

ООО «БиоЛинк»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №Е-012 от 05.09.2022

Набор реагентов для выявления мутаций гена *EGFR*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-EGFR-4R" по ТУ 21.20.23-006-57201404-2020,

вариант исполнения – Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (12)"

Номер серии	050922	QC _{FAM} (контрольная ПЦР) = 23	QC _{ROX} = 19
Дата изготовления	05.09.2022	QC _{FAM} (ПЦР L858R) = 29	TO _{L858R} = 6.0
Срок годности	до 09.2023	QC _{FAM} (ПЦР 19del) = 27	TO _{19del} = 5.0
		QC _{FAM} (ПЦР T790M) = 30	TO _{T790M} = 9.0

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 21.20.23-006-57201404-2020.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
ПЦР-смесь L858R	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
ПЦР-смесь 19del	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
ПЦР-смесь T790M	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
Тaq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР)	$Ct_{ROX} \leq QC_{ROX}$ Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	Соответствует
ПЦР со смесью L858R ПЦР со смесью 19del ПЦР со смесью T790M	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР L858R) $Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР 19del) $Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР T790M)	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО}+6$	Соответствует

4. Условия хранения и транспортирования

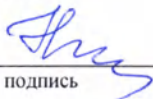
Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°С до минус 25°С.

Транспортировать набор реагентов при температуре не выше минус 18°С не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 21.20.23-006-57201404-2020.

Дата выдачи паспорта: **05.09.2022**

Начальник ОБТК: _____ / Кондратьева О. А. /


 подпись

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью 2 листа

Директор ООО «БИОЛИНК»

А.А. / Корниенко А. А. /

«21» сентября 2022 г.



ООО «БиоЛинк»

г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13. Тел.: +7 (383) 209-32-40, E-mail: info@biolinklab.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА №Е-013 от 05.09.2022

Набор реагентов для выявления мутаций гена *EGFR*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени

"Real-time-PCR-EGFR-4R" по ТУ 21.20.23-006-57201404-2020,

вариант исполнения – Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (36)"

Номер серии	050922	QC _{FAM} (контрольная ПЦР) = 23	QC _{ROX} = 19
Дата изготовления	05.09.2022	QC _{FAM} (ПЦР L858R) = 29	TO _{L858R} = 6.0
Срок годности	до 09.2023	QC _{FAM} (ПЦР 19del) = 27	TO _{19del} = 5.0
		QC _{FAM} (ПЦР T790M) = 30	TO _{T790M} = 9.0

Результат контроля

1. Проверка комплектности, упаковки и маркировки – соответствует требованиям ТУ 21.20.23-006-57201404-2020.
2. Проверка комплектности и внешнего вида реагентов

Наименование показателя	Количество, шт.	Характеристика и норма	Результат контроля
Контрольная ПЦР-смесь	2	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
ПЦР-смесь L858R	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
ПЦР-смесь 19del	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
ПЦР-смесь T790M	1	Прозрачная жидкость бледно-розового цвета	Соответствует
Тaq ДНК-полимераза	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
ПКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
ОКО	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
10x UDG буфер	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	1	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует

3. Проверка технических характеристик

Наименование показателя	Характеристика и норма		Результат контроля
Допустимые значения Ct	для ПКО	для ОКО	
ПЦР с контрольной смесью	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР)	$Ct_{ROX} \leq QC_{ROX}$ Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО} + 6$	Соответствует
ПЦР со смесью L858R ПЦР со смесью 19del ПЦР со смесью T790M	$Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР L858R) $Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР 19del) $Ct_{FAM} \leq QC_{FAM}$ (ПЦР T790M)	Ct_{FAM} не определено или $Ct_{FAM} > Ct_{ПКО} + 6$	Соответствует

4. Условия хранения и транспортирования

Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C.

Транспортировать набор реагентов при температуре не выше минус 18°C не более 5 суток.

Заключение ОБТК: набор реагентов соответствует требованиям ТУ 21.20.23-006-57201404-2020.

Дата выдачи паспорта: **05.09.2022**

Начальник ОБТК:  / Кондратьева О. А./
подпись

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью
_____ листа
Директор ООО «БИОЛИНК»
_____ / Корниенко А. А. /
«21» _____ 2022 г.





УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БиоЛинк»

Корниенко А.А.

«5» декабря 2022 г.



Набор реагентов для выявления мутаций гена *EGFR*
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени
"Real-time-PCR-EGFR-4R"
по ТУ 21.20.23-006-57201404-2020
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

Введение	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	4
2.1 Варианты исполнения	4
2.2 Состав набора реагентов	4
2.3 Число анализируемых проб	5
2.4 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	7
3.1 Предел обнаружения	7
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ	7
3.3 Характеристики аналитической эффективности	7
3.4 Диагностическая специфичность	8
3.5 Диагностическая чувствительность	8
3.6 Ограничения при применении	8
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа	8
4 Риски, связанные с применением набора реагентов	8
5 Меры предосторожности	9
6 Оборудование и материалы	11
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	11
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	11
7 Анализируемые пробы	12
8 Подготовка компонентов для анализа	12
8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой	12
8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений	13
9 Проведение анализа	14
9.1 Постановка контрольной ПЦР	14
9.2 Программирование и запуск термоциклера	15
9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР	16
9.4 Постановка контрольной ПЦР и ПЦР на мутации гена <i>EGFR</i>	17
9.5 Программирование и запуск термоциклера	19
10 Анализ результатов	19
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	19
10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций в гене <i>EGFR</i>	20

Условия хранения, транспортирования и эксплуатации.....	21
11.1 Условия хранения.....	21
11.2 Условия транспортирования	21
11.3 Условия эксплуатации	22
12 Гарантийные обязательства.....	22
13 Маркировка	23
Библиография.....	24
Приложение А (справочное) Список делеций в 19-м экзоне гена <i>EGFR</i> согласно базе данных COSMIC, которые могут быть выявлены с помощью набора реагентов	25
Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков	28
Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel».....	29

Введение

Рецептор эпидермального фактора роста EGFR (также называемый HER1, ErbB-1) играет важную роль в пролиферации эпителиальных клеток. При связывании рецептора EGFR с факторами роста происходит его активация и передача сигнала на внутриклеточный домен, обладающий тирозинкиназной активностью.

У пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого (НМКРЛ) в 15-40% случаев обнаруживаются активирующие соматические мутации в гене *EGFR*. Подавляющее большинство таких мутаций составляют делеции в 19-м экзоне (del19) и замена L858R в 21-м экзоне гена *EGFR*. Наличие этих мутаций ассоциировано с чувствительностью опухоли к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб, осимертиниб). Мутация T790M является наиболее частой причиной возникновения устойчивости к ингибиторам тирозинкиназы и выявляется примерно в 50% случаев у пациентов после проведения таргетной терапии. У некоторых пациентов с НМКРЛ (1-2%) мутация T790M может быть обнаружена при первичном молекулярно-генетическом анализе.

В соответствии с утверждёнными клиническими рекомендациями пациентам с немелкоклеточным раком рекомендовано проведение молекулярно-генетического исследования мутаций в гене *EGFR* (19-й и 21-й экзоны). При выявлении активирующих мутаций гена *EGFR* рекомендуется назначение таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (гефитиниб или эрлотиниб, а также афатиниб или осимертиниб). При выявлении мутации EGFR T790M всем пациентам рекомендуется назначение осимертиниба.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций 19del, L858R и T790M гена *EGFR* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика, определение показаний к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб или осимертиниб) у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций гена *EGFR* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-EGFR-4R" по ТУ 21.20.23-006-57201404-2020» представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (36)".

2.2 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объем реагента	
			на 12 реакций	на 36 реакций
1	Зеленый	Контрольная ПЦР-смесь ¹	740 мкл	2*1100 мкл
2	Желтый	ПЦР-смесь L858R ¹	280 мкл	840 мкл
3	Желтый	ПЦР-смесь ex19del ¹	280 мкл	840 мкл
4	Желтый	ПЦР-смесь T790M ¹	280 мкл	840 мкл
5	Синий	Тaq ДНК-полимераза	25 мкл	65 мкл
6	Красный	ПКО ²	110 мкл	330 мкл
7	Белый	ОКО ³	1400 мкл	4000 мкл
8	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
9	Бесцветный	UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	9 мкл	27 мкл

¹) ПЦР-смеси не содержат Таq ДНК-полимеразу.

²) ПКО – положительный контрольный образец, содержащий смесь ДНК с фрагментами гена *EGFR* человека с мутациями L858R, c.2236_2250del, T790M и ДНК человека без мутаций гена *EGFR*.

³) ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

3 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в дублях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 16 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в дублях).

2.4 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов. Для определения мутаций L858R, T790 применяется метод аллель-специфичной ПЦР, для определения делеций в 19-м экзоне гена *EGFR* (19del) применяется метод ПЦР с подавлением амплификации ДНК дикого типа.

Набор содержит четыре смеси для ПЦР (таблица 1): контрольную ПЦР-смесь для амплификации константного фрагмента гена *EGFR* и три ПЦР-смеси для амплификации фрагментов гена *EGFR* с мутациями L858R, 19del и T790M. ПЦР-смеси состоят из всех необходимых реагентов за исключением Taq ДНК-полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

Для контроля работы набора в его состав входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит смесь ДНК с фрагментами гена *EGFR* человека с мутациями L858R, с.2236_2250del, T790M и ДНК человека без мутаций гена *EGFR*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

Анализ на наличие мутации в гене *EGFR* состоит из двух этапов:

- 1) проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР;
- 2) ПЦР на наличие мутаций в гене *EGFR*.

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки пригодности и выбора подходящего разведения образцов ДНК. Мишенью для контрольной ПЦР является константный участок ДНК гена *EGFR*. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором

АМ. Контрольная ПЦР-смесь также содержит реагенты для амплификации внутреннего контроля (ВК). Мишенью ПЦР ВК является синтетическая последовательность, не имеющая гомологии с геном человека. Продукты ПЦР ВК детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Амплификация ВК служит контролем правильности постановки и отсутствия ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Пригодность образца ДНК оценивают по величине C_t , соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором кривая флуоресценции пересекает заданный пороговый уровень. C_t разведений клинических образцов ДНК сравнивают с C_t ПКО. Для последующих ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину C_t относительно C_t ПКО.

На втором этапе ДНК с выбранными разведениями анализируют одновременно ещё раз в контрольной ПЦР и в трёх ПЦР на мутации гена *EGFR*. Продукты ПЦР гена *EGFR* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зондов, меченных флуорофором FAM.

В аллель-специфичных ПЦР с ПЦР-смесями L858R и T790M происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *EGFR*, содержащего соответствующую мутацию, за счёт использования праймеров, которые комплементарны последовательностям ДНК с соответствующими мутациями. ПЦР-смесь ex19del содержит реагенты для амплификации 19-го экзона гена *EGFR* и олигонуклеотид-блокеры. Олигонуклеотид-блокеры прочно связываются с ДНК гена *EGFR* без делеции в 19-м экзоне и подавляют амплификацию ДНК. Если в области 19-го экзона есть делеция, то блокеры не связываются и амплификация не подавляется. Список возможных делеций 19-го экзона, которые могут быть определены при помощи набора реагентов, приведён в приложении А.

В ПЦР с ПЦР-смесями L858R, ex19del и T790M величина C_t для образцов ДНК, содержащих ген *EGFR* дикого типа, на несколько циклов больше, чем величина C_t для образцов ДНК, содержащих ген *EGFR* с соответствующей мутацией. Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значениями C_t в ПЦР на соответствующую мутацию и в контрольной ПЦР.

8 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией L858R гена *EGFR* на фоне ДНК гена *EGFR* без мутаций, 5% ДНК с мутацией с.2236_2250del гена *EGFR* на фоне ДНК гена *EGFR* без мутаций, 5% ДНК с мутацией T790M гена *EGFR* на фоне ДНК гена *EGFR* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 40 мкл с концентрацией 0,2 нг/мкл (60 копий гена *EGFR* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутаций L858R, 19del, T790M в гене *EGFR* человека на фоне ДНК гена *EGFR* дикого типа, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *EGFR* без мутаций L858R, 19del и T790M. Аналитическая специфичность целевых участков гена *EGFR* подтверждена *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций гена *EGFR*. Содержание парафина на срезе от 65% до 80% не влияет на результаты определения мутаций гена *EGFR*.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций L858R, 19del, T790M гена *EGFR*. Значение повторяемости результатов при определении мутации L858R гена *EGFR*, мутации 19del гена *EGFR* и мутации T790M гена *EGFR* составило 100% (интервал 96,38-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций L858R,

19del, T790M гена *EGFR*. Значение воспроизводимости результатов при определении мутации L858R гена *EGFR*, мутации 19del гена *EGFR* и мутации T790M гена *EGFR* составило 100% (интервал 96,38-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций L858R, 19del, T790M гена *EGFR* в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 89,11-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций L858R, 19del, T790M гена *EGFR* в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 88,43-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *EGFR* оценивается по значению Ct в контрольной ПЦР. Если в этой реакции величина Ct образца превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, и результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *EGFR* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

1. Недостаточное количество клеток опухолевой ткани на срезе из-за несоблюдения рекомендаций по выделению ДНК из парафиновых блоков (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Дегградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация фермента Таq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).

3. Снижение чувствительности анализа из-за пропуска этапа обработки образцов ДНК урацил-ДНК-гликозилазой (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат).
4. Тестирование образцов ДНК без дублей, образец ДНК не добавлен в ПЦР-смесь из-за ошибки (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат).
5. Интерпретация не валидных результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат, ложноположительный результат).
6. Смещение сигналов флуоресценции из-за использования неверного значения для порогового уровня флуоресценции при анализе данных ПЦР (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только Taq ДНК-полимеразу, входящую в состав набора.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
15. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21. **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.
16. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Вортекс персональный V-1 plus (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия) или аналогичное оборудование.

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат типа "Драй-блок" TDB-120 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT ХМ-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия) или аналогичный.

Микроцентрифужные пробирки градуированные объёмом 0,6 мл и 1,5 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключённых в парафиновые блоки, зарегистрированный в РФ (например, «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, ООО «Номотек», Россия).

Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные («ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия) или аналогичные.

Пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 штук или плашки для ПЦР на 96 лунок («Корнинг Инк.», США) или аналогичные.

Штатив для пробирок, 80 ячеек и/или штатив для пробирок, 96 ячеек («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из фиксированной формалином и заключенной в парафин (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) опухолевой ткани. В набор не входят реагенты для выделения ДНК.

Для выделения ДНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемый набор: «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020. Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков приведены в приложении Б.

ВНИМАНИЕ! Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Выделенные образцы ДНК хранить с соблюдением условий согласно требованиям инструкции используемого набора для выделения ДНК и с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

8 Подготовка компонентов для анализа

8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой

Обработка урацил-ДНК-гликозилазой образцов ДНК, выделенных из FFPE опухолевой ткани, улучшает чувствительность и специфичность анализа на наличие соматических мутаций.

8.1.1 Разморозить ОКО (пробирка №7, белая крышка), 10x UDG буфер (пробирка №8, бесцветная крышка) и образцы ДНК, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

1.2 Приготовить UDG-смесь: добавить в пробирку объемом 1,5 мл ОКО, 10х UDG-буфер и UDG (пробирка №9, бесцветная крышка) и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Количество реагентов на один образец ДНК приведено в таблице 2, для тестирования N клинических образцов ДНК указанное количество необходимо умножить на (N+1).

Таблица 2. Состав UDG-смеси

Реагент	Количество на 1 образец ДНК
ОКО	5 мкл
10х UDG буфер	4 мкл
UDG (Урацил-ДНК-гликозилаза)	1 мкл

8.1.3 Добавить в пробирки объемом 1,5 мл по 10 мкл UDG-смеси, по 40 мкл образцов ДНК и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Центрифугировать в течение 3 секунд на микроцентрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

Поместить пробирки в термостат и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C. После этого прогреть в течение 5 минут при температуре 95°C, чтобы инактивировать UDG, и центрифугировать в течение 3 секунд. ДНК, обработанную UDG, хранить не более суток при температуре 4°C или в течение 6 месяцев при температуре минус 20°C.

8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений

Необходимая степень разведения образцов ДНК зависит от количества ткани, взятой для выделения ДНК, и от концентрации ингибирующих примесей. При использовании рекомендаций по выделению ДНК (Приложение Б) для большинства образцов достаточно разведение в 5-20 раз, поэтому сначала рекомендуется тестировать все образцы в разведениях 1/5 и 1/20.

8.2.1 Приготовить две микропробирки объемом 1,5 мл для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1/5» и «1/20» соответственно.

8.2.2 В каждую пробирку добавить ОКО и образец ДНК согласно таблице 3.

Таблица 3. Разведение образцов ДНК

Разведение	Количество ДНК	Количество ОКО
1/5	30 мкл	120 мкл
1/20	10 мкл	190 мкл

8.2.3 Перемешать на вортексе в течение 2-3 сек, центрифугировать в течение 5-10 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Разведенную ДНК хранить не более суток при температуре 4°C или не более 6 месяцев при температуре минус 20°C.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка контрольной ПЦР

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Таq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях указанное количество необходимо умножить на $(4N + 5)$.

Таблица 4. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Таq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №6, красная крышка) и ОКО (пробирка №7, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что раствор полностью растаял. Содержимое пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки.

9.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси, добавить Таq ДНК-полимеразу (пробирка №5, синяя крышка) и тщательно перемешать пипетированием (не использовать вортекс). Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси и Таq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

9.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения шести клинических образцов ДНК и контрольных образцов в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведён на рисунке 1.

Разведение	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
1:5	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
1:20	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		
	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК в двух разведениях в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и разведение (1:5; 1:20).

9.1.5 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой и закрыть крышки.

9.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.1.7 Легко перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.2 Программирование и запуск термоциклера

9.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров	58°C	40 сек	
35	Денатурация	95°C	15 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	40 сек	

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *EGFR*.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР

9.3.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (C_t) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин C_t использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 100.

Примечание: экспоненциальная фаза соответствует линейному участку на графике кривой флуоресценции в логарифмической шкале.

9.3.2 Проверить величины C_t по каналам FAM и ROX для ПКО и ОКО (таблица 6, раздел таблицы «ПЦР с контрольной смесью»). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *EGFR* только в том случае, если величины C_t для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение $C_{t_{ROX}}$ меньше или равно QC_{ROX} ;
- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение $C_{t_{FAM}}$ либо $C_{t_{FAM}}$ больше $C_{t_{ПКО}}+6$ ($C_{t_{ПКО}}$ – C_t ПКО в контрольной ПЦР);
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равно QC_{FAM} (контрольная ПЦР).

величины QC_{ROX} и QC_{FAM} указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте. Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

9.3.3 Сравнить величины Ct по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов (Ct_C) и Ct ПКО ($Ct_{ПКО}$). Для проведения следующих ПЦР выбрать разведение образца, имеющее значение Ct_C , наиболее близкое к $Ct_{ПКО}$.

9.3.4 Если значение Ct_C определяется в диапазоне $Ct_{ПКО}-4 \leq Ct_C \leq Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*.

9.3.5 Если значение Ct_C меньше $Ct_{ПКО}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Ct на 1 цикл, и повторить анализ.

9.3.6 Если значение Ct_C больше $Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

9.4 Постановка контрольной ПЦР и ПЦР на мутации гена *EGFR*

9.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на $(2N + 5)$.

9.4.2 Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПЦР-смесь L858R (пробирка №2, жёлтая крышка), ПЦР-смесь ex19del (пробирка №3, жёлтая крышка), ПЦР-смесь T790M1 (пробирка №4, жёлтая крышка), ПКО (пробирка №6, красная крышка) и ОКО (пробирка №7, белая крышка), убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.4.3 Промаркировать четыре чистые пробирки объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 контрольную ПЦР-смесь, в пробирку №2 – ПЦР смесь L858R, в пробирку №3 – ПЦР-смесь ex19del, в пробирку №4 – ПЦР-смесь T790M. Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу. Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс) и центрифугировать 5 сек в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходных

ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

9.4.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 2.

ПЦР-смесь	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
Контрольная	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
L858R	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
ex19del	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
T790M1	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 2. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны ПЦР-смеси, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

9.4.5 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.4.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл разведённых клинических образцов ДНК, используя оптимальные разведения, определённые на этапе контрольной ПЦР;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.4.7 Перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.4.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.4.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

Программирование и запуск термоциклера

3.1 Программирование и запуск прибора проводить в соответствии с руководством по эксплуатации, п. 9.2.2-9.2.4 и таблицей 5.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для получения величин C_t использовать логарифмическую шкалу графика флуоресценции и выставить пороговый уровень как описано в разделе 9.3.1.

10.1.2 Проверить значения C_t по каналам ROX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *EGFR* только в том случае, если величины C_t для ОКО, ПКО имеют допустимые значения (таблица 6):

- для ОКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение C_{tROX} меньше или равно Q_{CROX} ;
- для ОКО во всех ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение C_{tFAM} либо значение C_{tFAM} больше $C_{tПКО}+6$ ($C_{tПКО} - C_t$ ПКО в этой же постановке ПЦР);
- для ПКО во всех ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяются значения $C_{tПКО}$ меньше или равные значениям Q_{CFAM} для этих ПЦР-смесей.

Таблица 6. Допустимые значения C_t для контрольных образцов

ПЦР	Допустимое значение C_t для образца	
	ОКО	ПКО
Контрольная ПЦР	$C_{tROX} \leq Q_{CROX}^1$ C_{tFAM} не определено или $C_{tFAM} > C_{tПКО}+6$	$C_{tFAM} \leq Q_{CFAM}$ (контрольная ПЦР) ¹
ПЦР на мутацию L858R	C_{tFAM} не определено или $C_{tFAM} > C_{tПКО}+6$	$C_{tFAM} \leq Q_{CFAM}$ (ПЦР L858R) ¹
ПЦР на мутацию 19del	C_{tFAM} не определено или $C_{tFAM} > C_{tПКО}+6$	$C_{tFAM} \leq Q_{CFAM}$ (ПЦР ex19del) ¹
ПЦР на мутацию T790M	C_{tFAM} не определено или $C_{tFAM} > C_{tПКО}+6$	$C_{tFAM} \leq Q_{CFAM}$ (ПЦР T790M) ¹

¹⁾ Значение Q_{CROX} и значения Q_{CFAM} для каждой ПЦР указаны на упаковке набора

агентов и в паспорте.

$Ct_{пко}$ – значение Ct ПКО в этой же постановке ПЦР.

10.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 7.

Таблица 7. Другие возможные значения Ct для контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	Значение Ct_{FAM}	Возможные проблемы
Контрольная ПЦР		
ОКО	$Ct_{ROX} > Q_{C_{ROX}}$	Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
	$Ct_{FAM} \leq Ct_{пко} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{FAM} > Q_{C_{FAM}}$ (контрольная ПЦР)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР смеси и/или деградация ПКО.
ПЦР на мутации L858R, 19del, T790M		
ОКО	$Ct_{FAM} \leq Ct_{пко} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{FAM} > Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР L858R) $Ct_{FAM} > Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР ex19del) $Ct_{FAM} > Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР T790M)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР смеси и/или деградация ПКО.

10.1.5 Для каждого клинического образца в контрольной ПЦР должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяться значение Ct (Ct_C).

10.1.6 Если значение Ct_C определяется в диапазоне $Ct_{пко} - 4 \leq Ct_C \leq Ct_{пко} + 4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*.

10.1.7 Если значение Ct_C меньше $Ct_{пко} - 4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Ct на 1 цикл, и повторить анализ.

10.1.8 Если значение Ct_C больше $Ct_{пко} + 4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций в гене *EGFR*

10.2.1 Для каждого клинического образца для каждой мутации рассчитать разницу $\Delta Ct = Ct_M - Ct_C$, где Ct_M – Ct образца в ПЦР со смесью, соответствующей мутации, Ct_C – Ct образца в контрольной ПЦР. Рекомендации по расчёту ΔCt в программе «MS Office Excel» приведены в приложении В.

10.2 Сравнить значения ΔC_t клинических образцов ДНК со значениями точек течения (ТО) для каждой мутации. Значения ТО для каждой мутации указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

10.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *EGFR*), если для обоих дублей значение ΔC_t меньше или равно значению ТО для этой мутации.

10.2.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *EGFR* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей ΔC_t больше ТО, или если значения C_{tM} образца не определены или для одного из дублей значение ΔC_t больше ТО, а для другого – значение C_{tM} не определено.

10.2.5 Если для одного из дублей значение ΔC_t меньше или равно ТО, а для другого ΔC_t больше ТО, то результат считают сомнительным и анализ повторяют. Если в повторном анализе получают сомнительный результат, то проводят макродиссекцию участков опухоли из срезов FFPE опухолевой ткани так, чтобы содержание опухолевых клеток было не менее 50%, выделяют ДНК и повторяют анализ.

11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

11.1 Условия хранения

11.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°C – не более 30 минут.

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°C.

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

12 Гарантийные обязательства

12.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

12.2 Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

12.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: +7 (383) 209-32-40

Электронная почта: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014. / D. Morgensztern, M. J. Campo, S. E. Dahlberg, et al. // J Thorac Oncol. – 2015 – Vol. 10 (1 Suppl 1). – P. S1-63. – DOI:10.1097/JTO.0000000000000405.
2. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. / J. C. Soria, Y. Ohe, J. Vansteenkiste, et al. // N Engl J Med. – 2018. – Vol. 378 (2). – P. 113-125. – DOI: 10.1056/NEJMoal713137
3. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. / K. M. Kerr, L. Bubendorf, M. J. Edelman, et al. // Ann Oncol. – 2014. Vol. 25 (9). – P. 1681-1690. – DOI: 10.1093/annonc/mdu145
4. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update / G. P. Kalemkerian, N. Narula, E. B. Kennedy, et al. // J Clin Oncol. – 2018. – Vol. 36 (9). – P. 911-919. – DOI: 10.1200/JCO.2017.76.7293
5. Клинические рекомендации. Злокачественное новообразование бронхов и лёгкого. / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» // Год утверждения (частота пересмотра): 2021.

Приложение А (справочное) Список делеций в 19-м экзоне гена *EGFR* согласно базе данных COSMIC, которые могут быть выявлены с помощью набора реагентов

Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
c.2233_2247del	p.K745_E749del	26038
c.2234_2235insAACTCCCGTCGCTATCAA	p.K745_E746insTPVAIK	255152
c.2234_2248del	p.K745_A750delinsT	1190791
c.2235_2236del	p.E746Ifs*16	9869973
c.2235_2237del	p.E746del	18420
c.2235_2246del	p.E746_E749del	28517
c.2235_2248delinsAATTC	p.E746_A750delinsIP	13550
c.2235_2249del	p.E746_A750del	6223
c.2235_2251delinsAATTC	p.E746_T751delinsIP	13552
c.2235_2251delinsAG	p.E746_T751delinsA	13549
c.2235_2252del	p.E746_T751del	24869
c.2235_2252delinsAAT	p.E746_T751delinsI	13551
c.2235_2255delinsAAT	p.E746_S752delinsI	12385
c.2236_2241delinsAATTAT	p.E746_L747delinsNY	3727812
c.2236_2248delinsAGAC	p.E746_A750delinsRP	12413
c.2236_2248delinsCAAC	p.E746_A750delinsQP	13557
c.2236_2250del	p.E746_A750del	6225
c.2236_2251delinsT	p.E746_T751delinsS	26513
c.2236_2252delinsAT	p.E746_T751delinsI	26680
c.2236_2252delinsCA	p.E746_T751delinsQ	22999
c.2236_2252delinsCT	p.E746_T751delinsL	51502
c.2236_2253del	p.E746_T751del	12728
c.2236_2253delinsATTCCT	p.E746_T751delinsIP	51526
c.2236_2255delinsAT	p.E746_S752delinsI	133188
c.2236_2256del	p.E746_S752del	133189
c.2236_2256delinsATC	p.E746_S752delinsI	133190
c.2236_2257delinsATCT	p.E746_P753delinsIS	133191
c.2236_2257delinsCTCT	p.E746_P753delinsLS	13200

Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
c.2237_2238inv	p.E746V	51497
c.2237_2250delinsTCCCT	p.E746_A750delinsVP	28623
c.2237_2251del	p.E746_T751delinsA	12678
c.2237_2251delinsTGG	p.E746_T751delinsVA	53205
c.2237_2251delinsTTC	p.E746_T751delinsVP	18421
c.2237_2252delinsT	p.E746_T751delinsV	12386
c.2237_2253delinsTC	p.E746_T751delinsV	133193
c.2237_2253delinsTTCCT	p.E746_T751delinsVP	52935
c.2237_2253delinsTTGCT	p.E746_T751delinsVA	12416
c.2237_2254del	p.E746_S752delinsA	12367
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	133194
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384
c.2237_2256delinsTC	p.E746_S752delinsV	18426
c.2237_2256delinsTG	p.E746_S752delinsV	674057
c.2237_2257delinsTCT	p.E746_P753delinsVS	18427
c.2237_2258delinsTTCA	p.E746_P753delinsVQ	51524
c.2238_2247del	p.L747Qfs*16	6978341
c.2238_2248delinsGC	p.L747_A750delinsP	12422
c.2238_2248delinsTC	p.E746_A750delinsDP	18428
c.2238_2251delinsGC	p.L747_T751delinsP	22944
c.2238_2252delinsGCA	p.L747_T751delinsQ	12419
c.2238_2255del	p.E746_S752delinsD	6220
c.2238_2255delinsGCAACA	p.L747_S752delinsQH	12421
c.2238_2256delinsGCAA	p.L747_S752delinsQ	26441
c.2238_2258del	p.L747_P753del	255211
c.2239_2247del	p.L747_E749del	6218
c.2239_2247delinsC	p.L747Rfs*13	6952818
c.2239_2248delinsC	p.L747_A750delinsP	12382
c.2239_2250del	p.L747_A750del	9179903
c.2239_2251delinsC	p.L747_T751delinsP	12383
c.2239_2252delinsCA	p.L747_T751delinsQ	12420

Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
c.2239_2253delinsGCT	p.L747_T751delinsA	23572
c.2239_2255delinsCAACA	p.L747_S752delinsQH	133196
c.2239_2256del	p.L747_S752del	6255
c.2239_2256delinsCAA	p.L747_S752delinsQ	12403
c.2239_2258delinsCA	p.L747_P753delinsQ	12387
c.2239_2262del	p.L747_K754del	24970
c.2239_2264delinsGCCAA	p.L747_A755delinsAN	85891
c.2239_2264delinsGGAG	p.L747Gfs*12	10001753
c.2240_2248del	p.L747_A750delinsS	4170221
c.2240_2251del	p.L747_T751delinsS	6210
c.2240_2254del	p.L747_T751del	23571
c.2240_2254del	p.L747_T751del	12369
c.2240_2257del	p.L747_P753delinsS	133197
c.2240_2257del	p.L747_P753delinsS	12370
c.2240_2261delinsCGAC	p.L747_K754delinsST	20883
c.2241_2244delinsCCCG	p.L747_R748delinsFP	18442
c.2241_2256del	p.L747Ffs*14	9869974

Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков

Для выделения ДНК из FFPE блоков излишки парафина обрезать скальпелем и приготовить серийные срезы толщиной 5 микрон с площадью ткани на срезе 25-80 мм². Если поверхность блока была длительное время экспонирована на воздухе, то первые 2-3 среза отбросить, а последующие пять использовать для выделения ДНК.

Первый или последний рабочие срезы серии окрасить гематоксилин-эозином, после чего патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток. Если на срезе менее 30% опухолевых клеток, то провести макродиссекцию. Рабочие срезы поместить в пробирку объемом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного на территории РФ.

Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». На рисунке Б1 приведён пример расчёта ΔCt .

В столбце «Target» ввести «Контроль» в ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, ввести названия ПЦР-смесей в ячейки, соответствующие ПЦР с этими смесями (рисунок Б1, элемент 1). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец «Ct_c», где Ct_c – Ct образца в контрольной ПЦР (рисунок Б1, элемент 4). Значения Ct в контрольной ПЦР скопировать в столбец «Cq» (рисунок Б1, элемент 3) и вставить в столбец «Ct_c» (рисунок Б1, элемент 4), таким образом, чтобы значения Cq и Ct_c для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец « ΔCt ». Используя функцию вычитания, для каждого образца для каждой мутации рассчитать разницу $\Delta Ct = Cq - Ct_c$ (рисунок Б1, элемент 5), что соответствует $\Delta Ct = Ct_{AS} - Ct_c$.

Добавить столбец «ТО», внести значения ТО для каждой мутации, указанные на упаковке набора (рисунок Б1, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значениями ТО для каждой мутации и записать результат (рисунок Б1, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *EGFR*), если для обеих дублей значение ΔCt меньше или равно значению ТО для этой мутации.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *EGFR* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обеих дублей ΔCt больше ТО, или если значения Ct_м образца не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше ТО, а для другого – значение Ct_м не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно ТО, а для другого ΔCt больше ТО, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

1 Target	Content	2 Sample	3 Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	4 CtC	5 ΔCt	6 TO	7 Результат
контроль	Unkn-04	ДНК38	19,97	20,05	0,121				
контроль	Unkn-04	ДНК38	20,14	20,05	0,121				
контроль	Unkn-05	ДНК39	20,41	20,43	0,036				
контроль	Unkn-05	ДНК39	20,46	20,43	0,036				
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,00	0,000				
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,00	0,000				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17,59	17,48	0,150				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17,38	17,48	0,150				
L858R	Unkn-16	ДНК38	29,44	29,86	0,593	19,97	9,47	6,0	отрицательный
L858R	Unkn-16	ДНК38	30,28	29,86	0,593	20,14	10,14	6,0	отрицательный
L858R	Unkn-17	ДНК39	24,17	24,13	0,057	20,41	3,77	6,0	положительный
L858R	Unkn-17	ДНК39	24,09	24,13	0,057	20,46	3,64	6,0	положительный
L858R	NTC-03	ОКО	nd	0,00	0,000				
L858R	NTC-03	ОКО	nd	0,00	0,000				
L858R	Pos Ctrl-03	ПКО	23,09	23,17	0,115				
L858R	Pos Ctrl-03	ПКО	23,25	23,17	0,115				
ex19del	Unkn-10	ДНК38	31,22	31,13	0,129	19,97	11,25	5,0	отрицательный
ex19del	Unkn-10	ДНК38	31,04	31,13	0,129	20,14	10,90	5,0	отрицательный
ex19del	Unkn-11	ДНК39	31,42	31,67	0,354	20,41	11,01	5,0	отрицательный
ex19del	Unkn-11	ДНК39	31,92	31,67	0,354	20,46	11,46	5,0	отрицательный
ex19del	NTC-02	ОКО	nd	0,00	0,000				
ex19del	NTC-02	ОКО	nd	0,00	0,000				
ex19del	Pos Ctrl-02	ПКО	22,19	22,09	0,143				
ex19del	Pos Ctrl-02	ПКО	21,99	22,09	0,143				
T790M	Unkn-22	ДНК38	nd	0,00	0,000	19,97	#ЗНАЧИ	9,0	отрицательный
T790M	Unkn-22	ДНК38	nd	0,00	0,000	20,14	#ЗНАЧИ	9,0	отрицательный
T790M	Unkn-23	ДНК39	nd	0,00	0,000	20,41	#ЗНАЧИ	9,0	отрицательный
T790M	Unkn-23	ДНК39	nd	0,00	0,000	20,46	#ЗНАЧИ	9,0	отрицательный
T790M	NTC-04	ОКО	nd	0,00	0,000				
T790M	NTC-04	ОКО	28,94	28,94	0,000				
T790M	Pos Ctrl-04	ПКО	22,55	22,58	0,040				
T790M	Pos Ctrl-04	ПКО	22,61	22,58	0,040				

Рисунок Б1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

1 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, с ПЦР-смесью L858R, ПЦР-смесью ex19del, ПЦР-смесью T790M.

2 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

3 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct образцов в контрольной ПЦР.

4 – столбец CtC, в который вставлены значения Ct из столбца «Cq».

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Cq - CtC$.

6 – значения TO для мутаций L858R, 19del и T790M (на упаковке набора и в паспорте).

7 – результат анализа на наличие мутаций в гене EGFR.

Cq Mean – среднее значение Cq для образца,

Cq Std. Dev – среднеквадратическое отклонение значения Cq для образца.

Значения C_q Mean и C_q Std. Dev не используются при расчётах.

nd – значение не определено, #ЗНАЧ! – ошибка в значении.

В приведённом на рисунке Б1 примере $TO_{L858R} = 6,0$, $TO_{19del} = 5,0$, $TO_{T790M} = 9,0$.

Образец ДНК38 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутаций в гене *EGFR* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью L858R значения ΔC_t составляют 9,47 и 10,14 (больше $TO = 6,0$), в ПЦР со смесью ex19del значения ΔC_t составляют 11,25 и 10,90 (больше $TO = 5,0$), в ПЦР со смесью T790M значения ΔC_t не определены.

Образец ДНК39 учитывается как положительный, содержащий мутацию L858R, так как в ПЦР со смесью L858R значения ΔC_t составляют 3,77 и 3,64 (для обоих дублей меньше $TO = 6,0$).

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

« 29 » сентября 2022 г.

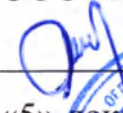




УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БиоЛинк»

 Корниенко А.А.
«5» декабря 2022 г.



**Набор реагентов для выявления мутаций гена *EGFR*
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени
"Real-time-PCR-EGFR-4R"
по ТУ 21.20.23-006-57201404-2020
ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

Содержание

Введение	3
1 Назначение набора	3
2 Характеристика набора	4
2.1 Варианты исполнения	4
2.2 Состав набора реагентов	4
2.3 Число анализируемых проб	5
2.4 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	7
3.1 Предел обнаружения	7
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ	7
3.3 Характеристики аналитической эффективности	7
3.4 Диагностическая специфичность	8
3.5 Диагностическая чувствительность	8
3.6 Ограничения при применении	8
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа	8
4 Риски, связанные с применением набора реагентов	8
5 Меры предосторожности	9
6 Оборудование и материалы	11
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	11
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	11
7 Анализируемые пробы	12
8 Подготовка компонентов для анализа	12
8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой	12
8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений	13
9 Проведение анализа	14
9.1 Постановка контрольной ПЦР	14
9.2 Программирование и запуск термоциклера	15
9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР	16
9.4 Постановка контрольной ПЦР и ПЦР на мутации гена <i>EGFR</i>	17
9.5 Программирование и запуск термоциклера	19
10 Анализ результатов	19
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	19
10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций в гене <i>EGFR</i>	20

Условия хранения, транспортирования и эксплуатации.....	21
11.1 Условия хранения.....	21
11.2 Условия транспортирования	21
11.3 Условия эксплуатации	22
12 Гарантийные обязательства.....	22
13 Маркировка	23
Библиография.....	24
Приложение А (справочное) Список делеций в 19-м экзоне гена <i>EGFR</i> согласно базе данных COSMIC, которые могут быть выявлены с помощью набора реагентов	25
Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков	28
Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»	29

Введение

Рецептор эпидермального фактора роста EGFR (также называемый HER1, ErbB-1) играет важную роль в пролиферации эпителиальных клеток. При связывании рецептора EGFR с факторами роста происходит его активация и передача сигнала на внутриклеточный домен, обладающий тирозинкиназной активностью.

У пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого (НМКРЛ) в 15-40% случаев обнаруживаются активирующие соматические мутации в гене *EGFR*. Подавляющее большинство таких мутаций составляют делеции в 19-м экзоне (del19) и замена L858R в 21-м экзоне гена *EGFR*. Наличие этих мутаций ассоциировано с чувствительностью опухоли к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб, осимертиниб). Мутация T790M является наиболее частой причиной возникновения устойчивости к ингибиторам тирозинкиназы и выявляется примерно в 50% случаев у пациентов после проведения таргетной терапии. У некоторых пациентов с НМКРЛ (1-2%) мутация T790M может быть обнаружена при первичном молекулярно-генетическом анализе.

В соответствии с утверждёнными клиническими рекомендациями пациентам с немелкоклеточным раком рекомендовано проведение молекулярно-генетического исследования мутаций в гене *EGFR* (19-й и 21-й экзоны). При выявлении активирующих мутаций гена *EGFR* рекомендуется назначение таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (гефитиниб или эрлотиниб, а также афатиниб или осимертиниб). При выявлении мутации EGFR T790M всем пациентам рекомендуется назначение осимертиниба.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций 19del, L858R и T790M гена *EGFR* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика, определение показаний к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб или осимертиниб) у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого. Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций гена *EGFR* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-EGFR-4R" по ТУ 21.20.23-006-57201404-2020» представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (36)".

2.2 Состав набора реагентов

Набор содержит пробирки с реагентами (таблица 1), инструкцию по применению и паспорт качества.

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакций	на 36 реакций
1	Зеленый	Контрольная ПЦР-смесь ¹	740 мкл	2*1100 мкл
2	Желтый	ПЦР-смесь L858R ¹	280 мкл	840 мкл
3	Желтый	ПЦР-смесь ex19del ¹	280 мкл	840 мкл
4	Желтый	ПЦР-смесь T790M ¹	280 мкл	840 мкл
5	Синий	Тaq ДНК-полимераза	25 мкл	65 мкл
6	Красный	ПКО ²	110 мкл	330 мкл
7	Белый	ОКО ³	1400 мкл	4000 мкл
8	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
9	Бесцветный	UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	9 мкл	27 мкл

¹) ПЦР-смеси не содержат Таq ДНК-полимеразу.

²) ПКО – положительный контрольный образец, содержащий смесь ДНК с фрагментами гена *EGFR* человека с мутациями L858R, c.2236_2250del, T790M и ДНК человека без мутаций гена *EGFR*.

³) ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

3 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в дублях).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-EGFR-4R (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 16 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в дублях).

2.4 Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов. Для определения мутаций L858R, T790 применяется метод аллель-специфичной ПЦР, для определения делеций в 19-м экзоне гена *EGFR* (19del) применяется метод ПЦР с подавлением амплификации ДНК дикого типа.

Набор содержит четыре смеси для ПЦР (таблица 1): контрольную ПЦР-смесь для амплификации константного фрагмента гена *EGFR* и три ПЦР-смеси для амплификации фрагментов гена *EGFR* с мутациями L858R, 19del и T790M. ПЦР-смеси состоят из всех необходимых реагентов за исключением Taq ДНК-полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

Для контроля работы набора в его состав входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит смесь ДНК с фрагментами гена *EGFR* человека с мутациями L858R, с.2236_2250del, T790M и ДНК человека без мутаций гена *EGFR*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Все исследуемые и контрольные образцы тестируют в дублях.

Анализ на наличие мутации в гене *EGFR* состоит из двух этапов:

- 1) проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР;
- 2) ПЦР на наличие мутаций в гене *EGFR*.

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки пригодности и выбора подходящего разведения образцов ДНК. Мишенью для контрольной ПЦР является константный участок ДНК гена *EGFR*. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором

М. Контрольная ПЦР-смесь также содержит реагенты для амплификации внутреннего контроля (ВК). Мишенью ПЦР ВК является синтетическая последовательность, не имеющая гомологии с геном человека. Продукты ПЦР ВК детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Амплификация ВК служит контролем правильности постановки и отсутствия ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Пригодность образца ДНК оценивают по величине Ct, соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором кривая флуоресценции пересекает заданный пороговый уровень. Ct разведений клинических образцов ДНК сравнивают с Ct ПКО. Для последующих ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину Ct относительно Ct ПКО.

На втором этапе ДНК с выбранными разведениями анализируют одновременно ещё раз в контрольной ПЦР и в трёх ПЦР на мутации гена *EGFR*. Продукты ПЦР гена *EGFR* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зондов, меченных флуорофором FAM.

В аллель-специфичных ПЦР с ПЦР-смесями L858R и T790M происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *EGFR*, содержащего соответствующую мутацию, за счёт использования праймеров, которые комплементарны последовательностям ДНК с соответствующими мутациями. ПЦР-смесь ex19del содержит реагенты для амплификации 19-го экзона гена *EGFR* и олигонуклеотид-блокатор. Олигонуклеотид-блокатор прочно связывается с ДНК гена *EGFR* без делеции в 19-м экзоне и подавляет амплификацию ДНК. Если в области 19-го экзона есть делеция, то блокатор не связывается и амплификация не подавляется. Список возможных делеций 19-го экзона, которые могут быть определены при помощи набора реагентов, приведён в приложении А.

В ПЦР с ПЦР-смесями L858R, ex19del и T790M величина Ct для образцов ДНК, содержащих ген *EGFR* дикого типа, на несколько циклов больше, чем величина Ct для образцов ДНК, содержащих ген *EGFR* с соответствующей мутацией. Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значениями Ct в ПЦР на соответствующую мутацию и в контрольной ПЦР.

Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией L858R гена *EGFR* на фоне ДНК гена *EGFR* без мутаций, 5% ДНК с мутацией с.2236_2250del гена *EGFR* на фоне ДНК гена *EGFR* без мутаций, 5% ДНК с мутацией T790M гена *EGFR* на фоне ДНК гена *EGFR* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 40 мкл с концентрацией 0,2 нг/мкл (60 копий гена *EGFR* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутаций L858R, 19del, T790M в гене *EGFR* человека на фоне ДНК гена *EGFR* дикого типа, что обеспечивается с помощью специфически подобранных праймеров и зондов, проверенных на контрольных образцах.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *EGFR* без мутаций L858R, 19del и T790M. Аналитическая специфичность целевых участков гена *EGFR* подтверждена *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций гена *EGFR*. Содержание парафина на срезе от 65% до 80% не влияет на результаты определения мутаций гена *EGFR*.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций L858R, 19del, T790M гена *EGFR*. Значение повторяемости результатов при определении мутации L858R гена *EGFR*, мутации 19del гена *EGFR* и мутации T790M гена *EGFR* составило 100% (интервал 96,38-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций L858R,

del, T790M гена *EGFR*. Значение воспроизводимости результатов при определении мутации L858R гена *EGFR*, мутации 19del гена *EGFR* и мутации T790M гена *EGFR* составило 100% (интервал 96,38-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций L858R, 19del, T790M гена *EGFR* в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 89,11-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций L858R, 19del, T790M гена *EGFR* в клинических испытаниях на выборке из 62 образцов составила 100% (интервал 88,43-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *EGFR* оценивается по значению Ct в контрольной ПЦР. Если в этой реакции величина Ct образца превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, и результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *EGFR* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

1. Недостаточное количество клеток опухолевой ткани на срезе из-за несоблюдения рекомендаций по выделению ДНК из парафиновых блоков (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Деградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инаktivация фермента Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).

3. Снижение чувствительности анализа из-за пропуска этапа обработки образцов ДНК урицил-ДНК-гликозилазой (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат).
4. Тестирование образцов ДНК без дублей, образец ДНК не добавлен в ПЦР-смесь из-за ошибки (возможный вред: отсутствие результата, ложноотрицательный результат).
5. Интерпретация не валидных результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат, ложноположительный результат).
6. Смещение сигналов флуоресценции из-за использования неверного значения для порогового уровня флуоресценции при анализе данных ПЦР (возможный вред: ложноотрицательный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только Taq ДНК-полимеразу, входящую в состав набора.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».
15. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21. **ВНИМАНИЕ!** При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, реагентов и оборудования.
16. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С." (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) или аналогичное оборудование.

Вортекс персональный V-1 plus (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия) или аналогичное оборудование.

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат типа "Драй-блок" TDB-120 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: «C1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) («Био-Рад Лабораториз, Инк.», США).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT XM-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

Центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (ООО «Биосан», Латвия) или аналогичное оборудование.

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия) или аналогичный.

Микроцентрифужные пробирки градуированные объёмом 0,6 мл и 1,5 мл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключённых в парафиновые блоки, зарегистрированный в РФ (например, «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, ООО «Номотек», Россия).

Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объёмом от 0,1 мкл до 1000 мкл («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные («ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия) или аналогичные.

Пробирки объёмом 0,2 мл в стрипах по 8 штук или плашки для ПЦР на 96 лунок («Корнинг Инк.», США) или аналогичные.

Штатив для пробирок, 80 ячеек и/или штатив для пробирок, 96 ячеек («Эксиджен, Инк.», США) или аналогичные.

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из фиксированной формалином и заключенной в парафин (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) опухолевой ткани. В набор не входят реагенты для выделения ДНК.

Для выделения ДНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемый набор: «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020. Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков приведены в приложении Б.

ВНИМАНИЕ! Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

Выделенные образцы ДНК хранить с соблюдением условий согласно требованиям инструкции используемого набора для выделения ДНК и с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

8 Подготовка компонентов для анализа

8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой

Обработка урацил-ДНК-гликозилазой образцов ДНК, выделенных из FFPE опухолевой ткани, улучшает чувствительность и специфичность анализа на наличие соматических мутаций.

8.1.1 Разморозить ОКО (пробирка №7, белая крышка), 10x UDG буфер (пробирка №8, бесцветная крышка) и образцы ДНК, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.2 Приготовить UDG-смесь: добавить в пробирку объемом 1,5 мл ОКО, 10х UDG буфер и UDG (пробирка №9, бесцветная крышка) и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Количество реагентов на один образец ДНК приведено в таблице 2, для тестирования N клинических образцов ДНК указанное количество необходимо умножить на (N+1).

Таблица 2. Состав UDG-смеси

Реагент	Количество на 1 образец ДНК
ОКО	5 мкл
10х UDG буфер	4 мкл
UDG (Урацил-ДНК-гликозилаза)	1 мкл

8.1.3 Добавить в пробирки объемом 1,5 мл по 10 мкл UDG-смеси, по 40 мкл образцов ДНК и перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс). Центрифугировать в течение 3 секунд на микроцентрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

Поместить пробирки в термостат и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C. После этого прогреть в течение 5 минут при температуре 95°C, чтобы инактивировать UDG, и центрифугировать в течение 3 секунд. ДНК, обработанную UDG, хранить не более суток при температуре 4°C или в течение 6 месяцев при температуре минус 20°C.

8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений

Необходимая степень разведения образцов ДНК зависит от количества ткани, взятой для выделения ДНК, и от концентрации ингибирующих примесей. При использовании рекомендаций по выделению ДНК (Приложение Б) для большинства образцов достаточно разведение в 5-20 раз, поэтому сначала рекомендуется тестировать все образцы в разведениях 1/5 и 1/20.

8.2.1 Приготовить две микропробирки объемом 1,5 мл для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1/5» и «1/20» соответственно.

8.2.2 В каждую пробирку добавить ОКО и образец ДНК согласно таблице 3.

Таблица 3. Разведение образцов ДНК

Разведение	Количество ДНК	Количество ОКО
1/5	30 мкл	120 мкл
1/20	10 мкл	190 мкл

8.2.3 Перемешать на вортексе в течение 2-3 сек, центрифугировать в течение 5-10 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Разведенную ДНК хранить не более суток при температуре 4°C или не более 6 месяцев при температуре минус 20°C.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка контрольной ПЦР

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях указанное количество необходимо умножить на $(4N + 5)$.

Таблица 4. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №6, красная крышка) и ОКО (пробирка №7, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что раствор полностью растаял. Содержимое пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки.

9.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 8.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси, добавить Taq ДНК-полимеразу (пробирка №5, синяя крышка) и тщательно перемешать пипетированием (не использовать вортекс). Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

9.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения шести клинических образцов ДНК и контрольных образцов в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведён на рисунке 1.



Разведение	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
1:5	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
1:20	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		
	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		

Рисунок 1. Схема расположения шести образцов ДНК в двух разведениях в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и разведение (1:5; 1:20).

9.1.5 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой и закрыть крышки.

9.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.1.7 Легко перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.2 Программирование и запуск термоциклера

9.2.1 Запрограммировать термоциклер для проведения ПЦР и детекции флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров	58°C	40 сек	
35	Денатурация	95°C	15 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	40 сек	

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *EGFR*.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР

9.3.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для каждого образца определить значение порогового цикла (Ct) – цикла амплификации, в котором кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговый уровень (threshold level). Для получения величин Ct использовать логарифмическую шкалу и выставить вручную пороговый уровень 100.

Примечание: экспоненциальная фаза соответствует линейному участку на графике кривой флуоресценции в логарифмической шкале.

9.3.2 Проверить величины Ct по каналам FAM и ROX для ПКО и ОКО (таблица 6, раздел таблицы «ПЦР с контрольной смесью»). Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *EGFR* только в том случае, если величины Ct для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Ct_{ROX} меньше или равно QC_{ROX} ;
- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение Ct_{FAM} либо Ct_{FAM} больше $Ct_{ПКО}+6$ ($Ct_{ПКО} - Ct_{ПКО}$ в контрольной ПЦР);
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение $Ct_{ПКО}$ меньше или равно QC_{FAM} (контрольная ПЦР).

значения QC_{ROX} и QC_{FAM} указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте. Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

9.3.3 Сравнить величины Ct по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов (Ct_C) и Ct ПКО ($Ct_{ПКО}$). Для проведения следующих ПЦР выбрать разведение образца, имеющее значение Ct_C , наиболее близкое к $Ct_{ПКО}$.

9.3.4 Если значение Ct_C определяется в диапазоне $Ct_{ПКО}-4 \leq Ct_C \leq Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*.

9.3.5 Если значение Ct_C меньше $Ct_{ПКО}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Ct на 1 цикл, и повторить анализ.

9.3.6 Если значение Ct_C больше $Ct_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

9.4 Постановка контрольной ПЦР и ПЦР на мутации гена *EGFR*

9.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 4, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на $(2N + 5)$.

9.4.2 Разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПЦР-смесь L858R (пробирка №2, жёлтая крышка), ПЦР-смесь ex19del (пробирка №3, жёлтая крышка), ПЦР-смесь T790M1 (пробирка №4, жёлтая крышка), ПКО (пробирка №6, красная крышка) и ОКО (пробирка №7, белая крышка), убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.4.3 Промаркировать четыре чистые пробирки объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 контрольную ПЦР-смесь, в пробирку №2 – ПЦР смесь L858R, в пробирку №3 – ПЦР-смесь ex19del, в пробирку №4 – ПЦР-смесь T790M. Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу. Перемешать пипетированием 8-10 раз (не использовать вортекс) и центрифугировать 5 сек в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходных

ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

9.4.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 2.

ПЦР-смесь	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
Контрольная	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
L858R	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
ex19del	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
T790M1	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 2. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок.

Указаны ПЦР-смеси, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

9.4.5 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.4.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл разведённых клинических образцов ДНК, используя оптимальные разведения, определённые на этапе контрольной ПЦР;
- по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;
- по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

Каждую пробирку открывать перед добавлением образца и закрывать сразу после добавления.

9.4.7 Перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.4.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.4.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

Программирование и запуск термоциклера

3.1 Программирование и запуск прибора проводить в соответствии с руководством по эксплуатации, п. 9.2.2-9.2.4 и таблицей 5.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для получения величин C_t использовать логарифмическую шкалу графика флуоресценции и выставить пороговый уровень как описано в разделе 9.3.1.

10.1.2 Проверить значения C_t по каналам ROX и FAM последовательно для ОКО, ПКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *EGFR* только в том случае, если величины C_t для ОКО, ПКО имеют допустимые значения (таблица 6):

- для ОКО в контрольной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение $C_{t_{ROX}}$ меньше или равно $Q_{C_{ROX}}$;
- для ОКО во всех ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение $C_{t_{FAM}}$ либо значение $C_{t_{FAM}}$ больше $C_{t_{ПКО}}+6$ ($C_{t_{ПКО}} - C_t$ ПКО в этой же постановке ПЦР);
- для ПКО во всех ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяются значения $C_{t_{ПКО}}$ меньше или равные значениям $Q_{C_{FAM}}$ для этих ПЦР-смесей.

Таблица 6. Допустимые значения C_t для контрольных образцов

ПЦР	Допустимое значение C_t для образца	
	ОКО	ПКО
Контрольная ПЦР	$C_{t_{ROX}} \leq Q_{C_{ROX}}^1$ $C_{t_{FAM}}$ не определено или $C_{t_{FAM}} > C_{t_{ПКО}}+6$	$C_{t_{FAM}} \leq Q_{C_{FAM}}$ (контрольная ПЦР) ¹
ПЦР на мутацию L858R	$C_{t_{FAM}}$ не определено или $C_{t_{FAM}} > C_{t_{ПКО}}+6$	$C_{t_{FAM}} \leq Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР L858R) ¹
ПЦР на мутацию 19del	$C_{t_{FAM}}$ не определено или $C_{t_{FAM}} > C_{t_{ПКО}}+6$	$C_{t_{FAM}} \leq Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР ex19del) ¹
ПЦР на мутацию T790M	$C_{t_{FAM}}$ не определено или $C_{t_{FAM}} > C_{t_{ПКО}}+6$	$C_{t_{FAM}} \leq Q_{C_{FAM}}$ (ПЦР T790M) ¹

¹⁾ Значение $Q_{C_{ROX}}$ и значения $Q_{C_{FAM}}$ для каждой ПЦР указаны на упаковке набора

агентов и в паспорте.

$Ct_{ПКО}$ – значение Ct ПКО в этой же постановке ПЦР.

10.1.4 Если величины Ct контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения Ct не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 7.

Таблица 7. Другие возможные значения Ct для контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	Значение Ct_{FAM}	Возможные проблемы
Контрольная ПЦР		
ОКО	$Ct_{ROX} > QC_{ROX}$	Возможно наличие ингибиторов или ошибки постановки ПЦР.
	$Ct_{FAM} \leq Ct_{ПКО} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР смеси и/или деградация ПКО.
ПЦР на мутации L858R, 19del, T790M		
ОКО	$Ct_{FAM} \leq Ct_{ПКО} + 6$	Возможна контаминация.
ПКО	$Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (ПЦР L858R) $Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (ПЦР ex19del) $Ct_{FAM} > QC_{FAM}$ (ПЦР T790M)	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР смеси и/или деградация ПКО.

10.1.5 Для каждого клинического образца в контрольной ПЦР должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяться значение Ct (Ct_C).

10.1.6 Если значение Ct_C определяется в диапазоне $Ct_{ПКО} - 4 \leq Ct_C \leq Ct_{ПКО} + 4$, то концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*.

10.1.7 Если значение Ct_C меньше $Ct_{ПКО} - 4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Ct на 1 цикл, и повторить анализ.

10.1.8 Если значение Ct_C больше $Ct_{ПКО} + 4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *EGFR*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций в гене *EGFR*

10.2.1 Для каждого клинического образца для каждой мутации рассчитать разницу $\Delta Ct = Ct_M - Ct_C$, где Ct_M – Ct образца в ПЦР со смесью, соответствующей мутации, Ct_C – Ct образца в контрольной ПЦР. Рекомендации по расчёту ΔCt в программе «MS Office Excel» приведены в приложении В.

10.2.2 Сравнить значения ΔC_t клинических образцов ДНК со значениями точек таяния (ТО) для каждой мутации. Значения ТО для каждой мутации указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте.

10.2.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *EGFR*), если для обоих дублей значение ΔC_t меньше или равно значению ТО для этой мутации.

10.2.4 Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *EGFR* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей ΔC_t больше ТО, или если значения C_{tM} образца не определены или для одного из дублей значение ΔC_t больше ТО, а для другого – значение C_{tM} не определено.

10.2.5 Если для одного из дублей значение ΔC_t меньше или равно ТО, а для другого ΔC_t больше ТО, то результат считают сомнительным и анализ повторяют. Если в повторном анализе получают сомнительный результат, то проводят макродиссекцию участков опухоли из срезов FFPE опухолевой ткани так, чтобы содержание опухолевых клеток было не менее 50%, выделяют ДНК и повторяют анализ.

11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

11.1 Условия хранения

11.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 18°C до минус 25°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°C – не более 30 минут.

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре не выше минус 18°C.

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°C до 25°C).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

12 Гарантийные обязательства

12.1 Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

12.2 Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

12.3 В случае нарушения условий транспортирования, обнаружения повреждений упаковки, а также по вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обратиться к производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: +7 (383) 209-32-40

Электронная почта: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014. / D. Morgensztern, M. J. Campo, S. E. Dahlberg, et al. // J Thorac Oncol. – 2015 – Vol. 10 (1 Suppl 1). – P. S1-63. – DOI:10.1097/JTO.0000000000000405.
2. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. / J. C. Soria, Y. Ohe, J. Vansteenkiste, et al. // N Engl J Med. – 2018. – Vol. 378 (2). – P. 113-125. – DOI: 10.1056/NEJMoa1713137
3. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. / K. M. Kerr, L. Bubendorf, M. J. Edelman, et al. // Ann Oncol. – 2014. Vol. 25 (9). – P. 1681-1690. – DOI: 10.1093/annonc/mdu145
4. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update / G. P. Kalemkerian, N. Narula, E. B. Kennedy, et al. // J Clin Oncol. – 2018. – Vol. 36 (9). – P. 911-919. – DOI: 10.1200/JCO.2017.76.7293
5. Клинические рекомендации. Злокачественное новообразование бронхов и лёгкого. / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» // Год утверждения (частота пересмотра): 2021.

Приложение А (справочное) Список делеций в 19-м экзоне гена *EGFR* согласно базе данных COSMIC, которые могут быть выявлены с помощью набора реагентов

Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
c.2233_2247del	p.K745_E749del	26038
c.2234_2235insAACTCCCGTCGCTATCAA	p.K745_E746insTPVAIK	255152
c.2234_2248del	p.K745_A750delinsT	1190791
c.2235_2236del	p.E746Ifs*16	9869973
c.2235_2237del	p.E746del	18420
c.2235_2246del	p.E746_E749del	28517
c.2235_2248delinsAATTC	p.E746_A750delinsIP	13550
c.2235_2249del	p.E746_A750del	6223
c.2235_2251delinsAATTC	p.E746_T751delinsIP	13552
c.2235_2251delinsAG	p.E746_T751delinsA	13549
c.2235_2252del	p.E746_T751del	24869
c.2235_2252delinsAAT	p.E746_T751delinsI	13551
c.2235_2255delinsAAT	p.E746_S752delinsI	12385
c.2236_2241delinsAATTAT	p.E746_L747delinsNY	3727812
c.2236_2248delinsAGAC	p.E746_A750delinsRP	12413
c.2236_2248delinsCAAC	p.E746_A750delinsQP	13557
c.2236_2250del	p.E746_A750del	6225
c.2236_2251delinsT	p.E746_T751delinsS	26513
c.2236_2252delinsAT	p.E746_T751delinsI	26680
c.2236_2252delinsCA	p.E746_T751delinsQ	22999
c.2236_2252delinsCT	p.E746_T751delinsL	51502
c.2236_2253del	p.E746_T751del	12728
c.2236_2253delinsATTCCT	p.E746_T751delinsIP	51526
c.2236_2255delinsAT	p.E746_S752delinsI	133188
c.2236_2256del	p.E746_S752del	133189
c.2236_2256delinsATC	p.E746_S752delinsI	133190
c.2236_2257delinsATCT	p.E746_P753delinsIS	133191
c.2236_2257delinsCTCT	p.E746_P753delinsLS	13200

Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
c.2237_2238inv	p.E746V	51497
c.2237_2250delinsTCCCT	p.E746_A750delinsVP	28623
c.2237_2251del	p.E746_T751delinsA	12678
c.2237_2251delinsTGG	p.E746_T751delinsVA	53205
c.2237_2251delinsTTC	p.E746_T751delinsVP	18421
c.2237_2252delinsT	p.E746_T751delinsV	12386
c.2237_2253delinsTC	p.E746_T751delinsV	133193
c.2237_2253delinsTTCCT	p.E746_T751delinsVP	52935
c.2237_2253delinsTTGCT	p.E746_T751delinsVA	12416
c.2237_2254del	p.E746_S752delinsA	12367
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	133194
c.2237_2255delinsT	p.E746_S752delinsV	12384
c.2237_2256delinsTC	p.E746_S752delinsV	18426
c.2237_2256delinsTG	p.E746_S752delinsV	674057
c.2237_2257delinsTCT	p.E746_P753delinsVS	18427
c.2237_2258delinsTTCA	p.E746_P753delinsVQ	51524
c.2238_2247del	p.L747Qfs*16	6978341
c.2238_2248delinsGC	p.L747_A750delinsP	12422
c.2238_2248delinsTC	p.E746_A750delinsDP	18428
c.2238_2251delinsGC	p.L747_T751delinsP	22944
c.2238_2252delinsGCA	p.L747_T751delinsQ	12419
c.2238_2255del	p.E746_S752delinsD	6220
c.2238_2255delinsGCAACA	p.L747_S752delinsQH	12421
c.2238_2256delinsGCAA	p.L747_S752delinsQ	26441
c.2238_2258del	p.L747_P753del	255211
c.2239_2247del	p.L747_E749del	6218
c.2239_2247delinsC	p.L747Rfs*13	6952818
c.2239_2248delinsC	p.L747_A750delinsP	12382
c.2239_2250del	p.L747_A750del	9179903
c.2239_2251delinsC	p.L747_T751delinsP	12383
c.2239_2252delinsCA	p.L747_T751delinsQ	12420

Мутация (замена нуклеотида)	Мутация (замена аминокислоты)	ID мутации в COSMIC
c.2239_2253delinsGCT	p.L747_T751delinsA	23572
c.2239_2255delinsCAACA	p.L747_S752delinsQH	133196
c.2239_2256del	p.L747_S752del	6255
c.2239_2256delinsCAA	p.L747_S752delinsQ	12403
c.2239_2258delinsCA	p.L747_P753delinsQ	12387
c.2239_2262del	p.L747_K754del	24970
c.2239_2264delinsGCCAA	p.L747_A755delinsAN	85891
c.2239_2264delinsGGAG	p.L747Gfs*12	10001753
c.2240_2248del	p.L747_A750delinsS	4170221
c.2240_2251del	p.L747_T751delinsS	6210
c.2240_2254del	p.L747_T751del	23571
c.2240_2254del	p.L747_T751del	12369
c.2240_2257del	p.L747_P753delinsS	133197
c.2240_2257del	p.L747_P753delinsS	12370
c.2240_2261delinsCGAC	p.L747_K754delinsST	20883
c.2241_2244delinsCCCG	p.L747_R748delinsFP	18442
c.2241_2256del	p.L747Ffs*14	9869974

Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков

Для выделения ДНК из FFPE блоков излишки парафина обрезать скальпелем и приготовить серийные срезы толщиной 5 микрон с площадью ткани на срезе 25-80 мм². Если поверхность блока была длительное время экспонирована на воздухе, то первые 2-3 среза отбросить, а последующие пять использовать для выделения ДНК.

Первый или последний рабочие срезы серии окрасить гематоксилин-эозином, после чего патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток. Если на срезе менее 30% опухолевых клеток, то провести макродиссекцию. Рабочие срезы поместить в пробирку объемом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного на территории РФ.

Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». На рисунке Б1 приведён пример расчёта ΔCt .

В столбце «Target» ввести «Контроль» в ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, ввести названия ПЦР-смесей в ячейки, соответствующие ПЦР с этими смесями (рисунок Б1, элемент 1). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец «Ct_c», где Ct_c – Ct образца в контрольной ПЦР (рисунок Б1, элемент 4). Значения Ct в контрольной ПЦР скопировать в столбце «Cq» (рисунок Б1, элемент 3) и вставить в столбец «Ct_c» (рисунок Б1, элемент 4), таким образом, чтобы значения Cq и Ct_c для каждого образца находились в одной строке, соответствующей этому образцу.

Добавить столбец « ΔCt ». Используя функцию вычитания, для каждого образца для каждой мутации рассчитать разницу $\Delta Ct = Cq - Ct_c$ (рисунок Б1, элемент 5), что соответствует $\Delta Ct = Ct_{AS} - Ct_c$.

Добавить столбец «ТО», внести значения ТО для каждой мутации, указанные на упаковке набора (рисунок Б1, элемент 6).

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCt клинических образцов ДНК со значениями ТО для каждой мутации и записать результат (рисунок Б1, элемент 7).

Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию в гене *EGFR*), если для обоих дублей значение ΔCt меньше или равно значению ТО для этой мутации.

Образец учитывается как отрицательный (не содержащий мутацию в гене *EGFR* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), если для обоих дублей ΔCt больше ТО, или если значения Ct_м образца не определены или для одного из дублей значение ΔCt больше ТО, а для другого – значение Ct_м не определено.

Если для одного из дублей значение ΔCt меньше или равно ТО, а для другого ΔCt больше ТО, то результат считают сомнительным, необходимо повторить анализ.

1 Target	Content	2 Sample	3 Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	4 CtC	5 ΔCt	6 TO	7 Результат
контроль	Unkn-04	ДНК38	19,97	20,05	0,121				
контроль	Unkn-04	ДНК38	20,14	20,05	0,121				
контроль	Unkn-05	ДНК39	20,41	20,43	0,036				
контроль	Unkn-05	ДНК39	20,46	20,43	0,036				
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,00	0,000				
контроль	NTC-01	ОКО	nd	0,00	0,000				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17,59	17,48	0,150				
контроль	Pos Ctrl-01	ПКО	17,38	17,48	0,150				
L858R	Unkn-16	ДНК38	29,44	29,86	0,593	19,97	9,47	6,0	отрицательный
L858R	Unkn-16	ДНК38	30,28	29,86	0,593	20,14	10,14	6,0	отрицательный
L858R	Unkn-17	ДНК39	24,17	24,13	0,057	20,41	3,77	6,0	положительный
L858R	Unkn-17	ДНК39	24,09	24,13	0,057	20,46	3,64	6,0	положительный
L858R	NTC-03	ОКО	nd	0,00	0,000				
L858R	NTC-03	ОКО	nd	0,00	0,000				
L858R	Pos Ctrl-03	ПКО	23,09	23,17	0,115				
L858R	Pos Ctrl-03	ПКО	23,25	23,17	0,115				
ex19del	Unkn-10	ДНК38	31,22	31,13	0,129	19,97	11,25	5,0	отрицательный
ex19del	Unkn-10	ДНК38	31,04	31,13	0,129	20,14	10,90	5,0	отрицательный
ex19del	Unkn-11	ДНК39	31,42	31,67	0,354	20,41	11,01	5,0	отрицательный
ex19del	Unkn-11	ДНК39	31,92	31,67	0,354	20,46	11,46	5,0	отрицательный
ex19del	NTC-02	ОКО	nd	0,00	0,000				
ex19del	NTC-02	ОКО	nd	0,00	0,000				
ex19del	Pos Ctrl-02	ПКО	22,19	22,09	0,143				
ex19del	Pos Ctrl-02	ПКО	21,99	22,09	0,143				
T790M	Unkn-22	ДНК38	nd	0,00	0,000	19,97	#ЗНАЧ!	9,0	отрицательный
T790M	Unkn-22	ДНК38	nd	0,00	0,000	20,14	#ЗНАЧ!	9,0	отрицательный
T790M	Unkn-23	ДНК39	nd	0,00	0,000	20,41	#ЗНАЧ!	9,0	отрицательный
T790M	Unkn-23	ДНК39	nd	0,00	0,000	20,46	#ЗНАЧ!	9,0	отрицательный
T790M	NTC-04	ОКО	nd	0,00	0,000				
T790M	NTC-04	ОКО	28,94	28,94	0,000				
T790M	Pos Ctrl-04	ПКО	22,55	22,58	0,040				
T790M	Pos Ctrl-04	ПКО	22,61	22,58	0,040				

Рисунок Б1. Обработка данных в программе «MS Office Excel»

1 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с контрольной смесью, с ПЦР-смесью L858R, ПЦР-смесью ex19del, ПЦР-смесью T790M.

2 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

3 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Ct образцов в контрольной ПЦР.

4 – столбец CtC, в который вставлены значения Ct из столбца «Cq».

5 – вычисление значений ΔCt по формуле $\Delta Ct = Cq - CtC$.

6 – значения TO для мутаций L858R, 19del и T790M (на упаковке набора и в паспорте).

7 – результат анализа на наличие мутаций в гене EGFR.

Cq Mean – среднее значение Cq для образца,

Cq Std. Dev – среднеквадратическое отклонение значения Cq для образца.

значения Cq Mean и Cq Std. Dev не используются при расчётах.

nd – значение не определено, #ЗНАЧ! – ошибка в значении.

В приведённом на рисунке Б1 примере $TO_{L858R} = 6,0$, $TO_{19del} = 5,0$, $TO_{T790M} = 9,0$.

Образец ДНК38 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутаций в гене *EGFR* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью L858R значения ΔCt составляют 9,47 и 10,14 (больше $TO = 6,0$), в ПЦР со смесью ex19del значения ΔCt составляют 11,25 и 10,90 (больше $TO = 5,0$), в ПЦР со смесью T790M значения ΔCt не определены.

Образец ДНК39 учитывается как положительный, содержащий мутацию L858R, так как в ПЦР со смесью L858R значения ΔCt составляют 3,77 и 3,64 (для обоих дублей меньше $TO = 6,0$).

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью
33 листа

Директор ООО «БИОЛИНК»

/ Корниенко А. А. /

« 5 » 15 ноября 2022 г.

