной пробирки **СТ** в химические отходы. И использованную пробирку **СТ** утилизируйте надлежащим образом.

R. Центрифугируйте пробирку **FT/СТ** при 16,000 - 20,000 x g в течение 1 минуты, чтобы высушить мембрану фильтра.

S. Поместите пробирку **FT** в заранее промаркированную пробирку для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл). Выбросьте содержимое использованной пробирки **СТ** в химические отходы. И использованную пробирку **СТ** утилизируйте надлежащим образом.

T. Внесите 100 мкл **DNA EB** на центр мембраны **FT** не касаясь самой мембраны **FT**.

U. Инкубируйте **FT** в пробирке для элюции при 15°C-30°C в течение 5 минут.

V. Центрифугируйте **FT** в пробирке для элюции при 8,000 x g в течение 1 минуты, чтобы собрать элюат на дне пробирки для элюции. Утилизируйте **FT** надлежащим образом. Элюат является исходным образцом ДНК.

W. Закройте крышки пробирок для элюции. Перейдите к этапу A раздела Количественный анализ ДНК.

Примечание: Количественный анализ ДНК необходимо проводить немедленно после процедуры выделения ДНК, до хранения образца ДНК.

Определение концентрации ДНК

- А. Перед проведением количественного анализа перемешайте каждый исходный образец ДНК на вортексе 5 секунд.
- В. Проведите количественный анализ ДНК с помощью спектрофотометра NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer (ND-1000 или ND-2000) по протоколу производителя. Используйте в качестве пустого образца **DNA EB**. Обычно требуется 2 измерения. Оба измерения должны укладываться в $\pm 10\%$ друг от друга при концентрации ДНК ≥ 20.0 нг/мкл. Если концентрация ДНК < 20.0 нг/мкл, различия между двумя измерениями должны укладываться в ± 2.0 нг/мкл.
- С. Концентрация исходного образца ДНК должна составлять ≥ 5 нг/мкл для проведения теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**.

Примечание: Каждый исходный образец ДНК должен иметь концентрацию не менее 5 нг/мкл для проведения теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**. Если концентрация исходного образца ДНК < 5 нг/мкл, для данного образца необходимо повторить процедуру пробоподготовки, используя две секции **FFPET** толщиной 5 мкм. Перейдите к этапу А раздела “Депарафинизация секций **FFPET** на предметных стеклах” или к этапу А раздела “Депарафинизация секций **FFPET** не на предметных стеклах”, объединив оба образца ткани в одной пробирке. Продолжите процедуру выделения ДНК. Если концентрация ДНК в исходном образце по-прежнему < 5 нг/мкл, может потребоваться запрос нового образца **FFPET**.

Примечание: Храните неразведенные исходные образцы ДНК при $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ не более 2 недель или при -20°C до 60 дней.

АМПЛИФИКАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ

Примечание: Чтобы не допустить контаминации рабочего мастермикса образцами ДНК, амплификацию и детекцию необходимо проводить в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Рабочую зону для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед началом приготовления рабочего мастермикса. Все поверхности, включая иштативы и дозаторы, необходимо тщательно протереть 0.5% раствором гипохлорита натрия, затем протереть 70% этанолом. Коммерческие чистящие средства обычно содержат гипохлорит натрия в концентрации 5.25%. Разведение 1:10 чистящего средства позволяет получить 0.5% раствор гипохлорита натрия.

Настройка прибора

Подробные инструкции по подготовке анализатора **cobas z 480** приведены в Руководстве пользователя системы **cobas® 4800**.

Создание задания

Подробные инструкции по постановке теста **BRAF** приведены в Руководстве пользователя программы **cobas® 4800** версии 2.0 для теста **cobas® BRAF V600 Mutation Test** (Руководство пользователя **cobas® BRAF**).

Расчет разведения образца ДНК с исходной концентрацией от 5 до 35 нг/мкл

Примечание: Разведение следует выполнять непосредственно перед амплификацией.

Примечание: Для одного образца проводится только одна постановка амплификации/детекции, в которой используется 25 мкл образца ДНК, разведенного до концентрации 5 нг/мкл (всего 125 нг ДНК).

- А. Для каждого образца определите необходимое количество исходной ДНК по следующей формуле:

Необходимый объем исходной ДНК = $(35 \text{ мкл} \times 5 \text{ нг/мкл}) / \text{концентрация исходной ДНК в нг/мкл}$

В. Для каждого образца определите необходимый объем растворителя (**DNA SD**) по следующей формуле:

Необходимый объем DNA SD в мкл = (35 мкл – необходимый объем исходной ДНК в мкл)

Пример:

Концентрация исходной ДНК = 21 нг/мкл

А. Необходимый объем исходной ДНК = (35 мкл x 5 нг/мкл) / 21 нг/мкл = 8.3 мкл

В. Необходимый объем DNA SD в мкл = (35 мкл – 8.3 мкл) = 26.7 мкл

Расчет разведения образца ДНК с исходной концентрацией более 35 нг/мкл

Примечание: Разведение следует выполнять непосредственно перед амплификацией.

Примечание: Для одного образца проводится только одна постановка амплификации/детекции, в которой используется 25 мкл образца ДНК, разведенного до концентрации 5 нг/мкл (всего 125 нг ДНК).

А. Если концентрация исходного образца ДНК >35 нг/мкл, используйте приведенную ниже формулу для расчета объема растворителя (**DNA SD**), необходимого для получения 35 мкл (или больше) разведенного образца ДНК. При этом используется не менее 5 мкл исходного образца ДНК, чтобы исключить вариации, связанные с использованием меньшего объема образца.

Необходимый объем DNA SD в мкл = ((5 мкл исходной ДНК x концентрация исходной ДНК в нг/мкл) / (5 нг/мкл)) – 5 мкл

Используйте рассчитанный объем **DNA SD** для разведения 5 мкл исходного образца ДНК

Пример:

Концентрация исходного образца ДНК = 42 нг/мкл

А. Необходимый объем DNA SD в мкл = ((5 мкл x 42 нг/мкл) / (5 нг/мкл)) – 5 мкл = 37 мкл

В. Используйте рассчитанный объем **DNA SD** для разведения 5 мкл исходного образца ДНК.

Разведение образца

А. Подготовьте необходимое количество микроцентрифужных пробирок объемом 1.5 мл для разведения исходных образцов ДНК, промаркируйте их в соответствии с идентификаторами образцов. Процедура проводится в зоне для внесения образцов.

В. С помощью дозатора и наконечника с аэрозольным барьером, внесите рассчитанный объем растворителя ДНК (**DNA SD**) в промаркированную пробирку.

С. Перемешайте исходный образец ДНК на вортексе в течение 10 секунд.

Д. С помощью дозатора и наконечника с аэрозольным барьером, внесите рассчитанный объем исходного образца ДНК в промаркированную пробирку, содержащую **DNA SD**. Для каждого образца используйте отдельный наконечник.

Е. Закройте пробирки и перемешайте разведенные образцы ДНК на вортексе в течение 10 секунд.

Ф. Смените перчатки.

Приготовление рабочего мастермикса (MMX)

Примечание: Смесь олигонуклеотидов BRAF Oligo Mix и рабочий MMX чувствительны к воздействию света. Все открытые флаконы с BRAF OM и рабочим MMX необходимо защищать от продолжительного воздействия света.

А. Рассчитайте необходимый объем **RXNMIX** по приведенной ниже формуле:

Необходимый объем **RXNMIX** = (число образцов + 2 контроля + 1) x 10 мкл

В. Рассчитайте необходимый объем **BRAF OM** по приведенной ниже формуле:

Необходимый объем **BRAF OM** = (число образцов + 2 контроля + 1) x 8 мкл

С. Рассчитайте необходимый объем **MGAC** по приведенной ниже формуле:

Необходимый объем **MGAC** = (число образцов + 2 контроля + 1) x 7 мкл

Можно воспользоваться таблицей 1 для определения объема каждого реагента, необходимого для приготовления рабочего MMX исходя из количества образцов в постановке.

Таблица 1

		Volumes of Reagents Needed for Working MMx									
		# of Specimens*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µL	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µL	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µL	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Total Vol. µL		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* # of Specimens + 2 Controls + 1

Д. Выньте необходимое число пробирок **RXNMIX**, **BRAF OM** и **MGAC** из хранения при 2°-8°C. Перемешайте каждую пробирку с реагентами на вортексе 5 секунд. Промаркируйте стерильную микроцентрифужную пробирку MMX для приготовления рабочего мастермикса.

Е. Внесите рассчитанный объем **RXNMIX** в промаркированную пробирку MMX.

Ф. Внесите рассчитанный объем **BRAF OM** в промаркированную пробирку MMX.

Г. Внесите рассчитанный объем **MGAC** в промаркированную пробирку MMX.

Н. Перемешайте на вортексе 5 секунд.

Примечание: Используйте только микроплашки **cobas® 4800 System Microwell Plate (AD-плашки)** и заклеивающую пленку (**Roche P/N 05232724001**)

И. Осторожно внесите по 25 мкл рабочего MMX в каждую реакционную лунку микроплашки (AD-плашки). Не касайтесь накопечником плашки за пределами лунки.

Внесение контролей и образцов

А. Внесите 25 мкл контроля **BRAF MUT** в лунку **A01** микроплашки (AD-плашки) и перемешайте пипетированием не менее 2 раз.

В. Сменив наконечник, внесите 25 мкл контроля **BRAF WT** в лунку **B01** микроплашки (AD-плашки) и перемешайте пипетированием не менее 2 раз.

Примечание: Каждая постановка должна включать контроль **BRAF MUT** в позиции **A01** и контроль **BRAF WT** в позиции **B01**, в противном случае постановка будет признана невалидной анализатором **cobas z 480**.

Примечание: При необходимости меняйте перчатки для предотвращения перекрестной контаминации образцов.

С. Используя наконечник с аэрозольным барьером, внесите 25 мкл разведенного образца ДНК в соответствующую лунку с рабочим MMX, начиная с позиции **C01** микроплашки (AD-плашки) в соответствии со схемой, приведенной ниже на Рисунке 1. Перемешайте пипетированием не менее 2 раз. Убедитесь, что вся реакционная смесь находится на дне лунки.

Примечание: ДНК образцов и контролей необходимо внести в микроплашку (AD-плашку) не позднее чем через 1 час после подготовки рабочего мастермикса (MMX)

Рисунок 1

Sample Plate Layout												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRAF MUT	Sample 7	Sample 15	Sample 23								
B	BRAF WT	Sample 8	Sample 16	Sample 24								
C	Sample 1	Sample 9	Sample 17									
D	Sample 2	Sample 10	Sample 18									
E	Sample 3	Sample 11	Sample 19									
F	Sample 4	Sample 12	Sample 20									
G	Sample 5	Sample 13	Sample 21									
H	Sample 6	Sample 14	Sample 22									

- D. Продолжите, пока все тестируемые образцы не будут внесены в лунки микроплашки (AD-плашки).
- E. Заклейте микроплашку (AD-плашку) заклеивающей пленкой (поставляется вместе с плашками). Используйте аппликатор для пленки для гарантии полного приклеивания пленки к микроплашке.
- F. До начала амплификации и детекции убедитесь, что в каждой лунке реакционная смесь находится на дне.

Примечание: Амплификация и детекцию необходимо начать не позднее чем через 1 час после внесения образцов ДНК и контролей в рабочий MMX.

Запуск ПЦР

Подробные инструкции по проведению теста BRAF в системе cobas® 4800 приведены в Руководстве пользователя программного обеспечения версии 2.0 для теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Примечание:** Валидация постановки и образцов выполняется программой cobas® 4800.
- Примечание:** Валидная постановка может содержать как валидные, так и невалидные результаты отдельных образцов.
- Интерпретация результатов для валидной постановки приведена в Таблице 2.

Таблица 2
Интерпретация результатов, полученных для образцов

Результат теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test	Интерпретация
Mutation Detected	Мутация выявлена в кодоне 600 экзона 15 гена BRAF
Mutation Not Detected*	Мутация не выявлена в кодоне 600 экзона 15 гена BRAF
Invalid	Результат невалидный. Повторите тестирование образца в соответствии с инструкциями, приведенными ниже в разделе “Повторное тестирование образцов

	с невалидными результатами”.
Failed	Постановка не прошла из-за ошибки оборудования или программы

* *Результат Mutation Not Detected (Мутация не выявлена) не исключает присутствия мутации в кодоне 600 BRAF, поскольку результат теста зависит от процента мутантных последовательностей, присутствующих в образце, адекватности сбора образца, присутствия ингибиторов, количества ДНК в образце.*

Повторное тестирование образцов с невалидными результатами

А. Повторите разведение исходного образца ДНК, для которого был получен невалидный результат, начиная с этапов “Расчет разведения исходного образца ДНК” и “Разведение образца” в разделе “АМПЛИФИКАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ”.

Примечание: Если для нового разведения осталось недостаточное количество исходного образца ДНК, возьмите новую секцию ткани толщиной 5 мкм и начните постановку с раздела “Депарафинизация секций FFPE на предметном стекле” или раздела “Депарафинизация секций FFPE не на предметном стекле”, затем перейдите к Этапу В ниже.

В. После разведения исходного образца ДНК до концентрации 5 нг/мкл, как описано в разделе “Разведение образца”, выполните дополнительное разведение 1:2, взяв для этого 20 мкл разведенного образца ДНК и добавьте к нему 20 мкл растворителя ДНК (DNA SD).

С. Перейдите к разделу “Приготовление рабочего мастермикса (ММх)” и последующим процедурам амплификации и детекции.

Примечание: Если образец по-прежнему дает невалидный результат после тестирования в разведении 1:2, повторите всю постановку теста, начиная с депарафинизации и выделения ДНК, с новой секцией FFPE толщиной 5 мкм. Для амплификации и детекции используйте стандартный образец ДНК объемом 25 мкл с концентрацией 5 нг/мкл (без дополнительного разведения).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Входящие в состав набора cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test контроли - мутантный (BRAF MUT) и дикого типа (BRAF WT) должны включаться в каждую постановку. Постановка признается валидной, если обе лунки с контролями - мутантным BRAF MUT (A01) и дикого типа BRAF WT (B01) имеют валидный статус. Мутантный контроль имеет валидный статус, если его значение Ct составляет от 23.5 до 30.5 по каналу детекции мутации, и от 23.5 до 29.0 по каналу детекции дикого типа. Контроль дикого типа имеет валидный статус, если его значение Ct составляет >43 по каналу детекции мутации, и от 31.5 до 38.5 по каналу детекции дикого типа. Если контроль BRAF MUT или контроль BRAF WT являются невалидными, постановку необходимо повторить. Приготовьте новое разведение ранее выделенной ДНК, и внесите его в новую микроплашку (AD-плашку) с контролями для проведения амплификации и детекции.

Мутантный контроль BRAF

Результат для контроля BRAF MUT должен быть ‘Valid’. Если результат контроля BRAF MUT постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Контроль дикого типа BRAF

Результат для контроля BRAF WT должен быть ‘Valid’. Если результат контроля BRAF WT постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

ТРЕБОВАНИЯ К ПРОЦЕДУРЕ

Как при проведении любого теста, для выполнения данного теста требуется соблюдение правил надлежащей лабораторной практики. Из-за высокой аналитической чувствительности тестов на

основе ПЦР необходимо предотвращать контаминацию реагентов и амплификационных смесей.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Тест проводится только для указанных типов образцов. Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** валидирован только для меланомных образцов FFPET.
2. Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** валидирован только при работе с набором для выделения геномной ДНК **cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190)**.
3. Детекция мутаций зависит от количества копий мутантной последовательности, присутствующей в образце, на ее эффективность могут оказывать влияние качество образца, количество выделенной ДНК и присутствие ингибирующих веществ.
4. Надежность полученных результатов зависит от адекватности фиксации образца, его транспортировки, хранения и обработки. Следуйте инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору, и в Руководстве пользователя системы **cobas® 4800**.
5. Добавление фермента AmpErase в мастермикс **cobas® 4800 BRAF V600** обеспечивает избирательную амплификацию ДНК мишени; однако для предотвращения контаминации реагентов необходимо соблюдение правил надлежащей лабораторной практики и точное следование инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору.
6. С данным продуктом может работать только персонал, обученный методу ПЦР и работе с системой **cobas® 4800 System v2.0**.
7. Только система **cobas® 4800 System v2.0** валидирована для работы с данным продуктом. Другие ПЦР-системы не валидированы для работы с данным продуктом.
8. Если лаборатория планирует переключиться с одной ПЦР-методики на другую, рекомендуется предварительно выполнить корреляционные исследования.
9. Оценка влияния некоторых потенциальных факторов (например, особенности фиксации образца) не проводилась.
10. Мутации и варианты в участках гена BRAF, перекрываемых праймерами или зондами набора **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**, встречаются редко, однако их наличие может привести к неудаче амплификации аллеля BRAF V600 или детекции мутации в кодоне 600.
11. Присутствие ингибиторов ПЦР может привести к получению ложноотрицательных или невалидных результатов.
12. Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** обнаруживает ограниченную перекрестную реактивность с образцами, содержащими иные мутации, чем V600E (V600K, V600D и V600E2). Подробнее об этом – в разделе Неклинические испытания теста.
13. В образцах FFPET, содержащих деградированную ДНК, тест может не выявлять мутацию V600E.
14. Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** является качественным тестом. Тест не предназначен для количественного определения мутаций.

НЕКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ТЕСТА

Аналитическая чувствительность

Для проведения описанных ниже неклинических испытаний теста, % опухолевой ткани и содержание меланина определяли в патологическом исследовании. Секвенирование в двух направлениях методом Сенгера использовали для отбора тестируемых образцов. Долю (%) мутации в образце определяли методом секвенирования 454 (метод полногеномного пиросеквенирования).

Аналитическая чувствительность – предел детекции (LoD)

Минимальное количество ДНК, с которым правильные результаты получались в 95% случаев, определялось с использованием панелей разведений, приготовленных из образцов трех типов:

- Смеси ДНК из образцов FFPET с мутацией BRAF V600E и дикого типа, с определенным процентом мутантных образцов
- ДНК из трех образцов FFPET с мутацией BRAF V600E

- Смеси ДНК из клеточных линий с мутацией BRAF V600E и дикого типа

Все образцы подвергались 454-секвенированию с целью определения процента мутаций в каждом.

Аналитическая чувствительность при тестировании смеси образцов

Образцы ДНК мутанта BRAF V600E из образцов FFPEТ смешивали с образцами ДНК дикого типа BRAF из образцов FFPEТ и получали один образец с концентрацией мутанта ~10%, три образца с концентрацией мутанта ~5%, и один образец с концентрацией мутанта ~3%. Также тестировали один образец BRAF дикого типа. Процент мутантов после смешивания проверяли 454-секвенированием. Каждый из пяти образцов смеси с мутацией V600E (но не образец дикого типа) затем разводили, получая панель образцов, показанную в Табл. 3.

Таблица 3

Приготовление панели разведений из смешанных образцов

Смесь	Средний % мутантов*	Приготовленные разведения ДНК (нг/25 мкл)**
10% смесь	9% (n=6)	125, 62.5, 31.3
5% смесь 1	5% (n=5)	125, 5, 2.5, 1.3, 0.6, 0.3
5% смесь 2	5% (n=5)	125, 5, 2.5, 1.3, 0.6, 0.3
5% смесь 3	6% (n=5)	125, 5, 2.5, 1.3, 0.6, 0.3
2.5% смесь	3% (n=5)	125, 62.5, 31.3
0% (дикий тип)	---	125

* Средний % мутантов в смеси, определенный 454-секвенированием.

** Количество геномной ДНК, содержащейся в каждом образце данной панели. 25 мкл – объем образца в ПЦР-смеси.

Каждый образец панели тестировали в восьми (8) повторях с тремя сериями набора **cobas®** 4800 BRAF V600 Mutation Test (n=24 для каждого образца панели). Табл. 4 показывает чувствительность каждой смеси FFPEТ, определенную как наименьшее количество ДНК, которое давало результат “Mutation Detected” не менее чем в 95% случаев (строки, выделенные серым).

Полученные результаты продемонстрировали, что тест **cobas®** 4800 BRAF V600 Mutation Test позволяет выявлять мутацию BRAF V600E, если доля мутации составляет $\geq 5\%$ при стандартной концентрации ДНК 125 нг/25 мкл. Способность теста выявлять эту мутацию при более низких концентрациях ДНК показывает, что даже ДНК, деградированная в ходе фиксации, все-таки может быть выявлена. Для образцов BRAF дикого типа все результаты были “Mutation Not Detected”.

Аналитическая чувствительность при тестировании образцов FFPEТ

Для подтверждения выявления мутации с долей 5% в клинических образцах тестировали 48 индивидуальных секций толщиной 5 мкм, полученных из 3 образцов FFPEТ с содержанием мутации BRAF V600E 4%, 6% и 12%, образцы тестировали индивидуально с тремя сериями набора **cobas®** DNA Sample Preparation Kit для выделения ДНК. Для определения влияния меланина на результат теста, один образец (с 6% мутации) имел высокую концентрацию меланина. Готовили серии разведений ДНК из каждой секции, чтобы получить набор панелей по 6 образцов, охарактеризованных в Табл. 5.

Каждый образец панели тестировали в 16 повторях с каждой из 3 серий набора **cobas®** 4800 BRAF V600 Mutation Test (n=48 для каждого образца панели). Табл. 6 показывает чувствительность каждой смеси FFPEТ, определенную как наименьшее количество ДНК, которое давало результат “Mutation Detected” не менее чем в 95% случаев (строки, выделенные серым).

Результаты продемонстрировали, что тест **cobas®** 4800 BRAF V600 Mutation Test позволяет выявлять мутацию BRAF V600E в реальных клинических образцах FFPEТ, если доля мутации составляет $\geq 5\%$ при стандартной концентрации ДНК 125 нг/25 мкл. Способность теста выявлять эту мутацию при более низких концентрациях ДНК показывает, что даже ДНК, деградированная в ходе фиксации, все-таки может быть выявлена. Образец с высокой степенью

пигментации, включенный в испытания, не продемонстрировал влияния меланина на чувствительность теста.

Таблица 4
Чувствительность теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test с использованием смесей FFPET

Смесь FFPET	Процент мутантов (по 454-секвенированию)	Кол-во ДНК в образце панели	Процент рез-та “Mutation Detected” (n=24)
10% смесь FFPET	9%	125 нг/25 мкл	100%
		62.5 нг/25 мкл	100%
		31.3 нг/25 мкл	100%
5% смесь FFPET 1	5%	125 нг/25 мкл	96%
		5.0 нг/25 мкл	100%
		2.5 нг/25 мкл	100%
		1.3 нг/25 мкл	75%
		0.6 нг/25 мкл	88%
		0.3 нг/25 мкл	71%
5% смесь FFPET 2	5%	125 нг/25 мкл	100%
		5.0 нг/25 мкл	92%
		2.5 нг/25 мкл	100%
		1.3 нг/25 мкл	96%
		0.6 нг/25 мкл	58%
		0.3 нг/25 мкл	50%
5% смесь FFPET 3	6%	125 нг/25 мкл	100%
		5.0 нг/25 мкл	100%
		2.5 нг/25 мкл	100%
		1.3 нг/25 мкл	100%
		0.6 нг/25 мкл	96%
		0.3 нг/25 мкл	71%
2.5% смесь FFPET	3%	125 нг/25 мкл	0%
		62.5 нг/25 мкл	4%
		31.3 нг/25 мкл	4%
0% (дикий тип)	---	125 нг/25 мкл	0%

Таблица 5
Приготовление панели разведений из образцов FFPET

Образец FFPET	Характеристики образца		Кол-во ДНК в образцах панели (нг/25 мкл)
	Средний % V600E *	Пигментация	
№1	6%	Высокая **	125, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0, 1.0
№2	12%	Низкая ***	125, 7.8, 3.9, 2.0, 1.0, 0.5
№3	4%	Низкая	125, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0

Аналитическая чувствительность при тестировании смеси клеточных линий
Образцы ДНК из двух клеточных линий меланомы [SK-MEL 28 (мутация BRAF V600E) и SK-MEL 2 (BRAF дикого типа)] смешивали, чтобы получить образец с долей мутации 5% (процент верифицирован 454-секвенированием). Готовили три отдельных серии разведений с концентрацией ДНК от 125 нг/25 мкл до нуля. Каждый образец тестировали в 20 повторях с каждой из 3 серий набора 3 cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test (60 повторов всего). Чувствительность определяли как минимальное количество ДНК, давшее результат BRAF

V600E "мутация выявлена" с частотой не менее 95%. Результаты данного исследования приведены в Таблице 7.

Таблица 6
Чувствительность теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test с использованием образцов FFPET

Образец FFPET	Процент мутантов (по 454-секвенированию)	Кол-во ДНК в образце панели	Процент рез-та "Mutation Detected" (n=48)
№1	6%	125 нг/25 мкл	100%
		15.6 нг/25 мкл	100%
		7.8 нг/25 мкл	98%
		3.9 нг/25 мкл	98%
		2.0 нг/25 мкл	81%
		1.0 нг/25 мкл	71%
№2	12%	125 нг/25 мкл	100%
		7.8 нг/25 мкл	100%
		3.9 нг/25 мкл	100%
		2.0 нг/25 мкл	98%
		1.0 нг/25 мкл	98%
		0.5 нг/25 мкл	94%
№3	4%	125 нг/25 мкл	98%
		31.3 нг/25 мкл	98%
		15.6 нг/25 мкл	85%
		7.8 нг/25 мкл	90%
		3.9 нг/25 мкл	90%
		2.0 нг/25 мкл	67%

Таблица 7
Чувствительность теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test с использованием смесей клеточных линий

Образец	Процент мутантов (по 454-секвенированию)	Кол-во ДНК в образце панели	Процент рез-та "Mutation Detected" (n=60)
Смесь клеточных линий	5%	125.0 нг/25мкл	97%
		31.3 нг/25мкл	100%
		15.6 нг/25мкл	95%
		7.8 нг/25мкл	98%
		3.9 нг/25мкл	95%
		2.0 нг/25мкл	82%
		1.0 нг/25мкл	78%
		0.5 нг/25мкл	77%

Тест дал результат "Мутация выявлена" с частотой 95% при концентрации 3.9 нг/25мкл, что соответствует разведению 1:32 относительно рекомендованной концентрации 125 нг/25мкл для внесения в реакцию. Это подразумевает, что тест выявляет мутацию BRAF V600E даже в тех случаях, когда около 97% ДНК подверглось деградации при фиксации.

Диапазон вносимого количества ДНК:

Рекомендованное количество ДНК, вносимое в реакцию в тесте cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test, составляет 125 нг. Различия в количестве вносимой в реакцию ДНК могут являться результатом ошибки при количественном анализе ДНК и/или деградации ДНК. Чтобы оценить влияние различий в количестве вносимой ДНК, геномную ДНК выделяли из 11 меланомных образцов FFPET, выбранных по их мутантному статусу и уровню пигментации, и готовили серии разведений, соответствующие концентрации ДНК 250 нг, 125 нг, 62.5 нг и 31.3

нг/ 25 мкл. Все 4 концентрации ДНК тестировали с двумя сериями набора. Ожидаемые результаты были получены для всех концентраций геномной ДНК.

Минимальное содержание опухолевой ткани

Всего 33 образца мутанта BRAF V600E тестировали, чтобы определить минимальную долю опухолевой ткани, необходимую для выявления мутации BRAF V600E в образцах с долей опухоли от 5% до 50%, без проведения макродиссекции. По одной секции для каждого образца тестировали с набором **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**. Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** позволил правильно определить все образцы с мутацией BRAF V600E, в которых доля мутантной ДНК составляла более 5%, а доля опухолевой ткани составляла не менее 15% (Таблица 8). Образцы, в которых содержание опухоли составило менее 15%, а доля мутантной ДНК была менее 5%, дали результат «мутация не выявлена». Дополнительные 24 образца дикого типа с содержанием опухоли в диапазоне от 5 до 45% тестировали с внесением в реакцию рекомендованного количества ДНК- 125 нг в 25 мкл. Все образцы дикого типа были определены правильно. Для образцов, содержащих опухолевую ткань <50%, рекомендуется проведение макродиссекции.

Таблица 8

Результаты тестирования 33 образцов BRAF V600E с разной долей содержания опухолевой ткани и мутаций

Номер образца V600E	Содержание опухоли*	Результат теста
1	5% / 5%	Мутация не выявлена
2	5% / 5%	Мутация не выявлена
3	5% / 5%	Мутация не выявлена
4	10% / 10%	Мутация не выявлена
5	10% / 10%	Мутация выявлена
6	15% / 10%	Мутация выявлена
7	15% / 15%	Мутация выявлена
8	15% / 15%	Мутация выявлена
9	15% / 15%	Мутация выявлена
10	15% / 15%	Мутация выявлена
11	15% / 15%	Мутация выявлена
12	15% / 20%	Мутация выявлена
13	20% / 20%	Мутация выявлена
14	20% / 20%	Мутация выявлена
15	25% / 20%	Мутация выявлена
16	25% / 25%	Мутация выявлена
17	30% / 25%	Мутация выявлена
18	30% / 30%	Мутация выявлена
19	30% / 35%	Мутация выявлена
20	30% / 35%	Мутация выявлена
21	35% / 30%	Мутация выявлена
22	35% / 35%	Мутация выявлена
23	35% / 35%	Мутация выявлена
24	35% / 35%	Мутация выявлена
25	35% / 40%	Мутация выявлена
26	40% / 35%	Мутация выявлена
27	40% / 35%	Мутация выявлена
28	40% / 40%	Мутация выявлена
29	40% / 40%	Мутация выявлена
30	40% / 40%	Мутация выявлена
31	40% / 45%	Мутация выявлена
32	45% / 45%	Мутация выявлена
33	50% / 40%	Мутация выявлена

**Содержание опухоли в образце оценивали при проводившемся патоморфологом анализе первой и последней из двенадцати соседних секций толщиной 5 мкм для каждого образца. Приведено содержание опухолевой ткани для первой и последней секций (например, 95% / 95%).*

Перекрестная реактивность

Перекрестную реактивность теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** оценивали при тестировании образцов следующих типов:

- Образцы FFPET меланомы с мутациями BRAF не-V600E с разной долей мутантной ДНК,
- Плазмиды, несущие мутации BRAF не-V600E,
- Плазмиды, гомологичные BRAF,
- Кожные микроорганизмы.

Перекрестную реактивность также оценивали, определяя влияние присутствия гомологичных плазмид BRAF или кожных микроорганизмов на выявление мутации BRAF V600E.

Образцы FFPET меланомы с мутациями BRAF не-V600E

Четырнадцать (14) образцов FFPET меланомы с мутациями BRAF не-V600E (V600D, V600E2, V600R или V600K) тестировали в трех повторях в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**.

Для 8 образцов BRAF не-V600E, во всех трех повторях была продемонстрирована перекрестная реактивность в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**. Данные 8 образцов были следующими: мутант BRAF V600D (18% мутации), мутант BRAF V600E2 (68.0% мутации) или мутант BRAF V600K (более 30% мутации). Перекрестную реактивность не отмечали для образца мутанта BRAF V600R (23% мутации) (Таблица 5).

Таблица 5

Частота детекции мутаций в тесте **cobas® BRAF V600 Mutation Test для мутаций BRAF не-V600E в образцах FFPET ***

Номер образца	Мутация BRAF	Процент мутации	Содержание опухолевой ткани ^a	Стадия опухоли	Частота выявления мутации (n=3)
1	V600D	18%	30% / 30%	IV	100%
2	V600E2	16%	75% / 75%	IV	0%
3		36%	75% / 80%	III	0%
4		68%	75% / 75%	IV	100%
5	V600R	23%	15% / 15%	IV	0%
6	V600K	17%	25%/25%	III	0%
7		22%	35% / 40%	IV	0%
8		23%	40% / 40%	IV	0%
9		31%	60% / 60%	IV	100%
10		35%	75% / 75%	IV	100%
11		40%	80% / 80%	IV	100%
12		36%	95% / 95%	IIC	100%
13		62%	75% / 75%	IV	100%
14		69%	80% / 80%	IV	100%

^aСодержание опухоли в образце оценивали при проводившемся патоморфологом анализе первой и последней из двенадцати соседних секций толщиной 5 мкм для каждого образца. Приведено содержание опухолевой ткани для первой и последней секций (например, 95% / 95%).

*Тест **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** не позволяет достоверно выявлять не-V600E мутации

Плазмиды BRAF не-V600E

Панели разведений плазмид, несущих мутации с долей от 5% до 75% относительно плазмиды дикого типа, готовили для девяти следующих мутаций BRAF не-V600E: D594G, G596R, K601E, L597Q, L597S, V600D, V600E2, V600K и V600R. Каждое разведение каждой плазмиды тестировали в трех повторах в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**. Перекрестную реактивность отмечали во всех трех повторах для плазмиды BRAF V600D с долей мутации $\geq 10\%$, плазмиды BRAF V600K с долей мутации $\geq 35\%$ и плазмиды BRAF V600E2 с долей мутации $\geq 65\%$. Перекрестную реактивность не отмечали для плазмид, несущих остальные 6 тестируемых мутаций BRAF.

Плазмиды, гомологичные BRAF

Образцы были получены для трех гомологичных BRAF плазмид (BRAF псевдоген, ARAF и RAF1), плазмиды с мутацией BRAF V600E, и плазмиды с BRAF дикого типа, как указано в таблице 6. Каждый образец тестировали в повторах от трех до шести в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**.

Таблица 6
Образцы гомологичных плазмид BRAF

Панель		Состав по объему	
Название	Образец	Компонент 1	Компонент 2
BRAF Pseudogene	1	95% BRAF псевдоген	5% BRAF V600E мутант
	2	100% BRAF псевдоген	- - -
ARAF	1	95% ARAF	5% BRAF V600E мутант
	2	100% ARAF	- - -
RAF1	1	95% RAF1	5% BRAF V600E мутант
	2	100% RAF1	- - -
Control	1	95% BRAF дикий тип	5% BRAF V600E мутант
	2	100% BRAF дикий тип	- - -
	3	95% буфер для элюции ДНК	5% BRAF V600E мутант

Ни одна из трех тестируемых гомологичных BRAF плазмид не дала положительный сигнал в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**, что указывает на отсутствие перекрестной реакции в тесте с гомологичными плазмидами BRAF.

Мутантная плазида BRAF V600E с долей 5% в присутствии 95% гомологичной плазмиды BRAF дала ожидавшийся результат “Мутация выявлена” во всех случаях, что указывает на отсутствие интерференции со стороны гомологичных плазмид при детекции мутации BRAF V600E.

Кожные микроорганизмы

Было установлено, что перечисленные ниже кожные микроорганизмы не дают перекрестную реактивность в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**, если вносятся в образец FFPE меланомы дикого типа в концентрации 1×10^6 колонии образующих единиц (CFU) на этапе лизиса ткани:

1. *Staphylococcus epidermis*
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Corynbacterium xerosis*
4. *Corynebacterium jeikeium*
5. *Corynbacterium minutissimum*
6. *Corynbacterium ulcerans*

Тестировавшиеся микроорганизмы также не давали интерференцию при детекции образцов FFPET с 8% мутации BRAF V600E, когда 1×10^6 колонии образующих единиц вносили в образец на этапе лизиса ткани.

Интерференция

Эксперименты по внесению потенциально интерферирующих веществ в образцы на этапе лизиса ткани показали, что триглицериды ($\leq 74\text{mM}$, 2x CLSI рекомендованной высокой концентрации¹²) и гемоглобин (≤ 2 мг/мл, 1x CLSI рекомендованной высокой концентрации¹²) не вызывают интерференцию в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**.

Некротная ткань

Способность теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** давать корректные результаты при анализе образцов с высоким содержанием некротной ткани определяли при тестировании 27 образцов FFPET меланомы V600E или дикого типа, в которых содержание некротной ткани составляло от 10% до 95%. Образцы отбирали на основании их статуса по мутации BRAF V600E, содержанию некротной ткани и доли мутации. Среди 27 выбранных образцов, 11 были мутантными BRAF V600E, а 16 были BRAF дикого типа. Доля мутации варьировала от 4% до 65%. Содержание опухоли и некротной ткани в каждом образце определялся патологоанатомом. Образцы тестировали в двух повторах с одной серией реагентов. Среди 11 образцов BRAF V600E, мутация была выявлена во всех образцах, кроме тех, где % мутации был ниже порога детекции (4%). Образец, содержащий 95% некротной ткани, доля мутации в котором составляла 10%, дал положительный результат выявления мутации. Мутация не была выявлена ни в одном из образцов дикого типа.

Таблица 7

Результаты теста *cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test* при тестировании образцов FFPET с меланомой с высокой долей некроза

Образец	% некроза	Результат теста (n = 2)
V600E	15%	Мутация выявлена/ Мутация выявлена
	15%	Мутация выявлена / Мутация выявлена
	20%	Мутация выявлена / Мутация выявлена
	25%	Мутация выявлена / Мутация выявлена
	25%	Мутация выявлена/ Мутация выявлена
	30%	Мутация выявлена/ Мутация выявлена
	30%	Мутация не выявлена/ Мутация не выявлена
	55%	Мутация выявлена/ Мутация выявлена
	55%	Мутация выявлена/ Мутация выявлена
	60%	Мутация выявлена/ Мутация выявлена
	95%	Мутация выявлена/ Мутация выявлена

Меланин

Влияние высоких концентраций эндогенного меланина определяли при тестировании образцов FFRET меланомы с высокой степенью пигментации. Всего 41 образец FFRET меланомы были выбраны на основании их уровня пигментации: 33 с сильной пигментацией, 3 были получены от афроамериканцев и 5 имели слабую пигментацию (образцы сравнения). Из образцов выделяли ДНК и определяли в них концентрацию меланина. Тестировали в одном повторе ДНК, выделенную из двух секций каждого из 41 образца. Три образца дали невалидные результаты. В одном образце мутация не была выявлена, далее было установлено, что мутация содержится в данном образце в концентрации ниже предела чувствительности. Три образца с невалидным результатом использовали для получения рекомендованной концентрации ДНК, а также двух-, четырех- и восьмикратных разведений относительно рекомендованной концентрации ДНК, равной 125 нг/ПЦР.

Полученные образцы разведенной ДНК (содержащие всего 125 нг, 61.5 нг, 31.25 нг и 15.6 нг ДНК в 25 мкл) тестировали повторно, чтобы определить, позволяет ли снижение содержания меланина в результате разведения образца получать валидные результаты. Все три образца при двукратном разведении дали правильные результаты.

Таблица 8

Результаты теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test при тестировании образцов FFRET с пигментной меланомой

ID образца	Разведение	Количество меланина в образце/ПЦР	Результат
1	Нет (125 нг)	0.15 мкг	Невалидный/невалидный
	Двукратное (62.5 нг)	0.08 мкг	Мутация выявлена/мутация выявлена
	Четырехкратное (31.3 нг)	0.04 мкг	Мутация выявлена/мутация выявлена
	Восьмикратное (15.6 нг)	0.02 мкг	Мутация выявлена/мутация выявлена
2	Нет (125 нг)	0.24 мкг	Невалидный/невалидный
	Двукратное (62.5 нг)	0.12 мкг	Мутация выявлена/мутация выявлена
	Четырехкратное (31.3 нг)	0.06 мкг	Мутация выявлена/мутация не выявлена
	Восьмикратное (15.6 нг)	0.03 мкг	Мутация не выявлена/Невалидный
3	Нет (125 нг)	0.34 мкг	Невалидный/невалидный
	Двукратное (62.5 нг)	0.17 мкг	Мутация выявлена/мутация выявлена
	Четырехкратное (31.3 нг)	0.08 мкг	Мутация выявлена/мутация выявлена
	Восьмикратное (15.6 нг)	0.04 мкг	Мутация выявлена/мутация выявлена

Результаты тестирования 17 образцов V600 дикого типа показали, что все образцы были определены правильно, был получен результат “мутация не выявлена” за исключением 2 образцов с высокой степенью пигментации, давших ложноположительный результат.

Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test** проводили испытания в 3 центрах (в каждом по 2 оператора), с 3 сериями реагентов и в течение 5 непоследовательных дней тестирования, в которых анализировали панель из 8 образцов ДНК, полученных из секций FFPE меланомы. Данная панель содержала образцы с пигментацией и без пигментации, с разным содержанием опухолевой ткани и разной долей мутантных аллелей, включая один образец с 4% (около 5% предела детекции (LOD)). Из 94 постановок, 92 (97.9%) были валидными. Из 1442 тестируемых образцов, 2 образца (0.14%) дали невалидные результаты. Для всех образцов панели, кроме образца LOD, правильный результат был получен в 100% валидных тестов, включая образцы с 20% мутации и два образца с высокой степенью пигментации. В образце LOD мутация V600E была выявлена в 90% (162/180) случаев. Ни для одного образца дикого типа не был получен ложноположительный результат. Результаты анализа общей согласованности представлены ниже.

Таблица 9

*Показатели общей согласованности для разных образцов панели при оценке воспроизводимости теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test***

Образец панели	Число валидных тестов	Согласованность (%)	95% CI* для согласованности (%)
Дикий тип-75% опухоли	180	100.0 (180/180)	(98.0, 100.0)
Дикий тип-75% опухоли пигментированной	180	100.0 (180/180)	(98.0, 100.0)
V600E-5% мутации	180	90.0 (162/180)	(84.7, 94.0)
V600E-20% мутации	180	100.0 (180/180)	(98.0, 100.0)
Мутант V600E - 50% мутации	180	100.0 (180/180)	(98.0, 100.0)
Мутант V600E - 50% мутации пигментированной	180	100.0 (180/180)	(98.0, 100.0)
Мутант V600E - 75% опухоли	180	100.0 (180/180)	(98.0, 100.0)
Мутант V600E - 90% опухоли	180	100.0 (180/180)	(98.0, 100.0)

Примечание: Результаты рассматривали как согласованные, если валидный тест образца панели Мутантного типа давал результат “мутация выявлена”, или если валидный тест образца панели Дикого типа давал результат “мутация не выявлена”.

* 95% CI=95% точный биномиальный доверительный интервал.

Для всех переменных (серия, центр, оператор, день, постановка), рассчитывали CV (%) для значений Ct мутанта и дикого типа, он составлял <3% и <1.8%, соответственно, для всех образцов панели. Для внешних контролей CV(%) составлял ≤ 2.0%.

Воспроизводимость при повторном тестировании

Для оценки воспроизводимости теста при повторном тестировании было проведено отдельное исследование. Результаты в двух повторах были получены для пяти разных образцов FFPE меланомы, тестируемых в четыре разных дня двумя операторами с использованием двух серий реагентов и двух приборов **cobas® 4800**. Четыре мутантных образца BRAF V600E, в двух из которых содержание опухолевой ткани было менее 35%, в двух доля мутации была менее 12% (~2X аналитической чувствительности теста, равной 5%), и один образец дикого типа были выбраны для данного исследования. В каждый из четырех дней, каждый оператор тестировал 4 секции для каждого из 5 образцов FFPE меланомы, по две секции тестировались с отдельной серией набора DNA Specimen Preparation Kit и набора **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**.

Всего каждый образец тестировали в 32 повторях. Воспроизводимость рассматривалась как допустимая, если не менее 95% результатов совпадали с результатами секвенирования для образцов. В одном повторе один мутантный образец BRAF V600E (10% мутации) и в одном повторе другой мутантный образец BRAF V600E (10% мутации) дали результат “Мутация не выявлена.” Все остальные повторы для данных образцов и все повторы других трех образцов дали ожидавшиеся результаты, таким образом, точность определения во всем исследовании составила 98.75%.

Таблица 10
Воспроизводимость теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

Образец панели (% мутантной последовательности)	% Содержания опухолевой ткани*	Стадия опухоли	Общее число тестов	Общее число неверных результатов	% точности
V600E (10%)	60% / 55%	IV	32	1	96.9
V600E (12%)	40% / 35%	IIIB	32	0	100
V600E (10%)	30% / 30%	IV	32	1	96.9
V600E (17%)	30% / 35%	II	32	0	100
WT	60% / 60%	IV	32	0	100

* Содержание опухоли в образце оценивали при проводившемся патоморфологом анализе первой и последней из двенадцати соседних секций толщиной 5 мкм для каждого образца. Приведено содержание опухолевой ткани для первой и последней секций (например, 95% / 95%).

Корреляция с референсным методом при тестировании клинических образцов фазы III:

В ходе сравнительных испытаний теста **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation test**, сравнивавшегося с 2X секвенированием в двух направлениях были выявлены 596 последовательных пациентов испытаний фазы III, для которых были получены клинические, демографические данные, а также результаты секвенирования методом Сенгера. Из этих пациентов 94 были исключены из-за несоответствия критериям включения, в 4 случаях отсутствовали данные патологического анализа, в 2 случаях были получены невалидные результаты теста **cobas** и для 47 образцов были получены невалидные результаты секвенирования методом Сенгера, таким образом, пригодными для анализа остались 449 образцов. Результаты анализа согласованности между результатами теста **cobas** и результатами секвенирования по Сенгеру для детекции мутации V600E приведены в Таблице 21. Положительный процент согласованности (PPA) с секвенированием по Сенгеру составил 97.3% (216/222), отрицательный процент согласованности (NPA) составил 84.6% (192/227), при этом общий процент согласованности составил 90.9%. Всего в тесте **cobas** было выявлено 35 случаев мутации, не определенных как мутация V600E методом секвенирования по Сенгеру. Восемь (8) из них были определены как образцы дикого типа, 25 были определены как V600K и 2 были определены как другие мутации кодона 600 при секвенировании методом Сенгера. Кроме того, 6 образцов были определены как не содержащие мутацию в тесте **cobas**, но как мутантные по V600E методом секвенирования по Сенгеру. Перекрестная реактивность теста **cobas** для V600K составила 66% (25/38).

Таблица 11

*BRAF V600 Mutation Test против секвенирования методом Сенгера при тестировании образцов, полученных в ходе испытаний III фазы**

Результат теста Cobas® 4800 BRAF Mutation Test	Секвенирование по методу Сенгера (метод сравнения)							Всего
	Выявленн ые мутации BRAF V600E	Не выявленные мутации BRAF V600E						
	V600E	V600K	V600E 2	V600R	V600D* *	V600 Other** *	Wild- type	
Выявленные мутации	216	25	1	0	1	0	8	251
Не выявленные мутации	6	13	12	2	0	1	164	198
Всего	222	38	13	2	1	1	172	449
Положительный процент согласованности (95% CI)			216/222 X 100% = 97.3% (94.2%, 98.8%)					
Отрицательный процент согласованности (95% CI)			192/227 X 100% = 84.6% (79.3%, 88.7%)					
Общий процент согласованности			408/449 X 100% = 90.9% (87.8%, 93.2%)					

* Предел детекции при секвенировании методом Сенгера составляет примерно 20% мутантных аллелей в образцах **FFPET**^{13,14,15,16}. Поэтому секвенирование методом Сенгера не может являться адекватным методом для подтверждения мутантного статуса при невысоком содержании мутантных аллелей. В связи с этим, при проведении данного исследования, некоторые образцы, отрицательные при анализе методом секвенирования по Сенгеру, но положительные в тесте cobas, давали положительный результат при титровании третьим методом. Валидированный предел детекции для теста cobas в образцах FFPET составил 5% мутантных аллелей.

**Вариант V600D (GTG>GAC)

***Мутация не указана в протоколе (вставка ACA непосредственно перед кодоном 600)

Распространенность мутации V600E в ходе фазы III клинических испытаний составила от 50 до 55% на основании результатов теста cobas. Полученные результаты совпадают с данными о распространенности V600E среди пациентов с меланомой, опубликованными в литературе³. Все пациенты, участвовавшие в фазе III исследования NO25026 (BRIM3), спонсированного Hoffmann-LaRoche, были отобраны на основании результата теста cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test. В исследование включались только пациенты, меланомная ткань которых давала в тесте положительный результат. Поэтому остается неизвестным, получают ли пациенты, отрицательные в тесте cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test, пользу от терапии вемурафенибом (Zelboraf™).

Клиническая эффективность вемурафениба

Тест cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test применялся в качестве вспомогательного теста для отбора пациентов для терапии вемурафенибом (Zelboraf™). Клиническая безопасность и эффективность вемурафениба (Zelboraf™) была продемонстрирована в исследовании NO25026

(BRIM3), международном, рандомизированном, открытом, контролируемом, мультицентровом исследовании фазы III, проводившемся среди ранее не получавших терапию пациентов с подлежащей резекции меланомой стадий IIIc или IV и мутацией V600E BRAF, в ходе исследования оценивали эффективность вемурафемба (RO5185426) в сравнении с дакарбазином. Образцы фиксированной в формалине ткани в парафиновых блоках (FFPET), полученные от всех пациентов с меланомой, которым предполагалось проведение терапии, тестировали в **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**. Пациенты с положительным результатом теста включались в исследование препарата, если они соответствовали остальным критериям включения. Пациенты с отрицательным результатом теста исключались из исследования. Исследование проводилось в 104 центрах (из них 22 центра в США).

В исследовании участвовали 675 пациента; 337 из них получали ZELBORAF, и 338 получали дакарбазин.

Основным критерием эффективности в данном исследовании являлась общая выживаемость (OS) и определяемая исследователем выживаемость без прогрессии заболевания (PFS). Еще одним критерием эффективности являлась общая частота ответа.

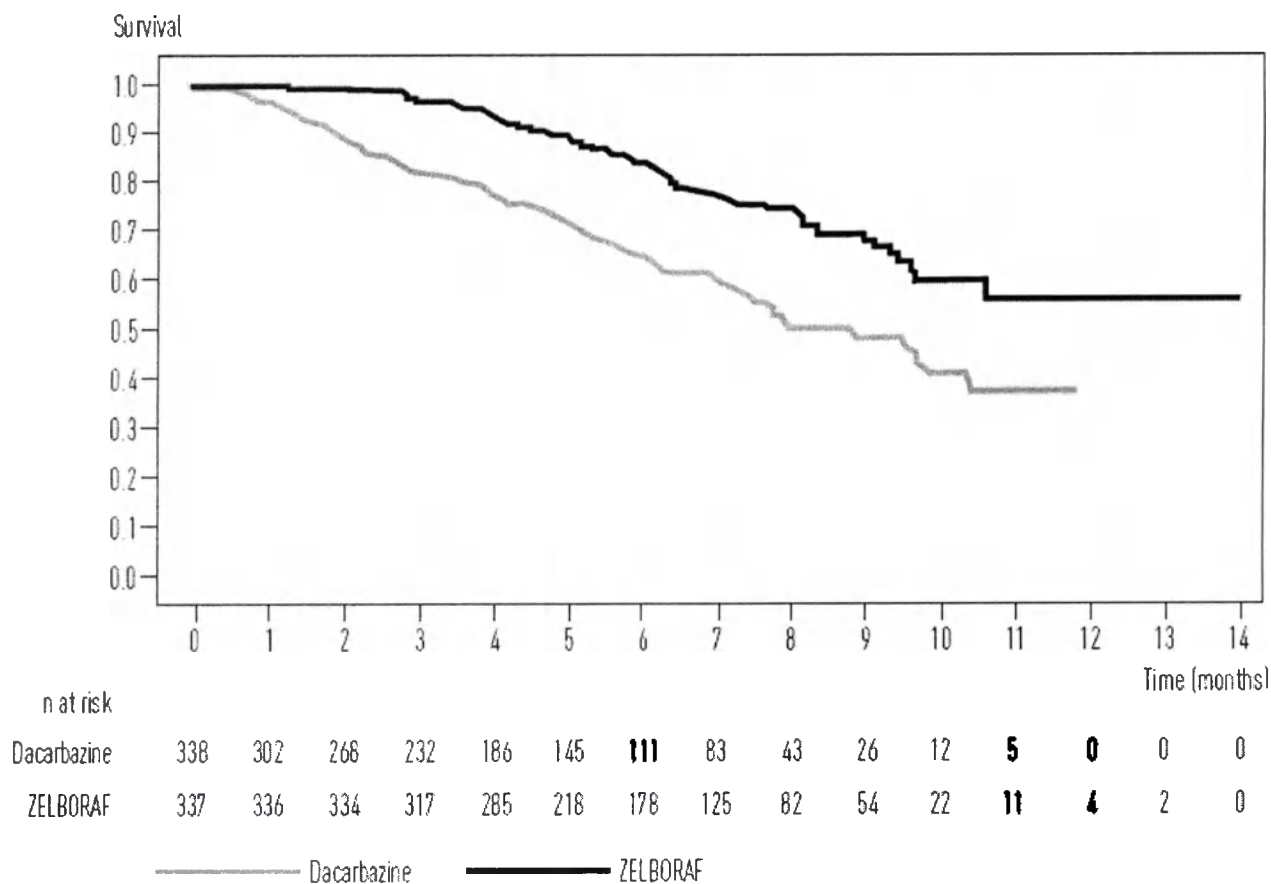
Обе группы пациентов были сбалансированы по исходным характеристикам. Большинство пациентов были мужчины (56%), европеоиды (99%), средний возраст составлял 54 года (24% были ≥ 65 лет), все пациенты имели статус ECOG равный 0 или 1, и у большинства пациентов заболевание было метастазирующим (95%).

Таблица 12:
Эффективность вемурафемба среди не получавших ранее терапию пациентов с меланомой, позитивной по мутации BRAFV600E ^a

	Вемурафемб (N=337)	Дакарбазин (N=338)	р-величина ^d
Общая выживаемость			
Количество смертей	78 (23%)	121 (36%)	
Соотношение рисков (95% CI) ^b	0.44 (0.33, 0.59)		<0.0001
Средняя выживаемость (месяцы) (95 % CI) ^c	Не достигалась (9.6, не достигалась)	7.9 (7.3, 9.6)	-
Средний период наблюдения (месяцы) (диапазон)	6.2 (0.4, 13.9)	4.5 (<0.1, 11.7)	
Соотношение рисков выживаемости без прогрессии (95% CI) ^b	0.26 (0.20, 0.33)		<0.0001
Среднее PFS (месяцы)	5.3 (4.9, 6.6)	1.6 (1.6, 1.7)	-

^a На основании выявления в тесте **cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test**
^b Соотношение рисков оценивали по модели Кокса; соотношение рисков < 1 свидетельствовало в пользу вемурафемба
^c оценка по Каплан-Мейер
^d Нестратифицированный log-rank тест

Рисунок 2:
Кривые Каплан-Мейера общей выживаемости – не получавшие терапию пациенты



Подтвержденная общая частота ответа составила 48.4% (95% CI: 41.6%, 55.2%) в группе ZELBORAF по сравнению с 5.5% (95% CI: 2.8%, 9.3%) в группе пациентов, получавших дакарбазин.

Утилизация

Во избежание возможного загрязнения окружающей среды реагенты с истекшим сроком годности, а также отходы использованных реагентов, должны утилизироваться в соответствии с местными государственными и / или больничными нормативными требованиями.

Правильное уничтожение и утилизация будет поддерживать сохранение природных ресурсов и содействовать защите здоровья человека и окружающей среды.

Изделие должно быть утилизировано в РФ согласно требованиям СанПин 2.1.7.2790-10 (Класс А).

Утилизация отходов упаковки.

Упаковка продукции «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностикс ГмбХ") разработана с целью сведения к минимуму загрязнения окружающей среды при сохранении целостности продукта во время транспортировки и хранения. Упаковочные отходы должны утилизироваться в местных пунктах сбора упаковки, в специализированные контейнеры, расположенные в муниципалитетах.

Утилизация изделия с истекшим сроком годности и отходов, использованных реагентов.

При утилизации и уничтожении изделий с истекшим сроком годности, а также отходов, использованных реагентов, необходимо действовать в соответствии с гигиеническими нормативами и следовать официальным инструкциям по утилизации и уничтожению потенциально инфекционного и химического материала, принятым на территории Российской Федерации и в данном ЛПУ.

Ключевыми вопросами в стратегии управления отходами является оптимизация тактик и подходов к конечным продуктам, а также минимизация возможного загрязнения окружающей среды.

Более подробную информацию можно получить у производителя / уполномоченного представителя производителя.

Не утилизировать совместно с бытовыми отходами.

Техническое обслуживание и ремонт

Данное изделие является одноразовым. Техническое обслуживание и ремонт – не применимо.

Гарантийные обязательства

Производитель (компания «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностикс ГмбХ")) гарантирует, что Тест-полоски Combur 10 Test M соответствуют спецификациям, заявленным на этикетке.

Производитель несет ответственность за работу изделий только в случае их правильного использования в соответствии с инструкцией, а также соблюдения правил хранения и транспортировки. Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

Производитель гарантирует стабильность реагентов до окончания срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, указанных в инструкции.

Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

Изделия должны использоваться только до истечения срока годности, который указан на упаковке.

НАСТОЯЩАЯ ОГРАНИЧЕННАЯ ГАРАНТИЯ ЗАМЕНЯЕТ СОБОЙ ИНЫЕ ГАРАНТИИ, ОДНОЗНАЧНО ВЫРАЖЕННЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ЛЮБУЮ ПОДРАЗУМЕВАЕМУЮ ГАРАНТИЮ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОММЕРЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЛИ ДЛЯ ЛЮБОЙ ИНОЙ ЦЕЛИ. КОМПАНИЯ ROCHE DIAGNOSTICS GmbH НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА СЛУЧАЙНЫЕ, НЕПРЯМЫЕ, СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ.

По вопросам, связанным с качеством изделий, а также с их работой, нужно обращаться к **Уполномоченному представителю производителя на территории РФ:**

Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2, тел.: (495) 229-69-99, факс: (495) 229-62-64

ЛИТЕРАТУРА

1. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**:949-54.
2. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1773**:1263–1284.
3. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005; **353**:2135-2147.
4. Pollock PM, Harper UL, Hansen, KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics* 2003; **33**:19-20.
5. COSMIC database (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic>), Release 52 (March 2011)
6. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26; **363**(9):809-819
7. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011; **364**:2507-2516.
8. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. **93**:125-128.
9. Chosewood, L.C and Wilson, D.E. *Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Fifth edition. (CDC) 21-1112. 2009
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Villanova, PA:CLSI, 2005
11. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2, Appendix D 2005
13. Querings et al. (2011) Benchmarking of Mutation Diagnostics in Clinical Lung Cancer Specimens. *PLoS ONE* 6(5): e19601.doi:10.1371/journal.pone.0019601
14. Pichler et al. Evaluation of High-Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool to Detect the BRAF V600E Mutation in Colorectal Tumors. *Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 11, No.2, March 2009
15. Tsiatis et al. Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations. *Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 12, No. 4, July 2010
16. Ogino et al. (2005) Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detection by Pyrosequencing. *Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 7, No. 3, August 2005.

Сведения о редакциях документа	
Doc Rev. 1.0 08/2011	Первая публикация.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
A Member of the Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(За технической помощью обращайтесь в службу
Roche Response Center
toll free: 1-800 526-1247)

ROCHE, COBAS, COBAS Z, Z05 и AMPERASE являются торговыми марками Roche.
Технология защиты от контаминации с помощью фермента AmpErase защищена патентом США 5,035,996 и его зарубежными аналогами, принадлежащим Invitrogen Corporation и переданным по лицензии Roche Molecular Systems, Inc.
EPPENDORF является торговой маркой Eppendorf AG.
PIPET-AID является торговой маркой Drummond Scientific.
NANODROP является торговой маркой Thermo Fisher Scientific.
с 2011 Roche Molecular Systems, Inc. Все права защищены.

08/2011

05952590001-01

Doc Rev. 1.0

В настоящее время для маркировки диагностической ПЦР продукции Roche используются следующие символы.



Вспомогательное программное обеспечение



Авторизованный представитель



Штрих-кодированные данные



Код серии



Биологическая опасность (потенциально инфекционный материал)



Каталожный номер



Сверьтесь с инструкцией



Содержит реагенты на < n > тестов



Состав набора



Распространитель



Для диагностики *In vitro*



Только для испытаний тестов IVD



Нижний предел заданного диапазона



Производитель



Хранить в темноте



Температурный диапазон (Хранить при)



Файл с описанием теста



Верхний предел заданного диапазона



Использовать до (последний день месяца)

Тест cobas® KRAS Mutation Test

cobas®

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*.

Набор реагентов для выделения ДНК
cobas® DNA Sample Preparation Kit

DNA SP

на 24 образца

P/N: 05985536190

Набор реагентов для определения мутаций KRAS
cobas® KRAS Mutation Test

KRAS

24 теста

P/N: 05852170190

ВНИМАНИЕ: Приобретение данного продукта позволяет покупателю использовать его для амплификации и детекции последовательностей нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ассоциированным методом для диагностики *in vitro* для решения задач, описанных в данной инструкции. Общий патент или какая-либо лицензия, за исключением указанного права на использование данного продукта, не передаются при приобретении данного продукта.

ЗНАЧЕНИЕ

Тест cobas® KRAS Mutation Test, для работы с системой cobas® 4800, является тестом ПЦР в реальном времени и предназначен для выявления мутаций в кодонах 12, 13 и 61 гена KRAS в образцах ДНК, выделенных из фиксированных в формалине тканей рака толстой и прямой кишки человека (РТПК) в парафиновых блоках.

ВВЕДЕНИЕ

Белок KRAS:

Белок KRAS является членом суперсемейства малых белков G. KRAS функционирует как GDP/GTP-регулируемый переключатель, передающий сигналы из внешнего пространства клетки, влияющие на клеточную пролиферацию, апоптоз и изменения актинового цитоскелета. Мутации, приводящие к аминокислотным заменам в позициях 12, 13 или 61, возникающие при различных злокачественных опухолях, в том числе при раке толстой и прямой кишки (РТПК) и немелкоклеточном раке легких (НМРЛ), блокируют фермент в GTP-связанной, активированной форме, что дает вклад в онкогенный процесс.¹

РТПК толстой и прямой кишки (РТПК):

Мутации KRAS встречаются в 24%-43% случаев рака толстой и прямой кишки²⁻³. Несмотря на то, что в настоящее время известно около 3000 точечных мутаций в гене KRAS, большинство регистрируется в кодонах 12 и 13 (~82% в кодоне 12 и ~17% в кодоне 13); мутации KRAS в других кодонах (например, в кодоне 61) встречаются гораздо реже (1%-4% мутаций). Хотя мутации в кодоне 61 встречаются редко, показано, что они приводят к постоянной активации KRAS, так же, как и мутации в кодонах 12 и 13.⁴ данные литературы свидетельствуют о том, что мутации в кодоне 61 являются прогностическим фактором отсутствия ответа на терапию моноклональными антителами против EGFR.⁵⁻⁶

Цетуксимаб и панитумумаб являются моноклональными антителами к рецептору фактора эпидермального роста (EGFR). данные препараты одобрены для терапии пациентов с метастазирующим раком толстой и прямой кишки. Несмотря на то, что в 50% - 80% случаев опухоли толстой и прямой кишки происходит избыточная экспрессия EGFR, экспрессия белка EGFR и амплификация данного гена обладают ограниченной прогностической значимостью при определении вероятности ответа на цетуксимаб и панитумумаб.⁷

Однако в настоящее время четко показано, что присутствие мутаций в гене KRAS коррелирует с отсутствием ответа на терапию антителами к EGFR у пациентов с метастазирующим раком толстой и

прямой кишки, и, таким образом, применение антител к EGFR в качестве терапии в подгруппе таких пациентов может быть ограничено.⁸⁻⁹ Данное предположение поддерживают следующие наблюдения:

- Ретроспективный анализ исследований, проводившихся в одиночных группах пациентов¹⁰⁻¹¹
- Ретроспективный анализ рандомизированных исследований¹²⁻¹³
- Проспективные рандомизированные исследования.¹⁴

Как следствие данных исследований, тестирование мутаций KRAS рекомендовано основными организациями онкологов США (ASCO, NCCN)¹⁵⁻¹⁶ и Европы (ESMO)¹⁷ для выявления пациентов, которым назначается терапия антителами к EGFR. Кроме того, органы здравоохранения США и Европы ограничивают применение данных агентов только для пациентов с опухолями, ассоциированными с диким типом KRAS.¹⁸⁻¹⁹

Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ)

Множество повторяющихся нарушений на молекулярном уровне было обнаружено в НМРЛ. Точечные мутации гена KRAS были найдены в 10% - 30% НМРЛ, по большей части в аденокарциомах.²⁰ Наиболее часто соматические мутации KRAS/RAS затрагивают кодоны 12, 13 и 61, в результате чего происходит накопление активных белков KRAS/RAS в клетке и последующая активация сигнальных путей, участвующих в злокачественных преобразованиях.

В опубликованной литературе показано, что пациенты с KRAS-положительным НМРЛ имеют худший прогноз²¹ и для них не приносят пользы дополнительная химиотерапия²² или терапия ингибиторами тирозинкиназы EGFR²³. Кроме того, было обнаружено, что пациенты, чья опухоль содержит мутации EGFR, не несут мутаций KRAS, и наоборот²⁴. Таким образом, эти пациенты представляют собой часть больных НМРЛ, для которых вопрос подбора терапии стоит особенно остро из-за меньшего количества доступных вариантов лечения, по сравнению с пациентами, у которых опухоли дикого типа по KRAS.

Тест cobas® KRAS Mutation Test

Тест cobas® KRAS Mutation Test является ПЦР-тестом и предназначен для выявления соматических мутаций в кодонах 12, 13 и 61 протоонкогенного белка KRAS, что позволяет выявлять пациентов с поздними стадиями РТПК, для которых терапия моноклональными антителами анти-EGFR не даст положительного результата или пациентов с НМРЛ, для которых бесполезны дополнительная химиотерапия или эрлотиниб.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест cobas® KRAS Mutation Test основан на двух процессах: (1) пробоподготовка вручную для получения геномной ДНК из фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET); (2) Амплификация и детекция в ПЦР ДНК-мишени с помощью пар комплементарных праймеров и двух олигонуклеотидных зондов, меченных разными флуоресцентными красителями. Один зонд предназначен для детекции последовательности кодона 12/13 экзона 2 гена KRAS, второй зонд предназначен для детекции последовательности кодона 61 экзона 3 гена KRAS. Детекция мутаций проводится методом анализа кривых плавления в анализаторе cobas z 480. Мутантный контроль, отрицательный контроль и калибратор включаются в каждую постановку для определения валидности постановки.

Пробоподготовка

Обработка образцов FFPET и выделение геномной ДНК проводится с помощью набора cobas® DNA Sample Preparation Kit, данный метод ручной пробоподготовки основан на связывании нуклеиновых кислот со стеклянным волокном. Депарафинизированные секции образцов FFPET толщиной 5 мкм лизируют в ходе инкубации с протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером при повышенной температуре, в результате происходит освобождение нуклеиновых кислот и разрушение ДНКаз.

Далее в лизирующую смесь вносится изопропанол, и смесь центрифугируется через колонку с фильтром из стеклянного волокна. Во время центрифугирования геномная ДНК связывается с поверхностью стеклянного волокна фильтра.

Несвязавшиеся вещества, такие как соли, белки и прочие компоненты клетки удаляются при центрифугировании. Связавшиеся нуклеиновые кислоты промываются и затем растворяются в водном растворе. Количество геномной ДНК определяют с помощью спектрофотометра и ее концентрацию доводят до необходимой, использующейся для проведения амплификации и детекции. ДНК мишени затем подвергается амплификации и детекции в анализаторе **cobas z 480** с помощью реагентов набора **cobas® KRAS Mutation Test kit**.

Амплификация в ПЦР

Выбор мишени

В тесте **cobas® KRAS Mutation Test** используются праймеры к последовательности величиной 85 пар оснований, содержащей кодоны 12 и 13 экзона 2 гена KRAS, и праймеры к последовательности величиной 75 пар оснований, содержащей кодон 61 экзона 3 гена KRAS геномной ДНК человека. Амплифицируются только участки гена KRAS, находящиеся между праймерами; полный ген KRAS не амплифицируется.

Амплификация мишени

Для амплификации мишени используется ДНК-полимераза Z05 *Thermus species*. Сначала реакционная смесь ПЦР нагревается для денатурации геномной ДНК, чтобы открылись сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси прямой и обратный праймеры связываются с последовательностями ДНК-мишени. ДНК-полимераза Z05 DNA в присутствии ионов двухвалентного металла и избытке dNTP удлинит каждый связавшийся праймер, в результате образуется вторая цепь ДНК. На этом первый цикл ПЦР завершается, и образуется двуцепочечная копия ДНК-мишени, представляющая собой фрагменты величиной 85 пар оснований и 75 пар оснований гена-мишени KRAS. Данный процесс повторяется заданное число раз, в каждом цикле количество копий ДНК ампликона удваивается. Амплифицируются только участки гена KRAS, находящиеся между праймерами; полный ген KRAS не амплифицируется.

Автоматизированная детекция в режиме реального времени

Анализатор **cobas z 480** способен измерять в режиме реального времени количество флуоресцентного сигнала, генерируемого специфичным продуктом ПЦР. После амплификации каждый ампликон, полученный в тесте **cobas® KRAS Mutation Test**, подвергается анализу с помощью программы плавления, в ходе которой меняется температура от 40°C до 95°C (TaqMelt). Специфичный для последовательности дикого типа зонд связывается при низких температурах как с ампликонами дикого типа, так и с ампликонами мутантными. В связанном состоянии, репортерный флуоресцентный краситель на 5'-конце зонда относительно удален от гасящего красителя на 3'-конце зонда, в результате репортерный краситель издает сигнал определенной длины волны. При повышении температуры зонд с ампликоном диссоциирует, в результате краситель-гаситель оказывается вблизи репортерного красителя и флуоресцентный сигнал снижается. Ампликоны, последовательность которых полностью совпадает с последовательностью зонда (дикий тип) дают плавление (диссоциацию с зондом) при более высоких температурах по сравнению с ампликонами, содержащими одно или несколько несовпадений (мутанты). Величина флуоресцентного сигнала при каждом значении температуры измеряется, и рассчитывается температура плавления. Присутствие мутаций в кодонах 12 и 13 экзона 2, и в кодоне 61 экзона 3 KRAS определяется на основании определенных значений температуры плавления. Чтобы избежать детекции синонимичных мутаций в кодонах 12 и 13 (не сопровождающихся заменой аминокислоты), модифицированное основание используется в качестве универсального основания и дает значение температуры плавления в пределах значений, характерных для дикого типа.

Избирательная амплификация

Избирательность амплификации нуклеиновой кислоты – мишени достигается в тесте cobas® KRAS Mutation Test за счет применения фермента AmpErase (урацил-N-гликозилазы) и трифосфата дезоксиуридина (dUTP)²⁵. Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси dNTPs в реагенте Мастермикс; поэтому дезоксиуридин содержится только в ампликонах. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом AmpErase до начала амплификации ДНК-мишени. Фермент AmpErase, входящий в состав реагента Мастермикс, катализирует расщепление содержащей дезоксиуридин ДНК по дезоксиуридиновому основанию, открывая дезоксирибозную цепь в позиции С1. При нагревании на первом этапе цикла, цепь ДНК ампликона разрывается в позиции дезоксиуридина и, следовательно, она не может в дальнейшем быть амплифицированной.

Фермент AmpErase инактивируется при нагревании выше 55°C, т.е. на протяжении температурных циклов, и поэтому не разрушает ампликоны мишени.

Показано, что в тесте cobas® KRAS Mutation Test инактивируется не менее 10³ копий содержащих дезоксиуридин ампликонов мутантной последовательности KRAS в ПЦР.

АГЕНТЫ

Набор для пробоподготовки
cobas® DNA Sample Preparation Kit
(P/N: 05985536190)

DNA SP 24 теста

DNA TLB
(Лизирующий буфер для тканей DNA Tissue Lysis Buffer)
Буфер Tris-HCl
Хлорид калия
0.04% ЭДТА
0.1% Тритон X-100
0.09% азид натрия

1 x 10 мл

PK
(Протеиназа К)
Протеиназа К (лиофилизованная)

1 x 100 мг

Хп  протеиназа К

опасно
DNA PBB
(Связывающий парафин буфер DNA Paraffin Binding Buffer)
Буфер Tris-HCl
49.6% гуанидин гидрохлорид
0.05% мочевины
17.3% тритон X-100

1 x 10 мл

Хп  49.6% (в/в) гуанидин HCl
опасно

WB I
(Промывочный буфер DNA Wash Buffer I)
Буфер Tris-HCl
64% гуанидин гидрохлорид

1 x 25 мл

Хп  64% (в/в) гуанидин HCl
опасно

WB II (Промывочный буфер DNA Wash Buffer II) Буфер Tris-HCl Хлорид натрия	1 x 12.5 мл
DNA EB (Буфер для элюции ДНК) Буфер Tris-HCl 0.09% азид натрия	1 x 6 мл
FT (пробирки с фильтром, с крышкой)	1 x 25 шт.
СТ (пробирки для сбора)	3 x 25 шт.
Набор cobas® KRAS Mutation Test (P/N: 05852170190)	KRAS 24 теста
KRAS MIX (KRAS реакционная смесь) Трициновый буфер Ацетат калия Гидроксид калия Глицерин 4.76 % диметил сульфоксид 0.1% консервант ProClin 300 < 0.9% dNTP < 0.1% ДНК-полимераза Z05 (бактериальная) < 0.1% фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная) <0.003% олигонуклеотидный аптамер	4 x 0.3 мл
MGAC (Ацетат магния) Ацетат магния 0.09% азид натрия	4 x 0.2 мл
KRAS 12/13 OM (KRAS Codon 12/13 смесь олигонуклеотидов) Tris-HCl буфер ЭДТА Поли-гА РНК (синтетическая) 0.1% консервант ProClin 300 <0.01% прямой и обратный праймеры KRAS <0.01% меченный флуоресцентными красителями зонд KRAS	2 x 0.3 мл
KRAS 61 OM (KRAS Codon 61 смесь олигонуклеотидов) Tris-HCl буфер ЭДТА Поли-гА РНК (синтетическая) 0.1% консервант ProClin 300 <0.01% прямой и обратный праймеры KRAS <0.01% меченный флуоресцентными красителями зонд KRAS	2 x 0.3 мл
KRAS MC (KRAS мутантный контроль) Tris-HCl буфер ЭДТА	4 x 0.1 мл

Поли-rA РНК (синтетическая)
0.05% азид натрия
<0.001% плазмидная ДНК, несущая последовательности экзонов 2 и 3
KRAS (бактериальная)
<0.001% ДНК KRAS дикого типа (из клеточной культуры)

KRAS CAL

4 x 0.1 мл

(KRAS калибратор)

Tris-HCl буфер

ЭДТА

Поли-rA РНК (синтетическая)

0.05% азид натрия

<0.001% ДНК KRAS дикого типа (из клеточной культуры)

DNA SD

2 x 3.5 мл

(буфер для разведения образцов ДНК)

Tris-HCl буфер

0.09% азид натрия

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

A. ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*.

B. Данный тест предназначен для анализа фиксированных в формалине образцов ткани рака толстой и прямой кишки (РТПК) в парафиновых блоках.

C. Не пипетировать ртом.

D. Не есть, не пить и не курить в рабочих зонах лаборатории.

E. Не допускайте контаминации реагентов микроорганизмами и ДНК.

F. Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с федеральными и местными правилами.

G. Не используйте наборы после истечения срока годности.

H. Не объединяйте реагенты из разных наборов или серий наборов.

I. Сведения о безопасности материалов (MSDS) можно получить по запросу в Вашем представительстве Roche.

J. Для предотвращения контаминации необходимо работать в перчатках и менять их при работе с образцами и с реагентами.

K. Для предотвращения контаминации рабочего мастермиска образцами ДНК, амплификацию и детекцию необходимо проводить в зоне, отделенной от зоны в которой проводится выделение ДНК.

Рабочая зона для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед приготовлением рабочего мастермиска. Для выполнения качественной очистки все поверхности, включая штативы и дозаторы, необходимо протереть 0.5% раствором гипохлорита натрия* и затем протереть 70% этанолом.

L. **DNA PBB, WB I и WB II** содержат гуанидин гидрохлорид. При разливе жидкостей, содержащий данный реагент, проведите очистку подходящим лабораторным детергентом и затем водой. При разливе потенциально инфекционного материала, очистите поверхность сначала лабораторным детергентом и водой, и затем 0.5% раствором гипохлорита натрия. Если разлив произошел в анализаторе **cobas z 480**, следуйте инструкциям, приведенным в Руководстве пользователя системы **cobas® 4800**.

Примечание: Коммерческое жидкое бытовое моющее средство обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5.25%. Разведение 1:10 бытового хлорсодержащего моющего средства дает 0.5% раствор гипохлорита натрия.

M. Все образцы необходимо рассматривать как инфекционные и соблюдать при работе с ними правила безопасной работы в лаборатории, указанные в документах *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁶ и CLSI Document M29-A3.²⁷

N. **DNA TLB** и **DNA PBB** содержат Тритон X-100, вызывающий раздражение слизистых. Избегайте попадания в глаза, на кожу и слизистые.

- O. **DNA TLB, DNA EB, MGAC, KRAS MC, KRAS CAL** и **DNA SD** содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб, образуя взрывоопасные азиды металлов. Выливая содержащие азид натрия растворы в лабораторную раковину, смывайте большим объемом воды для предотвращения образования азидов.
- P. Ксилен является опасным реагентом, работа с ним должна проводиться в укрытии. Утилизация проводится с химическими отходами в соответствии с федеральными и местными правилами.
- Q. При работе с любыми реагентами пользуйтесь одноразовыми перчатками, лабораторными халатами и защитой для глаз. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами и слизистой. В случае такого контакта немедленно смойте большим количеством воды, в противном случае могут возникнуть ожоги. Разлитые реагенты смойте водой и вытрите насухо.
- R. Все расходные материалы предназначены для однократного применения.
- S. Не используйте расходные материалы после истечения их срока годности.
- T. Не используйте раствор гипохлорита натрия (бытового моющего средства) для очистки анализатора **cobas z 480**. Проводите очистку анализатора **cobas z 480** в соответствии с Руководством пользователя системы **cobas® 4800**.
- U. Дополнительные меры предосторожности, безопасности и процедуры для снижения риска контаминации при работе с анализатором **cobas z 480** приведены в Руководстве пользователя системы **cobas® 4800**.
- Рекомендуется использовать одноразовые дозаторы и свободные от ДНКаз наконечники для пипеток.

ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И РАБОТЫ

- A. Храните **DNA TLB, DNA PBB, WB I, WB II, DNA EB, PK, FT** и **CT** при 15°C - 30°C. После открытия **DNA TLB, DNA PBB, WB I, WB II, DNA EB** и **PK** а могут быть использованы 8 раз или стабильны до истечения срока годности, что наступит раньше.
- B. Храните **PK** при 15-30°C. После внесения стерильной свободной от нуклеаз воды в **PK**, храните растворенную **PK** в аликвотах по 450 мкл при -20°C. После растворения **PK** необходимо использовать в течение 90 дней, или до истечения срока годности набора.
- C. После внесения абсолютного этанола, храните буферы **WB I** и **WB II** при 15-30°C. Данные рабочие растворы стабильны в течение 90 дней или до истечения срока годности, что наступит раньше.
- D. Храните **KRAS MIX, MGAC, KRAS 12/13 OM, KRAS 61 OM, KRAS MC, KRAS CAL** и **DNA SD** при 2°C - 8°C. После открытия эти реагенты могут быть использованы до 4 раз в течение 90 дней, или до истечения срока годности набора.
- E. Все реагенты необходимо разморозить при t от 15°C до 30°C в течение не менее 1 часа перед использованием. После разморозки использовать реагенты в течение 1 часа, и вернуть неиспользуемые реагенты в t от -25°C до -15°C для хранения в течение 1 часа. После вскрытия флакона все реагенты, за исключением **DNA SD**, могут быть использованы для пипетирования до 4 аликвот после 60 дней или до истечения срока годности, что наступит раньше.
- F. **KRAS 12/13 OM, KRAS 61 OM** и рабочий **MMX** (полученный при внесении **KRAS 12/13 OM** или **KRAS 61 OM** и **MGAC** в **KRAS MIX**) необходимо защищать от продолжительного воздействия света.
- G. После приготовления рабочий **MMX** необходимо хранить при 2-8°C в темноте. Выделенные образцы и контроли необходимо внести в рабочий мастермикс (**MMX**) в течение 1 часа после его приготовления.
- H. Подготовленные образцы (выделенная ДНК) стабильны до 24 часа при 20-30°C, до 14 дней при 2-8°C и до 60 дней замороженными при -20°C. Подготовленные образцы также стабильны после 4 циклов замораживания/оттаивания.
- I. Амплификацию необходимо начать в течение 1 часа после внесения выделенных образцов в рабочий мастермикс (полученный в результате внесения **KRAS 12/13 OM** или **KRAS 61 OM** и **MGAC** в **KRAS MIX**).

ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- A. Набор для пробоподготовки **cobas®** DNA Sample Preparation Kit
(P/N: 05985536190)
DNA TLB
(Лизирующий буфер для тканей)
PK
(Протеиназа K)
DNA PBB
(Буфер для связывания парафина)
WB I
(Промывочный буфер I)
WB II
(Промывочный буфер II)
DNA EB
(Буфер для элюции ДНК)
FT
(Пробирки с фильтром, с крышкой)
CT
(Пробирки для сбора)

DNA SP

24 теста

- B. Набор **cobas®** KRAS Mutation Test
(P/N: 05852170190)
KRAS MIX
(реакционная смесь) (крышка с прозрачным ярлыком)
MGAC
(ацетат магния) (крышка с желтым ярлыком)
KRAS 12/13 OM
(KRAS Codon 12/13 смесь олигонуклеотидов) (крышка с белым ярлыком)
KRAS 61 OM
(KRAS Codon 61 смесь олигонуклеотидов) (крышка с золотистым ярлыком)
KRAS MC
(KRAS мутантный контроль) (крышка с красным ярлыком)
KRAS CAL
(KRAS калибратор) (крышка с пурпурным ярлыком)
DNA SD
(Раствор для разведения образцов ДНК)

KRAS

24 Tests

НЕОБХОДИМЫЕ НЕПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Ксилол (Sigma, Cat.# 247642 или Fisher Scientific, Cat.# X5-4 или эквивалент)
- Абсолютный этанол (Sigma, Cat.# E7023 или Fisher Scientific, Cat.# BP2818-500 или эквивалент)
- Изопропанол (ACS, ≥99,5%)
- Стерильная свободная от ДНКаз вода (Applied Biosystems PCR Grade Water, Cat.# AM9937 или Thermo Scientific Molecular Biology Grade Water, Cat.# SH-3053801 или эквивалент)
- Стерильные одноразовые серологические пипетки: 5 и 25 мл
- Микроплашка **cobas®** 4800 System (AD-плашка) и заклеивающая пленка (Roche P/N 05232724001)
- Аппликатор для клеящей фольги **cobas®** 4800 (Roche P/N 04900383001)
- Дозаторы с переменным объемом*: (объемом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл) со свободными от ДНКаз наконечниками с аэрозольным барьером
- Дозатор (Drummond P/N: 4-000-100 или эквивалент)
- Настольная центрифуга, рассчитанная на 20,000 x g
- Два (2) термоблока, рассчитанных на нагревание микроцентрифужных пробирок до 56°C и 90°C**

- Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл, стерильные, свободные от ДНКаз/РНКаз, для ПЦР (Eppendorf, Cat# 022363212)
- Спектрофотометр NanoDrop UV-Vis (Thermo Scientific ND-1000 или ND-2000)**
- Вортекс**
- Штативы для микроцентрифужных пробирок
- Одноразовые перчатки, без талька
- Калиброванные термометры для термоблока**
- Водяная баня** рассчитанная на 37°C
- Бритва с одной острой стороной
- Холодильник для хранения при -25°C до -15°C

* Работа с дозаторами должна проводиться в соответствии с инструкциями производителя, их точность должна составлять 3% от указанного объема. Свободные от ДНКаз наконечники с аэрозольным барьером должны использоваться везде, где это указано в инструкции, для предотвращения деградации образцов и перекрестной контаминации.

**Эксплуатация всего оборудования должна осуществляться в соответствии с инструкциями производителя.

Приборы и программное обеспечение

- Анализатор **cobas z 480**
- Контрольный блок **cobas® 4800 SR2 System** с изображением OSXP
- Программа **cobas® 4800 SR2 System** версия 2.0 или выше
- Программа **KRAS Analysis Package Software Version 1.0** или выше
- Сканер штрих-кода
- Принтер

СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Примечание: Обращайтесь со всеми образцами, как с содержащими инфекционные агенты.

А. Сбор образцов

Набор **cobas® KRAS Mutation Test** валидирован для работы с образцами FFPEТ рака прямой кишки.

В. Транспортировка образцов

Образцы FFPEТ можно транспортировать при температуре 15-30°C. Транспортировка образцов FFPEТ НМРЛ должна выполняться в соответствии с федеральными и местными правилами перевозки этиологических агентов.²⁸

С. Хранение образцов

Образцы FFPEТ рака прямой кишки при хранении при 15-30°C стабильны в течение 12 месяцев после получения. Секции толщиной 5 мкм, нанесенные на предметные стекла, могут храниться при 15-30°C 60 дней.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА

*Примечание: Для теста **cobas® KRAS Mutation Test** используются только образцы FFPEТ РПТК в секциях толщиной 5 мкм, в которых доля опухолевой ткани составляет не менее 10%. Образцы, в которых содержится менее 10% опухолевой ткани должны подвергаться макродиссекции перед депарафинизацией.*

*Примечание: Подробные инструкции по работе с анализатором **cobas z 480** приведены в Руководстве пользователя анализатора **cobas z 480**.*

Примечание: Термоблоки для инкубации микроцентрифужных пробирок необходимо включить и выставить на 56°C и 90°C.

Объем постановки

Одна постановка может включать от 1 до 45 образцов (плюс контроли и калибратор) в 96 луночной микроплашке. При постановке более 24 образцов необходимо использовать более одного набора реагентов **cobas® KRAS Mutation Test**.

Набор **cobas® KRAS Mutation Test** содержит количество реагентов, достаточное для 8 постановок по 3 образца (плюс контроли и калибратор), максимум 24 образца с одним набором.

Организация постановки

Тест **cobas® KRAS Mutation Test** состоит из пробоподготовки вручную с помощью набора **cobas® DNA Sample Preparation Kit** и последующей амплификации/детекции в анализаторе **cobas z 480** с помощью набора **cobas® KRAS Mutation Test**.

Подготовка реагентов

A. Растворите протеиназу К (**ПК**), добавив 4.5 мл стерильной (степень очистки для ПЦР) воды в пробирку с помощью стерильной одноразовой серологической пипетки объемом 5 мл. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Сделайте аликвоты растворенной **ПК** по 450 мкл в микроцентрифужных пробирках объемом 1.5 мл и храните при -20°C. Если протеиназа К была растворена ранее и хранилась замороженной, оттайте необходимое количество аликвот до начала депарафинизации (70 мкл растворенной **ПК** необходимо для обработки одного образца).

Все растворы, хранящиеся при 15-30°C, должны быть прозрачными. Если в каком-либо реагенте присутствует преципитат, нагрейте реагент на водяной бане при 37°C до полного растворения преципитата. Не используйте реагент, если преципитат растворен не полностью.

C. Приготовьте промывочный буфер DNA Wash Buffer I (**WB I**) добавив 15 мл абсолютного этанола во флакон **WB I**. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер **WB I** при 15°C - 30°C.

D. Приготовьте промывочный буфер DNA Wash Buffer II (**WB II**) добавив 50 мл абсолютного этанола во флакон **WB II**. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер **WB II** при 15°C - 30°C.

Депарафинизация секций FFPET на предметных стеклах

Примечание: Ксилен является опасным реагентом. Все этапы депарафинизации должны проводиться под вытяжкой. См. Раздел Меры предосторожности

A. Поместите предметное стекло с секцией FFPET толщиной 5 мкм в контейнер с достаточным объемом ксилена, закрывающим предметное стекло полностью. Инкубируйте 5 минут.

Перенесите предметное стекло в контейнер с достаточным объемом абсолютного этанола, закрывающим предметное стекло полностью. Инкубируйте 5 минут.

C. Выньте предметное стекло и дайте секции высохнуть на воздухе полностью (5 - 10 минут).

D. Выполните макродиссекцию, если образец содержит <50% опухолевой ткани.

E. Промаркируйте по одной микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 мл для каждого образца.

F. Внесите по 180 мкл **DNA TLB** в каждую маркированную микроцентрифужную пробирку.

G. Внесите по 70 мкл растворенной **ПК** в каждую пробирку с **DNA TLB**

H. Соскоблите ткань с предметного стекла и поместите в смесь **DNA TLB** и **ПК**.

I. Перейдите к этапу A процедуры **Выделение ДНК**.

Депарафинизация секций FFPET не на предметных стеклах

Примечание: Ксилен является опасным реагентом. Все этапы депарафинизации должны проводиться под вытяжкой. См. Раздел Меры предосторожности

A. Выполните макродиссекцию, если образец содержит <50% опухолевой ткани. Поместите секцию FFPET толщиной 5 мкм в промаркированную микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл.

B. Внесите 500 мкл ксилена в пробирку с секцией FFPET.

- C. Тщательно перемешайте на вортексе 10 секунд.
- D. Оставьте на 5 минут при 15°C-30°C.
- E. Внесите 500 мкл абсолютного этанола и перемешайте на вортексе 10 секунд.
- F. Оставьте на 5 минут при 15°C-30°C.
- G. Центрифугируйте при 16,000 x g - 20,000 x g в течение 2 минут и удалите супернатант, не задев осадок. Удалите супернатант в химический отходы.
- H. Внесите 1 мл абсолютного этанола и перемешайте на вортексе 10 секунд.
- I. Центрифугируйте при 16,000 x g - 20,000 x g в течение 2 минут и удалите супернатант, не задев осадок. Удалите супернатант в химический отходы.

Примечание: Если осадок плавает в супернатанте, открутите снова 1 минуту при 16,000 x g-20,000 x g. Удалите остатки супернатанта.

- J. Высушите осадок ткани в течение 10 минут при 56°C в термоблоке в открытой пробирке.

Примечание: Прежде чем перейти к следующему этапу, убедитесь, что этанол испарился полностью, осадок должен быть сухим.

Примечание: При необходимости осадки можно хранить 24 часа при 2-8°C.

- K. Растворите осадок ткани в 180 мкл буфера для лизирования тканей (DNA TLB).
- L. Внесите 70 мкл растворенной РК.
- M. Перейдите к этапу А процедуры **Выделение ДНК**.

Выделение ДНК

Примечание: Проводите обработку отрицательного контроля одновременно с образцами. Приготовьте отрицательный контроль, смешав 180 мкл буфера для лизиса тканей (DNA TLB) и 70 мкл раствора РК в микроцентрифужной пробирке объемом 1.5 мл, промаркированной NEG CT. Отрицательный контроль необходимо обрабатывать по той же процедуре, что и клинические образцы.

- A. Перемешайте на вортексе пробирку с образцом/смесью **DNA TLB/РК** в течение 30 секунд.

Примечание: Ткань должна быть полностью погружена в смесь DNA TLB/РК.

- B. Поместите пробирку в термоблок на 56°C и инкубируйте 60 минут.
- C. Перемешайте на вортексе 10 секунд.

Примечание: Ткань должна быть полностью погружена в смесь DNA TLB/РК.

- D. Поместите пробирку в термоблок на 90°C и инкубируйте 60 минут.

Примечание: Во время инкубации подготовьте необходимое количество пробирок с фильтром (FT) поместив картридж в пробирки для сбора (CT) и промаркируйте каждую пробирку на крышке FT.

Примечание: Для каждого образца потребуется 1 FT, 3 CT и одна пробирка для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл).

Примечание: Во время инкубации промаркируйте необходимое число пробирок для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл).

- E. Дайте пробирке остыть до 15°C-30°C. После охлаждения открутите в центрифуге пробирку, чтобы собрать все ее содержимое на дне.
- F. Внесите 200 мкл **DNA PBВ** и перемешайте пипетированием 3 раза.
- G. Инкубируйте пробирку при 15°C-30°C в течение 10 минут.
- H. Добавьте 100 мкл изопропанола и перемешайте лизат пипетированием 3 раза.
- I. Перенесите лизат целиком в маркированную пробирку **FT/CT**.
- J. Центрифугируйте **FT/CT** при 8,000 x g в течение 1 минуты.
- K. Поместите **FT** в новую пробирку **CT**. Выбросьте содержимое использованной пробирки **CT** в химические отходы. Использованную пробирку **CT** утилизируйте надлежащим образом.

L. Внесите 500 мкл рабочего буфера **WB I** в **FT**.

*Примечание: Приготовление рабочего раствора **WB I** описано в разделе Подготовка реагентов.*

M. Центрифугируйте **FT/СТ** при 8,000 x g в течение 1 минуты.

N. Выбрасывайте содержимое всех пробирок **СТ** в химические отходы. Поместите **FT** назад в ту же пробирку **СТ**.

O. Внесите 500 мкл рабочего буфера **WB II** в **FT**.

*Примечание: Приготовление рабочего раствора **WB II** описано в разделе Подготовка реагентов.*

P. Центрифугируйте **FT/СТ** при 8,000 x g в течение 1 минуты.

Q. Поместите **FT** в новую пробирку **СТ**. Выбросьте содержимое использованной пробирки **СТ** в химические отходы. И использованную пробирку **СТ** утилизируйте надлежащим образом.

R. Центрифугируйте пробирку **FT/СТ** при 16,000 - 20,000 x g в течение 1 минуты, чтобы высушить мембрану фильтра.

S. Поместите пробирку **FT** в заранее промаркированную пробирку для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл). Выбросьте содержимое использованной пробирки **СТ** в химические отходы. И использованную пробирку **СТ** утилизируйте надлежащим образом.

T. Внесите 100 мкл **DNA EB** на центр мембраны **FT** не касаясь самой мембраны **FT**.

U. Инкубируйте **FT** в пробирке для элюции при 15°C-30°C в течение 5 минут.

V. Центрифугируйте **FT** в пробирке для элюции при 8,000 x g в течение 1 минуты, чтобы собрать элюат на дне пробирки для элюции. Утилизируйте **FT** надлежащим образом. Элюат является **исходным образцом ДНК**.

W. Закройте крышки пробирок для элюции. Перейдите к этапу A раздела **Количественный анализ ДНК**.

Примечание: Количественный анализ ДНК необходимо проводить немедленно после процедуры выделения ДНК, до хранения образца ДНК.

Количественный анализ ДНК

A. Перед проведением количественного анализа перемешайте каждый исходный образец ДНК на вортексе 5 секунд.

B. Проведите количественный анализ ДНК с помощью спектрофотометра NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer (ND-1000 или ND-2000) по протоколу производителя. Используйте в качестве пустого образца **DNA EB**. Обычно требуется 2 измерения. Оба измерения должны укладываться в $\pm 10\%$ друг от друга при концентрации ДНК ≥ 20.0 нг/мкл. Если концентрация ДНК < 20.0 нг/мкл, различия между двумя измерениями должны укладываться в ± 2.0 нг/мкл. Если измерения не укладываются в критерий $\pm 10\%$ друг от друга при концентрации ДНК ≥ 20.0 нг/мкл или не укладываются в критерий ± 2 нг/мкл при концентрации ДНК < 20.0 нг/мкл, необходимо выполнить два дополнительных измерения, соответствующих данным критериям. Затем необходимо рассчитать среднее для двух этих измерений.

Примечание: Концентрацию ДНК в обработанном отрицательном контроле (NEG CT) измерять не нужно.

C. Концентрация исходного образца ДНК должна составлять ≥ 4 нг/мкл для проведения теста **cobas® KRAS Mutation Test**. Две реакции амплификации/детекции проводится для каждого образца, для каждой амплификации/детекции используется 25 мкл разведения исходного образца ДНК с концентрацией 2 нг/мкл (всего 50 нг ДНК).

C. The DNA Stock concentration from the specimens must be ≥ 4 ng/ μ L to perform the **cobas®** Mutation Test. Two amplification/detections are run per specimen, using 25 μ L of a 2 ng/ μ L dilution of DNA Stock (total of 50 ng DNA) for each amplification/detection.

Примечание: Каждый исходный образец ДНК должен иметь концентрацию не менее 4 нг/мкл для проведения теста **cobas® 4800 KRAS Mutation Test**. Если концентрация исходного образца ДНК < 4 нг/мкл, для данного образца необходимо повторить процедуру пробоподготовки, используя две секции **FFPET** толщиной 5 мкм. Перейдите к этапу А раздела “Денатурализация секций **FFPET** на предметных стеклах” или к этапу А раздела “Денатурализация секций **FFPET** не на предметных стеклах”, объединив оба образца ткани в одной пробирке. Продолжите процедуру выделения ДНК. Если концентрация ДНК в исходном образце по-прежнему < 4 нг/мкл, может потребоваться запрос нового образца **FFPET**.

Примечание: Храните неразведенные исходные образцы ДНК (обработанные образцы ДНК и отрицательный контроль) при 2°C - 8°C не более 2 недель или при -20°C до 60 дней.

АМПЛИФИКАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ

Примечание: Чтобы не допустить контаминации рабочего мастермикса образцами ДНК, амплификацию и детекцию необходимо проводить в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Рабочую зону для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед началом приготовления рабочего мастермикса. Все поверхности, включая штативы и дозаторы, необходимо тщательно протереть 0.5% раствором гипохлорита натрия, затем протереть 70% этанолом. Коммерческие чистящие средства обычно содержат гипохлорит натрия в концентрации 5.25%. Разведение 1:10 чистящего средства позволяет получить 0.5% раствор гипохлорита натрия.

Настройка прибора

Подробные инструкции по подготовке анализатора **cobas z 480** приведены в Руководстве пользователя анализатора **cobas z 480**.

Создание назначения теста

Подробные инструкции по постановке теста **KRAS** приведены в Руководстве пользователя программы **cobas® 4800** версии 2.0 для теста **cobas® KRAS Mutation Test** (Руководство пользователя **cobas® KRAS**).

Расчет разведения исходного образца ДНК:

Расчет разведения исходного образца ДНК, концентрация которого составляет от 4 нг/мкл до 28 нг/мкл

Примечание: Исходные образцы ДНК необходимо разводить непосредственно перед проведением амплификации и детекции.

Примечание: Для каждого образца проводятся две (2) реакции амплификации/детекции, для этого необходим объем образца 50 мкл (по 25 мкл для кодона 12/13 и кодона 61) с концентрацией 2 нг/мкл после разведения исходного образца ДНК (всего 100 нг ДНК).

А. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем (в мкл) исходного образца ДНК:

$$\text{Мкл исходного образца ДНК} = (70 \text{ мкл} \times 2 \text{ нг/мкл}) \div \text{концентрация исходного образца ДНК [нг/мкл]}$$

В. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем (в мкл) растворителя для образца ДНК (**DNA SD**):

$$\text{мкл DNA SD} = 70 \text{ мкл} - \text{мкл исходного образца ДНК}$$

Пример:

$$\text{Концентрация исходного образца ДНК} = 6.5 \text{ нг/мкл}$$

$$\text{А. мкл исходного образца ДНК} = (70 \text{ мкл} \times 2 \text{ нг/мкл}) \div 6.5 \text{ нг/мкл} = 21.5 \text{ мкл}$$

$$\text{В. мкл DNA SD} = (70 \text{ мкл} - 21.5 \text{ мкл}) = 48.5 \text{ мкл}$$

Расчет разведения исходного образца ДНК, концентрация которого составляет >28 нг/мкл

Примечание: Исходные образцы ДНК необходимо разводить непосредственно перед проведением амплификации и детекции.

Примечание: Для каждого образца проводятся две (2) реакции амплификации/детекции, для этого необходим объем образца 50 мкл (по 25 мкл для кодонов 12/13 и кодона 61) с концентрацией 2 нг/мкл после разведения исходного образца ДНК (всего 100 нг ДНК).

А. Для исходных образцов ДНК с концентрацией > 28 нг/мкл, используйте приведенную ниже формулу для расчета объема растворителя образца ДНК (**DNA SD**), необходимого для получения не менее 70 мкл разведенного образца ДНК. Данная формула обеспечивает использование для разведения не менее 5 мкл исходного образца ДНК.

В. Для каждого образца рассчитайте объем (в мкл) **DNA SD**, необходимый для разведения 5 мкл исходного образца ДНК до концентрации 2 нг/мкл:

Необходимый объем **DNA SD** в мкл = $((5 \text{ мкл исходного образца ДНК} \times \text{концентрация ДНК в нг/мкл}) / 2 \text{ нг/мкл}) - 5 \text{ мкл}$

Пример:

Концентрация исходного образца ДНК = 31.7 нг/мкл

А. Необходимый объем **DNA SD** в мкл = $((5 \text{ мкл} \times 31.7 \text{ нг/мкл}) / 2 \text{ нг/мкл}) - 5 \text{ мкл} = 74.3 \text{ мкл}$

В. Используйте рассчитанный объем **SD** для разведения 5 мкл исходного образца ДНК.

Разведение образцов

А. Подготовьте необходимое число микроцентрифужных пробирок объемом 1.5 мл для разведений ДНК, промаркируйте их в соответствии с маркировкой образцов.

В. С помощью дозатора и наконечника с аэрозольным барьером, внесите рассчитанный объем растворителя ДНК (**DNA SD**) в промаркированную пробирку. Внесите 35 мкл **DNA SD** в пробирку, маркированную **NEG CT**.

С. Перемешайте исходный образец ДНК и отрицательный контроль на вортексе в течение 5-10 секунд.

Д. С помощью дозатора и наконечника с аэрозольным барьером, внесите рассчитанный объем исходного образца ДНК в промаркированную пробирку, содержащую **DNA SD**. Для каждого образца используйте отдельный наконечник. Внесите 35 мкл отрицательного контроля (элюат после выделения) в пробирку **NEG CT**.

Е. Закройте пробирки и перемешайте разведенные образцы ДНК на вортексе в течение 5-10 секунд.

Замените перчатки.

Приготовление рабочих мастермиксов (MMX 12/13 и MMX 61)

Примечание: KRAS 12/13 OM, KRAS 61 OM и рабочий мастермикс MMX чувствительны к воздействию света, необходимо защищать их от продолжительного воздействия света.

Примечание: Вследствие вязкости микса KRAS MIX и рабочего MMX, раскапывайте медленно, чтобы весь объем смеси выходил из наконечника.

Примечание: KRAS MIX, KRAS 12/13 OM и KRAS 61 OM могут иметь светло-желтый оттенок. Это не сказывается на рабочих характеристиках реагента.

В отдельных микроцентрифужных пробирках объемом 1.5 мл приготовьте две смеси рабочих MMX, один с **KRAS 12/13 OM**, второй с **KRAS 61 OM** in separate 1.5 mL Safe-Lock microcentrifuge tubes.

А. Calculate the volume of **KRAS MIX** required for each working MMX using the following formula:

Volume of **KRAS MIX** required = $(\text{Number of Specimens} + 2 \text{ Controls} + 1 \text{ Calibrator} + 1) \times 10 \mu\text{L}$

В. Рассчитайте объемы **KRAS 12/13 OM** и **KRAS 61 OM** необходимые для получения рабочих мастермиксов MMX по следующей формуле:

Необходимый объем **KRAS 12/13 OM** или **KRAS 61 OM** = (число образцов + 2 контроля + 1 калибратор + 1) x 10 мкл

С. Рассчитайте необходимый объем **MGAC** для каждого **MMX** по следующей формуле:

Необходимый объем **MGAC** = (число образцов + 2 контроля + 1 калибратор + 1) x 6 мкл

С помощью таблицы 1 определите объем каждого реагента, необходимый для получения рабочего **MMX** исходя из числа образцов в постановке.

Таблица 1

Объемы реагентов, необходимые для получения рабочих мастермиксов MMX 12/13 и MMX 61

Объемы реагентов, необходимые для получения рабочих мастермиксов MMX # образцов*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KRAS MIX	10 µL	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
KRAS 12/13 OM or KRAS 61 OM	10 µL	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
MGAC	6 µL	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84
Total Volume µL		130	156	182	208	234	260	286	312	338	364

* Includes sufficient volumes for 1 tube per specimen, 2 control tubes, 1 calibrator tube, and 1 extra tube

D. Возьмите необходимое число пробирок **KRAS MIX**, **KRAS 12/13 OM**, **KRAS 61 OM** и **MGAC** из хранения при 2°C - 8°C. Перемешайте на вортексе каждый реагент 5 секунд и осадите содержимое пробирок. Промаркируйте стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл для рабочего мастермикса **MMX 12/13** и рабочего мастермикса **MMX 61**.

Примечание: Рабочий MMX должен быть приготовлен в течение часа после разморозки реагентов. После разморозки вернуть все неиспользуемые реагенты в t от -25°C до -15°C в течение часа после использования.

E. Внесите рассчитанный объем **KRAS MIX** в пробирки для рабочих мастермиксов **MMX**.

F. Внесите рассчитанные объемы **KRAS 12/13 OM** и **KRAS 16 OM** в соответствующие пробирки для рабочих мастермиксов **MMX**.

G. Внесите рассчитанный объем **MGAC** в пробирки с рабочими **MMX**.

H. Перемешайте пробирки на вортексе 3- 5 секунд.

Примечание: ДНК образцов, контролей и калибратора необходимо внести в микроплашку (AD-плашку) не позднее чем через 1 час после подготовки рабочих мастермиксов (MMX)

Примечание: Используйте только микроплашки cobas® 4800 System (AD-плашки) и заклеивающую пленку (Roche P/N 05232724001)

Рисунок 1
Схема размещения образцов в плашке

Sample Plate Layout												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KRAS MC 12/13	KRAS MC 61	Sample 6 12/13	Sample 6 61	Sample 14 12/13	Sample 14 61	Sample 22 12/13	Sample 22 61				
B	NEG CTL 12/13	NEG CTL 61	Sample 7 12/13	Sample 7 61	Sample 15 12/13	Sample 15 61	Sample 23 12/13	Sample 23 61				
C	KRAS CAL 12/13	KRAS CAL 61	Sample 8 12/13	Sample 8 61	Sample 16 12/13	Sample 16 61	Sample 24 12/13	Sample 24 61				
D	Sample 1 12/13	Sample 1 61	Sample 9 12/13	Sample 9 61	Sample 17 12/13	Sample 17 61						
E	Sample 2 12/13	Sample 2 61	Sample 10 12/13	Sample 10 61	Sample 18 12/13	Sample 18 61						
F	Sample 3 12/13	Sample 3 61	Sample 11 12/13	Sample 11 61	Sample 19 12/13	Sample 19 61						
G	Sample 4 12/13	Sample 4 61	Sample 12 12/13	Sample 12 61	Sample 20 12/13	Sample 20 61						
H	Sample 5 12/13	Sample 5 61	Sample 13 12/13	Sample 13 61	Sample 21 12/13	Sample 21 61						

- A. Внесите по 25 мкл рабочего MMX в каждую задействованную в постановке реакционную лунку микроплашки (AD-плашки). Не касайтесь наконечником плашки за пределами лунки.
- Внесите рабочий мастермикс MMX 12/13 (содержащий KRAS 12/13 OM) в лунки нечетных столбцов микроплашки (AD-плашки) (1, 3, 5 и т.д.)
 - Внесите рабочий мастермикс MMX 61 (содержащий KRAS 61 OM) в лунки четных столбцов микроплашки (AD-плашки) (2, 4, 6 и т.д.)
- B. Внесите 25 мкл KRAS MC в лунки A1 и A2 микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз.
- C. Используя новый наконечник, внесите 25 мкл NEG CT в лунки B1 и B2 микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз.
- D. Используя новый наконечник, внесите 25 мкл KRAS CAL в лунки C1 и C2 микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз.

NOTE: каждая постановка должна содержать положительный контроль (KRAS MC) в лунках A1 и A2, отрицательный контроль (NEG CT) в лунках B1 и B2, и калибратор (KRAS CAL) в лунках C1 и C2, в противном случае анализатор cobas z 480 признает постановку невалидной.

Примечание: При необходимости меняйте перчатки для предотвращения перекрестной контаминации образцов.

- E. используя новый наконечник для каждого разведенного образца ДНК, внесите 25 мкл первого разведенного образца ДНК в лунки D1 и D2 микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз. Повторите данную процедуру для второго разведенного образца ДНК (лунки E1 и E2). В соответствии со схемой на Рисунке 1 внесите все оставшиеся образцы ДНК в лунки микроплашки (AD-плашки). Убедитесь, что вся реакционная смесь находится на дне лунки.
- F. Заклейте микроплашку (AD-плашку) заклеивающей пленкой (поставляется вместе с плашками). Используйте аппликатор для пленки для гарантии полного приклеивания пленки к микроплашке.
- G. До начала амплификации и детекции убедитесь, что в каждой лунке реакционная смесь находится на дне.

Примечание: Амплификацию и детекцию необходимо начать не позднее чем через 1 час после внесения первого образца ДНК в рабочий ММХ.

Запуск ПЦР

Подробные инструкции по проведению теста KRAS приведены в Инструкции пользователя cobas® KRAS.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Примечание: Валидация постановки и результатов образцов выполняется программой cobas® 4800 Software.

Примечание: Валидная постановка может содержать как валидные, так и невалидные результаты отдельных образцов.

Интерпретация результатов для валидной постановки приведена в Таблице 2.

Таблица 2
Интерпретация результатов теста cobas® KRAS Mutation Test

Результат теста	Мутация	Интерпретация
Mutation Detected	Codon 12/13 or Codon 61 (both may be present)	Мутация выявлена в кодоне 12/13 или в кодоне 61 KRAS, или в обоих кодонах.
Mutation Not Detected*	N/A	Мутация не выявлена в кодоне 12/13 или в кодоне 61 KRAS.
Invalid	N/A	Для образца получен невалидный результат. Повторите тестирование образца, следуя инструкциям, приведенным ниже в разделе “Повторное тестирование образцов с невалидными результатами”.
Failed	N/A	Постановка не прошла из-за ошибки оборудования или программы. Обратитесь за технической поддержкой в Ваше представительство Roche.

Результат Mutation Not Detected (Мутация не выявлена) не исключает присутствия мутации в кодонах 12/13 или 61 гена KRAS, поскольку результат теста зависит от доли мутантной последовательности, присутствующей в образце, адекватности сбора образца, присутствия ингибиторов, количества ДНК в образце.

Повторное тестирование образцов с невалидными результатами

- А. Повторите разведение исходного образца ДНК, для которого был получен невалидный результат, начиная с этапов “Расчет разведения исходного образца ДНК” и “Разведение образца” в разделе “АМПЛИФИКАЦИЯ И ДЕТЕКЦИЯ”.
- В. После разведения исходного образца ДНК до концентрации 2 нг/мкл, как описано в разделе “Разведение образца”, перейдите к разделу “Приготовление рабочих мастермиксов (ММХ 12/13 и ММХ 61)” и последующим процедурам амплификации и детекции.

Примечание: Если после повторного тестирования образец снова дал невалидный результат, или для получения нового разведения ДНК, как описано выше на этапе А, имеется недостаточное количество исходного образца ДНК, повторите всю процедуру теста для данного образца, начав с этапа Денатурации и Выделения ДНК из новой секции FFPEТ толщиной 5 микрон.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

По одной серии мутантного контроля **cobas® KRAS Test (KRAS MC)**, отрицательного контроля (**NEG CT**) и калибратора **KRAS Calibrator (KRAS CAL)** для рабочих мастермиксов **MMX 12/13** и **MMX 61** включается в каждую постановку. Постановка признается валидной, если лунки с мутантным контролем **KRAS (KRAS MC)** (**A1** и **A2**), лунки с отрицательным контролем (**NEG CT**) (**B1** и **B2**), и лунки с калибратором **KRAS (KRAS CAL)** (**C1** и **C2**) дали валидный результат. Если мутантный контроль **KRAS (KRAS MC)**, отрицательный контроль (**NEG CT**) или калибратор **KRAS (KRAS CAL)** при постановке с каким-либо мастермиксом (**MMX 12/13** или **MMX 61**) дал невалидный результат, вся постановка признается невалидной и требующей перестановки. Приготовьте новое разведение ранее выделенной ДНК, и внесите его в новую микроплашку (**AD-плашку**) с контролями для проведения амплификации и детекции.

Положительный контроль

Результат мутантного контроля **KRAS (KRAS MC)** должен быть 'Valid' для обоих рабочих мастермиксов **MMX 12/13** и **MMX 61**. Если результат контроля **KRAS MC** постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Отрицательный контроль

Результат отрицательного контроля (**NEG CT**) должен быть 'Valid' для обоих рабочих мастермиксов **MMX 12/13** и **MMX 61**. Если результат контроля **NEG CT** постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Калибратор

Результат калибратора **KRAS (KRAS CAL)** должен быть 'Valid' для обоих рабочих мастермиксов **MMX 12/13** и **MMX 61**. Если результат калибратора **KRAS CAL** постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Требования к процедуре

Как при проведении любого теста, для выполнения данного теста требуется соблюдение правил надлежащей лабораторной практики. Из-за высокой аналитической чувствительности тестов на основе ПЦР, необходимо предотвращать контаминацию реагентов и амплификационных смесей.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Тест проводится только для указанных типов образцов. Тест **cobas® KRAS Mutation Test** валидирован только для образцов **FFPET** рака толстой и прямой кишки.
2. Тест **cobas® KRAS Mutation Test** валидирован только при работе с набором для выделения геномной ДНК **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (Roche P/N: 05985536190).
3. Детекция мутаций зависит от количества копий мутантной последовательности, присутствующей в образце, на ее эффективность могут оказывать влияние качество образца, количество выделенной ДНК и присутствие ингибирующих веществ.
4. Надежность полученных результатов зависит от адекватности фиксации образца, его транспортировки, хранения и обработки. Следуйте инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору, и в Руководстве пользователя **cobas® KRAS**.
5. Добавление фермента **AmpErase** в мастермиксы **cobas® EGFR** обеспечивает избирательную амплификацию ДНК мишени; однако для предотвращения контаминации реагентов необходимо соблюдение правил надлежащей лабораторной практики и точное следование инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору.
6. С данным продуктом может работать только персонал, обученный методу ПЦР и работе с системой **cobas® 4800**.
7. Только анализатор **cobas z 480** валидирован для работы с данным продуктом. Другие термоциклеры с оптической детекцией в режиме реального времени не могут применяться с данным продуктом.
8. Вследствие различий между разными методами, перед переходом с одного метода анализа на другой рекомендуется проводить изучение корреляции результатов, получаемых в двух методах, для оценки различий между технологиями.

9. Влияние других факторов, таких как фиксация образца, не изучалось.
10. Мутации и варианты в участках гена KRAS, перекрываемых праймерами или зондами набора **cobas®** KRAS Mutation Test, встречаются редко, однако их наличие может привести к неудаче при детекции мутаций..
11. Присутствие ингибиторов ПЦР может привести к получению ложноотрицательных или невалидных результатов.
12. Изредка тест **cobas®** KRAS Mutation Test может выдавать результат “Mutation Not Detected” для некоторых сложных и множественных мутаций в кодонах 12/13 и кодоне 61, а также проявлять ограниченную перекрестную реактивность (результат “Mutation Detected”) для мутаций, фланкирующих мутации-мишени в кодонах 12/13 экзона 2 и кодона 61 экзона 3.
13. Тест **cobas®** KRAS Mutation Test был проверен на использование с 50 ng ДНК на реакцию. Использование количества ДНК менее 50 ng на реакцию не рекомендуется.
14. Описанную выше процедуру необходимо выполнять для обнаружения $\geq 5\%$ мутантных последовательностей на фоне ДНК дикого типа для мутаций KRAS²⁹, перечисленных в Таблице 3

Таблица 3
Мутации, обнаруженные при помощи теста **cobas® KRAS Mutation Test**

Мутация	Аминокислотная замена	COSMIC ID
c.34G>T	12C	516
c.34G>A	12S	517
c.34G>C	12R*	518
c.35G>T	12V	520
c.35G>A	12D	521
c.35G>C	12A	522
c.37G>T	13C	527
c.37G>A	13S	528
c.37G>C	13R*	529
c.38G>A	13D	532
c.38G>C	13A	533
c.38G>T	13V	534
c.181C>A	61K*	549
c.181C>G	61E	550
c.182A>C	61P	551
c.182A>G	61R	552
c.182A>T	61L	553
c.183A>C	61H (CAC)	554
c.183A>T	61H (CAT)	555

*Не тестировался с FFPEТ-образцами НМРЛ
Жирным = тестировались с плазмидной ДНК

НЕКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ТЕСТА

Неклиническая оценка испытаний для колоректального рака

Аналитическая чувствительность

Аналитическую чувствительность теста **cobas®** KRAS Mutation Test определяли с помощью панелей разведений образцов четырех типов:

- Смесь клеточных линий, полученная в результате смешивания образцов ДНК, выделенных из клеточных линий мутантного KRAS и KRAS дикого типа.

- Смесь плазмид, полученная в результате смешивания плазмид, несущих мутации KRAS с образом ДНК, выделенной из клеточной линии KRAS дикого типа.
- Смесь образцов, полученная в результате смешивания образцов ДНК, выделенной из клинических образцов FFPE с мутантным KRAS и с KRAS дикого типа.
- Образцы ДНК, выделенной из индивидуальных клинических образцов FFPE.

Все образцы, использовавшиеся в данном исследовании, были секвенированы в системе 454 Genome Sequencer FLX Titanium (секвенирование 454) для определения доли мутантной ДНК в каждом образце.

Аналитическая чувствительность теста cobas® KRAS Mutation Test при тестировании клеточных линий и смесей плазмид

ДНК из культуры клеток толстой и прямой кишки, несущих мутации в кодонах 12 или 13 экзона 2 KRAS выделяли и смешивали с ДНК, выделенной из культуры клеток, несущих KRAS дикого типа, в результате получали смесь с ~5% долей мутации, что подтверждали методом секвенирования 454. Готовили три отдельных панели разведений, содержащих следующие концентрации ДНК - 50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8 и 0.4 нг/25 мкл). Тестировали каждый образец панели в 24 повторях, с каждой из 3 серий реагентов 3 cobas® KRAS Mutation Test (всего 72 повтор для каждого образца). Чувствительность теста определяли как наименьшее количество ДНК, давшее результат KRAS мутация выявлена с частотой не менее 95% (Таблица 4).

Таблица 4
Чувствительность теста cobas® KRAS Mutation Test на основании результатов тестирования смеси клеточных линий и смеси плазмид

Мутация KRAS	Тип образца	Процент мутации*	Количество ДНК в образце панели (нг/25 мкл) давшее с частотой $\geq 95\%$ результат "Мутация выявлена" (N=72 повтор)
Кодон 12 (экзон 2)	Смесь клеточных линий	5.3%	0.8
Кодон 13 (экзон 2)	Смесь клеточных линий	4.9%	1.6
Кодон 61 (экзон 3)	Смесь плазмид	5.8%	6.3

Средний процент мутации по результатам секвенирования 454

Тест дал результат "Мутация выявлена" с частотой 95% для концентраций 0.8 нг/25 мкл, 1.6 нг/25 мкл, и 6.3 нг/25 мкл (разведения 1:64, 1:32 и 1:8 относительно рекомендованного количества вносимой в реакцию ДНК - 50 нг/25 мкл) для мутаций KRAS в кодонах 12, 13 и 61, соответственно. Это свидетельствует о способности теста выявлять все мутации KRAS в случае, если ~87% ДНК деградировали или не амплифицируется в результате фиксации образца, исходя из того, что смеси клеточной и плазмидной ДНК содержат 100% интактной и амплифицируемой ДНК.

Аналитическая чувствительность теста по результатам тестирования клинических образцов FFPE и смесей образцов

ДНК, несущую мутации KRAS в кодонах 12, 13 и 61 выделяли из образцов FFPE и смешивали с ДНК KRAS дикого типа, выделенной из образцов FFPE, чтобы получить образцы, в которых доля мутации составляла ~5%. Один неразведенный клинический образец использовали для тестирования мутации в кодоне 12 KRAS. Конечную долю мутантной ДНК в образцах определяли методом секвенирования 454. На основании каждого образца/смеси образцов получали панель разведений с концентрацией ДНК 50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8 и 0.4 нг/25 мкл). Образец панели для смеси #2 Exon 3, codon 61 с концентрацией 50 нг/25 мкл не тестировали.

Тестировали каждый образец панели в 8 повторях, с каждой из 3 серий реагентов **cobas® KRAS Mutation Test kit lots** (n=24/образец панели). Чувствительность выявления определяли как наименьшее количество ДНК, давшее результат KRAS “Мутация выявлена” с частотой не менее 95% (Таблица 5).

Таблица 5

*Чувствительность теста **cobas® KRAS Mutation Test** на основании результатов тестирования клинических образцов РТПК и смесей образцов*

Мутация KRAS	Тип образца	Процент мутации	Количество ДНК в образце панели (нг/25 мкл) давшее с частотой $\geq 95\%$ результат “Мутация выявлена” (N=24 повтора)
Кодон 12 (экзон 2)	FFPET образец	4.3%	3.1
	FFPET смесь	4.2%	3.1
	FFPET смесь	4.7%	3.1
Кодон 13 (экзон 2)	FFPET смесь	5.0%	3.1
	FFPET смесь	4.6%	1.6
	FFPET смесь	7.2%	1.6
Кодон 61 (экзон 3)	FFPET смесь	4.4%	3.1
	FFPET смесь	5.5%	3.1
	FFPET смесь	3.8%	6.3

Полученные результаты показали, что тест **cobas® KRAS Mutation Test** позволяет выявлять мутации в кодонах 12, 13 и 61 KRAS. Если их доля составляет ~5% при внесении в реакцию стандартного количества ДНК, равного 50 нг/25 мкл. Способность теста выявлять мутации при меньшей концентрации ДНК свидетельствует о том, что детекция может происходить и в образцах, содержащих деградировавшую или неамплифицируемую в результате фиксации ДНК.

Корреляция с референсным методом

Всего 188 образцов FFPET рака толстой и прямой кишки тестировали с использованием двух серий реагентов **cobas® KRAS Mutation Test**. Для всех образцов полученные результаты сравнивали с результатами 2X двунаправленного секвенирования методом Сэнгера. Несовпадающие результаты, полученные в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** и при 2X двунаправленном секвенировании по Сэнгеру, верифицировали методом секвенирования 454.

Результаты теста **cobas® KRAS Mutation Test** и 2X двунаправленного секвенирования методом Сэнгера

Данные об образцах и результаты 2X двунаправленного секвенирования по Сэнгеру для 188 образцов приведены в Таблице 6. Из 188 образцов 81 образец содержал мутацию в кодонах 12/13 KRAS и 7 образцов содержали мутацию в кодоне 61 KRAS, тогда как 107 образцов были дикого типа по KRAS или содержали мутации в KRAS не в кодонах 12/13 по результатам секвенирования методом Сэнгера, и 181 образец содержал KRAS дикого типа или мутации KRAS не в кодоне 61.

Таблица 6

Результаты секвенирования по Сэнгеру относительно стадии опухоли

Стадия опухоли	Результаты 2X двунаправленного секвенирования по Сэнгеру				Всего	% от общего числа
	Кодон 12	Кодон 13	Кодон 61	Дикий тип		
Стадия I	6	2	0	3	11	5.8%
Стадия II	20	5	3	37	65	34.4%
Стадия III	21	8	1	38	68	36.0%
Стадия IV	17*	3*	3	20	43	22.8%

Стадия неустановлена	0	0	0	2	2	1.1%
Всего	64	18	7	100	189	100.0%

* Один из 81 образцов с мутацией в кодоне 12/13 содержал мутации в обоих кодонах (12 и 13).

Сравнительный анализ результатов, полученных для 188 образцов рака толстой и прямой кишки в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** и при 2X двунаправленном секвенировании методом Сэнгера для мутаций **KRAS** в кодонах 12/13 экзона 2 и в кодоне 61 экзона 3, приведен в Таблицах 7 и 8.

Таблица 7
Результаты теста *cobas® KRAS Mutation Test* в сравнении с результатами 2X двунаправленного секвенирования по Сэнгеру, первая серия

		2X двунаправленное секвенирование по Сэнгеру			
		MT Кодон 12/13	MT Кодон 61	WT	Итого
cobas® KRAS Серия 1	MT Кодон 12/13	78	0	6	84
	MT Кодон 61	0	6	1	7
	WT	2	1	93	96
	Итого	80	7	100	187*
Соответствие положительных результатов = 96.6% (95% CI = 90.3 до 98.8%)					
Соответствие отрицательных результатов = 93.0% (95% CI = 86.3 до 96.6%)					
Соответствие всех результатов = 94.7% (95% CI = 90.4 до 97.1%)					

MT: Мутация WT: Дикий тип

*Один образец не был протестирован в 1 серии.

Таблица 8
Результаты теста *cobas® KRAS Mutation Test* в сравнении с результатами 2X двунаправленного секвенирования по Сэнгеру, вторая серия

		2X двунаправленное секвенирование по Сэнгеру			
		MT Кодон 12/13	MT Кодон 61	WT	Totals
cobas® KRAS Серия 2	MT Кодон 12/13	79	0	6	85
	MT Кодон 61	0	6	1	7
	WT	2	1	93	96
	Итого	81	7	100	188
Соответствие положительных результатов = 96.6% (95% CI = 90.3 до 98.8%)					
Соответствие отрицательных результатов = 93.0% (95% CI = 86.3 до 96.6%)					
Соответствие всех результатов = 94.7% (95% CI = 90.4 до 97.1%)					

MT: Мутация WT: Дикий тип

Общее совпадение результатов, полученных в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** и при 2X двунаправленном секвенировании методом Сэнгера для мутаций в кодоне 12/13 экзона 2 **KRAS**, составило 94.7% (всего 10 несовпавших результатов для каждой серии) для обеих серий набора **cobas® KRAS Mutation Test**.

Тестирование образцов с противоречивыми результатами методом секвенирования 454

Противоречивые результаты, полученные в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** и при 2X двунаправленном секвенировании методом Сэнгера для серии 1 и серии 2, были верифицированы методом секвенирования 454 (Таблицы 9 и 10).

Таблица 9

Результаты теста **cobas® KRAS Mutation Test** в сравнении с результатами 2Х-двунаправленного секвенирования по Сэнгеру после верификации методом секвенирования 454, первая серия

		2Х-двунаправленное секвенирование по Сэнгеру после верификации методом секвенирования 454			
		МТ Кодон 12/13	МТ Кодон 61	WT	Итого
cobas® KRAS Серия 1	МТ Кодон 12/13	83	0	1	84
	МТ Кодон 61	0	7	0	7
	WT	0	0	96	96
	Итого	83	7	97	187*
Соответствие положительных результатов = 100.0% (95% CI = 95.9 до 100.0%)					
Соответствие отрицательных результатов = 99.0% (95% CI = 94.4 до 99.8%)					
Соответствие всех результатов = 99.5% (95% CI = 97.0 до 99.9%)					

МТ: Мутация WT: Дикий тип

*Один образец не был протестирован в 1 серии.

Таблица 10

Результаты теста **cobas® KRAS Mutation Test** в сравнении с результатами 2Х-двунаправленного секвенирования по Сэнгеру после верификации методом секвенирования 454, вторая серия

		2Х-двунаправленное секвенирование по Сэнгеру после верификации методом секвенирования 454			
		МТ Кодон 12/13	МТ Кодон 61	WT	Итого
cobas® KRAS Серия 1	МТ Кодон 12/13	84	0	1	85
	МТ Кодон 61	0	7	0	7
	WT	0	0	96	96
	Итого	84	7	97	188
Соответствие положительных результатов = 100.0% (95% CI = 95.9 до 100.0%)					
Соответствие отрицательных результатов = 99.0% (95% CI = 94.4 до 99.8%)					
Соответствие всех результатов = 99.5% (95% CI = 97.0 до 99.9%)					

МТ: Мутация WT: Дикий тип

После верификации методом секвенирования 454 всех противоречивых результатов, полученных в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** и при 2Х двунаправленном секвенировании по Сэнгеру, общая согласованность результатов для двух методов составила 99.5% для обеих серий набора **cobas® KRAS Mutation Test**

Специфичность

Специфичность теста **cobas® KRAS Mutation Test** определяли при тестировании 188 образцов FFPEТ рака толстой и прямой кишки, использовавшихся параллельно при анализе корреляции с референсным методом.

Секвенирование методом Сэнгера

Специфичность теста **cobas® KRAS Mutation Test** рассчитывали, определяя процент образцов FFPEТ, определенных как дикий тип KRAS при 2X двунаправленном секвенировании по Сэнгеру относительно правильно определенных образцов KRAS дикого типа в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** (отрицательный процент согласованности).

Специфичность (отрицательный процент согласованности) по результатам тестирования 188 опухолевых образцов на мутации в кодонах 12/13 экзона 2 KRAS в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** и при 2X двунаправленном секвенировании по Сэнгеру, составила 93.0% (Таблицы 6 и 7) для обеих серий набора **cobas® KRAS Mutation Test**.

Тестирование образцов с несовпадающими результатами методом секвенирования 454

После использования метода секвенирования 454 для верификации противоречивых результатов, полученных в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** и при 2X двунаправленном секвенировании по Сэнгеру, показатель специфичности теста увеличился до 99.0% для обеих серий набора **cobas® KRAS Mutation Test** (Таблицы 8 и 9) при анализе мутаций в кодонах 12/13 KRAS и кодоне 61.

Улучшение показателя специфичности теста **cobas® KRAS Mutation Test** после верификации методом секвенирования 454 в первую очередь связана со способностью метода секвенирования 454 выявлять мутации KRAS, пропущенные при секвенировании методом Сэнгера из-за более низкой чувствительности последнего по сравнению с технологией секвенирования 454.

Перекрестная реактивность

Перекрестную реактивность теста **cobas® KRAS Mutation Test** определяли в ходет следующих исследований;

- Тестирование плазмид, несущих синонимичные мутации KRAS,
- Тестирование гомологичных плазмид KRAS,
- Тестирование микроорганизмов, представляющих микрофлору толстой и прямой кишки.

Перекрестную реактивность также определяли, оценивая наличие интерференции в присутствии плазмид, несущих синонимичные мутации KRAS, гомологичных плазмид KRAS и микрофлоры толстой и прямой кишки при детекции мутаций в кодонах 12, 13 и 61 KRAS.

Плазмиды с синонимичными мутациями KRAS

Образцы плазмид в смеси с ДНК клеточной культуры дикого типа готовили и тестировали для следующих трех синонимичных мутаций в экзоне 2, кодон 12 KRAS: GGA, GGC и GGG; трех синонимичных мутаций в экзоне 2, кодон 13 KRAS: GGA, GGT и GGG. Перекрестная реактивность не была отмечена для плазмид, несущих синонимичные мутации в кодонах 12 и 13 экзона 2 KRAS.

Смеси плазмид, несущих мутации KRAS в кодоне 12 или кодоне 13 с долей 5% относительно фоновой ДНК клеточной культуры дикого типа, тестировали в присутствии плазмид, несущих соответствующие синонимические мутации. Было продемонстрировано отсутствие интерференции, связанной с наличием в смеси плазмид с синонимическими мутациями.

Гомологичные плазмиды KRAS

Образцы, содержащие каждую из шести KRAS гомологичных плазмид (KRAS кодон 12/13 псевдоген, кодон 61 псевдоген, NRAS экзон 2, NRAS экзон 3, HRAS экзон 2 и HRAS экзон 3) в смеси с ДНК клеточной культуры дикого типа готовили и тестировали в трех повторях в тесте **cobas® KRAS Mutation Test**. Ни один из образцов плазмид не продемонстрировал перекрестную реактивность.

Смеси плазмид, несущих мутации KRAS кодон 12, кодон 13 или кодон 61 с долей 5% относительно фоновой ДНК клеточной культуры дикого типа, тестировали в присутствии соответствующих им гомологичных плазмид. Было продемонстрировано отсутствие интерференции, связанной с наличием в смеси гомологичных плазмид.

Микрофлора толстой и прямой кишки

Приведенные ниже микроорганизмы микрофлоры толстой и прямой кишки не вызывали перекрестную реактивность в тесте **cobas®** KRAS Mutation Test, когда вносились в количестве 1 x 10⁶ колоний образующих единиц на этапе лизиса ткани в 5 образцов, содержащих мутации KRAS кодон 12, 13 и 61 и дикого типа.

1. *Bacteroides caccae*
2. *Prevotella intermedia*
3. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Тестировавшиеся микроорганизмы также не вызывали интерференцию при детекции мутаций KRAS кодон 12 (2 образца), кодон 13 (1 образец) или кодон 61 (2 образца), когда вносились в количестве 1 x 10⁶ колонии образующих единиц на этапе лизиса ткани в образцы, содержащие мутации KRAS в проценте, указанном в Таблице 11.

Таблица 11
Процент мутаций, содержащийся в образцах, тестировавшихся при определении интерференции, вызываемой микрофлорой толстой и прямой кишки

№ образца	Статус мутации	% мутации по данным секвенирования 454
1	кодон 12	15.9
2	кодон 12	16.1
3	кодон 13	42.8
4	кодон 61	17.0
5	кодон 61	19.8

Интерференция

Эксперименты по внесению потенциально интерферирующих веществ в образцы на этапе лизиса ткани показали, что триглицериды (≤37mM, CLSI рекомендованная высокая концентрация²⁵), гемоглобин (≤2 мг/мл, CLSI рекомендованная высокая концентрация²⁵) и содержание в образце некротной ткани ≤50% не вызывают интерференцию в тесте **cobas®** KRAS Mutation Test.

Надежность

Надежность теста **cobas®** KRAS Mutation Test определяли с помощью одного клинического образца FFPET рака толстой и прямой кишки, несущего мутацию KRAS экзон 2, кодон 12 mutant и одного клинического образца FFPET рака толстой и прямой кишки, несущего мутацию KRAS экзон 3, кодон 61, доля которых составляла 13.1% и 17%, соответственно. Для каждого образца готовили 100 секций толщиной 5 мкм.

ДНК выделяли из каждой секции с набором **cobas®** DNA Sample Preparation Kit. Выделенную ДНК тестировали однократно для каждой из 100 секций образца. Проводили десять отдельных постановок в

тесте **cobas® KRAS Mutation Test**, в каждой анализировали по 20 секций. 100% секций дали результат “Мутация выявлена” в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** как для образца с мутацией KRAS кодон 12, так и для образца с мутацией KRAS кодон 61, таким образом, частота ложноотрицательного результата составила 0%

Воспроизводимость

Воспроизводимость теста **cobas® KRAS Mutation Test** анализировали с помощью 6 FFPE образцов рака толстой и прямой кишки. Два образца содержали мутацию KRAS кодон 12, два образца содержали мутацию KRAS кодон 61, и два образца содержали KRAS дикого типа. Характеристики образцов приведены в Таблице 12.

Образцы тестировались в двух повторах двумя операторами с использованием двух серий реагентов, четырех анализаторов **cobas z 480** в течение 4 дней (n=32/образец).

Таблица 12
Воспроизводимость теста cobas® KRAS Mutation Test

№ образца	Статус мутации KRAS	% мутации	Мутация выявлена (n=32)	Мутация не выявлена	Процент согласованности
1	Кодон 12	16.4%	32	0	100%
2	Кодон 12	20.6 %	32	0	100%
3	Кодон 13	16.7%	32	0	100%
4	Кодон 13	10.3%	32	0	100%
5	Кодон 61	28.1%	32	0	100%
6	Кодон 61	31.5%	32	0	100%
7	Дикий тип	-	0	32	100%
8	Дикий тип	-	0	32	100%

Точность результатов в тесте **cobas® KRAS Mutation Test** составила 100% (256/256) для всех дней исследований, всех образцов, повторов, операторов и серий набора.

Неклиническая оценка испытаний для немелкоклеточного рака легких.

Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность теста **cobas® KRAS Mutation Test** была получена с использованием двух отдельных панелей, приготовленных из двух типов образцов:

- Смесь клеточных линий, полученная в результате смешивания образцов ДНК, выделенных из клеточных линий мутантного KRAS и KRAS дикого типа.
- Смесь образцов, полученная в результате смешивания образцов ДНК, выделенной из клинических образцов FFPE с мутантным KRAS и с KRAS дикого типа..

Все образцы, использовавшиеся в данном исследовании, были секвенированы в системе 454 Genome Sequencer FLX Titanium (секвенирование 454) для определения доли мутантной ДНК в каждом образце.

Аналитическая чувствительность теста cobas® KRAS Mutation Test при тестировании смеси клеточных линий

ДНК из линий легочных клеток, несущих мутации в кодонах 12, 13 или 61 KRAS, выделяли и смешивали с ДНК, выделенной из культуры клеток, несущих KRAS дикого типа, в результате получали смесь с 2.5, 5% и 10% долей мутации, что подтверждали методом секвенирования 454. Готовили три отдельных панели разведений, содержащих следующие концентрации ДНК - 50.0, 12.5, 3.1, 0.8 и 0 нг/25 мкл. Тестировали каждый образец панели в 24 повторах, с каждой из 3 серий реагентов 3 **cobas® KRAS Mutation Test** (всего 72 повтор для каждого образца). Чувствительность теста определяли как наименьшее количество ДНК, давшее результат KRAS “Мутация выявлена” с частотой не менее 95%. Результаты показаны в Таблице 13

Таблица 13

Чувствительность теста cobas® KRAS Mutation Test при тестировании смеси клеточных линий

Мутация KRAS	Тип образца	Процент мутации*	Количество ДНК (нг/25 мкл) в образце панели, необходимое для получения ответа "Mutation Detected" в ≥ 95% случаев (N=72 повторностей)
Кодон 12 (Экзон 2)	Клеточная линия	12.1%	0.8
		6.1%	3.1
		2.4%	50.0
Кодон 13 (Экзон 2)	Клеточная линия	7.8%	0.8
		4.9%	3.1
		2.8%	3.1
Кодон 61 (экзон 3)	Клеточная линия	10.2%	0.8
		6.1%	0.8
		2.7%	12.5

* Средний процент мутаций при секвенировании 454

Тест показал 95%-ный уровень выявления мутаций ("Mutation Detected") в присутствии примеси мутаций 2.4% (при 50нг/25 мкл), 2.8% (при 3.1нг/25 мкл), 2.7% (при 12.5нг/25 мкл) для мутаций KRAS в кодонах 12, 13, и 61, соответственно. Это показывает, что тест будет определять мутации KRAS при их примеси в 5% или более при количестве используемой ДНК 50нг/25мкл.

Кроме того, тест показал 95%-ный уровень выявления мутаций при 3.1 нг/25 мкл, 3.1 нг/25 мкл и 0.8 нг/25 мкл (разведения рекомендованной концентрации ДНК (50 нг/25мкл) составляли 1:16, 1:16 и 1:64 для мутаций кодонов KRAS 12, 13 и 61 при ~5% мутаций, соответственно. Это показывает, что тест обнаружит мутации KRAS даже если ДНК вырождена или не амплифицируема на ~94% (если считать, что в исходной смеси клеточных линий было 100% осталась 100% интактной и амплифицируемой ДНК).

Аналитическая чувствительность при использовании смеси образцов FFPET.

ДНК, выделенная из образца FFPET с мутациями KRAS кодонов 12, 13 и 61, была смешана с ДНК, выделенной из образца FFPET дикого типа по KRAS, так чтобы примесь мутаций составляла ~5%. Полученный процент примеси мутаций для всех образцов был проверен методом секвенирования 454. На основании каждого образца/смеси образцов получали панель разведений с концентрацией ДНК 50.0, 12.5, 3.1, 0.8, и 0 нг/25 мкл.

Тестировали каждый образец панели в 8 повторах, с каждой из 3 серий реагентов cobas® KRAS Mutation Test kit lots (n=24/образец панели). Чувствительность выявления определяли как наименьшее количество ДНК, давшее результат KRAS "Mutation Detected" с частотой не менее 95%. Результаты показаны в таблице 14

Таблица 14

Чувствительность теста cobas® KRAS Mutation Test при использовании смеси образцов рака легких.

Мутация KRAS	Тип образца	Процент мутации*	Количество ДНК (нг/25 мкл) в образце панели, необходимое для получения ответа "Mutation Detected" в ≥ 95% случаев (N=72 повторностей) (N=24 повторности)
Кодон 12 (Экзон 2)	Смесь FFPET	6.2%	12.5
		6.0%	3.1
		5.6%	3.1
Кодон 13 (Экзон 2)	Смесь FFPET	6.2%	3.1
		4.4%	3.1
		4.4%	3.1
Кодон 61 (Экзон 3)	Смесь FFPET	6.5%	3.1
		6.4%	3.1
		4.5%	3.1

* Процент мутаций, определенный методом секвенирования 454

Полученные результаты показали, что тест cobas® KRAS Mutation Test позволяет выявлять мутации в кодонах 12, 13 и 61 KRAS, если их доля составляет ~5% при внесении в реакцию стандартного количества ДНК, равного 50 нг/25 мкл. Способность теста выявлять мутации при меньшей концентрации ДНК свидетельствует о том, что детекция может происходить и в образцах, содержащих деградировавшую при фиксации или неамплифицируемую ДНК.

Корреляция с референсным методом

Всего 194 образца FFPEТ рака легких тестировали с использованием двух серий реагентов cobas® KRAS Mutation Test. Для всех образцов полученные результаты сравнивали с результатами 2X двунаправленного секвенирования методом Сэнгера. Несовпадающие результаты, полученные в тесте cobas® KRAS Mutation Test и при 2X двунаправленном секвенировании по Сэнгеру, верифицировали методом секвенирования 454.

Результаты теста cobas® KRAS Mutation Test и 2X двунаправленного секвенирования методом Сэнгера

Данные об образцах и результаты 2X двунаправленного секвенирования по Сэнгеру для 188 образцов приведены в Таблице 15. Из 194 образцов 95 образцов содержали мутацию в кодонах 12/13 KRAS (один образец с мутацией в кодоне 12 содержал также мутацию в кодоне 61) и 1 образец содержал мутацию в кодоне 61 KRAS, тогда как 98 образцов были дикого типа по KRAS или содержали мутации в KRAS не в кодонах 12/13 по результатам секвенирования методом Сэнгера, и 192 образца содержали KRAS дикого типа или мутации KRAS не в кодоне 61.

Таблица 15
Результаты секвенирования по Сэнгеру для разных стадий опухоли

Стадия опухоли	Результаты 2X двунаправленного Секвенирования по Сэнгеру				Всего	% от всех
	Кодон 12	Кодон 13	Кодон 61	Дикий тип		
Стадия I	15	2	0	29	46	23.7%
Стадия II	12	0	0	7	19	9.8%
Стадия III	21	4	1	9	35	18.0%
Стадия IV	11	3	0	1	15	7.7%
Неизвестная стадия	24	3	0	52	79	40.7%
Всего	83	12	1	98	194	100.0%

Результаты, полученные при тестировании 194 образцов немелкоклеточного рака легких с помощью cobas® KRAS Mutation Test, в сравнении с результатами, полученными с использованием двунаправленного секвенирования по Сэнгеру для мутаций KRAS экзона 2, кодона 12/13 и экзона 3, кодона 61 показаны в таблицах 17.

Таблица 16
Тест cobas® KRAS Mutation Test, Серия 1 в сравнении с двунаправленным секвенированием по Сэнгеру

		Двунаправленное секвенирование по Сэнгеру			
		MT Кодон 12/13	MT Кодон 61	WT	Всего
cobas® KRAS Серия 1	MT Кодон 12/13	90	0	6	96
	MT Кодон 61	0	1	1	2
	WT	5	1	91	97
	Всего	95	2	98	195*
Соответствие положительных результатов = 93.8% (95% CI = 87.2% до 97.1%)					
Соответствие отрицательных результатов = 92.9% (95% CI = 86.0% до 96.5%)					
Общее соответствие результатов = 93.3% (95% CI = 88.9% до 96.1%)					

MT: Мутация WT: Дикий тип
* N=194, в одном образце две мутации (кодон 12 и кодон 61) по Сэнгеру

Общая согласованность cobas® KRAS Mutation Test в сравнении с двунаправленным секвенированием по Сэнгеру для мутаций KRAS кодонов 12/13 и 61 составила 93.8% (всего 13 спорных результатов) для 1 серии

Таблица 17
Тест **cobas[®] KRAS Mutation Test, Серия 2 в сравнении с двунаправленным секвенированием по Сэнгеру**

		Двунаправленное секвенирование по Сэнгеру			
		MT Кодон 12/13	MT Кодон 61	WT	Всего
cobas[®] KRAS Серия 2	MT Кодон 12/13	90	0	8	98
	MT Кодон 61	0	1	1	2
	WT	5	1	88	94
	Всего	95	2	97	194*

Соответствие положительных результатов = 93.8% (95% CI = 87.2% to 97.1%)

Соответствие отрицательных результатов = 90.7% (95% CI = 83.0% to 95.0%)

Соответствие всех результатов = 92.3% (95% CI = 87.6% to 95.3%)

MT: Мутация WT: Дикий тип

* N=193, в одном образце две мутации (кодон 12 и кодон 61) по Сэнгеру. Для одного из 194 образцов результат не получился.

Согласованность **cobas[®]** KRAS Mutation Test в сравнении с двунаправленным секвенированием по Сэнгеру для мутаций KRAS кодонов 12/13 и 61 составила 93.8% (всего 15 спорных результатов) для 2 серии реагентов **cobas[®]** KRAS Mutation Test.

Тестирование образцов с противоречивыми результатами методом секвенирования 454

Несогласующиеся результаты между **cobas[®]** KRAS Mutation Test и двунаправленным секвенированием по Сэнгеру кодонов KRAS12/13 и 61 были проверены методом секвенирования 454 и показаны в таблицах 18 и 19.

Таблица 18

Тест **cobas[®] KRAS Mutation Test, серия 1 в сравнении с двунаправленным секвенированием по Сэнгеру, с последующим разрешением неоднозначностей методом секвенирования 454**

		Секвенирование по Сэнгеру, разрешение секвенированием 454			
		MT Кодон 12/13	MT Кодон 61	WT	Всего
cobas[®] KRAS Серия 1	MT Кодон 12/13	96	0	0	96
	MT Кодон 61	0	1	1	2
	WT	3	0	94	97
	Всего	99	1	95	195*

Соответствие положительных результатов = 97.0% (95% CI = 91.5% до 99.0%)

Соответствие отрицательных результатов = 98.9% (95% CI = 94.3% до 99.8%)

Соответствие всех результатов = 97.9% (95% CI = 94.8% до 99.2%)

MT: Мутация WT: Дикий тип

*N=194, в одном образце две мутации (кодон 12 и кодон 61) по Сэнгеру

Таблица 19

Тест **cobas[®] KRAS Mutation Test, серия 2 в сравнении с двунаправленным секвенированием по Сэнгеру, с последующим разрешением неоднозначностей методом секвенирования 454**

		Секвенирование по Сэнгеру, разрешение секвенированием 454			
		MT Кодон 12/13	MT Кодон 61	WT	Всего
cobas[®] KRAS Серия 2	MT Кодон 12/13	98	0	0	98
	MT Кодон 61	0	1	1	2
	WT	0	0	94	94
	Всего	98	1	95	194*

Соответствие положительных результатов = 100.0% (95% CI = 96.3% to 100.0%)

Соответствие отрицательных результатов = 98.9% (95% CI = 94.3% to 99.8%)

Соответствие всех результатов = 99.5% (95% CI = 97.1% to 99.9%)

MT: Мутация WT: Дикий тип

*N=193, в одном образце две мутации (кодон 12 и кодон 61) по Сэнгеру. Для одного из 194 образцов результат не получился.

После того, как несогласующиеся результаты между тестом **cobas**[®] KRAS Mutation Test и двунаправленным секвенированием по Сэнгеру были проверены методом секвенирования 454, общая согласованность улучшилась до 97.9% и 99.5% для первой и второй серий реагентов **cobas**[®] KRAS Mutation Test, соответственно.

Специфичность

Специфичность теста **cobas**[®] KRAS Mutation Test была определена при тестировании 194 образцов FFPET немелкоклеточного рака легких в сочетании со сравнением с референсным методом.

Секвенирование по Сэнгеру

Специфичность теста **cobas**[®] KRAS Mutation Test была определена через определение процента образцов FFPET идентифицированных как KRAS дикого типа двунаправленным секвенированием по Сэнгеру и правильно названных мутаций KRAS дикого типа при помощи теста **cobas**[®] KRAS Mutation Test (процент соответствия отрицательных результатов).

Специфичность (процент соответствия отрицательных результатов), полученная при тестировании 194 образцов опухоли для мутаций кодонов KRAS 2/13 и 61 при помощи теста **cobas**[®] KRAS Mutation Test в сравнении с результатами, полученными при использовании двунаправленного секвенирования по Сэнгеру, составила 92.9% (Таблица 15) и 90.7% (Таблица 16) для серий 1 и 2 реагентов **cobas**[®] KRAS Mutation Test, соответственно.

Тестирование образцов с противоречивыми результатами методом секвенирования 454

Специфичность для обеих серий реагентов **cobas**[®] KRAS Mutation Test была улучшена до 98.9% (Таблицы 18 и 19) после секвенирования методом 454, который использовался, чтобы решить противоречивые результаты между тестом **cobas**[®] KRAS Mutation Test и двунаправленным секвенированием по Сэнгеру при проведении тестов для мутаций кодонов KRAS 12/13 и 61.

Улучшение специфичности теста **cobas**[®] KRAS Mutation Test после секвенирования методом 454 произошло в первую очередь из-за способности обнаружения тех мутаций KRAS при секвенировании методом 454, которые были пропущены при секвенировании методом Сэнгера из-за более низкой чувствительности секвенирования методом Сэнгера по сравнению с секвенированием 454.

Перекрестная реактивность с микроорганизмами в легких

Перекрестная реактивность теста **cobas**[®] KRAS Mutation Test была оценена при тестировании микроорганизмов в легких.

Перекрестную реактивность оценивали также путем определения присутствия микроорганизмов, мешающих обнаружению мутаций кодонов KRAS12, 13 и 61.

Добавляющие микроорганизмы в легких не оказали перекрестной реакции в Cobas[®] KRAS Mutation Test при добавлении к 5 образцам кодонов KRAS 12, 13 и 61 дикого типа при 1×10^6 колониеобразующих единиц на стадии лизиса ткани:

1. *Streptococcus pneumoniae*
2. *Haemophilus influenzae*

Тестируемые микроорганизмы также не мешают обнаружению мутаций в кодоне KRAS 12 (3 образца), кодоне 13 (1 образец) или кодоне 61 (1 образец) при добавлении 1×10^6 колониеобразующих единиц во время стадии лизиса ткани образца, содержащего мутации KRAS на уровнях, перечисленных в таблице 20.

Таблица 20

Процент мутаций в образцах, проверенных в присутствии легочных микроорганизмов

№ образца	Тип мутации	% мутации при секвенировании 454
1	кодон 12	15.3
2	кодон 12	32.3
3	кодон 12	32.5
4	кодон 13	13.4
5	кодон 61	32.6

Интерференция

Было показано, что триглицериды (рекомендованная CLSI высокая концентрация $\leq 37\text{мМ}^{30}$), гемоглобин (рекомендованная CLSI высокая концентрация $\leq 2\text{ мг/мл}^{30}$) и присутствие до 80% некротических тканей не создают интерференции с тестом **cobas®** KRAS Mutation Test при добавлении потенциально интерферирующих веществ на стадии лизиса при пробоподготовке.

Надежность

Надежность теста **cobas®** KRAS Mutation Test определяли с помощью одного клинического образца FFPE мелкоклеточного рака легких, несущего мутацию KRAS кодонов 12, 13 и 61.

Геномную ДНК выделяли из каждого среза с помощью набора **cobas®** DNA Sample Preparation Kit. Выделенную ДНК тестировали однократно для каждого из 100 срезов образца кодона 12, 102 срезов для образца кодона 13 и 100 срезов для образца кодона 61. Проводили 14 отдельных постановок в тесте **cobas®** KRAS Mutation Test. Все 100 повторностей с образцами кодонов 12 и 61 дали результат "Мутация выявлена". Сто образцов кодона 13 дали результат "Мутация выявлена", один образец - "Мутация не выявлена", и в одном образце результат не получился. Доля ложно-отрицательных результатов составила 0.7% (2/302).

Воспроизводимость

Воспроизводимость теста **cobas®** KRAS Mutation Test анализировали с помощью 8 FFPE образцов мелкоклеточного рака легких (Таблица 21).

Образцы тестировались в двух повторах двумя операторами с использованием двух серий реагентов, четырех анализаторов **cobas z 480** в течение 4 дней (n=32/образец).

Таблица 21
Воспроизводимость теста **cobas®** KRAS Mutation Test

Номер образца	Тип мутации KRAS	% мутации	Обнаружена мутация (n=32)	Мутация не обнаружена	Процент согласованности
1	Кодон 12	15.3%	32	0	100%
2	Кодон 12	17.5%	32	0	100%
3	Кодон 13	13.3%	32	0	100%
4	Кодон 13	27.8%	32	0	100%
5	Кодон 61	14.1%	32	0	100%
6	Кодон 61	32.6%	32	0	100%
7	Дикий тип	-	0	32	100%
8	Дикий тип	-	0	32	100%

Точность результатов в тесте **cobas®** KRAS Mutation Test составила 100% (256/256) для всех дней исследований, всех образцов, повторов, операторов и серий набора.

Утилизация

Во избежание возможного загрязнения окружающей среды реагенты с истекшим сроком годности, а также отходы использованных реагентов, должны утилизироваться в соответствии с местными государственными и / или больничными нормативными требованиями.

Правильное уничтожение и утилизация будет поддерживать сохранение природных ресурсов и содействовать защите здоровья человека и окружающей среды.

Изделие должно быть утилизировано в РФ согласно требованиям СанПин 2.1.7.2790-10 (Класс А).

Утилизация отходов упаковки.

Упаковка продукции «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностикс ГмбХ") разработана с целью сведения к минимуму загрязнения окружающей среды при сохранении целостности продукта во время транспортировки и хранения. Упаковочные отходы должны утилизироваться в местных пунктах сбора упаковки, в специализированные контейнеры, расположенные в муниципалитетах.

Утилизация изделия с истекшим сроком годности и отходов, использованных реагентов.

При утилизации и уничтожении изделий с истекшим сроком годности, а также отходов, использованных реагентов, необходимо действовать в соответствии с гигиеническими нормативами и следовать официальным инструкциям по утилизации и уничтожению потенциально инфекционного и химического материала, принятым на территории Российской Федерации и в данном ЛПУ.

Ключевыми вопросами в стратегии управления отходами является оптимизация тактик и подходов к конечным продуктам, а также минимизация возможного загрязнения окружающей среды.

Более подробную информацию можно получить у производителя / уполномоченного представителя производителя.

Не утилизировать совместно с бытовыми отходами.

Техническое обслуживание и ремонт

Данное изделие является одноразовым. Техническое обслуживание и ремонт – не применимо.

Гарантийные обязательства

Производитель (компания «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностикс ГмбХ")) гарантирует, что Тест-полоски Combur 10 Test M соответствуют спецификациям, заявленным на этикетке.

Производитель несет ответственность за работу изделий только в случае их правильного использования в соответствии с инструкцией, а также соблюдения правил хранения и транспортировки. Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

Производитель гарантирует стабильность реагентов до окончания срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, указанных в инструкции.

Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

Изделия должны использоваться только до истечения срока годности, который указан на упаковке.

НАСТОЯЩАЯ ОГРАНИЧЕННАЯ ГАРАНТИЯ ЗАМЕНЯЕТ СОБОЙ ИНЫЕ ГАРАНТИИ, ОДНОЗНАЧНО ВЫРАЖЕННЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ЛЮБУЮ ПОДРАЗУМЕВАЕМУЮ ГАРАНТИЮ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОММЕРЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЛИ ДЛЯ ЛЮБОЙ ИНОЙ ЦЕЛИ. КОМПАНИЯ ROCHE DIAGNOSTICS GmbH НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА СЛУЧАЙНЫЕ, НЕПРЯМЫЕ, СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ.

По вопросам, связанным с качеством изделий, а также с их работой, нужно обращаться к **Уполномоченному представителю производителя на территории РФ:**

Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2, тел.: (495) 229-69-99, факс: (495) 229-62-64

ЛИТЕРАТУРА

1. Shankaran V, Obel J, Benson III AB. Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions. *The Oncologist* 2010 15:157-67.
2. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, et al. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Nov 9(11):1193-7.
3. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001 Sep 1;85(5):692-6.
4. Der CJ, Finkel T, Cooper GM. Biological and biochemical properties of human ras^H genes mutated at codon 61. *Cell* 1986 Jan 17; 44:167-176.
5. Loupakakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009 Aug 18;101(4):715-21.
6. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncology*, 2010 Aug 11(8):753-62.
7. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
8. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 Feb 10;27(5):663-71.
9. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 Feb 5;360(6):563-72.
10. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
11. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007 Mar 15;67(6):2643-8.
12. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
13. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
14. Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J et al. randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and Oxaliplatin (FOXFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol* 2010 28:4697-4705.
15. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009 Apr 20;27(12):2091-6.
16. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colon cancer, 2010, v.2.
17. Van Cutsem E, Oliveira J; ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009 May;20 Suppl 4:61-3.
18. Food and Drug Administration. Class labeling changes to anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix): KRAS mutations. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucml172905.htm>.
19. European Medicines Agency: Committee for Medicinal Products for Human Use post-authorisation summary of positive opinion for Erbitux. http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/Erbitux_28040208en.pdf.
20. Karachaliou, N, Mayo, C, Costa, C. et al. KRAS Mutations in Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, (In press)
21. Masciaux, C, Lannino, N, Martin, B. et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British Journal of Cancer* (2005) 92, 131 – 139.
22. Shepherd, F, Bourredjem, A, Brambilla, E. et al. Prognostic and predictive effects of KRAS mutation subtype in completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC): A LACE-bio study. *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr 7007)
23. Mao, C, Qiub, L, Liao R. et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 69 (2010) 272–278
24. Riely, G, Politi, K, Vincent, A. et al. Update on Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non -Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:7232-7241.
25. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 93:125-128.

26. Chosewood, L.C. and Wilson, D.E. *Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Fifth # edition.(CDC) 21-1112. 2009.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Villanova, PA:CLSI, 2005.
28. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 52nd Edition. 2011.
29. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2011, v.51, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2, *Interference Testing in Clinical Chemistry*; Approved Guidelines – Second Edition, Appendix D 2005.

Сведения о редакциях документа

Doc Rev. 3.0
01/20113

1. Обновлено всюду, где были замечания относительно образцов FFPET немелкоклеточного рака легких (НМРЛ)
 - a. Добавлена секция **Неклиническая оценка испытаний** для немелкоклеточного рака легких
 - b. Обновлен раздел **Введение**
 - c. Обновлен раздел **Литература**
2. Обновлен раздел **Воспроизводимость** для РТПК
 - a. Обновлены результаты исследований с использованием 8 образцов FFPET
3. Обновлен раздел **Корреляция с референсным методом** для РТПК
 - a. Удален «колоректальный рак (РТПК)» под разделом **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
 - b. Добавлен аппликатор для клеящей фольги **cobas® 4800** (Roche P/N 04900383001) в раздел **НЕОБХОДИМЫЕ НЕПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**
 - c. Заменен "Printer HP P2055d" на "Printer"
 - d. Добавлен «немелкоклеточный рак легких» в раздел **Сбор образцов**
 - e. Удален «Колоректальный рак» из раздела **Хранение образцов**
 - f. Удален " РТПК " в примечании под разделом **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА**
 - g. Заменено "10% опухолевых клеток" на "10% опухолевых тканей" в примечании под разделами **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА** и **Депарафинизация срезов FFPET не на предметных стеклах**
 - h. Добавлено Примечание в раздел **Депарафинизация срезов FFPET не на предметных стеклах**
 - i. Обновлены следующие секции в разделе **ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**:
 - 1) Добавлена 13 секция «Тест **cobas®** KRAS Mutation Test был проверен на использование с 50 нг ДНК на реакцию. Использование количества ДНК менее 50 нг на реакцию не рекомендуется»
 - 2) Добавлена 14 секция «Описанную выше процедуру необходимо выполнять для обнаружения $\geq 5\%$ мутантных последовательностей на фоне дикого типа ДНК для мутации KRAS²⁹ в Таблице 3»
 - 3) Добавлена Таблица 3 **Мутации, обнаруженные при помощи теста **cobas®** KRAS Mutation Test**
4. Обновлен адрес Завода производства.
5. Изменен телефон технической поддержки с 1-800-428-2336 на 1-800-526-1247



Distributed by

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguari, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

ROCHE, COBAS, COBAS Z, TAQMELT и AMPERASE являются торговыми марками Roche.

Технология защиты от контаминации с помощью фермента AmpErase защищена патентом США 5,035,996 и его зарубежными аналогами, принадлежащим Invitrogen Corporation и переданным по лицензии Roche Molecular Systems, Inc.

EPPENDORF является торговой маркой Eppendorf AG.

PIPET-AID является торговой маркой Drummond Scientific.

NANODROP является торговой маркой Thermo Fisher Scientific.

© 2011 Roche Molecular Systems, Inc. Все права защищены.
01/2013
Doc Rev. 3.0

06322379001-01



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim



В настоящее время для маркировки диагностической ПЦР продукции Roche используются следующие символы.

	Вспомогательное программное обеспечение		Серия набора реагентов
	Авторизованный представитель		Биологическая опасность (потенциально инфекционный материал)
	Штрих-кодированные данные		Каталожный номер
	Сверьтесь с инструкцией		Только для испытаний тестов IVD
	Содержит реагенты на $< n >$ тестов		Нижний предел заданного диапазона
	Состав набора		Производитель
	Распространитель		Хранить в темноте
	Для диагностики <i>in vitro</i>		Температурный диапазон (Хранить при)
	Файл с описанием теста		Использовать до (последний день месяца)
	Верхний предел заданного диапазона		
	Данный продукт соответствует Европейской Директиве 98/79 ЕС о медицинском оборудовании для диагностики <i>in vitro</i> .		

Тест cobas® EGFR Mutation Test v2

Для диагностики in vitro



Набор реагентов для выделения ДНК cobas® DNA Sample Preparation Kit	24 теста	P/N: 05985536190
Набор реагентов для выделения ДНК cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	24 теста	P/N: 07247737190
Набор реагентов для определения мутаций cobas® EGFR Mutation Test v2	24 теста	P/N: 07248563190

Назначение	5
Краткое изложение и описание теста	5
Введение	5
Принципы процедуры	8
Пробоподготовка	8
Амплификация в ПЦР	8
РАЗДЕЛ А: Работа с образцами ткани	10
Пробоподготовка	10
Материалы и реагенты	11
Предоставляемые материалы и реагенты	11
Хранение реагентов и правила работы с ними.....	13
Необходимые дополнительные материалы	14
Необходимые приборы и программное обеспечение, не предоставляются	14
Меры предосторожности и правила работы	15
Меры предосторожности.....	15
Надлежащая лабораторная практика	15
Контаминация	15
Целостность.....	16
Утилизация отходов.....	16
Очистка и дезинфекция	16
Сбор, транспортировка и хранение образцов.....	17
Сбор образцов	17
Транспортировка, хранение и стабильность образцов	17
Хранение и стабильность обработанных образцов.....	17
Процедура теста	18
Постановка теста.....	18
Инструкция по работе с набором	19
Процедура выделения ДНК	21
Количественный анализ ДНК	23
Амплификация и детекция	23
Подготовка прибора.....	23
Расчет разведения исходного образца ДНК	25
Разведение образцов	25
Подготовка реакции.....	27
Приготовление рабочих мастер-миксов (MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2)	27
Подготовка плашки.....	28

Запуск ПЦР	28
Результаты	29
Интерпретация результатов	29
Повторное тестирование образцов с невалидными результатами	29
Контроль качества и валидность результатов	30
Мутантный контроль	30
Отрицательный контроль	30
Ограничения процедуры	30
Неклинические испытания теста	31
Аналитическая чувствительность – пустые образцы	31
Предел чувствительности для смесей образцов FFPEТ	31
Минимальное содержание опухоли	33
Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21	34
Образцы из клинического исследования EURTAC	34
Образцы из клинического исследования AURA2	34
Специфичность – микроорганизмы и гомологи EGFR	34
Микрофлора легких	34
Плазмиды гомологов EGFR	34
Интерференция	35
Некротные ткани	35
Воспроизводимость	35
Воспроизводимость при работе с образцами	35
Клинические испытания теста	36
Анализ клинической воспроизводимости 1	36
Анализ клинической воспроизводимости 2	37
Корреляция с референсным методом при тестировании образцов из фазы III исследования EURTAC	37
Корреляция с референсным методом при тестировании образцов из фазы II исследования AURA2	40
Данные клинических исходов	41
EURTAC	41
AURA2	42
Раздел В: Работа с образцами плазмы	44
Пробоподготовка	44
Материалы и реагенты	45
Предоставляемые материалы и реагенты	45
Хранение реагентов и правила работы с ними	48
Необходимые дополнительные материалы	48
Необходимые приборы и программное обеспечение, но не предоставляются	49
Меры предосторожности и правила работы	49

Меры предосторожности.....	49
Надлежащая лабораторная практика	49
Контаминации	50
Целостность.....	50
Утилизация отходов.....	50
Очистка и дезинфекция	50
Сбор, транспортировка и хранение образцов.....	51
Сбор образцов	51
Транспортировка, хранение и стабильность образцов	51
Хранение и стабильность обработанных образцов.....	51
Процедура теста.....	52
Постановка теста.....	52
Инструкция по работе с набором	52
Процедура выделения ДНК	53
Аmplификация и детекция.....	55
Подготовка реакции.....	56
Приготовление рабочих мастер-миксов (MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2)	56
Подготовка плашки.....	57
Запуск ПЦР.....	57
Результаты	58
Интерпретация результатов	58
Повторное тестирование образцов с невалидными результатами	58
Контроль качества и валидность результатов.....	58
Мутантный контроль	59
Отрицательный контроль.....	59
Ограничения процедуры	59
Неклинические испытания теста	61
Аналитические характеристики теста.....	61
Аналитическая чувствительность – пустые образцы	61
Предел чувствительности для ДНК клеточной линии	61
Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21	62
Образцы из клинических исследований AURA Продолжение и AURA2	62
Специфичность – микроорганизмы	62
Интерференция	62
Клинические испытания теста.....	63
Анализ клинической воспроизводимости	63
Предел детекции (LOD) для образцов плазмы NSCLC	64
Примечание: Клинические образцы в данном исследовании имели фоновую концентрацию ДНК дикого типа около	

24,000 копий/мл	65
Корреляция с референсным методом при тестировании образцов плазмы из фазы III когорты ASPIRATION	65
Корреляция между образцами плазмы и ткани в тесте cobas® EGFR Test при детекции делеции в экзоне 19 и замены L858R при тестировании образцов из фазы III исследования ENSURE	66
Корреляция с референсным методом при тестировании образцов плазмы из фазы II исследования AURA2	67
Корреляция между образцами плазмы и ткани при детекции замены T790M при тестировании образцов из фазы II исследования AURA2	68
Данные клинических исходов	69
ENSURE	69
AURA2	71
Утилизация	72
Техническое обслуживание и ремонт	72
Гарантийные обязательства	72
Дополнительная информация	73
Символы	73
Производитель и распространители	74
Торговые марки и патенты	74
Авторское право	74
Литература	75
Редакция документа	76

Назначение

Тест **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2 является тестом для диагностики in vitro методом ПЦР в реальном времени и предназначен для качественного выявления мутаций гена рецептора эпидермального фактора роста у пациентов с немелкоклеточным раком легких (NSCLC). Мутации EGFR определяют в ДНК, выделенной из фиксированных в формалине и залитых в парафиновые блоки образцов опухолевой ткани (FFPET) или в свободной циркулирующей ДНК из опухолевых клеток (cfDNA) в образцах плазмы, полученных из цельной периферической крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Тест также предназначен для помощи при отборе пациентов NSCLC для проведения терапии ингибиторами тирозиновых киназ (TKI). Тест применяется как дополнительный диагностический тест для выбора пациентов с NSCLC для терапии с помощью таргетных препаратов, приведенных ниже в Таблице 1 в соответствии с принятой маркировкой лекарственных средств:

Таблица 1

Препарат	FFPET	Плазма
TARCEVA [®] (эрлотиниб)	Делеции в экзоне 19 и замена L858R	Делеции в экзоне 19 и замена L858R
TAGRISSO [™] (осимертиниб)	T790M	T790M*

Пациенты, с позитивным результатом теста **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2 при тестировании образцов плазмы на наличие мутаций EGFR, указанных выше, подлежат терапии соответствующим препаратом, указанным в Таблице 1 (см. Примечание* для T790M). Пациенты, с отрицательным результатом теста на эти мутации в данном тесте, должны быть направлены на рутинную биопсию для тестирования мутаций EGFR в образцах FFPET.

*Эффективность препарата TAGRISSO[™] (осимертиниб) не продемонстрирована для пациентов EGFR T790M позитивным результатом при исследовании плазмы, отрицательным результатом при исследовании ткани или не тестированных, и клинические данные для пациентов с позитивным результатом T790M при исследовании плазмы пациентов ограничены; таким образом тестирование образцов плазмы наиболее целесообразно для пациентов с недоступными для исследования образцами биопсии.

Безопасность и эффективность препаратов не определены для следующих мутаций EGFR, также выявляемых в тесте **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2:

Таблица 2

Препарат	FFPET	Плазма
TARCEVA [®] (эрлотиниб)	G719X, инсерции в экзоне 20, T790M, S768I и L861Q	G719X, инсерции в экзоне 20, T790M, S768I и L861Q
TAGRISSO [™] (осимертиниб)	G719X, делеции в экзоне 19, L858R, инсерции в экзоне 20, S768I и L861Q	G719X, делеции в экзоне 19, L858R, инсерции в экзоне 20, S768I и L861Q

При пробоподготовке вручную образцы FFPET выделяют с помощью набора **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit, а образцы плазмы выделяют с помощью набора **cobas**[®] cfDNA Sample Preparation Kit. Автоматизированная амплификация и детекция проводится в анализаторе **cobas z 480**.

Краткое изложение и описание теста

Введение

Активирующие мутации в гене, кодирующем EGFR возникают преимущественно при NSCLC, что приводит к

07384351001-03RU

Doc. Rev. 3.0

постоянной активации киназной активности белка EGFR, что дает вклад в развитие онкогенного процесса.¹ Распространенность таких мутаций в общей популяции пациентов с NSCLC составляет примерно 10 % - 30 %.^{2,3} Однако наиболее часто, хотя и не исключительно, такие мутации наблюдаются у пациентов женского пола, некурящих или курящих мало, азиатского происхождения и имеющих в анамнезе гистологические признаки аденокарциномы.⁴

У пациентов с NSCLC, наиболее часто встречаются следующие мутации в гене EGFR: различные делеции в экзоне 19 или точечная мутация L858R в экзоне 21; эти мутации составляют примерно 85 % всех мутаций EGFR при NSCLC.⁵ Тест **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2 (**cobas**[®] EGFR Test) является тестом ПЦР в реальном времени, предназначенным для детекции замены G719X в экзоне 18, делеций в экзоне 19, замен T790M и S768I в экзоне 20, инсерций в экзоне 20, и замен L858R и L861Q в экзоне 21.

Тест **cobas**[®] EGFR Test применяется в качестве сопутствующего диагностического теста при назначении препарата TARCEVA[®], обратимо ингибирующего киназную активность EGFR, предотвращающего автофосфорилирование тирозиновых оснований, связанных с рецептором и таким образом подавляющего дальнейшую сигнальную систему, связанную с выживанием клеток и их пролиферацией. При мутациях EGFR – делеции в экзоне 19 или замене L858R в экзоне 21 аффинность связывания с эрлотинибом выше по сравнению с рецептором дикого типа.⁶ Клинические исследования показали, что пациенты с поздними стадиями NSCLC, имеющие мутации - делеции в экзоне 19 или замену L858R в экзоне 21, и получающие TARCEVA[®] в качестве терапии первой линии, имеют более высокую вероятность клинической пользы по сравнению с пациентами на химиотерапии.^{3, 7}

Тест **cobas**[®] EGFR Test применяется в качестве сопутствующего диагностического теста при назначении препарата TAGRISSO[™] (осимертиниб), обратимого ингибитора EGFR TKI-сенситизирующих и T790M резистентных мутаций при прогрессирующем NSCLC. TAGRISSO[™] ингибирует киназную активность EGFR, что приводит к подавлению внутриклеточного сигнального каскада, связанного с пролиферацией, выживанием и ангиогенезом клеток.⁸ Клинические исследования показали, что пациенты с прогрессивным нечетуячатым NSCLC при наличии EGFR TKI-сенситизирующей мутации и прогрессированием после терапии EGFR TKI первого поколения, имеющие резистентную мутацию T790M в экзоне 20, имеют высокую вероятность клинического ответа на TAGRISSO[™] (осимертиниб).⁵

В Таблице 3 приведены мутации в гене EGFR, выявляемые с помощью теста **cobas**[®] EGFR Test.

Таблица 3 Тест **cobas**[®] EGFR Test предназначен для выявления следующих мутаций

Экзон	Группа мутаций EGFR	Нуклеотидная последовательность EGFR	COSMIC ID ¹⁰
Экзон 18	G719X	2156G>C	6239
		2155G>A	6252
		2155G>T	6253
Экзон 19	Ex19Del	2240_2251del12	6210
		2239_2247del9	6218
		2238_2255del18	6220
		2235_2249del15	6223
		2236_2250del15	6225
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2237_2254del18	12367
		2240_2254del15	12369
		2240_2257del18	12370
		2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2251>C	12383
		2237_2255>T	12384
		2235_2255>AAT	12385
		2237_2252>T	12386
		2239_2258>CA	12387
		2239_2256>CAA	12403
		2237_2253>TTGCT	12416
		2238_2252>GCA	12419
		2238_2248>GC	12422
		2237_2251del15	12678
		2236_2253del18	12728
		2235_2248>AATTC	13550
		2235_2252>AAT	13551
		2235_2251>AATTC	13552
		2253_2276del24	13556
		2237_2257>TCT	18427
		2238_2252del15	23571
		2233_2247del15	26038
Экзон 20	S768I	2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	6240
	Ex20Ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9GCGTGGACA	13428
		2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	13558
Экзон 21	L858R	2573T>G	6224
		2573_2574TG>GT	12429
	L861Q	2582T>A	6213

Принципы процедуры

Тест **cobas**® EGFR Test основан на двух процессах: (1) пробоподготовка вручную для получения ДНК из фиксированных в формалине образцов ткани в парафиновых блоках (FFPET) или образцов плазмы; и (2) амплификация и детекция в ПЦР ДНК-мишени с помощью пар комплементарных праймеров и олигонуклеотидных зондов, меченных разными флуоресцентными красителями. Тест **cobas**® EGFR Test предназначен для выявления следующих мутаций:

- Экзон 18: G719X (G719A, G719C и G719S)
- Экзон 19: делеции и комплексные мутации (определяются как сочетание делеции и инсерции)
- Экзон 20: S768I, T790M и инсерции
- Экзон 21: L858R и L861Q

Выявление мутаций происходит методом ПЦР-анализа в анализаторе **cobas z 480**. Мутантный контроль и трицательный контроль включаются в каждую постановку для подтверждения валидности постановки.

Пробоподготовка

Наборы для пробоподготовки **cobas**® DNA Sample Preparation Kit и **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit предназначены для выделения вручную из образцов FFPET и плазмы, соответственно, метод основан на связывании нуклеиновых кислот со стеклянным волокном. Протеаза и хаотропный лизирующий/связывающий буфер обеспечивают освобождение нуклеиновых кислот и разрушение ДНКаз для защиты освободившейся ДНК. Далее в лизирующую смесь вносится изопропанол, и смесь центрифугируется через колонку с фильтром из стеклянного волокна. Во время центрифугирования геномная ДНК связывается с поверхностью стеклянного волокна фильтра. Не связавшиеся вещества, такие как соли, белки и прочие компоненты клетки удаляются при центрифугировании. Связавшиеся нуклеиновые кислоты промываются и затем растворяются в водном растворе. ДНК-мишень затем подвергается амплификации и детекции в анализаторе **cobas z 480** с помощью реагентов набора **cobas**® EGFR Mutation Test v2.

Амплификация в ПЦР

Выбор мишени

В тесте **cobas**® EGFR Test используются праймеры, специфичные последовательностям каждой из выявляемых мутаций. Для делеций в экзоне 19 мишенью является последовательность длиной 125 - 141 пар оснований; для замены L858R в экзоне 21 мишенью служит последовательность длиной 138 пар оснований; для замены T790M в экзоне 20 мишенью является последовательность длиной 118 пар оснований; для мутаций G719X в экзоне 18 амплифицируется последовательность величиной от 104 до 106 пар оснований; для мутации S768I в экзоне 20, амплифицируется последовательность величиной 133 пар оснований; для вставок в экзоне 20 амплифицируется последовательность величиной от 125 до 143 пар оснований; для мутации L858R в экзоне 21 амплифицируется последовательность величиной 138 пар оснований; для замены L861Q в экзоне 21 амплифицируется последовательность величиной 129 пар оснований. Амплифицируются только участки гена EGFR, фланкированные праймерами; весь ген EGFR не амплифицируется.

Амплификация мишени

Для амплификации мишени используется ДНК-полимераза *Thermus species* Z05-AS1. Сначала реакционная смесь ПЦР нагревается для денатурации ДНК, чтобы открылись сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси прямой и обратный праймеры связываются с последовательностями ДНК-мишени. ДНК-полимераза Z05, в присутствии ионов двухвалентного металла и избытке дНТФ, удлиняет каждый связавшийся праймер, в результате образуется вторая цепь ДНК. На этом первый цикл ПЦР завершается, и образуется двухцепочечная копия ДНК-мишени, представляющая собой фрагмент гена-мишени EGFR. Данный процесс повторяется заданное число раз, в каждом цикле количество копий ДНК ампликона удваивается.

Автоматическая детекция мутаций в режиме реального времени

В тесте **cobas**[®] EGFR Test используется метод ПЦР в реальном времени. Каждый специфичный для мишени олигонуклеотидный зонд в реакционной смеси мечен флуоресцентным красителем, который служит в качестве репортера, а также молекулой гасителя, которая в интактном зонде поглощает (гасит) флуоресцентный сигнал красителя-репортера. Во время каждого цикла амплификации зонд, комплементарный последовательности одноцепочечной ДНК ампликона, связывается с ней и разрушается ДНК-полимеразой Z05, обладающей нуклеазной активностью 5' - 3'. В результате этого краситель-репортер освобождается от гасителя, флуоресцентный сигнал определенной длины волны можно измерить при возбуждении красителя-репортера светом соответствующего спектра. Используются четыре разных красителя-репортера для зондов, специфичных мутациям – мишеням теста. Детекция амплификации семи последовательностей EGFR проводится независимо в трех реакциях, благодаря измерению флуоресцентного сигнала четырех разных длин волн в соответствующих оптических каналах.

Избирательная амплификация

Избирательность амплификации нуклеиновой кислоты – мишени достигается в тесте **cobas**[®] EGFR Test за счет применения фермента AmpErase (урацил-N-гликозилазы) и дезоксиуридина трифосфата (дУТФ)⁷. Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащую тимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридин трифосфат входит в состав смеси дУТФ в реагентах Мастер-микса; поэтому дезоксиуридин содержится только в ампликонах. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом AmpErase до начала амплификации ДНК-мишени. Фермент AmpErase, входящий в состав реагента Мастер-микс, катализирует расщепление содержащей дезоксиуридин ДНК по дезоксиуридиновому основанию, открывая дезоксирибозную цепь в позиции C1. При нагревании на первом этапе цикла, при щелочном pH, цепь ДНК ампликона разрывается в позиции дезоксиуридина и, следовательно, она не может в дальнейшем быть амплифицирована. Фермент AmpErase инактивируется при нагревании выше 55°C, т.е. на протяжении температурных циклов, и поэтому не разрушает ампликоны мишени. Показано, что в **cobas**[®] EGFR Test инактивируются содержащие дезоксиуридин ампликоны мутантной последовательности EGFR.

**СЛЕДУЙТЕ ИНСТРУКЦИЯМ В РАЗДЕЛЕ А ДЛЯ РАБОТЫ С ОБРАЗЦАМИ ТКАНИ.
СЛЕДУЙТЕ ИНСТРУКЦИЯМ В РАЗДЕЛЕ В ДЛЯ РАБОТЫ С ОБРАЗЦАМИ ПЛАЗМЫ.**

РАЗДЕЛ А: Работа с образцами ткани

Пробоподготовка

Обработка образцов FFPEТ и выделение геномной ДНК проводится с помощью набора **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit, данный метод ручной пробоподготовки основан на связывании нуклеиновых кислот со стеклянным волокном. Депарафинизированные срезы образцов FFPEТ толщиной 5 мкм лизируют в ходе инкубации с протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером при повышенной температуре, в результате происходит освобождение нуклеиновых кислот и разрушение ДНКаз. Далее в лизирующую смесь вносится изопропанол, и смесь центрифугируется через колонку с фильтром из стеклянного волокна. Во время центрифугирования геномная ДНК связывается с поверхностью стеклянного волокна фильтра. Не связавшиеся вещества, такие как соли, белки и прочие компоненты клетки удаляются при центрифугировании.

Связавшиеся нуклеиновые кислоты промываются и затем растворяются в водном растворе. Количество геномной ДНК определяют с помощью спектрофотометра и ее концентрацию доводят до необходимой, использующейся для проведения амплификации и детекции. в анализаторе **cobas z 480** с помощью реагентов набора **cobas**[®] EGFR Test.

Материалы и реагенты

Предоставляемые материалы и реагенты

Набор/Кассеты	Компоненты и состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения
Набор для пробоподготовки cobas® DNA Sample Preparation Kit 24 теста (P/N: 05985536190)	DNA TLB (буфер для лизиса тканей) (P/N: 05517613001) Трис-HCl буфер Хлорид калия 0.04% ЭДТА 0.1% Тритон X-100 0.09% азид натрия	1 x 10 мл	   Опасно H302: Ядовито при проглатывании или вдыхании. H315: Вызывает раздражение кожи. H317: Может вызывать аллергическую реакцию на коже. H318: Вызывает серьезное поражение глаз. H334: Может вызывать аллергические или астматические симптомы или затруднение дыхания при вдыхании. H335: Может вызывать раздражение дыхательных путей. P261: Не допускайте вдыхание пыли/дыма/газа/пара/спрея. P280: Работать в перчатках/защите для глаз/лица. P284 Работать в респираторе. P305+P351+P338+P310: при попадании в глаза: Тщательно промыть водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз выньте их. Продолжите промывать. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу P342 + P311: При респираторных симптомах: Обратитесь в токсикологический центр или к врачу. P362 + P364: Снимите загрязненную одежду, постирайте перед повторным использованием.
	PK (протеиназа K) (P/N: 05860695102) Протеиназа K, лиофилизованная	1 x 100 мг	
	DNA PBB (связывающий парафин буфер) (P/N: 05517621001) Трис-HCl буфер 49.6 % гидрохлорид гуанидина 0.05 % мочевины 17.3 % Тритон X-100	1 x 10 мл	
	WB I (промывочный буфер I) (P/N: 05517656001) Трис-HCl буфер 64 % гидрохлорид гуанидина	1 x 25 мл	
	WB II (промывочный буфер II) (P/N: 05517664001) Трис-HCl буфер Хлорид натрия	1 x 12.5 мл	
	DNA EB (Буфер для элюции ДНК) (P/N: 05517630001) Трис-HCl буфер 0.09 % азид натрия	1 x 6 мл	
	FT (фильтрующие пробирки с крышками) (P/N: 05089506102)	1 x 25 шт.	
	CT (пробирки для сбора) (P/N: 05880513001)	3 x 25 шт.	

Набор/Кассеты	Компоненты и состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения
Набор cobas® EGFR Mutation Test v2 24 теста (P/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR мастер-микс 1) (P/N 06471366001) Трис буфер, Хлорид калия Глицерин, ЭДТА Твин 20 3.13 % Диметил сульфоксид 0.09 % Азид натрия <0.10 % дНТФ <0.01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) <0.01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная) <0.01 % Аптамер <0.01 % прямые и обратные праймеры EGFR <0.01 % Меченные флуоресцентными красителями зонды EGFR	2 x 0.48 мл	Не применимо
	EGFR MMX-2 (EGFR мастер-микс 2) (P/N 06471382001) Трис буфер, Хлорид калия Глицерин, ЭДТА Твин 20 3.13 % Диметил сульфоксид 0.09 % Азид натрия <0.10 % дНТФ <0.01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) <0.01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная) <0.01 % Аптамер <0.01 % прямые и обратные праймеры EGFR <0.01 % Меченные флуоресцентными красителями зонды EGFR	2 x 0.48 мл	Не применимо
	EGFR MMX-3 v2 (EGFR мастер-микс 3) (P/N 07248610001) Трис буфер, Хлорид калия Глицерин, ЭДТА Твин 20 3.13 % Диметил сульфоксид 0.09 % Азид натрия <0.10 % дНТФ <0.01 % ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) <0.01 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная) <0.01 % Аптамер <0.01 % прямые и обратные праймеры EGFR <0.01 % Меченные флуоресцентными красителями зонды EGFR	2 x 0.48 мл	Не применимо

Набор/Кассеты	Компоненты и состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения
Набор cobas® EGFR Mutation Test v2 24 теста (P/N: 07248563190)	MGAC (ацетат магния) (P/N 05854326001) Ацетат магния 0.09 % азид натрия	6 x 0.2 мл	Не применимо
	EGFR MC (Мутантный контроль EGFR) (P/N 06471455001) Трис-буфер ЭДТА Поли-гА РНК (синтетическая) 0.05 % азид натрия <0.1 % Плазмидная ДНК, содержащая последовательности экзонов 18, 19, 20 и 21 EGFR (микробная) <0.1 % ДНК EGFR дикого типа (клеточная линия)	6 x 0.1 мл	Не применимо
	DNA SD (Раствор для разведения образцов ДНК) (P/N 05854474001) Трис-HCl буфер 0.09 % азид натрия	2 x 3.5 мл	Не применимо

^a Маркировка безопасности продукта соответствует рекомендациям EU GHS

Хранение реагентов и правила работы с ними

Реагент	Температура хранения	Продолжительность хранения
Набор cobas ® DNA Sample Preparation Kit*	15°C - 30°C	После открытия стабилен до 8 постановок в течение 90 дней или до истечения указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.
Набор cobas ® EGFR Mutation Test v2**	2°C - 8°C	После открытия стабилен до 4 постановок в течение 90 дней или до истечения указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.

Примечание: За исключением реагента РК, не замораживайте реагенты.

* После внесения стерильной свободной от нуклеаз воды в **РК**, храните неиспользованную восстановленную **РК** в аликвотах объемом 450 мкл при -20 °C. После восстановления **РК** необходимо использовать в течение 90 дней или до истечения указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше. После внесения абсолютного этанола храните **WB I** и **WB II** при 15 °C – 30 °C. Эти рабочие растворы стабильны в течение 90 дней или до истечения указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.

** **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** и рабочий **MMX** (приготовленный внесением **MGAC** в **EGFR MMX-1** или **EGFR MMX-2** или **EGFR MMX-3 v2**) необходимо защищать от длительного воздействия света. Рабочий **MMX** необходимо хранить при 2 °C – 8 °C в темноте. Подготовленные образцы и контроли необходимо внести в течение 1 часа после приготовления рабочего **MMX**. Амплификацию необходимо начать не позднее 1 часа после внесения подготовленных образцов и контролей в рабочий **MMX**.

Необходимые дополнительные материалы

Материалы	P/N
Ксилол (ACS, > 98.5% ксилол)	Любой поставщик
Абсолютный этанол (для молекулярной биологии)	Sigma E7023 или Fisher Scientific BP2818-500 или эквивалент
Изопропанол (ACS, > 99.5%)	Sigma 190764 или Fisher Scientific A451-1 или эквивалент
Стерильная свободная от нуклеаз вода (для молекулярной биологии)	Любой поставщик
Хлорка	Любой поставщик
70% Этанол	Любой поставщик
Стерильные одноразовые серологические пипетки 5- и 25- мл	Любой поставщик
cobas [®] 4800 System микроплашка (AD-плашка) и заклеивающая пленка	Roche 05232724001
cobas [®] 4800 System аппликатор для заклеивающей пленки (поставляется при инсталляции системы cobas [®] 4800)	Roche 04900383001
Дозаторы с переменным объемом* (на 5-1000 мкл)	Любой поставщик
Свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером	Любой поставщик
Дозатор Pipet-Aid TM *	Drummond 4-000-100 или эквивалент
Настольная микроцентрифуга* (до 20000 x g)	Eppendorf 5430 или 5430R или эквивалент
Два термоблока, рассчитанных на нагревание микроцентрифужных пробирок до 56°C и 90°C*	Любой поставщик
Микроцентрифужные пробирки с защелкивающейся крышкой (объемом 1.5 мл, стерильные, свободные от нуклеаз, для ПЦР)	Любой поставщик
Штативы для микроцентрифужных пробирок	Любой поставщик
Спектрофотометр для измерения концентрации ДНК*	Любой поставщик
Вортекс*	Любой поставщик
Одноразовые перчатки, без талька	Любой поставщик
Калиброванные термометры для термоблока *	Любой поставщик
Водяная баня* рассчитанная на 37°C	Любой поставщик
Бритва с одной острой стороной	Любой поставщик

* Эксплуатация всего оборудования должна осуществляться в соответствии с инструкциями производителя.
За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в Ваше региональное представительство Roche.

Необходимые приборы и программное обеспечение, не предоставляются

Необходимые приборы и программное обеспечение, не предоставляются
Анализатор cobas z 480
Контрольный блок системы cobas [®] 4800 с программным обеспечением системы версии 2.1 или выше
Программа EGFR Tissue P1 Analysis Package Software версии 1.0 или выше
Сканнер штрих-кода с подключением USB
Принтер

За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в Ваше региональное представительство Roche.

Меры предосторожности и правила работы

Меры предосторожности

Как и при выполнении любого теста, соблюдение правил надлежащей лабораторной практики является условием качественного выполнения данного теста.

- Только для диагностики *in vitro*.
- Сведения о безопасности материалов (SDS) доступны по запросу в вашем региональном представительстве Roche.
- Данный тест предназначен для работы с образцами FFPET NSCLC. Все образцы нужно рассматривать как потенциально инфекционные и соблюдать при работе с ними правила биологической безопасности, приведенные в документах Биологической безопасности в Микробиологических и Медико-биологических лабораториях¹² и CLSI Документ M29-A3.¹³

DNA PBB и DNA TLB содержат Тритон X-100, способный вызывать раздражение слизистых. Не допускайте попадание в глаза, на кожу и слизистые.

- Ксилол является ядовитым реагентом, работать с ним необходимо в укрытии. Утилизируйте ксилол как химические отходы в соответствии с местными, федеральными, государственными правилами.
- Рекомендуются использовать стерильные одноразовые пипетки и свободные от нуклеаз наконечники.

Надлежащая лабораторная практика

- Не пипетируйте ртом.
- Не есть, не пить и не курить в рабочих лабораторных помещениях.
- Тщательно мойте руки после работы с образцами и компонентами набора.
- При работе с любыми реагентами пользуйтесь одноразовыми перчатками, лабораторными халатами и защитой для глаз. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами и слизистой. В случае такого контакта немедленно смойте большим количеством воды, в противном случае могут возникнуть ожоги. Разлитые реагенты смойте водой и вытрите насухо.
- Тщательно очищайте и дезинфицируйте все рабочие поверхности свежеприготовленным 0.5 % раствором гипохлорита натрия в дистиллированной или деионизированной воде (разведите бытовую хлорку 1:10). Затем протрите поверхности 70 % этанолом.

Примечание: Коммерческие хлорсодержащие средства содержат гипохлорит натрия в концентрации 5.25 %. При разведении 1:10 коммерческого хлорсодержащего средства получают раствор гипохлорита натрия с концентрацией 0.5 %.

Контаминация

- Для предотвращения контаминации необходимо работать в перчатках и менять их при работе с образцами и с реагентами cobas® EGFR Test. Не допускайте контаминацию перчаток при работе с образцами.
- Необходимо часто менять перчатки, для снижения потенциального риска контаминации.
- Необходимо менять перчатки перед покиданием зоны выделения ДНК или при любом подозрении на контакт с раствором или образцом.
- Не допускайте контаминации реагентов микроорганизмами и нуклеазами.

- Рабочую зону для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед приготовлением рабочего мастер-микса. Отдельные расходные материалы и оборудование должны быть предназначены для каждого вида работ, и не должны перемещаться из одной зоны в другую. Например, дозаторы и расходные материалы для выделения ДНК не должны использоваться для подготовки реагентов для амплификации и детекции.
- Рекомендуется организовать работу в одном направлении, так, чтобы один вид работы сменялся другим. Например, необходимо закончить выделение ДНК, перед тем как приступить к амплификации и детекции. Выделение ДНК и амплификацию необходимо проводить в отдельных помещениях. Для предотвращения контаминации рабочего мастер-микса образцами, рабочую зону для амплификации необходимо тщательно очистить перед приготовлением мастер-микса.

Целостность

- Не используйте наборы после истечения срока годности.
- Не объединяйте реагенты из разных наборов или серий наборов.
- Не используйте расходные материалы после истечения их срока годности.
- Все расходные материалы предназначены для однократного применения.
- Все оборудование необходимо обслуживать в соответствии с инструкциями производителя.

Утилизация отходов

- **DNA TLB, DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC и DNA SD** содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб, образуя взрывоопасные азиды металлов. Выливая содержащие азид натрия растворы в лабораторную раковину, смывайте большим объемом воды для предотвращения образования азидов.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с федеральными и местными правилами.

Очистка и дезинфекция

- **DNA PBB и WB I** содержат гуанидин гидрохлорид. При разливе жидкостей, содержащий данный реагент, проведите очистку подходящим лабораторным детергентом и затем водой. При разливе потенциально инфекционного материала, очистите поверхность сначала лабораторным детергентом и водой, и затем 0.5 % раствором гипохлорита натрия.
- Если разлив произошел в приборе **cobas® 4800**, при очистке следуйте инструкциям, приведенным в Руководстве пользователя системы **cobas® 4800**.
- Не используйте раствор гипохлорита натрия (бытового моющего средства) для очистки анализатора **cobas z 480**. Проводите очистку анализатора **cobas z 480** в соответствии с Руководством пользователя системы **cobas® 4800**.
- Дополнительные меры предосторожности, безопасности и процедуры для снижения риска контаминации при работе с анализатором **cobas z 480** приведены в Руководстве пользователя анализатора **cobas z 480**.

Сбор, транспортировка и хранение образцов

Примечание: Работайте со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами.

Сбор образцов

Для работы с набором cobas® EGFR Test валидированы образцы NSCLC FFPET.

Транспортировка, хранение и стабильность образцов

Образцы NSCLC FFPET можно транспортировать при температуре 15 °C – 30 °C. Транспортировка образцов FFPET должна соответствовать региональным, федеральным и государственным правилам перевозки этиологических агентов.¹⁰

Подтверждена стабильность образцов FFPET, хранящихся при температуре 15 °C – 30 °C до 12 месяцев после сбора. Срезы толщиной 5 микрон на предметных стеклах могут храниться при температуре 15 °C – 30 °C до 60 дней.

Образцы FFPET стабильны при следующих условиях:

Тип образца FFPET	Блок FFPET	Секция FFPET толщиной 5 мкм
Температура хранения образца FFPET	15°C to 30°C	15°C - 30°C
Продолжительность хранения	До 12 месяцев	До 60 дней

Хранение и стабильность обработанных образцов

Обработанные образцы (выделенная ДНК) стабильны:

Температура хранения выделенной ДНК	От -15°C до -25°C	2°C - 8°C	15°C - 30°C
Продолжительность хранения	до 3 циклов оттаивания/замораживания в течение 60 дней	до 14 дней	до 1 дня

Выделенная ДНК должна быть использована для тестирования в течение указанных периодов хранения или до истечения срока годности набора cobas® DNA Sample Preparation Kit, использованного для ее выделения, в зависимости от того, что наступит раньше.

Процедура теста

Постановка теста

Рисунок 1 cobas® EGFR Test рабочий процесс с cobas® DNA Sample Preparation Kit

1	Включите систему
2	Запустите обслуживание прибора
3	Выньте образцы и реагенты из хранения
4	Проведите депарафинизацию образцов
5	Выполните выделение ДНК
6	Растворите ДНК
7	Создайте рабочее назначение и распечатайте схему плашки
8	Приготовьте реагенты для амплификации
9	Внесите в микроплашку реагенты для амплификации
10	Внесите в микроплашку образцы
11	Заклейте микроплашку
12	Загрузите микроплашку в анализатор cobas z 480
13	Запустите постановку
14	Просмотрите результаты
15	С ЛИС: отправьте результаты в ЛИС
16	Выгрузите анализатор

Инструкция по работе с набором

Примечание: Для теста cobas® EGFR Test v2 используются только образцы опухолевой ткани, фиксированные в формалине и залитые в парафин (FFPET NSCLC), в срезах толщиной 5 мкм, в которых доля опухолевой ткани составляет не менее 10 %. Образцы, в которых содержится менее 10 % опухолевой ткани, должны подвергаться макродиссекции после депарафинизации.

Примечание: Подробные инструкции по работе с анализатором cobas z 480 приведены в Руководстве пользователя анализатора cobas z 480.

Примечание: Термоблоки для инкубации микроцентрифужных пробирок с защелкивающейся крышкой необходимо включить и выставить на 56 °C и 90 °C.

Объем постановки

Одна постановка может включать от 1 до 30 образцов (плюс контроли) в 96-луночной микроплашке. При постановке более 24 образцов необходимо использовать более одного набора реагентов cobas® EGFR Test.

Набор cobas® EGFR Test содержит количество реагентов, достаточное для 8 постановок по 3 образца (плюс контроли), максимум 24 образца с одним набором.

Подготовка реагентов

До начала работы с набором реагентов в первый раз, приготовьте рабочие растворы реагентов, как описано в таблице ниже. Вносите воду с помощью серологических пипеток объемом 5 мл. Для внесения этанола используйте серологические пипетки объемом 25 мл. Если протеиназа К была ранее восстановлена и заморожена, разморозьте необходимое количество аликвот для обработки образцов.

Реагенты	Восстановление / Подготовка
Протеиназа К (РК)	Растворите протеиназу К (РК), добавив 4.5 мл стерильной (степень очистки для ПЦР) воды в пробирку с помощью стерильной одноразовой серологической пипетки объемом 5 мл. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Сделайте аликвоты растворенной РК по 450 мкл в микроцентрифужных пробирках с защелкивающейся крышкой объемом 1.5 мл и храните при -20°C до 90 дней или до истечения срока годности набора. Если протеиназа К была растворена ранее и хранилась замороженной, оттайте необходимое количество аликвот до начала депарафинизации (70 мкл растворенной РК необходимо для обработки одного образца).
Промывочный буфер I (WB I)	Приготовьте рабочий промывочный буфер WB I добавив 15 мл абсолютного этанола во флакон WB I. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер WB I при 15°C - 30°C до 90 дней или до истечения срока годности набора.
Промывочный буфер II (WB II)	Приготовьте рабочий промывочный буфер WB II добавив 50 мл абсолютного этанола во флакон WB II. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер WB II при 15°C - 30°C до 90 дней или до истечения срока годности набора.

Все растворы, хранящиеся при 15-30 °C, должны быть прозрачными. Если в каком-либо реагенте присутствует преципитат, нагрейте реагент на водяной бане при 37 °C до полного растворения преципитата. Не используйте реагент, если осадок растворен не полностью.

Депарафинизация срезов FFPET на предметных стеклах

Примечание: Ксилол является опасным реагентом. Все этапы депарафинизации должны проводиться под вытяжкой. См. раздел Меры предосторожности.

Примечание: Образцы, в которых содержится менее 10% опухолевой ткани должны подвергаться макродиссекции.

- Поместите предметное стекло со срезом FFPET толщиной 5 мкм в контейнер с достаточным объемом ксилола, закрывающим предметное стекло полностью. Инкубируйте 5 минут.

2. Перенесите предметное стекло в контейнер с достаточным объемом абсолютного этанола, закрывающим предметное стекло полностью. Инкубируйте 5 минут.
3. Выньте предметное стекло и дайте срезу высохнуть на воздухе полностью (5 – 10 минут).
4. Выполните макродиссекцию, если образец содержит менее 10 % опухолевой ткани.
5. Промаркируйте по одной микроцентрифужной пробирке с защелкивающейся крышкой объемом 1.5 мл для каждого образца.
6. Внесите по 180 мкл **DNA TLB** в каждую маркированную микроцентрифужную пробирку с защелкивающейся крышкой.
7. Внесите по 70 мкл растворенной РК в каждую микроцентрифужную пробирку с защелкивающейся крышкой с **DNA TLB**.
8. Соскоблите ткань с предметного стекла в микроцентрифужную пробирку с защелкивающейся крышкой и поместите в смесь **DNA TLB** и **РК**.
9. Перейдите к этапу 1 процедуры **Выделение ДНК**.

Депарафинизация срезов FFPET не на предметных стеклах

Примечание: Ксилол является опасным реагентом. Все этапы депарафинизации должны проводиться под вытяжкой. См. Раздел Меры предосторожности.

Примечание: Образцы, в которых содержится менее 10 % опухолевой ткани, необходимо поместить на предметное стекло и провести макродиссекции. Далее провести процедуру депарафинизации, описанную в разделе «Депарафинизация срезов FFPET на предметных стеклах».

1. Поместите срез FFPET толщиной 5 мкм в промаркированную микроцентрифужную пробирку с защелкивающейся крышкой объемом 1.5 мл.
2. Внесите 500 мкл ксилола микроцентрифужную пробирку с защелкивающейся крышкой со срезом FFPET.
3. Тщательно перемешайте на вортексе 10 секунд.
4. Оставьте пробирку на 5 минут при 15 °C – 30 °C.
5. Внесите 500 мкл абсолютного этанола и перемешайте на вортексе 10 секунд.
6. Оставьте пробирку на 5 минут при 15 °C – 30 °C.
7. Центрифугируйте при 16000 x g – 20000 x g в течение 2 минут, и удалите супернатант, не задев осадок. Удалите супернатант в химические отходы.
8. Внесите 1 мл абсолютного этанола и перемешайте на вортексе 10 секунд.
9. Центрифугируйте при 16000 x g – 20000 x g в течение 2 минут, и удалите супернатант, не задев осадок. Удалите супернатант в химические отходы.
10. Если осадок плавает в супернатанте, открутите снова 1 минуту при 16000 x g - 20000 x g. Удалите остатки супернатанта.
11. Высушите осадок ткани в течение 10 минут при 56 °C в термоблоке в открытой пробирке.
12. Прежде чем перейти к следующему этапу, убедитесь, что этанол испарился полностью, осадок должен быть сухим.
13. При необходимости осадки можно хранить 24 часа при 2 – 8 °C.
14. Растворите осадок ткани в 180 мкл буфера для лизирования тканей (**DNA TLB**).
15. Внесите 70 мкл растворенной РК.
16. Перейдите к этапу 1 процедуры **Выделение ДНК**.

Процедура выделения ДНК

Примечание: Проводите обработку отрицательного контроля одновременно с образцами. Приготовьте отрицательный контроль, смешав 180 мкл буфера для лизиса тканей (DNA TLB) и 70 мкл раствора РК в микроцентрифужной пробирке с защелкивающейся крышкой объемом 1.5 мл, промаркированной NEG. Отрицательный контроль необходимо обрабатывать по той же процедуре, что и клинические образцы.

1. Перемешайте на вортексе пробирки с образцами/смесью DNA TLB/РК и пробирку с отрицательным контролем (NEG) в течение 30 секунд.

Примечание: Ткань должна быть полностью погружена в смесь DNA TLB/РК.

2. Поместите пробирки в термоблок на 56 °C и инкубируйте 60 минут.
3. Перемешайте на вортексе 10 секунд.

Примечание: Ткань должна быть полностью погружена в смесь DNA TLB/РК.

4. Поместите пробирки в термоблок на 90 °C и инкубируйте 60 минут.

Примечание: Во время инкубации подготовьте необходимое количество пробирок с фильтром (FT) поместив картридж в пробирки для сбора (СТ) и промаркируйте каждую FT пробирку на крышке.

Примечание: Для каждого образца потребуется 1 FT, 3 СТ и одна пробирка для элюции микроцентрифужная пробирка с защелкивающейся крышкой объемом 1.5 мл).

Примечание: Во время инкубации промаркируйте необходимое число пробирок для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл).

5. Дайте пробирке остыть до 15 °C – 30 °C. После охлаждения открутите в центрифуге пробирку, чтобы собрать все ее содержимое на дне.
6. Внесите 200 мкл DNA PBВ и перемешайте пипетированием 3 раза.
7. Инкубируйте пробирку при 15 °C – 30 °C в течение 10 минут.
8. Добавьте 100 мкл изопропанола и перемешайте лизат пипетированием 3 раза.
9. Перенесите лизат целиком в маркированную пробирку FT/СТ.
10. Центрифугируйте FT/СТ при 8000 x g в течение 1 минуты.
11. Поместите FT в новую пробирку СТ. Выбросьте содержимое использованной пробирки СТ в химические отходы. И использованную пробирку СТ утилизируйте надлежащим образом.
12. Внесите 500 мкл рабочего буфера WB I в FT.

Примечание: Приготовление рабочего раствора WB I описано в разделе Подготовка реагентов.

13. Центрифугируйте FT/СТ при 8000 x g в течение 1 минуты.
14. Сбросьте содержимое всех пробирок СТ в химические отходы. Поместите FT назад в ту же пробирку СТ.
15. Внесите 500 мкл рабочего буфера WB II в FT.

Примечание: Приготовление рабочего раствора WB II описано в разделе Подготовка реагентов.

16. Центрифугируйте FT/СТ при 8000 x g в течение 1 минуты.
17. Поместите FT в новую пробирку СТ. Выбросьте содержимое использованной пробирки СТ в химические отходы. И использованную пробирку СТ утилизируйте надлежащим образом.
18. Центрифугируйте пробирку FT/СТ при 16000 - 20000 x g в течение 1 минуты, чтобы высушить мембрану фильтра.

19. Поместите пробирку **FT** в заранее промаркированную пробирку для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл). Выбросьте содержимое использованной пробирки **СТ** в химические отходы. И использованную пробирку **СТ** утилизируйте надлежащим образом.
20. Внесите 100 мкл **DNA EB** на центр мембраны **FT**, не касаясь самой мембраны **FT**.
21. Инкубируйте **FT** в пробирке для элюции при 15 °C – 30 °C в течение 5 минут.
22. Центрифугируйте **FT** в пробирке для элюции при 8000 x g в течение 1 минуты, чтобы собрать элюат на дне пробирки для элюции. Утилизируйте **FT** надлежащим образом.
23. Закройте крышки пробирок для элюции. Перейдите к этапу 1 раздела **Количественный анализ ДНК**.

***Примечание:** Количественный анализ ДНК необходимо проводить немедленно после процедуры выделения ДНК, до хранения образца ДНК.*

Количественный анализ ДНК

1. Перед проведением количественного анализа перемешайте каждый исходный образец ДНК на вортексе 5 секунд.
2. Проведите количественный анализ ДНК с помощью спектрофотометра по протоколу производителя. Используйте в качестве пустого образца **DNA EB**. Обычно требуется 2 измерения. Оба измерения должны укладываться в $\pm 10\%$ друг от друга при концентрации ДНК ≥ 20.0 нг/мкл. Если концентрация ДНК < 20.0 нг/мкл, различия между двумя измерениями должны укладываться в ± 2.0 нг/мкл. Если измерения не укладываются в критерий $\pm 10\%$ друг от друга при концентрации ДНК ≥ 20.0 нг/мкл или не укладываются в критерий ± 2 нг/мкл при концентрации ДНК < 20.0 нг/мкл, необходимо выполнить два дополнительных измерения до достижения соответствующих критериев. Затем необходимо рассчитать среднее для двух этих измерений.

Примечание: Концентрацию ДНК в обработанном отрицательном контроле (NEG) измерять не нужно.

Концентрация исходного образца ДНК должна составлять > 2 нг/мкл для проведения теста cobas® EGFR Test. Три реакции амплификации/детекции проводится для каждого образца, для каждой амплификации/детекции используется 25 мкл разведения исходного образца ДНК с концентрацией 2 нг/мкл (всего 50 нг ДНК).

Примечание: Каждый исходный образец ДНК должен иметь концентрацию не менее 2 нг/мкл для проведения теста cobas® 4800 EGFR Test. Если концентрация исходного образца ДНК < 2 нг/мкл, для данного образца необходимо повторить процедуры пробоподготовки и количественного анализа ДНК, используя два среза FFPEТ толщиной 5 мкм. Для образцов на предметных стеклах после депарафинизации объедините оба образца ткани в одной пробирке, поместив их в **DNA TLB + PK**. Продолжите процедуру выделения ДНК и количественного анализа, как описано выше. Для образцов не на предметных стеклах, объедините оба среза в одной пробирке с **DNA TLB + PK**, и продолжите процедуру выделения ДНК и количественного анализа, как описано выше. Если концентрация ДНК в исходном образце по-прежнему < 2 нг/мкл, необходимо запросить для анализа новый образец FFPEТ.

Примечание: Обработанные образцы (выделенная ДНК) стабильны до 24 часов при температуре $15^\circ\text{C} - 30^\circ\text{C}$ или до 14 дней при $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$, или при $-15^\circ\text{C} - -25^\circ\text{C}$ до 60 дней. При хранении при $-15^\circ\text{C} - -25^\circ\text{C}$ образцы стабильны до трех циклов замораживания/оттаивания. Выделенная ДНК должна быть подвергнута амплификации в течение указанных периодов хранения или до истечения срока годности набора cobas® DNA Sample Preparation Kit, в зависимости от того, что наступит раньше.

Амплификация и детекция

Примечание: Чтобы не допустить контаминации рабочего мастер-микса образцами ДНК, амплификацию и детекцию необходимо проводить в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Рабочую зону для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед началом приготовления рабочего мастер-микса. Все поверхности, включая штативы и дозаторы, необходимо тщательно протереть 0.5 % раствором гипохлорита натрия, затем протереть 70 % этанолом. Коммерческие чистящие средства обычно содержат гипохлорит натрия в концентрации 5.25 %. Разведение 1:10 чистящего средства позволяет получить 0.5 % раствор гипохлорита натрия.

Подготовка прибора

Подробные инструкции по подготовке анализатора cobas z 480 приведены в Руководстве пользователя анализатора cobas z 480.

Создание назначения теста

Подробные инструкции по постановке теста EGFR приведены в Руководстве пользователя анализатора cobas z 480 системы cobas® 4800 и руководства пользователя программы cobas® EGFR Mutation Test v2.

Создайте схему плашки, указав позиции для всех образцов и контролей в постановке. Мутационный контроль размещают в плашке в позициях A01 – A03. Отрицательный контроль размещают в плашке в позициях B01 – B03. Разведенные клинические образцы вносят каждый в три столбца, начиная с позиций C01 – C03 заканчивая позициями H10 – H12, как показано на Рисунке 2.

Рисунок 2 Схема плашки для теста cobas® EGFR Test

Строка / столбец	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3 v2	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3 v2	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3 v2	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3 v2
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3 v2	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3 v2	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3 v2	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3 v2
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3 v2	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3 v2	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3 v2	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3 v2
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3 v2	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3 v2	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3 v2	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3 v2
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3 v2	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3 v2	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3 v2	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3 v2
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3 v2	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3 v2	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3 v2	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3 v2
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3 v2	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3 v2	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3 v2	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3 v2
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3 v2	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3 v2	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3 v2	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3 v2

На схеме: MC= мутационный контроль, NEG = отрицательный контроль S# = ID образца, MMX # соответствует мастер-миксу 1, 2 или 3 v2.

- Примечание:** Каждый образец необходимо вносить в три последовательных столбца в один ряд, чтобы получить валидные результаты.
- Примечание:** Рабочий мастер-микс 1 необходимо вносить в столбцы 01, 04, 07 и 10 на плашке. абочий мастер-микс 2 необходимо вносить в столбцы 02, 05, 08 и 11 на плашке. Рабочий мастер-микс 3 v2 необходимо вносить в столбцы 03, 06, 09 и 12 на плашке.
- Примечание:** На одну плашку можно загрузить до 30 образцов. Если для постановки на плашке требуются реагенты более чем из одного набора, эти наборы должны быть все из одной серии.

Расчет разведения исходного образца ДНК

Расчет разведения исходного образца ДНК с концентрацией 2 нг/мкл - 36 нг/мкл

Примечание: Исходную биомассу ДНК из образцов необходимо разводить непосредственно перед проведением амплификации и детекции.

Примечание: Для каждого образца проводятся три реакции амплификации/детекции, для этого необходим объем образца 75 мкл (по 25 мкл для каждой из трех реакций) с концентрацией 2 нг/мкл после разведения биомассы ДНК (всего 150 нг ДНК).

1. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем (в мкл) биомассы ДНК:

мкл исходного образца ДНК = $(90 \text{ мкл} \times 2 \text{ нг/мкл}) + \text{концентрация исходного образца ДНК [нг/мкл]}$

2. Для каждого образца рассчитайте необходимый объем (в мкл) растворителя для образца ДНК (DNA SD):

мкл DNA SD = $90 \text{ мкл} - \text{мкл исходного образца ДНК}$:

Пример:

Концентрация исходного образца ДНК = 6.5 нг/мкл

1. мкл исходного образца ДНК = $(90 \text{ мкл} \times 2 \text{ нг/мкл}) + 6.5 \text{ нг/мкл} = 27.7 \text{ мкл}$

2. мкл DNA SD = $(90 \text{ мкл} - 27.7 \text{ мкл}) = 62.3 \text{ мкл}$

Расчет разведения образца ДНК с концентрацией > 36 нг/мкл

Примечание: Исходную биомассу ДНК из образцов необходимо разводить непосредственно перед проведением амплификации и детекции.

Примечание: Для каждого образца проводятся три реакции амплификации/детекции, для этого необходим объем образца 75 мкл (по 25 мкл для каждой из трех реакций) с концентрацией 2 нг/мкл после разведения биомассы ДНК (всего 150 нг ДНК).

1. Для исходных образцов ДНК с концентрацией > 36 нг/мкл, используйте приведенную ниже формулу для расчета объема растворителя образца ДНК (DNA SD), необходимого для получения не менее 90 мкл разведенного образца ДНК. Данная формула обеспечивает использование для разведения не менее 5 мкл исходного образца ДНК.

2. Для каждого образца рассчитайте объем (в мкл) DNA SD, необходимый для разведения 5 мкл исходного образца ДНК до концентрации 2 нг/мкл:

Необходимый объем DNA SD в мкл = $[(5 \text{ мкл исходного образца ДНК} \times \text{концентрация ДНК в нг/мкл}) / 2 \text{ нг/мкл}] - 5 \text{ мкл}$

Пример:

Концентрация исходного образца ДНК = 100 нг/мкл

1. Необходимый объем DNA SD в мкл = $[(5 \text{ мкл} \times 100 \text{ нг/мкл}) / 2 \text{ нг/мкл}] - 5 \text{ мкл} = 245 \text{ мкл}$

2. Используйте рассчитанный объем DNA SD для разведения 5 мкл исходного образца ДНК.

Разведение образцов

1. Подготовьте необходимое число микроцентрифужных пробирок с защелкивающейся крышкой объемом 1.5 мл для разведений ДНК, промаркируйте их в соответствии с маркировкой образцов.

2. С помощью дозатора и наконечника с аэрозольным барьером, внесите рассчитанный объем растворителя ДНК (DNA SD) в промаркированную пробирку. Внесите 45 мкл DNA SD в пробирку с защелкивающейся крышкой, маркированную NEG.

3. Перемешайте исходный образец ДНК и отрицательный контроль на вортексе в течение 5-10 секунд.
4. С помощью дозатора и наконечника с аэрозольным барьером, внесите рассчитанный объем исходного образца ДНК в промаркированную пробирку, содержащую **DNA SD**. Для каждого образца используйте отдельный наконечник. Внесите 45 мкл отрицательного контроля (элюат после выделения) в пробирку **NEG**.
5. Закройте пробирки и перемешайте на вортексе в течение 5 – 10 секунд.
6. Смените перчатки.

Подготовка реакции

Приготовление рабочих мастер-миксов (MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2)

Примечание: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 и рабочие мастер-миксы MMX чувствительны к воздействию света, необходимо защищать их от продолжительного воздействия света.

Примечание: Вследствие вязкости миксов EGFR и рабочих MMX, раскапывайте медленно, чтобы весь объем смеси выходил из наконечника.

Примечание: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 и EGFR MMX-3 v2 могут иметь светлый синий/пурпурный оттенок. Это не сказывается на рабочих характеристиках реагента.

В отдельных микроцентрифужных пробирках с защелкивающейся крышкой объемом 1.5 мкл приготовьте три смеси рабочих MMX, один с EGFR MMX-1, второй с EGFR MMX-2, и третий с EGFR MMX-3 v2.

1. Рассчитайте объемы EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 и EGFR MMX-3 v2 для приготовления рабочих MMX по следующей формуле:

Необходимый объем EGFR MMX-1 или EGFR MMX-2 или EGFR MMX-3 v2 = (число образцов + 2 контроля +1) x 20 мкл

2. Рассчитайте необходимый объем MGAC для каждого MMX по следующей формуле:

Необходимый объем MGAC = (число образцов + 2 контроля +1) x 5 мкл

С помощью таблицы 4 определите объем каждого реагента, необходимый для получения рабочего MMX исходя из числа образцов в постановке.

Таблица 4 Объемы реагентов, необходимые для приготовления рабочих мастер-миксов MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2

		# образцов*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 мкл	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 мкл	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Конечный объем каждого рабочего мастер-микса MMX (мкл)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Объемы для # образцов рассчитаны исходя из суммы N образцов + 2 контроля + 1

3. Возьмите необходимое число пробирок EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 и MGAC из хранения при 2 °C – 8 °C. Перемешайте на вортексе каждый реагент 5 секунд и осадите содержимое пробирок. Промаркируйте стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл для рабочего MMX-1, рабочего MMX-2 и рабочего MMX-3v2.
4. Внесите рассчитанные объемы EGFR MMX-1 или EGFR MMX-2 или EGFR MMX-3 v2 в соответствующие пробирки для рабочих MMX.
5. Внесите рассчитанный объем MGAC в пробирки с рабочими MMX.
6. Перемешайте пробирки на вортексе 3 – 5 секунд.

Примечание: Образцы и контроли необходимо внести в микроплашку (AD-плашку) не позднее чем через 1 час после подготовки рабочих мастер-миксов (MMX).

Примечание: Используйте только микроплашки cobas® 4800 System (AD-плашки) и заклеивающую пленку.

Подготовка плашки

1. Внесите по 25 мкл рабочего MMX в каждую задействованную в постановке реакционную лунку микроплашки (AD-плашки). Не касайтесь наконечником плашки за пределами лунки.
 - Внесите рабочий MMX-1 (содержащий **EGFR MMX-1**) в лунки микроплашки (AD-плашки) в столбцы 01, 04, 07 и 10.
 - Внесите рабочий MMX-2 (содержащий **EGFR MMX-2**) в лунки микроплашки (AD-плашки) в столбцы 02, 05, 08, и 11.
 - Внесите рабочий MMX-3 v2 (содержащий **EGFR MMX-3 v2**) в лунки микроплашки (AD-плашки) в столбцы 03, 06, 09 и 12.
2. Внесите 25 мкл **EGFR MC** в лунки **A01, A02 и A03** микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз.
3. Используя новый наконечник, внесите 25 мкл **NEG** в лунки **B01, B02 и B03** микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз.

Примечание: Каждая постановка должна включать в себя положительный контроль (**EGFR MC**) в лунках **A01, A02 и A03**, и отрицательный контроль (**NEG**) в лунках **B01, B02 и B03**, в противном случае анализатор **cobas z 480** признает постановку невалидной.

Примечание: При необходимости меняйте перчатки для предотвращения перекрестной контаминации образцов.

4. Используя новый наконечник, внесите 25 мкл ДНК первого образца в лунки **C01, C02 и C03** микроплашки (AD-плашки), меняйте наконечник для внесения каждого образца ДНК; перемешайте пипетированием не менее двух раз. Повторите процедуру для внесения каждого образца ДНК в соответствии со схемой на Рисунке 2, внесите все оставшиеся образцы ДНК в лунки микроплашки (AD-плашки). Убедитесь, что вся реакционная смесь находится на дне лунки.
5. Заклейте микроплашку (AD-плашку) заклеивающей пленкой (поставляется вместе с плашками). Используйте аппликатор для пленки для гарантии полного приклеивания пленки к микроплашке.
6. Перед запуском ПЦР убедитесь, что в каждой лунке реакционная смесь находится на дне.

Примечание: Амплификацию и детекцию необходимо начать не позднее чем через 1 час после внесения первого образца ДНК в рабочий MMX.

Запуск ПЦР

Подробные инструкции по проведению теста EGFR приведены в Инструкции пользователя **cobas® EGFR**. Когда появится всплывающее окно “Select test”, выберите “EGFR Tissue P1” и нажмите кнопку “OK”.

Результаты

Интерпретация результатов

Примечание: Валидация постановки и результатов образцов выполняется программой cobas® 4800 Software.

Примечание: Валидная постановка может содержать как валидные, так и невалидные результаты отдельных образцов.

Интерпретация результатов для валидной постановки приведена в Таблице 5.

Таблица 5 Интерпретация результатов теста cobas® EGFRTest

Результат теста	Мутация	Интерпретация
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Может присутствовать более одной мутации)	В участках-мишенях гена EGFR выявлены мутации.
No Mutation Detected (NMD)*	Не применимо *	В участках-мишенях гена EGFR не выявлены мутации
Invalid	Не применимо	Для образца получен невалидный результат. Повторите тестирование образца, следуя инструкциям, приведенным ниже в разделе “Повторное тестирование образцов с невалидными результатами”.
Failed	Не применимо .	Постановка не прошла из-за ошибки оборудования или программы. Обратитесь за технической поддержкой в Ваше представительство Roche.

* Результат Mutation Not Detected (Мутация не выявлена) не исключает присутствия мутации в участках гена EGFR, поскольку результат теста зависит от доли мутантной последовательности, присутствующей в образце, адекватности сбора образца, присутствия ингибиторов, количества ДНК в образце.

Повторное тестирование образцов с невалидными результатами

- Повторите разведение исходного образца ДНК, для которого был получен невалидный результат, начиная с этапов “Расчет разведения исходного образца ДНК” и “Разведение образца” в разделе **Амплификация и детекция**.
- После разведения исходного образца ДНК до концентрации 2 нг/мкл, как описано в разделе “Разведение образца”, перейдите к разделу “Приготовление рабочих мастер-миксов (MMX-1, MMX-2 and MMX-3 v2)” и последующим процедурам амплификации и детекции.

Примечание: Если после повторного тестирования образец снова дал невалидный результат, или для получения нового разведения ДНК, как описано выше на этапе А, имеется недостаточное количество исходного образца ДНК, повторите всю процедуру теста для данного образца, начав с этапа Депарафинизации и Выделения ДНК из нового среза FFPEТ толщиной 5 микрон.

Контроль качества и валидность результатов

По одной серии мутантного контроля **cobas**® EGFR Test (**EGFR MC**) (лунки **A01**, **A02** и **A03**) и одной серии отрицательного контроля (**NEG**) (лунки **B01**, **B02** и **B03**) для рабочих мастер-миксов MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2 включают в каждую постановку объемом до 30 образцов. Постановка признается валидной, если в лунках с мутантным контролем EGFR (**EGFR MC**) и в лунках с отрицательным контролем (**NEG**) получены валидные результаты. Если для мутантного контроля EGFR (**EGFR MC**) или отрицательного контроля (**NEG**) получен невалидный результат, вся постановка признается невалидной и требует перестановки. Приготовьте новое разведение ранее выделенной ДНК, и внесите его в новую микроплашку (AD-плашку) с контролями для проведения амплификации и детекции.

Мутантный контроль

Результат **EGFR MC** должен быть 'Valid'. Если результат контроля EGFR MC постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Отрицательный контроль

Результат **NEG** должен быть 'Valid'. Если результат **NEG** постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Ограничения процедуры

1. Проводите исследование только с указанными типами образцов. Тест **cobas**® EGFR Test был валидирован для тех опухолевых образцов немелкоклеточного рака легкого, которые фиксированы в формалине и залиты в парафин (NSCLC FFPE).
2. Тест **cobas**® EGFR Test валидирован только для работы с набором для пробоподготовки **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. Детекция мутаций зависит от количества копий мутантной последовательности, присутствующей в образце, на ее эффективность могут оказывать влияние качество образца, количество выделенной ДНК и присутствие ингибирующих веществ.
4. Надежность полученных результатов зависит от адекватности фиксации образца, его транспортировки, хранения и обработки. Следуйте инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору, и в Руководстве пользователя **cobas**® EGFR Test.
5. Влияние других факторов, таких как фиксация образца, не изучалось.
6. Добавление фермента AmpErase в мастер-миксы **cobas**® EGFR обеспечивает избирательную амплификацию ДНК мишени; однако для предотвращения контаминации реагентов необходимо соблюдение правил надлежащей лабораторной практики и точное следование инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору.
7. С данным продуктом может работать только персонал, обученный методу ПЦР и работе с системой **cobas**® 4800.
8. Только анализатор **cobas z 480** валидирован для работы с данным продуктом. Другие термоциклеры с оптической детекцией в режиме реального времени не могут применяться с данным продуктом.
9. Вследствие различий, присущих разным технологиям, пользователю рекомендуется перед переходом с одной технологии на другую провести в своей лаборатории корреляционные исследования для оценки существующих различий.
10. Присутствие ингибиторов ПЦР может приводить к получению ложноотрицательных или невалидных результатов.

07384351001-03RU

Doc. Rev. 3.0

11. Мутации и варианты в участках гена EGFR, перекрываемых праймерами или зондами набора **cobas**® EGFR Mutation Test, встречаются редко, однако их наличие может привести к неудаче при детекции мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 (результат “No Mutation Detected”).
12. Тест **cobas**® EGFR Test обладает перекрестной реактивностью (дает результат “Mutation Detected”) с мутацией L747S в экзоне 19, редкой приобретаемой мутацией, связанной с резистентностью к терапии TKI.¹¹
13. Тест **cobas**® EGFR Test валидирован для постановки, в которой в каждую реакционную лунку вносится 50 нг ДНК. Не рекомендуется вносить в реакцию ДНК в количестве менее 50 нг.
14. Тест **cobas**® EGFR Test является качественным тестом. Тест не предназначен для количественного анализа выявленных мутаций.
15. Образцы NSCLC FFPET, содержащие деградированную ДНК, могут ограничивать способность теста выявлять мутации в EGFR.
16. Образцы с результатом “No Mutation Detected” («Мутации не выявлены») могут содержать мутации в EGFR, не выявленные тестом.
17. Тест **cobas**® EGFR Test позволяет выявлять мутации в EGFR у пациентов с NSCLC, опухоли которых содержат замены в экзоне 18 (G719X), делеции в экзоне 19,ставки и замены в экзоне 20 (T790M, S768I) и замены в экзоне 21 (L858R, L861Q), но не другие мутации в EGFR.

Неклинические испытания теста

Примечание: Представленные ниже результаты исследований отражают обобщенные данные для v1 и v2 теста **cobas**® EGFR Test.

При проведении неклинических испытаний, описанных ниже, процент опухолевой ткани определялся патологом. При выборе образцов для тестирования использовали методы секвенирования по Сенгеру в двух направлениях, а также секвенирование нового поколения (NGS). Процент содержания мутаций в образцах NSCLC FFPET определяли методом NGS.

Аналитическая чувствительность – пустые образцы

Для оценки работы теста **cobas**® EGFR Test в отсутствие матрицы и для проверки отсутствия аналитического сигнала, указывающего на присутствие мутаций в низкой концентрации, тестировали образцы, не содержащие матрицу и образцы NSCLC FFPET, содержащие последовательность EGFR дикого типа. Результаты анализа, выполненного в соответствии с рекомендациями CLSI EP17-A2¹⁶, детекция пустых образцов составила ноль для всех мутаций.

Предел чувствительности для смесей образцов FFPET

Три образца FFPET экстрактов ДНК, содержащих делеционные мутации в экзоне 19, четыре образца FFPET экстракции ДНК с мутацией L858R, два образца FFPET экстракции ДНК с двойной мутацией L858R и T790M, два образца FFPET экстракции ДНК с мутацией G719A, один образец FFPET экстракции ДНК с двойной мутацией T790M и G719A, один образец FFPET экстракции ДНК с двойной мутацией G719C и S768I, один образец FFPET экстракции ДНК с двойной мутацией S768I и G719S, три образца FFPET экстракции ДНК с инсерцией в экзоне 20, и три образца FFPET экстракции ДНК с мутацией L861Q были смешаны с ДНК, выделенной из образца FFPET с EGFR дикого типа, чтобы получить смесь, содержащую 10, 5.0, 2.5 и 1.25% мутаций на основании данных секвенирования нового поколения (NGS) - метода, валидированного для выявления мутаций в экзонах EGFR 18, 19, 20 и 21. Готовили серии разведений для каждой смеси образцов, каждый образец в серии разведений тестировали в восьми повторах с каждой из 3 серий набора **cobas**® EGFR Test (n=24/образец панели). Предел чувствительности для каждого образца определяли, как наименьшее количество ДНК, давшее результат EGFR “Мутация выявлена” с частотой не менее 95 %, показаны в Таблице 6.

07384351001-03RU

Doc. Rev. 3.0

Таблица 6 Предел чувствительности теста **cobas**[®] EGFR Test при тестировании смесей образцов FFPET

Экзон EGFR	Группа мутаций EGFR	Нуклеотидная последовательность EGFR	Доля мутации в образце панели, дающая с частотой $\geq 5\%$ результат "Мутация выявлена" при внесении в реакционную лунку 50 нг ДНК (N=24 повтора)	COSMIC ID ⁶
18	G719X	2156 G>C	2.5	6239
		2156 G>C	4.7	6239
		2155 G>A	3.2	6252
		2155 G>A	5.6	6253
19	Делеция, экзон 19	2235_2249del15	1.4	6223
		2236_2250del15	2.5	6225
		2239_2256del18*	4.7	6255
		2240_2254del15	7.2	12369
		2240_2257del18	13.4**	12370
		2239_2248>C	2.2	12382
		2237_2255>T*	4.1	12384
		2237_2253>TTGCT*	6.3	12416
		2238_2252del15	2.4	23571
		2238_2252del15*	5.5	23571
20	T790M	2369 C>T	2.0	6240
		2369 C>T	2.4	6240
		2369 C>T	3.0	6240
	S768I	2303 G>T	1.3	6241
		2303 G>T	2.4	6241
	Вставка, экзон 20	2307_2308insGCCAGCGTG	1.7	12376
		2319_2320insCAC	6.8	12377
		2310_2311insGGT	1.3	12378
21	L858R	2573 T>G	4.0	6224
		2573 T>G	4.2	6224
		2573 T>G	4.3	6224
		2573 T>G	4.3	6224
		2573 T>G	5.3	6224
	L861Q	2582T>A	2.1	6213
		2582T>A	2.2	6213
		2582T>A	3.4	6213

* Только одна концентрация, соответствующая примерно 5 % доли мутации, тестировалась для данных делеций в экзоне 19, редких в когорте EORTC. Смесей ДНК образцов тестировали в трех центрах.

** Предел чувствительности теста **cobas**[®] EGFR Test для данной мутации превышает 10 % доли мутации при внесении в реакционную лунку стандартного количества ДНК (50 нг).

Полученные результаты продемонстрировали, что тест **cobas**[®] EGFR Test позволяет выявлять мутации в экзонах EGFR 18, 19, 20 и 21 при их доле не менее 5 % при внесении в реакцию стандартного количества ДНК, составляющего 50 нг/лунку.

Минимальное содержание опухоли

Всего 66 независимых мутантных образцов EGFR (из них 35 делеционных мутантов в экзоне 19 и 31 мутант L858R в экзоне 21) с содержанием опухолевой ткани от 25 % до 99 % тестировали для определения минимального содержания опухолевой ткани, необходимой для детекции мутаций EGFR в образцах NSCLC. Ни один из тестируемых образцов не содержал одновременно делеции в экзоне 19 и замены L858R в экзоне 21. Каждый образец тестировали без макродиссекции (целым), и после макродиссекции. Полученные значения CtR для целых образцов и после диссекции анализировали методом регрессии Деминга и методом Бланда-Альтмана (отклонения против среднего). Полученные результаты свидетельствуют в пользу анализа образцов с содержанием опухолевой ткани более 25 % без макродиссекции.

Дополнительные 10 образцов NSCLC с диким типом EGFR (содержание опухолевой ткани 1 – 90 %) и 10 образцов с мутациями в EGFR (содержание опухолевой ткани 8 – 95 %) тестировали для оценки необходимости использования макродиссекции для повышения чувствительности теста **cobas**[®] EGFR Test при тестировании образцов с низким содержанием опухолевой ткани. Каждый образец тестировали без макродиссекции (целым), и после макродиссекции. Результаты, полученные для образцов после макродиссекции, соответствовали результатам тех же образцов без диссекции, ожидаемые результаты мутаций и дикого типа были получены для всех 20 образцов.

В ходе фазы III испытаний EURTAC (эрлотиниб против химиотерапии цисплатином) образцы NSCLC FFPET с содержанием опухолевой ткани менее 10 % подвергали макродиссекции перед выявлением мутаций EGFR. Группу образцов EURTAC анализировали на наличие мутаций в EGFR параллельно тестом **cobas**[®] EGFR Test и методом секвенирования (NGS). В таблицах 7 и 8 приведены результаты для образцов NSCLC с валидными парными результатами по экзону 19 EGFR и замене L858R в тесте **cobas**[®] EGFR Test и NGS. При использовании в качестве референсного теста NGS было показано, что макродиссекция для образцов NSCLC FFPET с содержанием опухоли менее 10 % позволяет получить результаты с точностью, сопоставимой с анализом срезов NSCLC FFPET без макродиссекции.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу использования макродиссекции для срезов NSCLC FFPET с содержанием опухолевой ткани менее 10 % перед проведением теста **cobas**[®] EGFR.

Таблица 5 Результаты теста **cobas**[®] EGFR Test при тестировании образцов NSCLC FFPET с содержанием опухолевой ткани ≤ 10 % (после макродиссекции)

Величина согласованности	Процент согласованности (N)	95% CI
Процент совпадения положительных результатов (PPA)	97.2% (35/36)	85.8%, 99.5%
Процент совпадения отрицательных результатов (NPA)	94.5% (52/55)	85.1%, 98.1%
Общий процент совпадения (OPA)	95.6% (87/91)	89.2%, 98.3%

Таблица 6 Результаты теста **cobas**[®] EGFR Test при тестировании образцов NSCLC FFPET с содержанием опухолевой ткани > 10 % (без макродиссекции)

Величина согласованности	Процент согласованности (N)	95% CI
Процент совпадения положительных результатов (PPA)	93.0% (107/115)	86.9%, 96.4%
Процент совпадения отрицательных результатов (NPA)	98.5% (199/202)	95.7%, 99.5%
Общий процент совпадения (OPA)	96.5% (306/317)	93.9%, 98.1%

Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21

Образцы из клинического исследования EURTAC

Тест **cobas®** EGFR Test дал результат “Mutation Detected” для следующих мутаций EGFR , встречающихся в образцах из клинического исследования EURTAC (Таблица 9). Аналитические характеристики теста **cobas®** EGFR Test при детекции этих мутаций не определяли.

Таблица 9 Мутации, выявленные в когорте EURTAC, дающие перекрестную реактивность в тесте **cobas®** EGFR Test

Экзон	Мутантная последовательность	AA замена	ID космиды ¹⁶
19	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Not Found
	2236_2244del9	E746_R748>E	Not Found
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Not Found
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Not Found

Образцы из клинического исследования AURA2

Тест **cobas®** EGFR Test дал результат “Mutation Detected” для следующих мутаций EGFR , встречающихся в образцах из клинического исследования AURA2 (Таблица 10). Аналитические характеристики теста **cobas®** EGFR Test при детекции этих мутаций не определяли.

Таблица 10 Мутации, выявленные в когорте AURA2, дающие перекрестную реактивность в тесте **cobas®** EGFR Test

Экзон	Мутантная последовательность	AA замена	ID космиды ¹⁶
21	2572_2573CT>AG	L858R	13553

Специфичность – микроорганизмы и гомологи EGFR

Специфичность теста **cobas®** EGFR Test оценивали при тестировании легочной микрофлоры и плазмид, содержащих гомологи EGFR, т.е. плазмид, содержащих последовательности участков HER2, HER3 и HER4 – аналогов последовательностей экзонов EGFR 18, 19, 20 и 21, амплифицируемых с помощью набора **cobas®** EGFR Test.

Микрофлора легких

Было установлено, что *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* не вызывают перекрестной реактивности и интерференции в тесте **cobas®** EGFR Test, если вносятся в количестве 4 x 10⁵ колонии образующих единиц в образцы, содержащие последовательности EGFR дикого типа и мутантные, на этапе лизиса ткани.

Плазмиды гомологов EGFR

Было продемонстрировано, что аналогичные последовательности белка тирозиновой киназы эпидермального рецептора (EGFR/HER1, HER2, HER3 и HER4) не обладают перекрестной реактивностью в тесте **cobas®** EGFR Test при внесении в образец ДНК перед процедурой амплификации/детекции последовательности, потенциально дающей перекрестную реактивность, в количестве копий, эквивалентном 50 нг/ПЦР. В постановку также включали контроль, не содержащий плазмидную ДНК. Полученные результаты показали, что выявленные 07384351001-03RU

мутации во всех 15 тестируемых образцах FFPET соответствовали ожидаемым мутациям, определенным методом секвенирования, независимо от присутствия или отсутствия добавленной плазмидной ДНК, содержащей ген HER. Дополнительно тестировали мутацию L747S (экзон 19) на наличие перекрестной реактивности. Полученные результаты показали, что тест **cobas**[®] EGFR Test дает перекрестную реакцию с мутацией L747S в экзоне 19 EGFR.

Интерференция

Эксперименты по внесению потенциально интерферирующих веществ в образцы на этапе лизиса ткани показали, что триглицериды (37мМ, рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷) и гемоглобин (2 мг/мл, рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷) не вызывают интерференцию в тесте **cobas**[®] EGFR Test.

Было установлено, что Альбутерол (Вентолин), Ипратропиум (Атровент), Флутиказон (Флоназ), Цефтазидим (Фортаз), Имипенем-циластатин (Primaxin), пиперациллин-тазобактам, Циластатин (Циластатин натрия), Бетадин и Лидокаин не вызывают интерференцию в тесте **cobas**[®] EGFR Test при внесении в образцы на этапе лизиса ткани.

Некротические ткани

Было продемонстрировано, что образцы NSCLC FFPET с содержанием некротической ткани до 60 % при наличии мутаций в EGFR и с содержанием до 85% в образцах дикого типа не вызывают интерференцию в тесте **cobas**[®] EGFR Test.

Воспроизводимость

Воспроизводимость теста **cobas**[®] EGFR Test определяли с помощью следующих шести образцов FFPET: 2 образца дикого типа; 4 мутантных образца, по одному: с делецией в экзоне 19, заменами S768I и G719X, заменами T790M и L858R, и вставкой в экзоне 20, соответственно. Данные образцы тестировались в двух повторях двумя операторами, с двумя сериями реагентов и на двух анализаторах **cobas z 480** в течение 4 дней. Всего каждый образец тестировался в 32 повторях. Частота получения правильного ответа в тесте **cobas**[®] EGFR Test составила 96.9 % (186/192).

Во втором исследовании воспроизводимость теста **cobas**[®] EGFR Test оценивали методом тестирования следующих четырех образцов FFPET: один образец с EGFR дикого типа; три образца FFPET с мутациями в EGFR, по одному: L861Q, G719X и инсерции в экзоне 20. Данные образцы тестировались в двух повторях двумя операторами, с двумя сериями реагентов и на двух анализаторах **cobas z 480** в течение нескольких дней. Тест **cobas**[®] EGFR Test дал верный результат в 99.2 % (127/128) при анализе объединенных результатов для всех повторов образцов, операторов, серий набора и анализаторов.

Воспроизводимость при работе с образцами

Воспроизводимость набора для пробоподготовки **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit оценивали с помощью образцов, полученных из трех блоков FFPET, один из которых содержал делецию в экзоне 19, второй – замену L858R, и третий – дикий тип. Каждый образец тестировали в двух повторях в каждом сайте (лаборатории) каждый день. Срезы образцов рандомно тестировали в течение 6 дней в трех лабораториях, в каждом с помощью одного оператора на одном анализаторе **cobas z 480**, с тремя сериями набора **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit и одной серией набора **cobas**[®] EGFR Test. Ежедневно каждый оператор выделял и тестировал ДНК из двух срезов NSCLC FFPET для каждого образца с помощью теста **cobas**[®] EGFR Test. Все образцы дали валидные и корректные результаты на протяжении шести дней тестирования. При анализе объединенных данных, частота корректного результата в тесте **cobas**[®] EGFR Test составила 100 % (108/108).

Клинические испытания теста

Анализ клинической воспроизводимости 1

Внешние испытания воспроизводимости теста cobas® EGFR Test проводились в трех центрах (по 2 оператора в каждом), с 3 сериями набора реагентов, в течение 5 непоследовательных дней, с помощью панели из 13 образцов ДНК, выделенных из срезов FFPE NSCLC дикого типа (WT) и мутантных (MT). Образцы панели содержали мутацию L858R в экзоне 21 и пять разных делеций в экзоне 19. Из 92 постановок 90 (97.8 %) были валидными. Всего 2340 тестов было выполнено для 13 образцов панели в 90 валидных постановках; все результаты тестов в этих постановках были валидными. Результат “No Mutation Detected” был получен в 180 валидных тестах образцов WT панели, обеспечив 100 % совпадений. Частота совпадений составила 100 % для 10 из 12 образцов MT панели. Для образца панели EX19_2240_2257del18 – 5 % мутаций, частота совпадений составила 62.8 % (в 67 из 180 тестов был получен результат Mutation Not Detected). Для образца панели EX19_2240_2257del18 – 10 % мутаций, частота совпадений составила 99.4 % (в 1 из 180 тестов был получен результат Mutation Not Detected). Данные по средней частоте совпадений представлены в Таблице 11.

Коэффициент вариации (CV) составил < 6 % для всех мутантных образцов панели. Для каждого отдельного образца панели величина CV была < 3.5 %. Для внешнего контроля средняя величина CV была < 1.3 %. Величина CV% была < 0.5 % при сравнении между сериями набора реагентов и < 1.2 % для каждой серии.

Таблица 11 Средние показатели величины совпадения результатов для каждого образца панели при исследовании воспроизводимости 1 теста cobas® EGFR Test v2

Образец панели	Число валидных тестов	Совпадение (N)	% совпадения (95% CI) ^a
Дикий тип	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2235_2249del15 – 5% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2235_2249del15 – ≤10% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2236_2250del15 – 5% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2236_2250del15 – ≤10% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2239_2248>C – 5% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2239_2248>C – ≤10% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2240_2254del15 – 5% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2240_2254del15 – ≤10% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX19_2240_2257del18 – 5% мутации	180	113	62.8 (55.3, 69.9)*
EX19_2240_2257del18 – ≤10% мутации	180	179	99.4 (96.9, 100.0)*
EX21_2573T>G=L858R – 5% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)
EX21_2573T>G=L858R – ≤10% мутации	180	180	100 (98.0, 100.0)

Примечание: Результаты считались совпадающими, когда мутантный образец панели давал валидный результат (“Mutation Detected”) или образец панели дикого типа давал валидный результат «мутация не выявлена».

^a 95 % CI = 95 % точный биномиальный доверительный интервал.

* Аналитическая чувствительность теста cobas® EGFR Test при детекции данной мутации составляет более 10 % доли мутации при внесении в реакции стандартного количества ДНК, 50 нг в лунку.

Анализ клинической воспроизводимости 2

Внешние испытания воспроизводимости теста **cobas**[®] EGFR Test проводились в трех центрах (в 2 внешних и 1 внутреннем, по 2 оператора в каждом), с 3 сериями набора реагентов, в течение 5 непоследовательных дней, с помощью панели из 11 образцов ДНК, выделенных из срезов FFPET NSCLC дикого типа (WT) и мутантных (MT). Образцы панели содержали мутацию G719X в экзоне 18, замену T790M в экзоне 20, замену S768I в экзоне 20, вставку в экзоне 20, и замену L861Q в экзоне 21. Из 91 постановки 90 (98.9 %) были валидными. Всего 1980 тестов было выполнено для 11 образцов панели в 90 валидных постановках; все результаты тестов в этих постановках были валидными. Результат выявления мутаций отсутствовал во всех 180 валидных тестах образцов панели WT, обеспечив 100 % совпадений. Частота совпадения, равная 100%, была отмечена для всех мутантных образцов панели, за исключением инсерции в экзоне 20 панели LOD. Обобщенные результаты оценки совпадений приведены в Таблице 12. Значение коэффициента вариации (CV) составило < 9.2% для всех мутантных образцов панели. Для внешнего контроля общая величина CV составила ≤ 1.3%. Величина CV при сравнении между сериями набора реагентов составила ≤ 0.6% и ≤ 1.1% при сравнении для одного набора реагентов.

Таблица 12Средние показатели величины совпадения результатов для каждого образца панели при исследовании воспроизводимости 2 теста **cobas**[®] EGFR Test v2

Образец панели	Число валидных тестов	Совпадение (N)	% совпадения(95% CI)*
Дикий тип	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 18 G719X - LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 20 T790M - LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 20 S768I - LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 20 Insertion - LOD	180	166	92.2 (87.3, 95.7)
Exon 21 L861Q - LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 18 G719X - 2X LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 20 T790M - 2X LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 20 S768I - 2X LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 20 Insertion - 2X LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)
Exon 21 L861Q - 2X LOD	180	180	100 (98.0, 100.0)

Примечание: Результаты считались совпадающими, когда мутантный образец панели давал валидный результат при выявлении мутации или образец дикого типа давал валидный результат NMD.

^a 95 % CI = 95 % точный биномиальный доверительный интервал.

* 95% CI = 95% exact binomial confidence interval.

CI = доверительный интервал; LOD = предел детекции; NMD = мутации не выявлены

Корреляция с референсным методом при тестировании образцов из фазы III исследования EURTAC

Клинические испытания теста **cobas**[®] EGFR Test проводили путем сравнения полученных результатов с результатами двух референсных методов – секвенирования в двух направлениях по Сенгеру и количественного секвенирования нового поколения (NGS) с использованием 487 фиксированных в формалине парафиновых образцов опухолевой ткани легких от пациентов с поздней стадией NSCLC, проходивших скрининг в ходе фазы III исследования EURTAC (эрлотиниб vs. химиотерапии цисплатином).^{6, 18} Клинические и демографические характеристики пациентов, доступных для ретроспективного тестирования, были сопоставимы с таковыми у остальных пациентов (557), образцы которых не были доступны для ретроспективного тестирования.

Всего 1276 пациентов проходили скрининг перед включением в исследование EURTAC с использованием лабораторных тестов (тест клинического исследования, CTA). После исключения пациентов, неподлежащих участию и не имеющих результатов CTA, 1044 пациента потенциально подлежали включению в исследование.

Среди этих 1044 пациентов 225 имели мутации по данным тестирования CTA, 792 относились к дикому типу по данным тестирования CTA, и 27 имели неопределенные результаты тестирования CTA. Из 1044 пациентов, образцы от 487 пациентов были доступны для повторного тестирования в **cobas**[®] EGFR Test.

Все 487 образцы тестировали вслепую в тесте **cobas**[®] EGFR Test и методом секвенирования по Сенгеру. Из этих образцов 406 дали валидные результаты в тесте **cobas**[®] EGFR Test и при секвенировании по Сенгеру, 38 невалидных результатов было получено в тесте **cobas**[®] EGFR Test и при секвенировании по Сенгеру, 38 невалидных результатов – только при секвенировании, и 5 невалидных результатов – только в тесте **cobas**[®] EGFR Test. Из 487 образцов, доступных для повторного тестирования набором **cobas**[®] EGFR Test, 444 образца дали валидный результат в тесте **cobas**[®] EGFR Test и также были тестированы методом NGS. Из них невалидный результат в NGS был получен для 36 образцов; таким образом, 408 дали валидный результат в тесте **cobas**[®] EGFR Test и в NGS. Аналитическую точность теста **cobas**[®] EGFR Test в сравнении с каждым референсным методом оценивали, рассчитывая процент совпадения положительных результатов (PPA), процент совпадения отрицательных результатов (NPA) и общий процент совпадения результатов (OPA), а также соответствующие 95 % доверительные интервалы (95 % CI) для делеций в экзоне 19 и мутации L858R совместно и отдельно.

В когорте EURTAC тест **cobas**[®] EGFR Test выявил следующие делеции в экзоне 19 и экзоне 21 гена EGFR (Таблица 13).

Для выявленных в когорте EURTAC мутаций, аналитическая чувствительность была определена для мутаций, приведенных в Таблице 13.

Таблица 13 Мутации, выявленные в когорте EURTAC с помощью теста **cobas**[®] EGFR Test

Экзон	Мутантная последовательность	AA замена	ID космиды
19	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2239_2256del18	L747_S752delLREATS	6255
	2240_2254del15	L747_T751delLREAT	12369
	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
	2239_2248>C	L747_A750>P	12382
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2253>TTGCT	E746_T751>VA	12416
	2237_2257>TCT	E746_P753>VS	18427
	2238_2252del15	L747_T751delLREAT	23571
	2236_2252>AT	E746_T751>I	26680
	2239_2253>CAA	L747_T751>Q	51527
	2234_2251>AAT	K745_T751>K	Not Found
	2236_2244del9	E746_R748>E	Not Found
	2236_2263>GAAGCAT	E746_A755>E	Not Found
	2237_2251>AAC	E746_751T>E	Not Found
	2239_2257>GT	L747_P753>V	Not Found
21	2573 T>G	L858R	6224

Всего 406 образца с валидными результатами теста cobas® EGFR Test и секвенирования по Сенгеру были включены в анализ совпадений. Величина PPA между тестом cobas® EGFR Test и секвенированием по Сенгеру составила 96.6 % (95 % CI: 91.5 % - 98.7 %), величина NPA составила 88.3 % (95 % CI: 84.1 % - 91.5 %) при тестировании делеций в экзоне 19 и замены L858R, как показано в Таблице 14. Величина OPA составила 90.6 %, с нижним пределом 95 % CI выше 87 %. Величины PPA, NPA и OPA при детекции делеций в экзоне 19 составили > 92%. Значения PPA, NPA и OPA при детекции замены L858R составили > 95%.

Таблица 14 Сравнение теста cobas® EGFR Test с секвенированием по Сенгеру при выявлении делеций в экзоне 19 и замены L858R EGFR

Мутация	Параметр согласованности	Процент совпадения (N)	95% CI
Делеция в экзоне 19	Процент положительного совпадения (PPA)	97.3% (71/73)	90.5%, 99.2%
	Процент отрицательного совпадения (NPA)	92.5% (308/333)	89.2%, 94.9%
	Общий процент совпадения (OPA)	93.3% (379/406)	90.5%, 95.4%
L858R	Процент положительного совпадения (PPA)	95.3% (41/43)	84.5%, 98.7%
	Процент отрицательного совпадения (NPA)	97.5% (354/363)	95.4%, 98.7%
	Общий процент совпадения (OPA)	97.3% (395/406)	95.2%, 98.5%
Всего	Процент положительного совпадения (PPA)	96.6% (112/116)	91.5%, 98.7%
	Процент отрицательного совпадения (NPA)	88.3% (256/290)	84.1%, 91.5%
	Общий процент совпадения (OPA)	90.6% (368/406)	87.4%, 93.1%

Всего 408 образца с валидными результатами теста cobas® EGFR и NGS были включены в анализ совпадений. Величины PPA и NPA между тестом cobas® EGFR Test и NGS при выявлении делеций и замены L858R в экзоне 19 составили 94.0 % (95 % CI: 89.1 % - 96.8 %) и 97.7 % (95 % CI: 95.0 % - 98.9 %), соответственно, как указано в Таблице 15. Величина OPA составила 96.3 %, с нижним пределом 95 % CI, равным 94.0 %. Значения PPA, NPA и OPA при детекции делеций в экзоне 19 составили >95%, при величинах нижнего предела 95% CI > 90%. Значения PPA, NPA и OPA при детекции замены L858R также составили >95%, при величинах нижнего предела 95% CI ≥ 95%, за исключением PPA (90%), как следствие небольшого числа случаев выявления мутации L858R.

Таблица 15 Сравнение теста cobas® EGFR Test с NGS при выявлении делеций в экзоне 19 и замены L858R EGFR

Мутация	Параметр согласованности	Процент совпадения (N)	95% CI
Делеция в экзоне 19	Процент положительного совпадения (PPA)	95.9% (94/98)	90.0%, 98.4%
	Процент отрицательного совпадения (NPA)	99.7% (309/310)	98.2%, 99.9%
	Общий процент совпадения (OPA)	98.8% (403/408)	97.2%, 99.5%
L858R	Процент положительного совпадения (PPA)	90.6% (48/53)	79.7%, 95.9%
	Процент отрицательного совпадения (NPA)	98.6% (350/355)	96.7%, 99.4%
	Общий процент совпадения (OPA)	97.5% (398/408)	95.5%, 98.7%
Всего	Процент положительного совпадения (PPA)	94.0% (142/151)	89.1%, 96.8%
	Процент отрицательного совпадения (NPA)	97.7% (251/257)	95.0%, 98.9%
	Общий процент совпадения (OPA)	96.3% (393/408)	94.0%, 97.8%

Корреляция с референсным методом при тестировании образцов из фазы II исследования AURA2

Клинические испытания теста cobas® EGFR Test проводили путем сравнения полученных результатов с результатами валидированной платформы секвенирования нового поколения (NGS) с использованием 383 фиксированных в формалине парафиновых блоков опухолевой ткани легких от пациентов с поздней стадией NSCLC, проходивших скрининг в ходе фазы III исследования AURA2 препарата TAGRISSO™.

Всего 472 пациента прошли тестирование в исследовании AURA2 с помощью теста cobas® EGFR Test. После исключения не соответствующих критериям включения пациентов, 383 пациента могли быть включены в данное исследование.

Все 383 образца тестировали вслепую двумя методами – cobas® EGFR Test и валидированным методом NGS. Из них 368 дали валидные результаты в обоих тестах cobas® EGFR Test и NGS. Всего 2 невалидных результата были получены в обоих тестах cobas® EGFR Test и NGS, 2 невалидных результата только в тесте NGS, и 11 невалидных результатов только в тесте cobas® EGFR Test. Аналитическую точность теста cobas® EGFR Test в сравнении с референсным методом (NGS) при детекции замены T790M определяли методом расчета процента положительного совпадения (PPA), процента отрицательного совпадения (NPA), и общего процента совпадения (OPA), а также соответствующих значений 95% CI для мутации T790M.

В исследовании AURA2 тест cobas® EGFR Test позволил выявить мутации в гене EGFR, приведенные в Таблице 16. Для выявленных в когорте AURA 2 мутаций , аналитическая чувствительность была определена для мутаций, приведенных в Таблице 6.

Таблица 16 Мутации, выявленные в тесте cobas® EGFR Test в когорте AURA 2

Экзон	Мутантная последовательность	AA замена	ID космиды
18	2156G>C	G719A	6239
	2155G>A	G719S	6252
	2155G>T	G719C	6253
19	2239_2247delTTAAGAGAA	L747_E749delLRE	6218
	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2239_2256del18	L747_S752delLREATS	6255
	2240_2254del15	L747_T751delLREAT	12369
	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
	2239_2248>C	L747_A750>P	12382
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2251del15	E746_T751>A	12678
	2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	13550
	2235_2252>AAT	E746_T751>I	13551
	2253_2276del24	S752_I759delSPKANKEI	13556
	2237_2257>TCT	E746_P753>VS	18427
20	2369C>T	T790M	6240
	2303G>T	S768I	6241
21	2573T>G	L858R	6224
	2573_2574TG>GT	L858R	12429
	2582T>A	L861Q	6213

Всего 368 образцов, давших валидные результаты в тестах **cobas**[®] EGFR Test и NGS, были включены в анализ согласованности. Величина PPA между тестом **cobas**[®] EGFR Test и NGS составила 88.3% (95% CI: 83.8% - 91.7%), величина NPA составила 97.3% (95% CI: 92.4% - 99.1%), величина OPA составила 91.0% (95% CI: 87.7% - 93.5%) при детекции замены T790M (Таблица 17). Тридцать образцов были позитивными в тесте NGS, но отрицательны в тесте **cobas**[®] EGFR Test: в 11/30 образцов доля мутации T790M, определенная методом NGS, была ниже LoD (< 2% мутации) теста **cobas**[®] EGFR Test. В 19/30 образцах задержка при достижении IC пороговой величины Ct указывает на низкое качество образца ДНК.

Таблица 17 Сравнение теста **cobas**[®] EGFR Test с NGS при выявлении мутации EGFR T790M

Параметр согласованности	Процент совпадения (N)	95% CI
Процент положительного совпадения (PPA)	88.3% (226/256)	83.8%, 91.7%
Процент отрицательного совпадения (NPA)	97.3% (109/112)	92.4%, 99.1%
Общий процент совпадения (OPA)	91.0% (335/368)	87.7%, 93.5%

Данные клинических исходов

EURTAC

Исследование EURTAC представляет собой мультицентровое, открытое рандомизированное исследование фазы III препарата TARCEVA[®] (эрлотиниб) в сравнении со стандартной химиотерапией в качестве препарата первой линии для не получавших ранее химиотерапию пациентов с NSCLC, имеющих делеции в экзоне 19 или замены в экзоне 21 (L858R), выявленные при клиническом тестировании (СТА). Исследование было выполнено при финансовой поддержке Испанской группы по изучению рака легких (SLCG). Всего в исследование было включено 174 пациента. Результаты исследования показали, что пациенты, получавшие TARCEVA[®], имели статистически значимые более высокие показатели выживаемости без прогрессирования (PFS) (среднее PFS 10.4 месяцев против 5.1 месяцев) по сравнению с пациентами, получавшими химиотерапию, соотношение рисков составило 0.34 (p < 0.0001, 95 % CI [0.21; 0.54]). Частота ответа на терапию в группе TARCEVA[®] была выше по сравнению с частотой ответа в группе пациентов, получавших химиотерапию (65.1 % против 16.1 %). Отсутствовали значимые различия по величине средней выживаемости (OS) между двумя группами пациентов, так как 76 % пациентов со стандартной химиотерапии перешли на терапию TARCEVA[®].

Из 174 пациентов, включенных в исследование EURTAC, образцы 134 пациентов (77 % исследуемой когорты, включая 69 пациентов в группе получавших эрлотиниб и 65 пациентов в группе получавших химиотерапию) были доступны для повторного тестирования и были проанализированы ретроспективно в тесте **cobas**[®] EGFR Test. Из этих 134 образцов, тестированных в **cobas**[®] EGFR Test, 116 образцов (от 59 пациентов, получавших эрлотиниб и 57 пациентов, получавших химиотерапию) дали результат “Mutation Detected” в тесте **cobas**[®] EGFR Test. Анализ данных для этих 116 пациентов продемонстрировал, что получавшие TARCEVA[®] пациенты имели значительное увеличение времени PFS (среднее PFS 10.4 vs. 5.4 месяцев) и меньшую вероятность прогрессирования заболевания и смерти (HR= 0.34, 95 % CI [0.21;0.54], p < 0.0001) по сравнению с получавшими химиотерапию пациентами (Рисунок 3). Частота ответа на терапию в группе получавших TARCEVA[®] пациентов была выше по сравнению с группой получавших химиотерапию (59.3 % против 14.0 %). Отсутствовали значимые различия по величине средней выживаемости (OS) между двумя группами пациентов. Выявленное клиническое преимущество в группе пациентов, тестированных с помощью **cobas**[®] EGFR Test было сопоставимо с наблюдавшимся в общей исследованной когорте (Таблица 18).

Дополнительный анализ эффективности был проведен для пациентов, позитивных в тесте **cobas**[®] EGFR Test, но давших отрицательный или невалидный результат при тестировании СТА. При наихудшем сценарии (соотношение рисков равно 1 для пациентов, позитивных в тесте **cobas**[®] EGFR Test и негативных в СТА), величина соотношения рисков составила 0.42 (95 % CI [0.26; 0.57]).

Рисунок 3 График выживаемости Каплан-Мейера для PFS в зависимости от терапии для пациентов с мутациями, выявленными в тесте cobas® EGFR Test

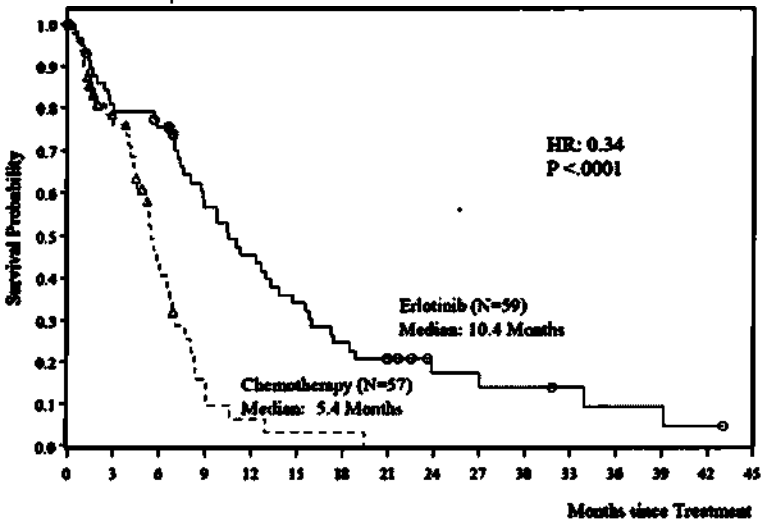


Таблица 18 Клиническое преимущество для пациентов, тестируемых в cobas® EGFR Test, сопоставимое с наблюдавшимся в когорте EURTAC

Параметр	cobas® EGFR Test - позитивная группа n = 116		EURTAC n = 173*	
	Химиотерапия n = 57	Эрлотиниб n = 59	Химиотерапия n = 87	Эрлотиниб n = 86
PFS				
Медиана (месяцы)	5.4	10.4	5.1	10.4
Соотношение рисков	0.34		0.34	
95% CI соотношения рисков	[0.21; 0.54]		[0.23; 0.49]	
P-значение (логранговый критерий)	<0.0001		<0.0001	

* один пациент отозвал согласие после завершения исследования EURTAC, в результате количество участников составило n = 173

AURA2

AURA2 представляет собой мультицентровое открытое исследование фазы II, по оценке безопасности и эффективности препарата TAGRISSO™ в качестве терапии второй или третьей линии для пациентов с поздними стадиями NSCLC, у которых произошло прогрессирование после предшествующей терапии одобренным препаратом EGFR TKI. Все пациенты для включения в исследование должны были иметь мутацию T790M по результатам теста cobas® EGFR Test. Первичной оценкой эффективности являлась частота объективного ответа (ORR) в соответствии с RECIST 1.1 по результатам слепой оценки независимой центральной группы (BICR) по стандартному ряду критериев. Величину ORR (%) определяли как число пациентов, имевших как минимум при 1 визите полный ответ (CR) или частичный ответ (PR), подтвержденный как минимум через 4 недели (то есть лучший объективный ответ [BOR] при CR или PR).

Из 472 пациентов, обследованных для включения в исследование AURA2, 383 пациентов могли пройти тестирование в cobas® EGFR Test. Из них 233 T790M+ пациентов были включены в исследование AURA2, и 210 пациентов были включены и получали препарат TAGRISSO™ (полный анализ, FAS).

Ниже в Таблице 19 представлены значения ORR по данным BICR и обследования в ходе AURA2. Из 210 пациентов, получавших хотя бы одну дозу TAGRISSO™ (FAS), 128 дали подтвержденный ответ на терапию по данным BICR при величине ORR, равной 61.0% (95% CI: 54.0% - 67.6%), и 135 пациентов дали ответ по данным обследования в ходе AURA2 при величине ORR равной 64.3% (95% CI: 57.4% - 70.8%).

Все 383 пациента, соответствующие критериям включения в исследование AURA2, были повторно тестированы тестом **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2. Из 233 T790M положительных пациентов, включенных в исследование AURA 2, 225 были T790M+ в тесте **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2 и 204 были включены в FAS.

Из 204 пациентов, получавших TAGRISSO™ (FAS), 127 имели подтвержденный BICR ответ при величине ORR 62.3% (95% CI: 55.2% - 68.9%), и 133 пациента имели ответ по данным обследования в ходе AURA2 с величиной ORR, равной 65.2% (95% CI: 58.2% - 71.7%).

Таблица 19 Клинические преимущества T790M+ пациентов, тестирувавшихся в тесте **cobas**[®] EGFR Test в исследовании AURA2

		AURA2			cobas [®] EGFR Test (IVD) T790M позитивные		
Тип анализа	Assessed by	N	Число подтвержденных случаев ответа	ORR (95% CI)	N	Число подтвержденных случаев ответа	ORR (95% CI)
Полный анализ (FAS)	Вслепую, независимая центральная группа	210	128	61.0% (54.0%, 67.6%)	204	127	62.3% (55.2%, 68.9%)
	Исследователи		135	64.3% (57.4%, 70.8%)		133	65.2% (58.2%, 71.7%)

Раздел В: Работа с образцами плазмы

Пробоподготовка

Для выделения свободной циркулирующей ДНК (сцДНК) образцы плазмы обрабатывают набором cobas® cfDNA Sample Preparation Kit, ручным методом пробоподготовки, основанным на связывании нуклеиновых кислот со стекляннм волокном. Два миллилитра (мл) плазмы обрабатывают протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером, которые обеспечивают разрушение ДНКаз для защиты освободившейся сцДНК. Далее в лизирующую смесь вносится изопропанол, и смесь центрифугируется через колонку с фильтром из стекляннго волокна. Во время центрифугирования сцДНК связывается с поверхностью стекляннго волокна фильтра. Не связавшиеся вещества, такие как соли, белки и прочие компоненты удаляются при центрифугировании. Связавшиеся нуклеиновые кислоты промываются и затем растворяются в водном растворе. ДНК мишени затем подвергается амплификации и детекции в анализаторе cobas z 480 с помощью реагентов набора cobas® EGFR Test.

Материалы и реагенты

Предоставляемые материалы и реагенты

Набор/Кассеты	Компоненты и состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения*
Набор для пробоподготовки cobas® cfDNA Sample Preparation Kit 24 теста (P/N: 07247737190)	PK (протеиназа К) (P/N: 05860695102) Протеиназа К, лиофилизованная	2 x 100 мг	   Опасно H302 + H332: Ядовито при проглатывании или вдыхании. H315: Вызывает раздражение кожи. H317: Может вызывать аллергическую реакцию на коже. H318: Вызывает серьезное поражение глаз. H334: Может вызывать аллергические или астматические симптомы или затруднение дыхания при вдыхании. H335: Может вызывать раздражение дыхательных путей. P261: Не допускайте вдыхание пыли/дыма/газа/пара/спрея. P280: Работать в перчатках/защите для глаз/лица. P284 Работать в респираторе. P305+P351+P338+P310: при попадании в глаза: Тщательно промыть водой в течение нескольких минут. При наличии контактных линз выньте их. Продолжите промывать. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу P342 + P311: При респираторных симптомах: Обратитесь в токсикологический центр или к врачу. P362 + P364: Снимите загрязненную одежду, постирайте перед повторным использованием.
	DNA PBB (связывающий парафин ^b буфер) (P/N: 05517621001) Трис-НСl буфер 49.6% гидрохлорид гуанидина 0.05% мочевины 17.3% Тритон X-100	8 x 10 мл	
	WB I (промывочный буфер I) (P/N: 05517656001) Трис-НСl буфер 64% гидрохлорид гуанидина	1 x 25 мл	
	WB II (промывочный буфер II) (P/N: 05517664001) Трис-НСl буфер Хлорид натрия	1 x 12.5 мл	
	DNA EB (Буфер для элюции ДНК) (P/N: 05517630001) Трис-НСl буфер 0.09% азид натрия	1 x 6 мл	
	HPEA FT High Pure Extension Assembly Unit) (фильтрующие пробирки с крышками) (P/N: 07323204102)	5 x 5 шт.	
	CT (пробирки для сбора) (P/N: 05880513001)	3 x 25 шт.	

Набор/Кассеты	Компоненты и состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения ¹
Набор cobas® EGFR Mutation Test v2 24 теста (P/N: 07248563190)	EGFR MMX-1 (EGFR мастермикс 1) (P/N 06471366001) Трис буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Твин 20 3.13% диметил сульфоксид 0.09% азид натрия <0.10% дНТФ <0.01% ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) <0.01% фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная) <0.01% аптамер <0.01% прямые и обратные праймеры EGFR <0.01% Меченные флуоресцентными красителями зонды EGFR	2 x 0.48 мл	Не применимо
	EGFR MMX-2 (EGFR мастермикс 2) (P/N 06471382001) Трис буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Твин 20 3.13% диметил сульфоксид 0.09% азид натрия <0.10% дНТФ <0.01% ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) <0.01% фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная) <0.01% аптамер <0.01% прямые и обратные праймеры EGFR <0.01% Меченные флуоресцентными красителями зонды EGFR	2 x 0.48 мл	Не применимо
	EGFR MMX-3 v2 (EGFR мастермикс 3) (P/N 07248610001) Трис буфер Хлорид калия Глицерин ЭДТА Твин 20 3.13% диметил сульфоксид 0.09% азид натрия <0.10% дНТФ <0.01% ДНК-полимераза Z05-AS1 (бактериальная) <0.01% фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная) <0.01% аптамер <0.01% прямые и обратные праймеры EGFR <0.01% Меченные флуоресцентными красителями зонды EGFR	2 x 0.48 мл	Не применимо

Набор/Кассеты	Компоненты и состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения ^а
Набор cobas[®] EGFR Mutation Test v2 24 теста (P/N: 07248563190)	MGAC (ацетат магния) (P/N 05854326001) Ацетат магния 0.09% азид натрия	6 x 0.2 мл	Не применимо
	EGFR MC (Мутантный контроль EGFR) (P/N 06471455001) Трис-буфер ЭДТА Поли-гА РНК (синтетическая) 0.05% азид натрия < 0.1% Плазмидная ДНК, содержащая последовательности экзонов 18, 19, 20 и 21 EGFR (микробная) < 0.1% ДНК EGFR дикого типа (клеточная линия)	6 x 0.1 мл	Не применимо
	DNA SD (Растворитель для образцов ДНК) (P/N 05854474001) Трис-HCl буфер 0.09% Азид натрия	2 x 3.5 мл	Не применимо

^а Маркировка безопасности продукта соответствует рекомендациям EU GHS

^б Связывающий парафин буфер используется для образцов плазмы.

Хранение реагентов и правила работы с ними

Реагент	Температура хранения	Продолжительность хранения
Набор cobas® cfDNA Sample Preparation Kit	15°C - 30°C	После открытия стабилен до 8 постановок в течение 30 дней или до истечения указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.
Набор cobas® EGFR Mutation Test v2*	2°C - 8°C	После открытия стабилен до 4 постановок в течение 90 дней или до истечения указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.

Примечание: За исключением реагента РК не замораживайте реагенты.

* EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 и рабочий MMX (приготовленный внесением MGAC в EGFR MMX-1 или EGFR MMX-2 или EGFR MMX-3 v2) необходимо защищать от длительного воздействия света. Рабочий MMX необходимо хранить при 2°C в темноте. Подготовленные образцы и контроли необходимо внести в течение 1 часа после приготовления рабочего MMX. Амплификацию необходимо начать не позднее 1 часа после внесения подготовленных образцов и контролей в рабочий MMX.

Необходимые дополнительные материалы

Материалы	P/N
Абсолютный этанол (для молекулярной биологии)	Sigma E7023 или Fisher Scientific BP2818-500 или эквивалент
Изопропанол (ACS, > 99.5%)	Sigma 190764 или Fisher Scientific A451-1 или эквивалент
Стерильная свободная от нуклеаз вода (для молекулярной биологии)	Любой поставщик
Хлорка	Любой поставщик
70% Этанол	Любой поставщик
Стерильные одноразовые серологические пипетки 5- и 25- мл	Любой поставщик
cobas® 4800 System микроплашка (AD-плашка) и заклеивающая пленка	Roche 05232724001
cobas® 4800 System аппликатор для заклеивающей пленки (поставляется при инсталляции системы cobas® 4800)	Roche 04900383001
Дозаторы с переменным объемом* (на 5-1000 мкл)	Любой поставщик
Свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером	Любой поставщик
Дозатор Pipet-Aid™*	Drummond 4-000-100 или эквивалент
Настольная центрифуга* (4000 x г при работе с пробирками 50 мл в бакет-роторе)	Eppendorf 5810 или эквивалент
Настольная микроцентрифуга* (до 20000 x г)	Eppendorf 5430 или 5430R или эквивалент
Стерильные пластиковые пробирки с коническим дном объемом 15 мл	Любой поставщик
Микроцентрифужные пробирки с защелкивающейся крышкой (объемом 1.5 мл, стерильные, свободные от нуклеаз, для ПЦР)	Любой поставщик
Штативы для микроцентрифужных пробирок и пробирок с коническим дном	Любой поставщик
Вортекс*	Любой поставщик
Одноразовые перчатки, без талька	Любой поставщик

* Эксплуатация всего оборудования должна осуществляться в соответствии с инструкциями производителя.

За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в Ваше региональное представительство Roche.

Необходимые приборы и программное обеспечение, но не предоставляются

Необходимые приборы и программное обеспечение, не предоставляются
Анализатор cobas z 480
Контрольный блок системы cobas® 4800 с программным обеспечением системы версии 2.1 или выше
Программа EGFR Plasma P2 Analysis Package Software версии 1.0 или выше
Сканнер штрих-кода с подключением USB
Принтер

За дополнительной информацией о приобретаемых отдельно материалах обратитесь в Ваше региональное представительство Roche.

Меры предосторожности и правила работы

Меры предосторожности

Как и при выполнении любого теста, соблюдение правил надлежащей лабораторной практики является условием качественного выполнения данного теста.

- Только для диагностики *in vitro*.
- Сведения о безопасности материалов (SDS) доступны по запросу в вашем региональном представительстве Roche.
- Данный тест предназначен для работы с образцами плазмы NSCLC. Все образцы нужно рассматривать как потенциально инфекционные и соблюдать при работе с ними правила биологической безопасности, приведенные в документах Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹² и CLSI Document M29-A4.¹³
- **DNA PBВ** содержит Triton X-100, способный вызывать раздражение слизистых. Не допускайте попадание в глаза, на кожу и слизистые.
- Рекомендуется использовать стерильные одноразовые пипетки и свободные от нуклеаз наконечники.

Надлежащая лабораторная практика

- Не пипетируйте ртом.
- Не есть, не пить и не курить в рабочих лабораторных помещениях.
- Тщательно мойте руки после работы с образцами и компонентами набора.
- При работе с любыми реагентами пользуйтесь одноразовыми перчатками, лабораторными халатами и защитой для глаз. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами и слизистой. В случае такого контакта немедленно смойте большим количеством воды, в противном случае могут возникнуть ожоги. Разлитые реагенты смойте водой и вытрите насухо.
- Тщательно очищайте и дезинфицируйте все рабочие поверхности свежеприготовленным 0.5 % раствором гипохлорита натрия в дистиллированной или деионизированной воде (разведите бытовую хлорку 1:10). Затем протрите поверхности 70 % этанолом.

Примечание: Коммерческие хлорсодержащие средства содержат гипохлорит натрия в концентрации 5.25 %. При разведении 1:10 коммерческого хлорсодержащего средства получают раствор гипохлорита натрия с концентрацией 0.5 %.

Контаминации

- Для предотвращения контаминации необходимо работать в перчатках и менять их при работе с образцами и с реагентами cobas® EGFR Test. Не допускайте контаминацию перчаток при работе с образцами.
- Необходимо часто менять перчатки для снижения потенциального риска контаминации.
- Необходимо менять перчатки перед покиданием зоны выделения ДНК или при любом подозрении на контакт с раствором или образцом.
- Не допускайте контаминации реагентов микроорганизмами и нуклеазами.
- Рабочую зону для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед приготовлением рабочего мастер-микса. Отдельные расходные материалы и оборудование должны быть предназначены для каждого вида работ, и не должны перемещаться из одной зоны в другую. Например, дозаторы и расходные материалы для выделения ДНК не должны использоваться для подготовки реагентов для амплификации и детекции.
- Рекомендуется организовать работу в одном направлении, так, чтобы один вид работы сменялся другим. Например, необходимо закончить выделение ДНК перед тем как приступить к амплификации и детекции. Выделение ДНК и амплификацию необходимо проводить в отдельных помещениях. Для предотвращения контаминации рабочего мастер-микса образцами, рабочую зону для амплификации необходимо тщательно очистить перед приготовлением мастер-микса.

Целостность

- Не используйте наборы после истечения срока годности.
- Не объединяйте реагенты из разных наборов или серий наборов.
- Не используйте расходные материалы после истечения их срока годности.
- Все расходные материалы предназначены для однократного применения.
- Все оборудование необходимо обслуживать в соответствии с инструкциями производителя.

Утилизация отходов

- **DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC и DNA SD** содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб, образуя взрывоопасные азиды металлов. Выливая содержащие азид натрия растворы в лабораторную раковину, смывайте большим объемом воды для предотвращения образования азидов.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с государственными, федеральными и местными правилами.

Очистка и дезинфекция

- **DNA PBB и WB I** содержат гуанидин гидрохлорид. При разливе жидкостей, содержащий данный реагент, проведите очистку подходящим лабораторным детергентом и затем водой. При разливе потенциально инфекционного материала, очистите поверхность сначала лабораторным детергентом и водой, и затем 0.5% раствором гипохлорита натрия.
- Если разлив произошел в приборе cobas® 4800, при очистке следуйте инструкциям, приведенным в Руководстве пользователя системы cobas® 4800.

- Не используйте раствор гипохлорита натрия (бытового моющего средства) для очистки анализатора cobas z 480. Проводите очистку анализатора cobas z 480 в соответствии с Руководством пользователя системы cobas® 4800.
- Дополнительные меры предосторожности, безопасности и процедуры для снижения риска контаминации при работе с анализатором cobas z 480 приведены в Руководстве пользователя анализатора cobas z 480.

Сбор, транспортировка и хранение образцов

Примечание: Работайте со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами.

Сбор образцов

Набор cobas® cfDNA Sample Preparation Kit предназначен для работы с образцами плазмы K2 EDTA. Плазму необходимо отделить от крови в течение 4 часов после забора крови и хранить до тестирования при температуре, указанной ниже.

Транспортировка, хранение и стабильность образцов

Образцы плазмы можно транспортировать замороженными. Транспортировка образцов плазмы должна соответствовать региональным, федеральным и государственным правилам перевозки этиологических агентов.¹⁴

Образцы плазмы стабильны при следующих условиях:

Температура хранения образцов плазмы	$\leq -70^{\circ}\text{C}$	$2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$
Продолжительность хранения	До 12 месяцев	До 3 дней

Хранение и стабильность обработанных образцов

Обработанные образцы (выделенная ДНК) стабильны:

Температура хранения выделенной ДНК	$-15^{\circ}\text{C} - -25^{\circ}\text{C}$	$2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$	$15^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$
Продолжительность хранения	до 2 цикла оттаивания/замораживания в течение 60 дней	До 21 дня	До 7 дней

Выделенная ДНК должна быть использована для тестирования в течение указанных периодов хранения или до истечения срока годности набора cobas® cfDNA Sample Preparation Kit, использованного для ее выделения, в зависимости от того, что наступит раньше.

Перед началом работы с неразведенными образцами выделенной ДНК, после хранения перемешайте на вортексе и осадите содержимое со стенок и крышки пробирки в центрифуге.

Процедура теста

Постановка теста

Рисунок 4 Схема постановки теста **cobas**[®] EGFR Test при пробоподготовке с тестом **cobas**[®] cfDNA Sample Preparation kit

1	Включите систему
2	Запустите обслуживание прибора
3	Выньте образцы и реагенты из хранения
4	Подготовьте образцы к выделению на колонках
5	Выполните выделение ДНК
6	Растворите ДНК
7	Создайте рабочее назначение и распечатайте схему плашки
8	Приготовьте реагенты для амплификации
9	Внесите в микроплашку реагенты для амплификации
10	Внесите в микроплашку образцы
11	Заклейте микроплашку
12	Загрузите микроплашку в анализатор cobas z 480
13	Запустите постановку
14	Просмотрите результаты
15	С ЛИС: отправьте результаты в ЛИС
16	Выгрузите анализатор

Инструкция по работе с набором

Примечание: Для теста **cobas**[®] EGFR Test используются только образцы плазмы K2 EDTA.

Примечание: Подробные инструкции по работе с анализатором **cobas z 480** приведены в Руководстве пользователя анализатора **cobas z 480**.

Объем постановки

Одна постановка может включать от 1 до 30 образцов (плюс контроли) в 96-луночной микроплашке. При постановке более 24 образцов необходимо использовать более одного набора реагентов **cobas**[®] EGFR Test.

Набор **cobas**[®] EGFR Test содержит количество реагентов, достаточное для 8 постановок по 3 образца (плюс контроли), максимум 24 образца с одним набором.

Подготовка и хранение реагентов

До начала работы с набором реагентов в первый раз, приготовьте рабочие растворы реагентов, как описано ниже. Вносите воду с помощью серологических пипеток объемом 5 мл. Для внесения этанола используйте серологические пипетки объемом 25 мл. Если протеиназа К была ранее восстановлена и заморожена, разморозьте необходимое количество аликвот для обработки образцов.

Реагенты	Восстановление / Подготовка
Протеиназа К (PK)	Растворите протеиназу К (PK), добавив 4.5 мл стерильной (степень очистки для ПЦР) воды в пробирку с помощью стерильной одноразовой серологической пипетки объемом 5 мл. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Сделайте аликвоты растворенной PK по 1.1 мл в микроцентрифужных пробирках объемом 1.5 мл и храните при -20°C до 90 дней или до истечения срока годности набора. Если протеиназа К была растворена ранее и хранилась замороженной, разморозить необходимое количество аликвот (250 мкл растворенной PK необходимо для обработки одного образца).
Промывочный буфер I (WB I)	Приготовьте рабочий промывочный буфер WB I добавив 15 мл абсолютного этанола во флакон WB I. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер WB I при 15°C - 30°C до 90 дней или до истечения срока годности набора.
Промывочный буфер II (WB II)	Приготовьте рабочий промывочный буфер WB II добавив 50 мл абсолютного этанола во флакон WB II. Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Укажите на флаконе, что этанол внесен, и дату внесения. Храните рабочий буфер WB II при 15°C - 30°C до 90 дней или до истечения срока годности набора.

Все растворы, хранящиеся при 15 – 30 °C, должны быть прозрачными. Если в каком-либо реагенте присутствует преципитат, нагрейте реагент на водяной бане при 37 °C до полного растворения преципитата. Не используйте реагент, если осадок растворен не полностью.

Процедура выделения ДНК

1. Промаркируйте по одной конической пробирке объемом 15 мл для каждого образца плазмы и отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля можно использовать стерильную воду, и проводить его обработку так же, как и клинических образцов.
2. Перемешайте образцы плазмы на вортексе, затем перенесите 2 мл каждого образца плазмы или отрицательного контроля (стерильной воды) в соответствующие пробирки объемом 15 мл.

Примечание: Минимум 2 мл плазмы нужно для выделения набором cobas® cfDNA Sample Preparation Kit.

3. Внесите по 250 мкл PK в каждую пробирку.
4. Внесите по 2 мл DNA PBB в каждую пробирку.
5. Перемешайте пробирки с DNA PBB/PK переворачиванием 3 – 5 раз.
6. Инкубируйте пробирки при комнатной температуре (15 °C – 30 °C) в течение 30 минут.

Примечание: Во время инкубации подготовьте нужное число пробирок HPEA FT, промаркируйте крышку каждой пробирки HPEA FT.

Примечание: Для каждого образца потребуются одна пробирка HPEA FT, три пробирки (CT) и две пробирки для элюции (микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл).

Примечание: Во время инкубации промаркируйте необходимое число пробирок для элюции (микроцентрифужная пробирка объемом 1.5 мл).

7. Внесите по 500 мкл изопропанола и перемешайте лизат переворачиванием 3 - 5 раз.
8. Перенесите лизат в промаркированные HPEA FT.
9. С помощью настольной центрифуги с бакет-ротором центрифугируйте HPEA FT при 4000 x g в течение 5 минут.
10. После центрифугирования выньте HPEA FT из конических пробирок объемом 50 мл. Поместите HPEA FT в CT. Удалите большой фиксатор, выкрутив и выдернув его.
11. Удалите маленький фиксатор из-под крышки фильтровальной пробирки (FT), толкнув его вверх так,

чтобы пленка порвалась на обеих сторонах крышки, затем вытяните ее.

12. Выньте НРЕА из FT, опрокинув его со стороны крышки FT.
13. Выбросьте отходы из НРЕА FT в химические отходы и утилизируйте надлежащим образом.
14. Промаркируйте крышки FT пробирок.
15. Внесите по 500 мкл рабочего WB I в каждую FT.

Примечание: Приготовление рабочего раствора WB I описано в разделе Подготовка реагентов.

16. Для остальной части протокола используйте настольную микроцентрифугу.
17. Центрифугируйте FT/СТ при 8000 x g в течение 1 минуты.
18. Поместите каждую FT в новую СТ. Сбросьте содержимое всех пробирок СТ в химические отходы и утилизируйте старые СТ надлежащим образом.
19. Внесите по 500 мкл рабочего WB II в каждую FT.

Примечание: Приготовление рабочего раствора WB II описано в разделе Подготовка реагентов.

20. Центрифугируйте FT/СТ при 8000 x g в течение 1 минуты.
21. Центрифугируйте FT/СТ при 8000 x g в течение 1 минуты.
22. Поместите каждую FT в новую СТ. Сбросьте содержимое всех пробирок СТ в химические отходы и утилизируйте старые СТ надлежащим образом.
23. Центрифугируйте FT/СТ при 16000 x g – 20000 x g в течение 1 минуты, чтобы высушить фильтр мембраны.
24. Поместите FT в маркированные пробирки для элюции (свободные от нуклеаз микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл) и нанесите на пробирки метки ориентации. Сбросьте содержимое всех пробирок СТ в химические отходы и утилизируйте старые СТ надлежащим образом.
25. Внесите по 100 мкл DNA EB на центр мембраны FT, не касаясь ее.
26. Инкубируйте FT в пробирке для элюции при комнатной температуре (15 °C–30 °C) в течение 5 минут.
27. Поместите пробирки в центрифугу метками ориентации наружу. Центрифугируйте FT в пробирке для элюции при 8000 x g в течение 1 минуты, чтобы собрать элюат в пробирке для элюции (маркированная свободная от нуклеаз пробирка объемом 1.5 мл). Элюат представляет собой стоковый образец ДНК.
28. Выбросьте FT. Закройте крышки пробирок для элюции.
29. Осторожно отберите 80 мкл стокового раствора ДНК, не задевая осадок (он может быть невидимым). Перенесите отобранный стоковый раствор ДНК во вторую пробирку для элюции (свободную от РНКаз/ДНКаз микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл), промаркированную с указанием сведений об образце. Стоковые образцы ДНК готовы для проведения ПЦР после перемешивания на вортексе. Храните стоковые образцы ДНК в соответствии с инструкциями, приведенными в разделе **Транспортировка, хранение и стабильность образцов.**

Примечание: Если осадок оказался задетым, верните стоковый раствор ДНК в исходную пробирку для элюции, закройте пробирку, и, ориентируя ее в центрифуге меткой наружу, центрифугируйте при 8,000 x g в течение 1 минуты, чтобы собрать элюат. Повторите этап 28, чтобы отобрать 80 мкл стокового раствора ДНК.

Амплификация и детекция

Примечание: Чтобы не допустить контаминации рабочего мастер-микса образцами ДНК, амплификацию и детекцию необходимо проводить в зоне, отделенной от зоны выделения ДНК. Рабочую зону для амплификации и детекции необходимо тщательно очищать перед началом приготовления рабочего мастер-микса. Все поверхности, включая штативы и дозаторы, необходимо тщательно протереть 0.5 % раствором гипохлорита натрия, затем протереть 70 % этанолом. Коммерческие чистящие средства обычно содержат гипохлорит натрия в концентрации 5.25 %. Разведение 1:10 чистящего средства позволяет получить 0.5 % раствор гипохлорита натрия.

Подготовка прибора

Подробные инструкции по подготовке анализатора cobas z 480 приведены в Руководстве пользователя анализатора cobas z 480.

Создание назначения теста

Подробные инструкции по постановке теста EGFR приведены в Руководстве пользователя анализатора cobas z 480 системы cobas® 4800 и руководства пользователя программы cobas® EGFR Mutation Test v2.

Создайте схему плашки, указав позиции для всех образцов и контролей в постановке. Мутационный контроль размещают в плашке в позициях A01 – A03. Отрицательный контроль размещают в плашке в позициях B01 – B03. Разведенные клинические образцы вносят каждый в три столбца, начиная с позиций C01 – C03 заканчивая позициями H10 – H12, как показано на Рисунке 5.

Рисунок 5 Схема плашки для теста cobas® EGFR Test

Строка/ столбец	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3 v2	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3 v2	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3 v2	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3 v2
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3 v2	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3 v2	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3 v2	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3 v2
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3 v2	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3 v2	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3 v2	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3 v2
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3 v2	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3 v2	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3 v2	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3 v2
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3 v2	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3 v2	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3 v2	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3 v2
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3 v2	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3 v2	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3 v2	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3 v2
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3 v2	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3 v2	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3 v2	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3 v2
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3 v2	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3 v2	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3 v2	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3 v2

На схеме: MC= мутационный контроль, NEG = отрицательный контроль S# = ID образца, MMX # соответствует мастер-миксу 1, 2 или 3 v2.

Примечание: Каждый образец необходимо вносить в три последовательных столбца в один ряд, чтобы получить валидные результаты.

Примечание: Рабочий мастер-микс 1 необходимо вносить в столбцы 01, 04, 07 и 10 на плашке. Рабочий мастер-микс 2 необходимо вносить в столбцы 02, 05, 08 и 11 на плашке. Рабочий мастер-микс 3 v2 необходимо вносить в столбцы 03, 06, 09 и 12 на плашке.

Примечание: На одну плашку можно загрузить до 30 образцов. Если для постановки на плашке требуются реагенты более чем из одного набора, эти наборы должны быть все из одной серии.

07384351001-03RU

Doc. Rev. 3.0

Подготовка реакции

Приготовление рабочих мастер-миксов (MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2)

Примечание: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 и рабочие мастер-миксы MMX чувствительны к воздействию света, необходимо защищать их от продолжительного воздействия света.

Примечание: Вследствие вязкости миксов EGFR и рабочих MMX, раскатывайте медленно, чтобы весь объем смеси выходил из наконечника.

Примечание: EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 и EGFR MMX-3 v2 могут иметь светлый синий/пурпурный оттенок. Это не сказывается на рабочих характеристиках реагента.

В отдельных микроцентрифужных пробирках Safe-Lock™ объемом 1.5 мл приготовьте три смеси рабочих MMX, один с EGFR MMX-1, второй с EGFR MMX-2, и третий с EGFR MMX-3 v2.

Рассчитайте объемы EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 и EGFR MMX-3 v2 для приготовления рабочих MMX по следующей формуле:

Необходимый объем EGFR MMX-1 или EGFR MMX-2 или EGFR MMX-3 v2 = (число образцов + 2 контроля + 1) x 20 мкл

2. Рассчитайте необходимый объем MGAC для каждого MMX по следующей формуле:

Необходимый объем MGAC = (число образцов + 2 контроля + 1) x 5 мкл

С помощью Таблицы 20 определите объем каждого реагента, необходимый для получения рабочего MMX исходя из числа образцов в постановке.

Таблица 20 Объемы реагентов, необходимые для приготовления рабочих мастер-миксов MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2

		# образцов*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 мкл	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 мкл	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Конечный объем каждого рабочего мастер-микса MMX (мкл)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Объемы для # образцов рассчитаны исходя из суммы N образцов + 2 контроля + 1

- Возьмите необходимое число пробирок EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 и MGAC из хранения при 2°C - 8°C. Перемешайте на вортексе каждый реагент 5 секунд и осадите содержимое пробирок. Промаркируйте стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл для рабочего MMX-1, рабочего MMX-2 и рабочего MMX-3v2.
- Внесите рассчитанные объемы EGFR MMX-1 или EGFR MMX-2 или EGFR MMX-3 v2 в соответствующие пробирки для рабочих MMX.
- Внесите рассчитанный объем MGAC в пробирки с рабочими MMX.
- Перемешайте пробирки на вортексе 3- 5 секунд.

Примечание: Образцы и контроли необходимо внести в микроплашку (AD-плашку) не позднее чем через 1 час после подготовки рабочих мастер-миксов (MMX).

Примечание: Используйте только микроплашки cobas® 4800 System (AD-плашки) и заклеивающую пленку.

Подготовка плашки

Примечание: При использовании хранившихся стоковых растворов ДНК, следуйте инструкциям, приведенным в разделе **Транспортировка, хранение и стабильность образцов**.

1. Внесите по 25 мкл рабочего ММХ в каждую задействованную в постановке реакционную лунку микроплашки (AD-плашки). Не касайтесь наконечником плашки за пределами лунки.
 - Внесите рабочий ММХ-1 (содержащий **EGFR ММХ-1**) в лунки микроплашки (AD-плашки) в столбцы 01, 04, 07 и 10.
 - Внесите рабочий ММХ-2 (содержащий **EGFR ММХ-2**) в лунки микроплашки (AD-плашки) в столбцы 02, 05, 08, и 11.
 - Внесите рабочий ММХ-3 v2 (содержащий **EGFR ММХ-3 v2**) в лунки микроплашки (AD-плашки) в столбцы 03, 06, 09 и 12.

Внесите 25 мкл **EGFR MC** в лунки **A01, A02 и A03** микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз.

3. Используя новый наконечник, внесите 25 мкл **NEG** в лунки **B01, B02 и B03** микроплашки (AD-плашки); перемешайте пипетированием не менее двух раз.

Примечание: Каждая постановка должна включать в себя **EGFR MC** в лунках **A01, A02 и A03**, и **NEG CT** в лунках **B01, B02 и B03**, в противном случае анализатор cobas z 480 признает постановку невалидной.

Примечание: При необходимости меняйте перчатки для предотвращения перекрестной контаминации образцов.

4. Используя новый наконечник, внесите 25 мкл ДНК первого образца в лунки C01, C02 и C03 микроплашки (AD-плашки), меняйте наконечник для внесения каждого образца ДНК; перемешайте пипетированием не менее двух раз. Повторите процедуру для внесения каждого образца ДНК в соответствии со схемой на Рисунке 5 внесите все оставшиеся образцы ДНК в лунки микроплашки (AD-плашки). Убедитесь, что вся реакционная смесь находится на дне лунки.

Примечание: Перед началом работы с хранившимися стоковыми образцами ДНК перемешайте их на вортексе и осадите содержимое пробирок в центрифуге.

5. Заклейте микроплашку (AD-плашку) заклеивающей пленкой (поставляется вместе с плашками). Используйте аппликатор для пленки для гарантии полного приклеивания пленки к микроплашке.
6. Перед запуском ПЦР убедитесь, что в каждой лунке реакционная смесь находится на дне.

Примечание: Амплификацию и детекцию необходимо начать не позднее чем через 1 час после внесения первого образца ДНК в рабочий ММХ.

Запуск ПЦР

Подробные инструкции по проведению теста EGFR приведены в Инструкции пользователя cobas® EGFR. Когда откроется выпадающее окно “Select test”, выберите “EGFR Plasma P2” и нажмите кнопку “OK”.

Результаты

Интерпретация результатов

Примечание: Валидация постановки и результатов образцов выполняется программой cobas® 4800 Software.

Примечание: Валидная постановка может содержать как валидные, так и невалидные результаты отдельных образцов.

Интерпретация результатов для валидной постановки приведена в Таблице 21.

Таблица 13. Интерпретация результатов теста cobas® EGFRTest

Результат теста	Мутация	Интерпретация
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Может присутствовать более одной мутации)	Мутация выявлена в указанном участке EGFR.
No Mutation Detected (NMD)*	Не применимо	Мутация не выявлена в указанном участке EGFR.
Invalid	Не применимо	Для образца получен невалидный результат. Повторите тестирование образца, следуя инструкциям, приведенным ниже в разделе “Повторное тестирование образцов с невалидными результатами”.
Failed	Не применимо	Постановка не прошла из-за ошибки оборудования или программы. Обратитесь за технической поддержкой в Ваше представительство Roche.

* Результат Mutation Not Detected (Мутация не выявлена) не исключает присутствия мутации в участках гена EGFR, поскольку результат теста зависит от доли мутантной последовательности, присутствующей в образце, адекватности сбора образца, присутствия ингибиторов, количества ДНК в образце.

Повторное тестирование образцов с невалидными результатами

- В случае невалидной постановки оставшийся объем выделенной ДНК образцов недостаточен для повторения амплификации и детекции. Повторите для всех образцов полную процедуру теста, начиная с этапа выделения ДНК.
- Если постановка валидна, но результат образца не валиден, объем выделенной ДНК недостаточен для повторения амплификации и детекции. Повторите для невалидного образца полную процедуру теста, начиная с этапа выделения ДНК.

Контроль качества и валидность результатов

По одной серии мутантного контроля cobas® EGFR Test (EGFR MC) (лунки A01, A02 и A03) и одной серии отрицательного контроля (NEG) (лунки B01, B02 и B03) для рабочих мастер-миксов MMX-1, MMX-2 и MMX-3 v2 включают в каждую постановку объемом до 30 образцов. Постановка признается валидной, если в лунках с EGFR MC и в лунках с NEG получены валидные результаты. Если для мутантного контроля EGFR (EGFR MC) или отрицательного контроля (NEG) получен невалидный результат, вся постановка признается невалидной и требующей перестановки.

Мутантный контроль

Результат **EGFR MC** должен быть 'Valid'. Если результат контроля EGFR MC постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Отрицательный контроль

Результат **NEG** должен быть 'Valid'. Если результат NEG постоянно невалиден, обратитесь в Ваше представительство Roche за технической поддержкой.

Ограничения процедуры

1. Используйте тест только для указанных типов образцов. Тест **cobas**[®] EGFR Test валидирован для образцов плазмы K2 ЭДТА пациентов с NSCLC.
2. Тест **cobas**[®] EGFR Test валидирован только для работы с набором для пробоподготовки **cobas**[®] cfDNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 07247737190).
3. Детекция мутаций зависит от количества копий мутантной последовательности, присутствующей в образце, на ее эффективность могут оказывать влияние качество образца, количество выделенной ДНК и присутствие ингибирующих веществ.
4. Надежность полученных результатов зависит от адекватности фиксации образца, его транспортировки, хранения и обработки. Следуйте инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору, и в Руководстве пользователя **cobas**[®] EGFR Test.
5. Касание дна пробирки для элюции при раскапывании может привести к захвату осадка и негативно повлиять на результаты теста.
6. Добавление фермента AmpErase в мастермиксы **cobas**[®] EGFR обеспечивает избирательную амплификацию ДНК мишени; однако для предотвращения контаминации реагентов необходимо соблюдение правил надлежащей лабораторной практики и точное следование инструкциям, приведенным в данном вкладыше к набору.
7. С данным продуктом может работать только персонал, обученный методу ПЦР и работе с системой **cobas**[®] 4800.
8. Только анализатор **cobas z 480** валидирован для работы с данным продуктом. Другие термоциклеры с оптической детекцией в режиме реального времени не могут применяться с данным продуктом.
9. Вследствие естественных различий между технологиями, пользователю рекомендуется, прежде чем заменить одну технологию на другую, провести корреляционные испытания для двух методов для оценки возможных различий между технологиями.
10. Присутствие ингибиторов ПЦР может приводить к получению ложноотрицательных или невалидных результатов.
11. Мутации и варианты в участках гена EGFR, перекрываемых праймерами или зондами набора **cobas**[®] EGFR Mutation Test, встречаются редко, однако их наличие может привести к неудаче при детекции мутаций в экзонах 18, 19, 20 и 21 (результат "No Mutation Detected").
12. Тест **cobas**[®] EGFR Test демонстрирует перекрестную реактивность (что приводит к результату "Mutation Detected") с мутацией L747S в экзоне 19, редкой приобретенной мутацией, связанной с резистентностью к терапии TKI.¹⁵
13. Образцы, тестированные в высоких концентрациях ($> 10^5$ копий/мл), могут давать ложные результаты.
14. Тест **cobas**[®] EGFR Test валидирован для постановки, в которой в каждую реакционную лунку вносится 25 мкл ДНК. Не рекомендуется вносить в реакцию ДНК в количестве менее 25 мкл.

15. Описанная выше процедура должна выполняться для детекции мутаций в EGFR, перечисленных в Таблице 3, в образцах плазмы K2 EDTA, с концентрацией мутантной ДНК ≥ 100 копий/мл.
16. Образцы с результатом “No Mutation Detected” («Мутации не выявлены») могут содержать мутации в EGFR, не выявленные тестом.
17. В случае результата “No Mutation Detected” («Мутации не выявлены») при тестировании образца плазмы может быть рекомендовано тестирование образца ткани.

Неклинические испытания теста

Аналитические характеристики теста

Представленные ниже данные предназначены для демонстрации аналитических характеристик теста cobas® EGFR Test.

Аналитическая чувствительность – пустые образцы

Для оценки работы теста cobas® EGFR Test в отсутствие шаблона и для проверки отсутствия аналитического сигнала, указывающего на присутствие мутаций в низкой концентрации, тестировали образцы плазмы с K2 ЭДТА от здоровых доноров, содержащие последовательность EGFR дикого типа. Результаты анализа, выполненного в соответствии с рекомендациями CLSI EP17-A2¹⁶, детекция пустых образцов составила ноль из всех мутаций.

Предел чувствительности для ДНК клеточной линии

Образцы фрагментированной ДНК из клеточных линий, содержащие мутации каждого из семи классов, выявляемых тестом, вносили в плазму K2 ЭДТА здоровых доноров, имеющих EGFR дикого типа. Готовили серии разведений и тестировали каждый образец панели в 24 повторях с использованием трех серий набора реагентов cobas® EGFR Test.

Предел чувствительности теста определяли для каждого из семи классов мутаций, выявляемых тестом, как минимальную концентрацию ДНК, дающую результат EGFR “Mutation Detected” («Мутация выявлена») с частотой не менее 95 %. Полученные результаты приведены в Таблице 22.

Таблица 22 Предел чувствительности теста cobas® EGFR Test для образцов плазмы K2 EDTA

Экзон EGFR	Тип мутации EGFR	Нуклеотидная последовательность EGFR	Предел детекции (копии/мл)	ID космиды ¹⁰
18	G719X	2156 G>C	100	6239
19	Делеция в экзоне 19	2235_2249del15	75	6223
20	T790M	2369 C>T	100	6240
	S768I	2303 G>T	25	6241
	инсерция в экзоне 20	2307_2308insGCCAGCGTG	25	12376
21	L858RP	2573 T>G	100	6224
	L861Q	2582T>A	30	6213

*Клеточная ДНК, механически фрагментированная на фрагменты размером примерно 220 п.о., с содержанием фоновой ДНК дикого типа в концентрации примерно 100 000 копий/мл.

Полученные результаты продемонстрировали, что тест cobas® EGFR Test позволяет выявлять мутации в экзонах 18, 19, 20 и 21 EGFR в концентрации ≥ 100 копий мутантной ДНК в мл плазмы при стандартном объеме вносимой в реакционную лунку ДНК, равном 25 мкл.

Перекрестная реактивность с другими мутациями в экзонах 18, 19, 20 и 21

Образцы из клинических исследований AURA Продолжение и AURA2

Тест **cobas**[®] EGFR Test дал результат “Mutation Detected” для следующих мутаций EGFR , встречавшихся в образцах из клинических исследований AURA Продолжение и AURA2 (Таблица 23). Исследование AURA продолжение проводилось в дополнение к образцам из когорты AURA2 для повышения вероятности выявления редких мутаций в плазме. Аналитические характеристики теста **cobas**[®] EGFR Test при детекции этих мутаций не определяли.

Таблица 23 Мутации, выявленные в когорте AURA Продолжение и AURA2, дающие перекрестную реактивность в тесте **cobas**[®] EGFR Test

Экзон	Мутантная последовательность	AA замена	ID космиды ¹⁵
19	2254_2277del24	S752_I759delSPKANKEI	6256
	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2239_2247delTTAAGAGAA	L747_E749delLRE	6218
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	не установлен
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	не установлен

Специфичность – микроорганизмы

Специфичность теста **cobas**[®] EGFR Test оценивали при тестировании *Staphylococcus epidermidis* в концентрации 1 x 10⁶ колониеобразующих единиц, в котором установили отсутствие перекрестной реактивности или интерференции с **cobas**[®] EGFR Test, когда внесли в образцы плазмы с К2 ЭДТА здоровых доноров, содержащие последовательности EGFR дикого типа и мутантные.

Интерференция

Было продемонстрировано отсутствие интерференции с тестом **cobas**[®] EGFR Test для триглицеридов (37мМ, рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷), билирубина прямого и непрямого (0.2 г/л, рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷) и гемоглобина (1,5 г/л, рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷) при внесении в образцы плазмы с К2 ЭДТА от здоровых доноров, содержащие последовательности EGFR дикого типа и мутантные. Гемоглобин в концентрации 2,0 г/л в плазме вызывал интерференцию в тесте **cobas**[®] EGFR Test. Альбумин в концентрации ≥60 г/л (60 g/L, г/л, рекомендованная CLSI высокая концентрация¹⁷) может вызывать интерференцию в тесте **cobas**[®] EGFR Test.

Полученные результаты продемонстрировали отсутствие интерференции ЭДТА, Неупогена и TARCEVA[®] с характеристиками теста **cobas**[®] EGFR Test при внесении потенциально интерферирующих веществ в образцы плазмы К2 ЭДТА от здоровых доноров, содержащие последовательности EGFR дикого типа и мутантные.

Клинические испытания теста

Анализ клинической воспроизводимости

Исследования по оценке воспроизводимости теста cobas® EGFR Test проводили в трех центрах (2 внешних и 1 внутренний, по 2 оператора в каждом), с 3 сериями набора реагентов, в течение 3 непоследовательных дней, с использованием панели из 9 образцов, содержащих смесь ДНК из клеточных линий, разведенных в плазме NSCLC. Мутации, включающие одну замену G719X в экзоне 18 , одну делецию в экзоне 19, две замены T790M в экзоне 20, одну инсерцию в экзоне 20, одну замену L858R в экзоне 21 и одну замену L861Q в экзоне 21, были представлены в четырех смешанных образцах, как указано в Таблице 24. Каждую смесь готовили в двух концентрациях: примерно 100 копий/мл и 300 копий/мл. Полученные смешанные образцы составляли 8 образцов панели, девятым был образец дикого типа.

Таблица 24 Комбинации смесей мутаций в образцах панели

Комбинация клеточной ДНК 1	Комбинация клеточной ДНК 2	Комбинация клеточной ДНК 3	Комбинация клеточной ДНК 4
Exon 19 Del	L858R	S768I	L861Q
T790M	T790M	G719A	Exon20 ins

Всего было проведено 37 постановок, из них валидными были 36 постановок, и 1 – невалидная. Всего 648 образцов панели (или 1224 мутации) были протестированы, из них 646 образцов (или 1220 мутаций) дали валидный результат. Результат “Mutation Detected” отсутствовал в 72 валидных постановках образца дикого типа, что дало 100% совпадений. Величина совпадений варьировала для разных мутаций: для восьми величина совпадения составила 100%, для пяти > 97%, одна мутация (G719X) продемонстрировала более низкий уровень совпадения, около 90%. обобщенные результаты оценки совпадений для каждой мутации приведены ниже в Таблице 25. Коэффициент вариации (CV) составил ≤ 12.8% для всех образцов панели, содержащих мутации. Для внутреннего и мутантного контролей величина CV составила ≤ 1.5%. При сравнении между сериями набора реагентов CV составил ≤ 0.89%, для одного набора ≤ 1.47%.

Таблица 25 Средние показатели величины совпадения результатов для каждого образца панели при исследовании воспроизводимости

Мутация	Число валидных тестов	Число совпадений	Согласованность % (95% CI) ^a
Дикий тип - NA	72	72	100 (95.0, 100.0)
Экзон 18 G719A - 100 копий/мл	72	65	90.3 (81.0, 96.0) ^b
Экзон 19 делеция (2235_2249del15) - 100 копий/мл	72	72	100 (95.0, 100.0)
Экзон 20 вставка (2307_2308ins9) - 100 копий/мл	72	72	100 (95.0, 100.0)
Экзон 20 S768I - 100 копий/мл	72	72	100 (95.0, 100.0)
Экзон 20 T790M - 100 копий/мл	143	139	97.2 (93.0, 99.2)
Экзон 21 L858R - 100 копий/мл	71	70	98.6 (92.4, 100.0)
Экзон 21 L861Q - 100 копий/мл	72	72	100 (95.0, 100.0)
Экзон 18 G719A - 300 копий/мл	71	70	98.6 (92.4, 100.0)
Экзон 19 делеция (2235_2249del15) - 300 копий/мл	72	72	100 (95.0, 100.0)
Экзон 20 вставка (2307_2308ins9) - 300 копий/мл	72	72	100 (95.0, 100.0)
Экзон 20 S768I - 300 копий/мл	71	71	100 (94.9, 100.0)
Экзон 20 T790M - 300 копий/мл	144	142	98.6 (95.1, 99.8)
Экзон 21 L858R - 300 копий/мл	72	71	98.6 (92.5, 100.0)
Экзон 21 L861Q - 300 копий/мл	72	72	100 (95.0, 100.0)

^a 95% CI = 95% точный биномиальный доверительный интервал.^b Более низкий уровень согласованности для данного образца был получен вследствие нескольких неправильных результатов (n = 6/24 объединенных повторов), полученных в одном из трех центров

Примечание: Результаты рассматривали как совпадающие, когда валидный результат "Mutation Detected" был получен для мутантного образца панели, или когда валидный результат "No Mutation Detected" был получен для образца панели дикого типа.

Примечание: Образцы в данном исследовании содержали ДНК клеточных линий, механически фрагментированную до размера в среднем 220 п.о. при фоновой концентрации ДНК дикого типа около 12,000 копий/мл.

Предел детекции (LOD) для образцов плазмы NSCLC

Исследование для подтверждения LOD теста cobas® EGFR Test при тестировании образцов плазмы NSCLC проводили для трех делеций в экзоне 19, одной замены L858R и одной замены T790M. Исследование выполнялось в трех центрах (двух внешних и одном внутреннем, по 2 оператора в каждом), с тремя сериями набора реагентов, в течение двух не последовательных дней, с помощью панели из 11 образцов плазмы NSCLC (пять мутаций, каждая в двух концентрациях: 1X LOD и 2X LOD; также образец дикого типа). Всего проводили 12 постановок (по два повтора в каждой постановке), все постановки были валидными. Всего было проведено 264 теста для 11 образцов панели, из них 262 (99.2%) тестов были валидными. Результат "Mutation Detected" не был получен ни в одном из 23 валидных тестов для образца дикого типа, что дало 100% совпадений. Величина совпадений для образца экзон 20 T790M-1 X LOD составила 95.6%; и 100% для всех остальных мутантных образцов панели. Показатели согласованности для каждого образца панели приведены ниже в Таблице 26. Коэффициент вариации (CV) составил < 7.0% для всех мутантных образцов панели.

Таблица 26 Показатели согласованности для каждого образца панели

Образец панели	Число валидных тестов	Число совпадений	Согласованность % (95% CI) ^a
Дикий тип - NA	23	23	100 (85.2, 100.0)
Экзон 19 делеция 1 - 1 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)
Экзон 19 делеция 1 - 2 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)
Экзон 19 делеция 2 - 1 X LOD	23	23	100 (85.2, 100.0)
Экзон 19 делеция 2 - 2 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)
Экзон 19 делеция 3 - 1 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)
Экзон 19 делеция 3 - 2 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)
Экзон 20 T790M - 1 X LOD	24	23	95.8 (78.9, 99.9)
Экзон 20 T790M - 2 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)
Экзон 21 L858R - 1 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)
Экзон 21 L858R - 2 X LOD	24	24	100 (85.8, 100.0)

^a95% CI = 95% точный биномиальный доверительный интервал.

Примечание: Результаты рассматривали как совпадающие, когда валидный результат “Mutation Detected” был получен для мутантного образца панели, или когда валидный результат “No Mutation Detected” был получен для образца панели дикого типа.

Примечание: Клинические образцы в данном исследовании имели фоновую концентрацию ДНК дикого типа около 24,000 копий/мл

Корреляция с референсным методом при тестировании образцов плазмы из фазы III когорты ASPIRATION

Аналитическую точность теста **cobas**[®] EGFR Test при детекции делеции в экзоне 19 и замены L858R оценивали в сравнении с валидированным тестом на платформе секвенирования нового поколения (NGS) при тестировании образцов плазмы от пациентов с прогрессирующим NSCLC из одного или нескольких приведенных ниже исследований (когорты ASPIRATION): клиническое исследование Genentech G027821 (MetMab) и G027761 (MetLung), а также клиническое исследование Roche ML25637 (ASPIRATION).

Всего 128 образцов плазмы объемом 2 мл с валидными результатами в обоих тестах **cobas**[®] EGFR Test и NGS были включены в анализ согласованности детекции делеции в экзоне 19 EGFR и замены L858R. Всего 32 образца имели результат MD и 95 образцов имели результат NMD в тесте NGS. Величина PPA между результатами теста **cobas**[®] EGFR Test в плазме и теста NGS в плазме составила 87.5% (95% CI: 71.9%, 95.0%); величина NPA между тестом **cobas**[®] EGFR Test и тестом NGS составила 96.8% (95% CI: 91.1%, 98.9%), как показано в Таблице 27.

Таблица 27 Сравнение результатов тестов **cobas**[®] EGFR Test и NGS при детекции в образцах плазмы делеции в экзоне 19 EGFR и замены L858R

Показатель согласованности	Процент совпадения (N)	95% CI
Процент положительного совпадения (PPA)	87.5% (28/32)	71.9%, 95.0%
Процент отрицательного совпадения (NPA)	96.8% (92/95)	91.1%, 98.9%

Корреляция между образцами плазмы и ткани в тесте cobas® EGFR Test при детекции делеции в экзоне 19 и замены L858R при тестировании образцов из фазы III исследования ENSURE

Исследование ENSURE (YO25121) являлось открытым рандомизированным исследованием фазы III по оценке эффективности и безопасности эрлотиниба в сравнении с гемцитабином/цисплатином в качестве терапии первой линии немелкоклеточного рака легких (NSCLC) IIIB/IV стадии для пациентов с наличием делеции в экзоне 19 или замены L858R в домене тирозиновой киназы рецептора эпидермального роста (EGFR) в опухолевой ткани. Всего скрининг прошли 647 пациентов, 601 пациент имел валидный результат в тесте cobas® EGFR Test в ткани для делеции в экзоне и замены L858R, и 217 пациентов были рандомно включены в данное исследование.

Всего 517 пациентов (86.0%, 517/601) имели парные образцы плазмы, из них 441 пациент имел образцы плазмы объемом ≥ 2.0 мл, т.е. объем плазмы, для работы с которым валидирован тест cobas® EGFR Test.

Корреляцию между детекцией в плазме и ткани в тесте cobas® EGFR Test оценивали отдельно для делеции в экзоне 19 и замены L858R, и совместно. Всего 431 образец, давший валидные результаты в парных образцах ткани и плазмы в тесте cobas® EGFR Test, были включены в анализ. Обобщенный для обеих мутаций процент положительных совпадений (PPA) между образцами плазмы и ткани составил 76.7% (95% CI: 70.5% - 81.9%), процент отрицательных совпадений (NPA) составил 98.2% (95% CI: 95.4% - 99.3%), как показано в Таблице 28. Значения PPA, NPA и OPA отдельно для делеции в экзоне 19 и замены L858R также приведены в Таблице 28.

Таблица 28 Согласованность между результатами в образцах плазмы и ткани в тесте cobas® EGFR Test при детекции делеции в экзоне 19 и замены L858R

Мутация	Показатель согласованности	Процент совпадения (N)	95% CI
Всего	Процент совпадения положительных результатов (PPA)	76.7% (161/210)	70.5%, 81.9%
	Процент совпадения отрицательных результатов (NPA)	98.2% (217/221)	95.4%, 99.3%
	Общий процент совпадения (OPA)	87.7% (378/431)	84.2%, 90.5%
Экзон 19 делеция	Процент совпадения положительных результатов (PPA)	80.8% (97/120)	72.9%, 86.9%
	Процент совпадения отрицательных результатов (NPA)	98.7% (307/311)	96.7%, 99.5%
	Общий процент совпадения (OPA)	93.7% (404/431)	91.0%, 95.7%
L858R	Процент совпадения положительных результатов (PPA)	67.8% (61/90)	57.6%, 76.5%
	Процент совпадения отрицательных результатов (NPA)	99.1% (338/341)	97.4%, 99.7%
	Общий процент совпадения (OPA)	92.6% (399/431)	89.7%, 94.7%

Примечание: PPA и NPA рассчитывали, используя результаты для образцов ткани как референсные.

Положительная прогностическая значимость (PPV) и отрицательная прогностическая значимость (NPV) для детекции делеции в экзоне 19 и замены L858R в совокупности были рассчитаны бутстрэп-методом с учетом разной распространенности мутации в образцах ткани (Таблица 29). Как ожидалось, значение PPV увеличивается и значение NPV уменьшается при увеличении распространенности мутации EGFR в популяции. Для европеоидной популяции, в которой характерно наличие мутации EGFR в ткани в 10 – 15% случаев, значение PPV варьирует от 82.8% до 88.6%, а значение NPV варьирует от 96.0% до 97.4%. Значение PPV варьирует от 94.8% – 97.8%, а NPV в пределах 80.8% – 90.9% при 30 – 50% распространенности мутации EGFR в ткани, характерной для азиатской популяции.

Таблица 29Рассчитанные прогностические значения для теста cobas® EGFR Test в образцах ткани и теста cobas® EGFR Test в образцах плазмы (объем образцов плазмы ≥ 2.0 мл) на основании распространенности мутации EGFR в ткани

Предполагаемая распространенность EGFR в образцах ткани	Положительная прогностическая значимость (PPV)	Отрицательная прогностическая значимость (NPV)
10%	82.8% (71.3%, 93.7%)	97.4% (96.2%, 98.7%)
15%	88.6% (79.7%, 96.9%)	96.0% (94.3%, 97.6%)
20%	91.6% (85.0%, 97.8%)	94.4% (92.3%, 96.3%)
30%	94.8% (90.0%, 98.6%)	90.9% (88.4%, 93.4%)
40%	96.8% (93.0%, 99.4%)	86.4% (83.3%, 89.4%)
50%	97.8% (95.0%, 100.0%)	80.8% (77.4%, 84.8%)

Примечание: Значения 95% CI рассчитывали бутстрэп-методом.

Примечание: Результаты для 79 образцов объемом < 2.0 мл были определены как невалидные в данном исследовании.

Примечание: PPA и NPA рассчитывали, используя результаты для образцов плазмы как референсные.

Корреляция с референсным методом при тестировании образцов плазмы из фазы II исследования AURA2

Клинические испытания теста cobas® EGFR Test проводили в сравнении с валидированным тестом на платформе секвенирования нового поколения (NGS) при тестировании образцов плазмы от пациентов с прогрессирующим NSCLC из исследования фазы II AURA2 препарата TAGRISSO™.

Из 383 пациентов 344 имели образцы плазмы, тестированные в cobas® EGFR Test, из них 342 дали валидный результат, а 2 – невалидный. Из 344 образцов плазмы, протестированных в cobas® EGFR Test, 322 (93.6%) образца также тестировали методом NGS, остальные 22 образца не имели оставшийся объем, достаточный для анализа методом NGS.

Аналитическую точность теста cobas® EGFR Test сравнивали с референсным методом (NGS) при детекции замены T790M в образцах плазмы. Всего 320 образцов с валидными результатами в обоих тестах, cobas® EGFR Test и NGS, были включены в анализ согласованности. Процент положительной согласованности (PPA) между тестами cobas® EGFR Test и NGS составил 91.5% (95% CI: 85.7% - 95.1%), процент отрицательной согласованности (NPA) составил 91.1% (95% CI: 86.0% - 94.4%) при детекции мутации T790M (Таблица 30).

Таблица 30 Сравнение результатов тестов cobas® EGFR Test и NGS при детекции замены EGFR T790M в образцах плазмы

Показатель согласованности	Процент совпадения (N)	95% CI
Процент положительного совпадения (PPA)	91.5% (129/141)	85.7%, 95.1%
Процент отрицательного совпадения (NPA)	91.1% (163/179)	86.0%, 94.4%

В образцах плазмы из исследования AURA2, тест cobas® EGFR Test позволил выявить мутации в экзонах 18, 19, 20 и 21 гена EGFR, приведенные в Таблице 31.

Таблица 31 Мутации, выявленные с помощью теста **cobas**[®] EGFR Test в когорте AURA 2

Экзон	Мутантная последовательность	AA замена	ID космиды ¹⁵
18	2156G>C	G719A	6239
	2155G>A	G719S	6252
	2155G>T	G719C	6253
19	2235_2249del15	E746_A750delELREA	6223
	2236_2250del15	E746_A750delELREA	6225
	2236_2256>ATC	E746_S752>I	133190
	2237_2251del15	E746_T751>A	12678
	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
	2237_2258>TATC	E746_P753>VS	не установлено
	2238_2248>GC	L747_A750>P	12422
	2239_2247delTTAAGAGAA	L747_E749delLRE	6218
	2239_2248TTAAGAGAAG>C	L747_A750>P	12382
	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
	2239_2256>CAG	L747_S752>Q	не установлено
	2239_2256del18	L747_S752delLREATS	6255
	2239_2258>CA	L747_P753>Q	12387
	2239_2264>GCCAA	L747_A755>AN	85891
	2240_2251del12	L747_T751>S	6210
	2240_2254del15	L747_T751delLREAT	12369
	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
	2240_2264>CGAGAGA	L747_A755>SRD	не установлено
	2253_2276del24	S752_I759delSPKANKEI	13556
20	2369C>T	T790M	6240
	2303G>T	S768I	6241
21	2573T>G	L858R	6224
	2573_2574TG>GT	L858R	12429
	2582T>A	L861Q	6213

Корреляция между образцами плазмы и ткани при детекции замены T790M при тестировании образцов из фазы II исследования AURA2

Исследование AURA2 являлось открытым одnogрупповым исследованием фазы II безопасности и эффективности препарата TAGRISSO[™] в качестве терапии второй или третьей линии для пациентов с прогрессирующим NSCLC, имеющих прогрессирование после предыдущей терапии агентом TKI и позитивных по мутации T790M в тесте **cobas**[®] EGFR Test. Всего скрининг прошли 472 пациента, из них 383 пациента прошли тестирование образцов ткани. Валидный результат теста EGFR по мутации T790M в тесте **cobas**[®] EGFR Test имел 371 пациент, из них 233 пациента были T790M позитивными, и 210 пациентов были рандомизированно включены в исследование.

Из 383 пациентов 344 имели образцы плазмы. Всего 334 пары образцов с валидными результатами теста **cobas**[®] EGFR Test в плазме и ткани были включены в анализ.

Процент положительной согласованности (PPA) между образцами плазмы и ткани составил 58.7% (95% CI: 52.2%, 65.0%), процент отрицательной согласованности (NPA) составил 80.2% (95% CI: 71.8%, 86.5%) при детекции замены T790M.

Положительная прогностическая значимость (PPV) составила 85.6% (95% CI: 79.2%, 90.3%), а отрицательная прогностическая значимость (NPV) - 49.2% (95% CI: 42.0%, 56.4%) при детекции замены T790M (Таблица 32).

На величину PPV, приведенную в Таблице 32, повлияли 22 образца, негативных по мутации T790M в тесте **cobas**[®] EGFR Test в ткани и положительные по T790M в тесте **cobas**[®] EGFR Test в плазме. Методом NGS 18 образцов были подтверждены как положительные по T790M в плазме, один образец не имел достаточного объема для тестирования в NGS. только три образца были определены как отрицательные по T790M методом NGS.

Таблица 32Согласованность между результатами теста **cobas**[®] EGFR Test при детекции мутации T790M в образцах плазмы и ткани

Мутация	Показатель согласованности	Процент совпадения (N)	95% CI
T790M	Процент совпадения положительных результатов (PPA)	58.7% (131/223)	52.2%, 65.0%
	Процент совпадения отрицательных результатов (NPA)	80.2% (89/111)	71.8%, 86.5%
	Общий процент совпадения (OPA)	65.9% (220/334)	60.6%, 70.8%
	Положительная прогностическая значимость (PPV)	85.6% (131/153)	79.2%, 90.3%
	Отрицательная прогностическая значимость (NPV)	49.2% (89/181)	42.0%, 56.4%

Примечание: PPA и NPA рассчитывали, используя результаты для образцов ткани как референсные.

Примечание: PPA и NPA рассчитывали, используя результаты для образцов плазмы как референсные.

Согласованность между результатами выявления резистентной мутации T790M в плазме и ткани ниже по сравнению с активирующими мутациями. На величину PPA может влиять гетерогенность ткани: в отличие от активирующих мутаций, таких как замена L858R или делеции в экзоне 19, замена T790M может присутствовать в небольшой доле опухолевых клеток, что характерно для приобретенных мутаций; поэтому несущая T790M сДНК может содержаться в плазме в очень небольшой концентрации, ниже уровня детекции. На величину NPA также может влиять гетерогенность опухолевой ткани: поскольку замена T790M может не присутствовать во всех опухолевых клетках, биопсия ткани может быть взята в том месте опухоли, где мутация T790M отсутствует, при том, что в других участках может находиться T790M-позитивная ткань.¹⁹

Данные клинических исходов

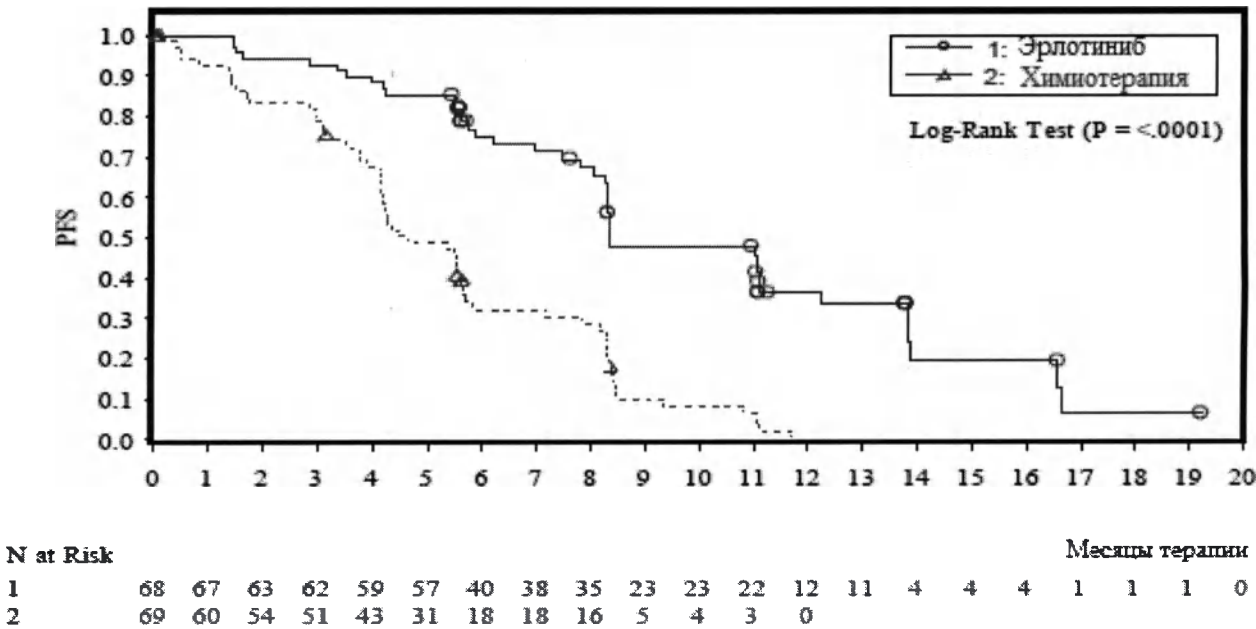
ENSURE

В исследовании ENSURE, включавшем 217 пациентов (имевших в образцах ткани делеции в экзоне 19 или замену L858R по результатам теста **cobas**[®] EGFR Test v1), 214 (98.6%) пациентов имели доступные для анализа образцы плазмы, из них у 180 пациентов объем образцов плазмы составлял 2.0 мл. Из 180 образцов плазмы объемом 2 мл, проанализированных в тесте **cobas**[®] EGFR Test, 137 образцов дали результат “Mutation Detected” по делеции в экзоне 19 или замене L858R (68 пациентов в группе получавших эрлотиниб, 69 пациентов в группе получавших химиотерапию), 42 образцов дали результат “No Mutation Detected” (22 пациентов в группе получавших эрлотиниб, 20 пациентов в группе получавших химиотерапию), и один образец дал невалидный результат. Кривые выживаемости Калан-Мейера для данных PFS по исследовательской оценке приведены на Рисунке 6 для пациентов с делециями в экзоне 19 или заменой L858R в образцах плазмы. Пациенты в группе получавших эрлотиниб имели более продолжительный показатель PFS по сравнению с получавшими химиотерапию пациентами, при этом две кривые четко разделялись на протяжении периода наблюдения (p < 0.001), что указывало на значительное клиническое преимущество терапии эрлотинибом для пациентов с активирующими мутациями EGFR, выявляемыми в плазме.

07384351001-03RU

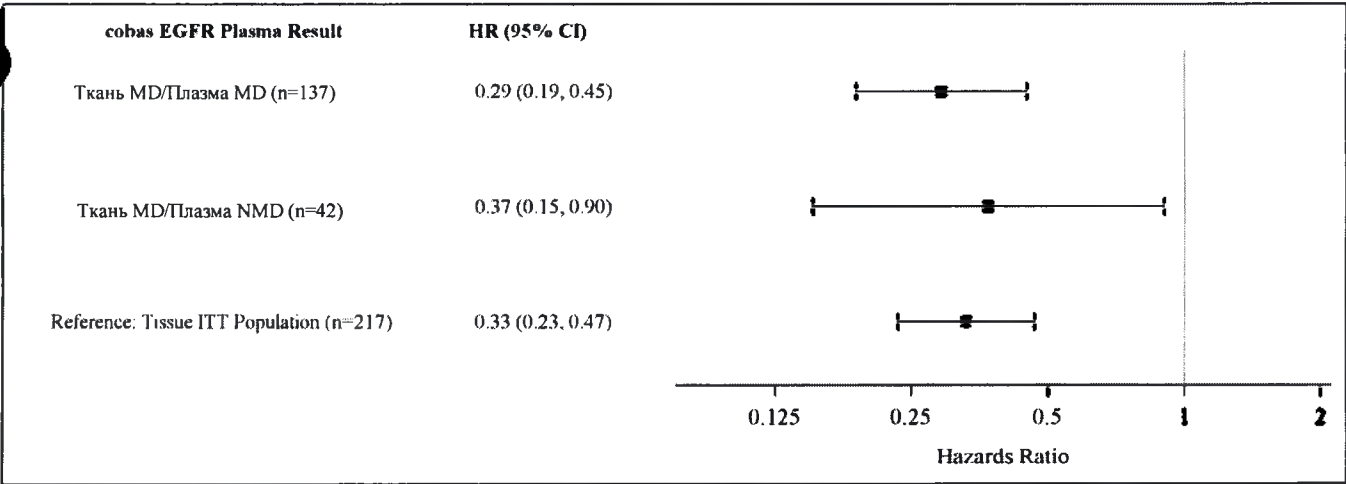
Doc. Rev. 3.0

Рисунок 6 График выживаемости Каплан-Мейера для PFS в зависимости от терапии для пациентов с мутациями, выявленными в тесте cobas® EGFR Test в образцах плазмы и ткани (оценка исследователя) (образцы плазмы объемом 2 мл)



Значительное преимущество PFS наблюдалось для всех пациентов, положительных по мутациям EGFR в ткани, имеющих образцы плазмы объемом 2.0 мл, независимо от положительного или отрицательного результата детекции мутации в плазме. Это преимущество было сходным с преимуществом PFS, наблюдаемым в общей когорте в исследовании ENSURE ITT (HR = 0.33; 95% CI: 0.23, 0.47), как показано ниже на Рисунке 7.

Рисунок 7 График Forest для соотношений рисков (HR) для PFS по оценке исследователя (образцы плазмы объемом 2 мл)



Примечание: MD = мутация выявлена (делеция в экзоне 19 или L858R); NMD = мутация не выявлена (делеция в экзоне 19 или L858R)

AURA2

Первичной оценкой эффективности являлась частота объективного ответа (ORR) в соответствии с RECIST 1.1 по результатам слепой оценки независимой центральной группы (BICR) по стандартному ряду критериев. Величину ORR определяли как число (%) пациентов, имевших как минимум один визит и полный ответ (CR) или частичный ответ (PR), подтвержденный как минимум через 4 недели (то есть лучший объективный ответ [BOR] при CR или PR).

В когорте оценочного анализа по ткани (ERAS) (T790M+ пациенты по результатам теста cobas® EGFR Test в ткани, получавшие как минимум одну дозу TAGRISSO™ и имевшие определяемое заболевание по данным BICR), 111 пациентов были T790M+ в плазме по результатам теста cobas® EGFR Test (т.е. T790M+ в ткани и плазме). Величина ORR в этой подгруппе составила 64.9% (72/111, 95% CI: 52.1%, 70.4%), что сопоставимо с наблюдаемой величиной ORR в группе ERAS (64.1%).

В когорте полного анализа по ткани (FAS) (T790M+ пациенты по результатам теста cobas® EGFR в ткани, получавшие как минимум одну дозу TAGRISSO™), 117 пациентов были T790M+ в плазме по результатам теста cobas® EGFR Test. Величина ORR для пациентов с T790M+ в образцах и ткани, и плазмы составила 61.5% (72/117, 95% CI: 55.2%, 73.7%), что также сходится с величиной ORR в популяции FAS по ткани (61%). Результаты анализа представлены в Таблице 33. Поскольку включение в исследование AURA2 основывалось на положительном результате в образце ткани, данные исходов для пациентов (T790M плазма+, T790M ткань-) не доступны для данного исследования.

Таблица 33: Частота объективного ответа в зависимости от результата в образцах плазмы у пациентов (T790M+ в ткани) в исследовании AURA2

Популяция (T790M+ в образце ткани)	Результат теста of cobas® EGFR Mutation Test в образце плазмы	N	Число ответивших пациентов (ORR) ^a n(%)	ORR (95% CI)
Полный анализ по ткани (ткань FAS)	T790M+(плазма FAS)	117	72 (61.5%)	(55.2%, 73.7%)
	T790M-	89	53 (59.6%)	(51.3%, 73.0%)
	Всего (ткань FAS)	210	128 (61.0%)	(57.0%, 70.8%)
Оценочный анализ по ткани (ткань ERAS)	T790M+(плазма ERAS)	111	72 (64.9%)	(52.1%, 70.4%)
	T790M-	83	52 (62.7%)	(48.6%, 69.8%)
	Всего (ткань ERAS)	198	127 (64.1%)	(54.0%, 67.6%)

^aПод ответом подразумевается только подтвержденный ответ.

Утилизация

Во избежание возможного загрязнения окружающей среды реагенты с истекшим сроком годности, а также отходы использованных реагентов, должны утилизироваться в соответствии с местными государственными и / или больничными нормативными требованиями.

Правильное уничтожение и утилизация будет поддерживать сохранение природных ресурсов и содействовать защите здоровья человека и окружающей среды.

Изделие должно быть утилизировано в РФ согласно требованиям СанПин 2.1.7.2790-10 (Класс А).

Утилизация отходов упаковки.

Упаковка продукции «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностикас ГмбХ") разработана с целью сведения к минимуму загрязнения окружающей среды при сохранении целостности продукта во время транспортировки и хранения. Упаковочные отходы должны утилизироваться в местных пунктах сбора упаковки, в специализированные контейнеры, расположенные в муниципалитетах.

Утилизация изделия с истекшим сроком годности и отходов, использованных реагентов.

При утилизации и уничтожении изделий с истекшим сроком годности, а также отходов, использованных реагентов, необходимо действовать в соответствии с гигиеническими нормативами и следовать официальным инструкциям по утилизации и уничтожению потенциально инфекционного и химического материала, принятым на территории Российской Федерации и в данном ЛПУ.

Ключевыми вопросами в стратегии управления отходами является оптимизация тактик и подходов к конечным продуктам, а также минимизация возможного загрязнения окружающей среды.

Более подробную информацию можно получить у производителя / уполномоченного представителя производителя.

Не утилизировать совместно с бытовыми отходами.

Техническое обслуживание и ремонт

Данное изделие является одноразовым. Техническое обслуживание и ремонт – не применимо.

Гарантийные обязательства

Производитель (компания «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностикас ГмбХ")) гарантирует, что Тест-полоски Combur 10 Test M соответствуют спецификациям, заявленным на этикетке.

Производитель несет ответственность за работу изделий только в случае их правильного использования в соответствии с инструкцией, а также соблюдения правил хранения и транспортировки. Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

Производитель гарантирует стабильность реагентов до окончания срока годности при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, указанных в инструкции.

Производитель гарантирует безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных производителем.

Изделия должны использоваться только до истечения срока годности, который указан на упаковке.

НАСТОЯЩАЯ ОГРАНИЧЕННАЯ ГАРАНТИЯ ЗАМЕНЯЕТ СОБОЙ ИНЫЕ ГАРАНТИИ, ОДНОЗНАЧНО ВЫРАЖЕННЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ЛЮБУЮ ПОДРАЗУМЕВАЕМУЮ ГАРАНТИЮ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОММЕРЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЛИ ДЛЯ ЛЮБОЙ ИНОЙ ЦЕЛИ. КОМПАНИЯ ROCHE DIAGNOSTICS GmbH НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА СЛУЧАЙНЫЕ, НЕПРЯМЫЕ, СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ.

По вопросам, связанным с качеством изделий, а также с их работой, нужно обращаться к Уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2, тел.: (495) 229-69-99, факс: (495) 229-62-64

Дополнительная информация

Символы

Приведенные ниже символы применяются для маркировки диагностической ПЦР продукции Roche.

Таблица 34 Символы, применяемые для маркировки диагностической ПЦР продукции Roche



Вспомогательное программное обеспечение



Средство медицинского назначения для диагностики *In-Vitro*



Авторизованный представитель в Европейском сообществе



Нижний предел выбранного диапазона



Список штрих-кодов



Производитель



Номер серии



Хранить в темноте



Биологическая опасность



Рассчитано на <n> тестов



Номер по каталогу



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции



Файл с описанием теста



Состав набора



Верхний предел выбранного диапазона



Распространитель



Использовать до



Только для испытаний IVD



Международный код маркировки и учёта логистических единиц



Данный продукт соответствует требованиям Европейской Директивы 98/79 ЕС для средств медицинского назначения для диагностики *in vitro*.

Служба технической поддержки в США 1-800-526-1247

Производитель и распространители

Таблица 35 Производитель и распространители

Произведено в США

Roche Diagnostics GmbH Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany



Manufactured in the United States
Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany



Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Торговые марки и патенты

См. <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Авторское право

©2016 Roche Molecular Systems, Inc.

Литература

1. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, DA Haber. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:169-181.
2. Pao W, J Chmielecki. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:760-774.
3. Zhou C, Wu Y-L, G Chen. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;12:735-742.
4. Paz-Ares L, Soulières D, I Melezínek. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med*. 2010;14:51-69.
5. Cheng L, Alexander RE, GT MacLennan. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol*. 212; 25:347-369.
6. TARCEVA® (erlotinib) Package Insert.
7. Wu YL, Lee JS, S Thongprasert. Intercalated combination of chemotherapy and erlotinib for patients with advanced stage non-small-cell lung cancer (FASTACT-2): a randomized, double-blind trial. *Lan Onc*. 2013; 14:777-86.
8. TAGRISSO™ (osimertinib) Package Insert.
9. Janne PA, Yang JCH, DW Kim. AZD9291 in EGFR Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM*. 2015; 372:1689-99.
10. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2011, v.51.
<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.
11. Longo MC, Berninger MS, JL Hartley. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-128.
12. Chosewood LC, DE. Wilson. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication. (CDC). 2009;21-1112.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014
14. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 57th Edition. 2016.
15. Costa DB, Nguyen KS, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, Yeap BY, et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):7060-7067.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2: Wayne, PA; CLSI, Jun 2012.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document EP7-A2E Appendix D: Wayne, PA; CLSI, 2005.
18. Rosell R. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13 v3:239-246.
19. TK Sundaresan. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses.

Редакция документа

Информация о редакции документа	
Doc Rev. 1.0 08/2015	Первая публикация.
Doc Rev. 2.0 06/2016	Небольшие стилистические правки в Разделе А: Работа с образцами FFPET Добавлен Раздел В: Работа с образцами плазмы При возникновении вопросов обратитесь в Ваше региональное представительство Roche.
Doc Rev. 3.0 10/2016	Добавлены данные исследования AURA2 в раздел В: Работа с образцами плазмы При возникновении вопросов обратитесь в Ваше региональное представительство Roche.

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.)

Условия и сроки хранения

1. Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests)
Хранить при температуре 2 - 8°C.

Срок годности набора реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests) максимально 24 месяца с даты изготовления.

2. Набор реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests)

Хранить при температуре -15 - -25°C.

Срок годности набора реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests) максимально 24 месяца с даты изготовления.

3. Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests)

Хранить при температуре 2 - 8°C.

Срок годности набора реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests) максимально 24 месяца с даты изготовления.

4. Набор реагентов для выделения ДНК, на 24 образца, варианты исполнения:

4.1 Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)

Хранить при температуре 15 - 30°C.

Срок годности набора реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24) максимально 25 месяцев с даты изготовления.

4.2 Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)

Хранить при температуре 15 - 30°C.

Срок годности набора реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24) максимально 25 месяцев с даты изготовления.

Комплект поставки

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

1. Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests)

2. Набор реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests)

3. Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests)

4. Набор реагентов для выделения ДНК, на 24 образца, варианты исполнения:

4.1 Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)

4.2 Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)

Упаковка

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

1. Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests)

Набор реагентов готов к применению, поставляется в наборе и не должен разделяться. Один набор рассчитан на 24 теста. Упаковка изделия обеспечивает достаточную защиту от механических, климатических воздействий при условии соблюдения правил транспортировки. Изделие упаковано герметично.

2. Набор реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests)

Набор реагентов готов к применению, поставляется в наборе и не должен разделяться. Один набор рассчитан на 24 теста.

Упаковка изделия обеспечивает достаточную защиту от механических, климатических воздействий при условии соблюдения правил транспортировки. Изделие упаковано герметично.

3. Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests)

Набор реагентов готов к применению, поставляется в наборе и не должен разделяться. Один набор рассчитан на 24 теста.

Упаковка изделия обеспечивает достаточную защиту от механических, климатических воздействий при условии соблюдения правил транспортировки. Изделие упаковано герметично.

4. Набор реагентов для выделения ДНК, на 24 образца, варианты исполнения:

4.1 Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)

Набор реагентов готов к применению, поставляется в наборе и не должен разделяться. Один набор рассчитан на 24 теста.

Упаковка изделия обеспечивает достаточную защиту от механических, климатических воздействий при условии соблюдения правил транспортировки. Изделие упаковано герметично.

4.2 Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)

Набор реагентов готов к применению, поставляется в наборе и не должен разделяться. Один набор рассчитан на 24 теста.

Упаковка изделия обеспечивает достаточную защиту от механических, климатических воздействий при условии соблюдения правил транспортировки. Изделие упаковано герметично.

Маркировка картонной упаковки

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

1. Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: Содержит достаточно для n- тестов
7. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
8. CE-маркировка
9. Температура хранения
10. Логотип производителя

2. Набор реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: Содержит достаточно для n- тестов
7. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
8. CE-маркировка
9. Температура хранения

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.)

10. Логотип производителя
11. Предупреждения и меры безопасности: H317, P261, P280, P333+P313, P362+P364

3. Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: Содержит достаточно для n- тестов
7. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
8. CE-маркировка
9. Температура хранения
10. Логотип производителя

4. Набор реагентов для выделения ДНК, на 24 образца, варианты исполнения:

4.1 Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: Содержит достаточно для n- тестов
7. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
8. CE-маркировка
9. Температура хранения
10. Логотип производителя
11. Предупреждения и меры безопасности: H302+H332, H315, H317, H318, H334, H335, P261, P280, P284, P305+P351+P338+P310, P342+P311, P362+P364

4.2 Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: Содержит достаточно для n- тестов
7. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
8. CE-маркировка
9. Температура хранения
10. Логотип производителя
11. Предупреждения и меры безопасности: H302 + H332, H315, H317, H318, H334, H335, P261, P264, P270, P271, P272, P280, P285, P301 + P312, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P310, P330, P333 + P313, P362, P403 + P233, P405, P501

Маркировка флакона

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

1. Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests)

1. Название
2. Логотип производителя
3. Наименование аналитических систем
4. Каталожный номер REF
5. Название и адрес производителя
6. Страна происхождения

7. Состав
8. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
9. Температура хранения и транспортировки
10. Срок годности
11. Номер лота
12. Производственный код

2. Набор реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
7. Температура хранения и транспортировки
8. Срок годности
9. Номер лота
10. Производственный код

3. Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
7. Температура хранения и транспортировки
8. Срок годности
9. Номер лота
10. Производственный код

4. Набор реагентов для выделения ДНК, на 24 образца, варианты исполнения:

4.1 Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: только для использования in-vitro IVD
7. Температура хранения и транспортировки
8. Срок годности
9. Номер лота
10. Производственный код

4.2 Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)

1. Название
2. Каталожный номер REF
3. Название и адрес производителя
4. Страна происхождения
5. Состав
6. Обозначение: только для использования **in-vitro** IVD
7. Температура хранения и транспортировки

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.)

8. Срок годности
9. Номер лота
10. Производственный код

Макет маркировки на русском языке

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

1. Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests)

Набор реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests)

Регистрационное удостоверение № _____

Срок годности см. на упаковке (изделие стабильно максимально 24 мес. с момента производства, дату изготовления см. в сертификате анализа)

Температура хранения см. на упаковке

Номер лота см. на упаковке

Антитела к ВИЧ 1, 2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют

Производитель: «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ"), Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Germany, Германия

Изделие предназначено только для диагностики in-vitro

Уполномоченный представитель производителя на территории РФ: Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2 Тел: +7 495 229-69-99, факс: +7 495 229-62-64. E-mail: moscow.reception_dia@roche.com

Кат. номер 05985595190

2. Набор реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests)

Набор реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests)

Регистрационное удостоверение № _____

Срок годности см. на упаковке (изделие стабильно максимально 24 мес. с момента производства, дату изготовления см. в сертификате анализа)

Температура хранения см. на упаковке

Номер лота см. на упаковке

Антитела к ВИЧ 1, 2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют

Производитель: «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ"), Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Germany, Германия

Изделие предназначено только для диагностики in-vitro

Уполномоченный представитель производителя на территории РФ: Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2 Тел: +7 495 229-69-99, факс: +7 495 229-62-64. E-mail: moscow.reception_dia@roche.com

Кат. номер 05852170190

3. Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests)

Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests)

Регистрационное удостоверение № _____

Срок годности см. на упаковке (изделие стабильно максимально 24 мес. с момента производства, дату изготовления см. в сертификате анализа)

Температура хранения см. на упаковке

Номер лота см. на упаковке

Антитела к ВИЧ 1, 2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют

Производитель: «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ"), Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Germany, Германия

Изделие предназначено только для диагностики in-vitro

Уполномоченный представитель производителя на территории РФ: Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2 Тел: +7 495 229-69-99, факс: +7 495 229-62-64. E-mail: moscow.reception_dia@roche.com

Кат. номер 07248563190

4. Набор реагентов для выделения ДНК, на 24 образца, варианты исполнения:

4.1 Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)

Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24)

Регистрационное удостоверение № _____

Срок годности см. на упаковке (изделие стабильно максимально 25 мес. с момента производства, дату изготовления см. в сертификате анализа)

Температура хранения см. на упаковке

Номер лота см. на упаковке

Антитела к ВИЧ 1, 2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют

Производитель: «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ"), Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Germany, Германия

Изделие предназначено только для диагностики in-vitro

Уполномоченный представитель производителя на территории РФ: Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2 Тел: +7 495 229-69-99, факс: +7 495 229-62-64. E-mail: moscow.reception_dia@roche.com

Кат. номер 05985536190

4.2 Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.)

Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24)

Регистрационное удостоверение № _____

Срок годности см. на упаковке (изделие стабильно максимально 25 мес. с момента производства, дату изготовления см. в сертификате анализа)

Температура хранения см. на упаковке

Номер лота см. на упаковке

Антитела к ВИЧ 1, 2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют

Производитель: «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ"), Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim, Germany, Германия

Изделие предназначено только для диагностики in-vitro

Уполномоченный представитель производителя на территории РФ: Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2 Тел: +7 495 229-69-99, факс: +7 495 229-62-64. E-mail: moscow.reception_dia@roche.com

Кат. номер 07247737190

Требования к маркировке групповой упаковки (транспортной тары), установленные изготовителем

Товар с транспортной (групповой) маркировкой упаковки используется только для перемещения изделия с производственной площадки до собственного склада производителя на территории страны изготовителя. Т.о. товар с транспортной маркировкой не поставляется на территорию РФ. На транспортной маркировке указаны сведения, имеющиеся на регулярной маркировке, в том числе дата производства продукта фиксирована.

Условия транспортировки

Перед отправкой с завода продукт проходит контрольные проверки. Международные символы на упаковке и специальные инструкции по обращению указывают транспортировщику, как следует обращаться с этим продуктом. При получении продукта внимательно осмотрите упаковку. При наличии любых следов неправильного обращения или повреждения немедленно обратитесь в отдел обслуживания клиентов компании «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ") или к региональному поставщику.

Транспортировка осуществляется всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта. Температура при транспортировке составляет: Для набора реагентов для определения мутаций BRAF V600, 24 теста (cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test, 24 tests +2 ... +8°C

Для набора реагентов для определения мутаций KRAS, 24 теста (cobas KRAS Mutation Test, 24 tests) -15...-25°C

Набор реагентов для определения мутаций EGFR v2, 24 теста (cobas EGFR Mutation Test v2, 24 tests) +2 ... +8°C

Набор реагентов для выделения ДНК cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24) +15 ... +30°C

Набор реагентов для выделения ДНК cobas cfDNA Sample Preparation Kit (cobas cfDNA Sample Preparation Kit, 24) +15 ... +30°C

Стерилизация

Изделие поставляется нестерильным. Не подлежит повторному использованию и/или стерилизации пользователем.

Требования к охране окружающей среды

Медицинское изделие при использовании, транспортировке и хранении не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду при соблюдении условий применения и мер предосторожности, указанных в инструкции.

Утилизация

Во избежание возможного загрязнения окружающей среды Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800 с истекшим сроком годности, а также отходы, использованных реагентов, должны утилизироваться в соответствии с местными государственными и / или больничными нормативными требованиями (включая СанПин 2.1.7.2790-10, отходы класса Б).

Правильное уничтожение и утилизация будет поддерживать сохранение природных ресурсов и содействовать защите здоровья человека и окружающей среды.

Утилизация отходов упаковки.

Упаковка продукции «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ") разработана с целью сведения к минимуму загрязнения окружающей среды при сохранении целостности продукта во время транспортировки и хранения. Упаковочные отходы должны утилизироваться в местных пунктах сбора упаковки, в специализированные контейнеры, расположенные в муниципалитетах.

Утилизация изделия с истекшим сроком годности и отходов, использованных реагентов.

При утилизации и уничтожении изделий с истекшим сроком годности, а также отходов, использованных реагентов, необходимо действовать в соответствии с гигиеническими нормативами и следовать официальным инструкциям по утилизации и уничтожению потенциально инфекционного и химического материала, принятым на территории Российской Федерации и в данном ЛПУ.

Ключевыми вопросами в стратегии управления отходами является оптимизация тактик и подходов к конечным продуктам, а также минимизация возможного загрязнения окружающей среды.

Более подробную информацию можно получить у производителя / уполномоченного представителя производителя.

Утилизация должна проводиться в соответствии с местными нормами законодательства, а также в соответствии с протоколами медицинского учреждения, где используются данные медицинские изделия.

Не утилизировать совместно с бытовыми отходами.

Техническое обслуживание и ремонт.

Данное медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Гарантийные обязательства

Производитель (компания «Roche Diagnostics GmbH» ("Рош Диагностика ГмбХ")) гарантирует, что Наборы реагентов для

Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800

Приложение 1 (Раздел специально предназначен для инструкции по применению на русском языке.)

системы модульной cobas 4800 соответствуют спецификациям, заявленным на этикетке. Производитель несет ответственность за работу изделий только в случае их правильного использования в соответствии с инструкцией, а также соблюдения правил хранения и транспортировки.

Изделия должны использоваться только до истечения срока годности, который указан на упаковке.

НАСТОЯЩАЯ ОГРАНИЧЕННАЯ ГАРАНТИЯ ЗАМЕНЯЕТ СОБОЙ ИНЫЕ ГАРАНТИИ, ОДНОЗНАЧНО ВЫРАЖЕННЫЕ ИЛИ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ, ВКЛЮЧАЯ ЛЮБУЮ ПОДРАЗУМЕВАЕМУЮ ГАРАНТИЮ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОММЕРЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЛИ ДЛЯ ЛЮБОЙ ИНОЙ ЦЕЛИ. КОМПАНИЯ ROCHE DIAGNOSTICS GmbH НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА СЛУЧАЙНЫЕ, НЕПРЯМЫЕ, СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИЛИ КОСВЕННЫЕ УБЫТКИ.

По вопросам, связанным с качеством изделий, а также с их работой, нужно обращаться к Уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

Общество с ограниченной ответственностью «Рош Диагностика Рус» (ООО «Рош Диагностика Рус»), 107031, Москва, Трубная площадь, д.2, тел.: (495) 229-69-99, факс: (495) 229-62-64

Претензии по качеству (рекламация)

Порядок предъявления рекламаций и ответов на них регулируется гражданским правом. Рекламация может предъявляться только по таким вопросам, которые не являлись предметом приемки товара, произведенной в соответствии с условиями договора.

По всем вопросам, связанным с обслуживанием изделия, необходимо обратиться к Уполномоченному представителю производителя.

В случае рекламации обращаться к производителю и / или уполномоченному представителю производителя.

*Примечание:

Система модульная cobas 4800 для ПЦР-диагностики in vitro, с принадлежностями, производства "Рош Молекуляр Системс, Инк.", США, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/09271 от 19.09.2016 (далее по тексту cobas 4800).

Die Übereinstimmung vorstehender Fotokopie mit
der vorgelegten Urschrift wird hiermit beglaubigt.

Mannheim, den 10.07.2017

Notariat Mannheim

(Seeler)
Notarin



[Логотип: «Рош»]

[Штамп: Удостоверенная копия]

Текст на русском языке Инструкции по применению на медицинское изделие: **Наборы реагентов для системы модульной cobas 4800**

производства «Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH), Сандхофер Штрассе 116, D-68305 Маннхайм, Германия (Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany)

РАЗРАБОТЧИК

**«Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH), Германия.
Сандхофер Штрассе 116, D-68305 Маннхайм, Германия
(Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim, Germany)**

Утверждено

«Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH)

Дата: 06 июля 2017 года

[подпись]

Андреа Вебер (Andrea Weber)

Менеджер проекта отдела нормативно-правового регулирования

[Штамп: «Рош Диагностикс ГмбХ» (Roche Diagnostics GmbH)

Сандхофер Штрассе 116

68305 Маннхайм

(Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim)]

2017

«Рош Диагностикс ГмбХ»; Сандхофер Штрассе 116; D-68305 Маннхайм, Германия (Roche Diagnostics GmbH; Sandhofer Strasse 116; D-68305 Mannheim, Germany); тел.: +49 621 759 0; факс: +49 621 759 2890

Место нахождения органа управления: г. Маннхайм – Регистрационный суд: суд первой инстанции г. Маннхайма, № в торговом реестре: 3962 – Правление: д-р Урсула Редекер, председатель; Эдгар Фит

Председатель наблюдательного совета: д-р Северин Шван

ЛИТЕРАТУРА

1. Дэвис Х., Бигнел Д.Р., Кокс К. (Davies H, Bignell GR, Cox C) и др. "Мутации гена BRAF в раке человека". Журнал "Природа" 2002; 417:949-54.
2. МакКубрей Д.А., Стелмэн Л.С., Чэппел В.Х. (McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH) и др. "Роли путей Raf/MEK/ERK в клеточном росте, злокачественной трансформации и лекарственной устойчивости". Журнал "Протоколы биохимии и биофизики" 2007; 1773:1263-1284.
3. Кертин Д.А., Фридлинд Д., Кагешита Т. (Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T) и др. "Различные наборы генетических изменений в меланоме". "Журнал Новой Англии о медицине". 2005; 353:2135-2147.
4. Поллок П.М., Харпер Ю.Л. Хэнсен К.С. (Pollock PM, Harper UL, Hansen, KS) и др. "Высокая частота мутаций BRAF в невусах". Журнал "Природа Генетика" 2003; 33:19-20.
5. База данных COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic>). Выпуск 52 (Март 2011).
6. Флаэрти К.Т., Пузанов И., Ким К.Б. (Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB) и др. "Ингибирование мутировавшего активированного BRAF в метастатической меланоме". "Медицинский журнал Новой Англии" 2010 Авг 26; 363(9):809-819.
7. Чапмэн П.Б., Хаусчилд А., Роберт К. (Chapman PB, Hauschild A, Robert C) и др. "Повышение выживаемости с вемурафениб при меланоме с мутацией BRAF V600E". "Журнал Новой Англии о медицине" 2011; 364:2507-2516.
8. Лонго М.К., Бернингер М.С. и Хартли Д.Л. (Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L.) "Использование урацил ДНК гликозилазы для борьбы с переносимым загрязнением в полимеразной цепной реакции". Журнал "Ген" 1990; 93:125-128.
9. Чойсвуд Л.К. и Вилсон Д.Е. (Chosewood L.C., Wilson, D.E.) "Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях". Публикация HNS Пятое издание. (CDC) 21-1112. 2009.
10. Институт клинических лабораторных стандартов (CLSI). Защита лабораторных работников от профессионально приобретенных инфекций. Утвержденное руководство - Третье издание. Документ CLSI M29-A3 Вилланова, Пенсильвания: CLSI, 2005.
11. Международная ассоциация воздушного транспорта. Правила по опасным грузам, 52-е издание. 2011.
12. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) EP7-A2, Приложение D 2005.
13. Квирингс (Querings) и др. (2011) "Бенчмаркинг диагностики мутаций в клинических образцах рака легких". PLoS ONE 6(5): e19601.doi:10.1371/journal.pone.0019601
14. Пичлер (Pichler) и др. "Оценка анализа плавления с высоким разрешением в качестве диагностического инструмента для обнаружения мутации BRAF V600E в опухолях колоректального отдела". "Журнал молекулярной диагностики", Том 11, № 2, Март 2009.
15. Тсиатис (Tsiatis) и др. "Сравнение анализа секвенирования по Сенгеру, Пиросеквенирование и анализ кривой плавления для обнаружения мутаций KRAS". "Журнал молекулярной диагностики", Том 12, № 4, Июль 2010.

16. Огино (Ogino) и др. (2005) "Метод чувствительного секвенирования для обнаружения мутаций KRAS методом Пиросеквенирования". "Журнал молекулярной диагностики", Том 7, № 3, Август 2005.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шанкаран В., Обел Д., Бенсон III А.Б. (Shankaran V, Obel J, Benson III AB). "Прогнозирование ответа на ингибиторы EGFR при метастатическом колоректальном раке: текущая практика и будущие направления". Журнал "Онколог" 2010 15:157-67.
2. Самовитс В.С., Куртин К., Шаффер Д. (Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D) и др. "Связь мутаций Ki-ras при раке толстой кишки, стадией и выживаемостью опухолей: исследование, основанное на популяции". Журнал "Эпидемиологии рака, Биомаркеры и профилактика" 2000 Ноя 9(11):1193-7.
3. Андреев Х.Д., Нормэн А.Р., Куннингхэм Д. (Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D) и др. "Мутации Kirsten ras у пациентов с колоректальным раком: исследование RASCAL II". "Британский журнал рака" 2001 Сен 1; 85(5):692-6.
4. Дер К.Д., Финкел Т., Купер Г.М. (Der CJ, Finkel T, Cooper GM). "Биологические и биохимические свойства ras генов человека, мутировавших на кодоне 61". Журнал "Клетка" 1986 Янв 17; 44:167-176.
5. Лупакис Ф., Руссо А., Кремолини К. (Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C) и др. "KRAS-кодон 61, 146 и BRAF предсказывают устойчивость к цетуксимабам плюс иринотекану в KRAS-кодоне 12 и 13 метастатического колоректального рака дикого типа". "Британский журнал рака" 2009 Авг 18; 101(4):715-21.
6. Де Рук В., Клейз Б., Бернаскони Д. (De Roock W, Claes B, Bernasconi D) и др. "Влияние мутаций KRAS, BRAF, NRAS и PIK3CA на эффективность цетуксимаба плюс химиотерапия при химиотерапии - рефрактерный метастатический колоректальный рак: ретроспективный анализ консорциума". Журнал "Lancet Онкология", 2010 Авг 11(8):753-62.
7. Сиена С., Сартор-Бянчи А., Ди Николантонио Ф. (Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F) и др. "Биомаркеры прогнозируют клинический результат терапии рецептором эпидермального фактора роста при метастатическом колоректальном раке". "Журнал Национального института рака" 2009 Окт 7; 101(19):1308-24.
8. Бокмейер К., Бондаренко И., Макхсон А. (Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A) и др. "Флюороурацил, лейковорин и оксалиплатин с и без цетуксимаба в лечении первой линии метастатического колоректального рака". "Журнал клинической онкологии" 2009 Фев 10; 27(5):663-71.
9. Тол Д., Купмэн М., Кэтс А. (Tol J, Koopman M, Cats A) и др. "Химиотерапия, бевацизумаб и цетуксимаб при метастатическом колоректальном раке". "Журнал Новой Англии о медицине" 2009 Дек; 360(6):563-72.
10. Ливр А., Бачет Д.Б., Ле Корр Д. (Lievre A, Bachet JB, Le Corre D) и др. "Статус мутации KRAS является прогнозирующим ответом на терапию цетуксимабом при колоректальном раке". Журнал "Исследование рака" 2006 Апр 15; 66(8):3992-5.
11. Бенвенути С., Сартор-Бянчи А., Ди Николантонио Ф. (Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F) и др. "Онкогенная активация сигнального пути RAS/RAF снижает реакцию метастатических колоректальных злокачественных опухолей на терапию антител к анти-эпидермальному рецептору фактора роста". Журнал "Исследование рака" 2007 Мар 15; 67(6):2643-8.
12. Амадо Р.Д., Волф М., Питерс М. (Amado RG, Wolf M, Peeters M) и др. "Диффузный KRAS необходим для эффективности панитумумаба у пациентов с метастатическим

- колоректальным раком". "Журнал клинической онкологии" 2008 Апр 1; 26(10):1626-34.
13. Карапетис К.С., Кхамбата-Форд С., Джонкер Д.Д. (Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ) и др. "Мутации K-ras и преимущества цетуксимаба при прогрессирующем колоректальном раке". "Журнал Новой Англии о медицине" 2008 Окт 23; 359(17):1757-65.
 14. Доулард Д.-И., Сиена С., Кассиди Д. (Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J) и др. "Рандомизированное III фазное исследование панитумумаба с инфузионным фторурацилом, лейковинном и оксалиплатином (FOXFOX4) по сравнению с FOLFOX4 как лечение первой линии у пациентов с ранее нелеченным метастатическим колоректальным раком: Исследование PRIME". "Журнал клинической онкологии" 2010; 28:4697-4705.
 15. Аллегра К.Д., Джесап Д.М., Сомерфилд М.Р. (Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR) и др. "Американское общество клинической онкологии: предварительное клиническое заключение: тестирование мутаций гена KRAS у пациентов с метастатической колоректальной карциномой для прогнозирования реакции на терапию моноклональных антител к рецептору антипидермального фактора роста". "Журнал клинической онкологии" 2009 Апр 20; 27(12):2091-6.
 16. Национальная комплексная онкологическая сеть. NCCN Руководство по клинической практике в онкологии. Журнал "Рак толстой кишки" 2010, т.2.
 17. Ван Кутсем Е., Оливейра Д. (Van Cutsem E, Oliveira J); "Руководящие принципы ESMO Рабочая группа. Прогрессирующий колоректальный рак: ESMO клинические рекомендации по диагностике, лечению и последующему наблюдению". Журнал "Анналы онкологии" 2009 Май; 20 Прил 4:61-3.
 18. Управление по контролю за продуктами и лекарствами. Маркировка классов изменяется на моноклональные антитела против EGFR, цетуксимаб (Erbixux) и панитумумаб (Vectibix): KRAS мутации. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucml172905.htm>.
 19. Европейское агентство по лекарственным средствам: Комитет по лекарственным средствам для использования человеком пост-регистрационное резюме положительного мнения для Erbixux. http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/Erbixux_28040208en.pdf.
 20. Карачалиу Н., Майо К., Коста К. (Karachaliou, N, Mayo, C, Costa, C) и др. "Мутации KRAS при раке легких". Журнал "Клинический рак легких" (В печати).
 21. Маскок К., Лэннино Н., Мартин Б. (Mascaux, C, Lannino, N, Martin, B) и др. "Роль онкогена RAS в выживании пациентов с раком легких: систематический обзор литературы с мета-анализом". "Британский журнал рака" (2005) 92, 131 - 139.
 22. Шепхерд Ф., Буррджем А., Брамбилла Е. (Shepherd, F, Bourredjem, A, Brambilla, E) и др. "Прогностическое и прогнозирующее действие подтипа мутации KRAS в полностью резецированном немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ): Исследование LACE-bio". "Журнал клинической онкологии" 30, 2012 (прил; разд 7007).
 23. Мао К., Киуб Л., Лиао Р. (Mao, C, Qiub, L, Liao R) и др. "Мутации KRAS и резистентность к лечению EGFR-TKI у пациентов с немелкоклеточным раком легкого: Метаанализ 22 исследований". Журнал "Рак легких" 69 (2010) 272-278.
 24. Риели Д., Полити К., Винсент А. (Riely, G, Politi, K, Vincent, A) и др. "Обновление эпидермального фактора роста мутаций рецепторов в раке легкого, не связанного с клетками. Журнал "Исследование рака" 2006; 12:7232-7241.

25. Лонго М.К., Бернингер М.С. и Д.Л. Хартли (Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L.) 1990. "Использование урацил ДНК гликозилазы для борьбы с переносимым загрязнением в полимеразной цепной реакции". Журнал "Ген". 93:125-128.
26. Чойсвуд Л.К. и Вилсон Д.Е. (Chosewood L.C., Wilson, D.E.) "Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях". Публикация NHS Пятая # редакция. (CDC) 21-1112. 2009.
27. Институт клинических лабораторных стандартов (CLSI). Защита лабораторных работников от профессионально приобретенных инфекций. Утвержденное руководство - Третье издание. Документ CLSI M29-A3 Вилланова, Пенсильвания: CLSI, 2005.
28. Международная ассоциация воздушного транспорта. Правила по опасным грузам, 52-е издание. 2011.
29. Каталог соматических мутаций в раке (COSMIC), 2011, т.51, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>.
30. Институт клинических и лабораторных стандартов (CLSI) EP7-A2, Интерференционное тестирование в клинической химии; Утвержденные руководящие принципы - Второе издание, Приложение D 2005.

Литература

1. Шарма С.В., Белл Д.В., Сеттлмэн Д., Д.А. Хабер (Sharma SV, Bell DW, Settleman J, DA Haber). "Рецепторные мутации эпидермального фактора роста при раке легкого". Журнал "Природа Обзоры Рак". 2007; 7:169-181.
2. Пао В., Д. Чмиелески (Paо W, J Chmielecki). "Рациональное, биологически обоснованное лечение EGFR-мутантного немелкоклеточного рака легкого". Журнал "Природа Обзоры Рак". 2010; 10:760-774.
3. Чжу К., Ву И.-Л., Д. Чен (Zhou C, Wu Y-L, G Chen). "Эрлотиниб по сравнению с химиотерапией в качестве лечения первой линии для пациентов с прогрессирующим мутационным положительным немелкоклеточным раком легких EGFR (OPTIMAL, CTONG-0802): многоцентровое, открытое рандомизированное 3х фазное исследование". Журнал "Lancet Онкология". 2011; 12:735-742.
4. Паз-Арез Л., Соулиерес Д., И. Мелезмек (Paz-Ares L, Soulieres D, I Melezmek). "Клинические исходы у пациентов с немелкоклеточным раком легких с мутациями EGFR: объединенный анализ". "Журнал клеточной и молекулярной медицины". 2010; 14:51-69.
5. Ченг Л., Александр Р.Е., Д.Т. МакЛенэн (Cheng L, Alexander RE, GT MacLennan). "Молекулярная патология рака легких: ключ к персонализированной медицине". "Mod Path". 212; 25:347-369.
6. TARCEVA® (эрлотиниб) Вкладыш в упаковку.
7. Ву И.Л., Ли Д.С., С. Тонгпрасерт (Wu YL, Lee JS, S Thongprasert). "Интеркалярная комбинация химиотерапии и эрлотиниба для пациентов с немелкоклеточным раком легких позднего этапа (FASTACT-2): рандомизированное двойное слепое исследование". Журнал "Lancet Онкология". 2013; 14:777-786.
8. TAGRISSO™ (озимертиниб) Вкладыш в упаковку.
9. Джэнн П.А., Янг Д.К.Х., Д.В. Ким (Janne PA, Yang JCH, DW Kim). "AZD9291 в EGFR Ингибитор-резистентный немелкоклеточный рак легких". "Журнал Новой Англии о медицине". 2015; 372:1689-99.
10. Каталог соматических мутаций в раке (COSMIC), 2011, т.51. <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.

11. Лонго М.К., Бернингер М.С., Д.Л. Хартли (Longo MC, Berninger MS, JL Hartley). "Использование урацил ДНК гликозилазы для борьбы с переносимым загрязнением в полимеразной цепной реакции". Журнал "Ген". 1990; 93:125-128.
12. Чойсвуд Л.К., Д.Е. Вилсон (Chosewood LC, DE. Wilson). "Биологическая безопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях - Пятое издание". Министерство здравоохранения и социальных служб США. (CDC). 2009; 21-1112.
13. Институт клинических лабораторных стандартов (CLSI). Защита лабораторных работников от профессионально приобретенных инфекций. Утвержденное руководство - Четвертое издание. Документ CLSI M29-A4: Уэйн, Пенсильвания; CLSI, 2014
14. Международная ассоциация воздушного транспорта. Правила по опасным грузам, 57-е издание. 2016.
15. Коста Д.Б., Нгуен К.С., Чо Б.К., Секвист Л.В., Джеkmэн, Риели Д.Д., Йеп Б.И. (Costa DB, Nguyen KS, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, Year BY) и др. "Эффекты эрлотиниба в EGFR мутировавшем немелкоклеточном раке легкого с сопротивлением gefитинибу". Журнал "Клиническое исследование рака". 2008; 14(21):7060-7067.
16. Институт клинических лабораторных стандартов (CLSI). Оценка возможностей обнаружения для клинических лабораторных методов измерения; Утвержденное руководство - второе издание. Документ CLSI EP17-A2: Уэйн, Пенсильвания; CLSI, 2012.
17. Институт клинических лабораторных стандартов (CLSI). Интерференционное тестирование в клинической химии; Утвержденное руководство - Второе издание. Документ CLSI EP7-A2E Приложение D: Уэйн, Пенсильвания; CLSI, 2005.
18. Роселл Р. (Rosell R.) "Эрлотиниб по сравнению со стандартной химиотерапией в качестве лечения первой линии для Европейских пациентов с прогрессирующим мутационным положительным немелкоклеточным раком легких (EURTAC): многоцентровое, открытое рандомизированное 3х фазное исследование". Журнал "Lancet Онкология". 2012; 13 т3:239-246.
19. Т.К. Сандаресэн (TK Sundaresan). "Обнаружение T790M, приобретенная резистентность мутации EGFR, путем биопсии опухоли и неинвазивного анализа крови".

Настоящим подтверждается подлинность представленных фотокопий и проставленных подписей.

г. Маннхайм, 10.07.2017 г.

Нотариальная контора г. Маннхайма

[подпись]

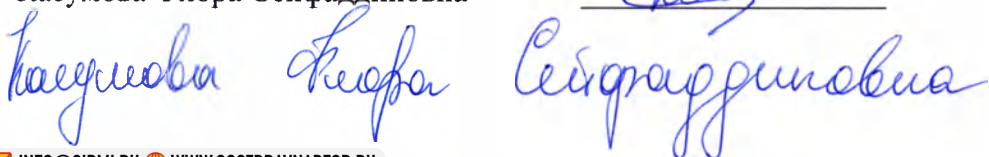
(Зеелер)

Нотариус

[Гербовая печать: Нотариальная контора
г. Маннхайма]

[Гербовая печать: Нотариальная контора
г. Маннхайма]

Перевод выполнила переводчик
Касумова Флора Сейфаддиновна



Российская Федерация, город Москва.

Двадцать первого июля две тысячи семнадцатого года.

Я, Дроздова Анна Сергеевна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Бибишевой Амалии Романовны, свидетельствую подлинность подписи переводчика **Касумовой Флоры Сейфаддиновны**.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшей документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: №

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 00 руб.



[Handwritten signature]

А.С. Дроздова

Всего прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью 160 листов.

ВРИО нотариуса



А.С. Дроздова

