

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Тороповский А.Н.¹, Павлова О.Н.¹, Викторов Д.А.¹, Никитин А.Г.¹, Масляков В.В.²

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ТЕСТ-KRAS-ТКАНЬ *IN VITRO* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАНИЙ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК

¹ООО «ТестГен», 432072, г. Ульяновск, Россия;

²Частное УОО ВО «Саратовский медицинский университет» «Реавиз», 410012, Саратов, Россия

Целью работы является проверка функциональных свойств и эффективности набора реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016 для внедрения его в клиничко-лабораторную практику с целью определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

На базе ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА» с 18 июля по 21 августа 2018 г. были проведены испытания медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» производства ООО «ТестГен».

В качестве субъектов клинического испытания было использовано 44 образца фиксированной в парафине ткани от пациентов с диагнозом «колоректальный рак». В ходе проведения клинических испытаний было проанализировано 44 образца фиксированной в парафине ткани в двух сериях экспериментов, то есть проведено 88 клиничко-лабораторных опытов, из которых 48 опытов с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена KRAS и 40 опытов с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена KRAS. Анализ и оценка результатов проведенных клиничко-лабораторных испытаний медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» подтвердили, что оно позволяет проводить качественное определение статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена KRAS методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани, с высокими показателями диагностической чувствительности 90,9% и диагностической специфичности 95,0% с достоверной вероятностью 90%. Воспроизводимость результатов 100%, что подтверждает высокую надежность набора.

Ключевые слова: колоректальный рак; ген KRAS; метод ПЦР-РВ, EGFR.

Для цитирования: Тороповский А.Н., Павлова О.Н., Викторов Д.А., Никитин А.Г., Масляков В.В. Результаты испытания набора реагентов тест-KRAS-ткань *in vitro* для определения показаний к таргетной терапии у пациентов с диагнозом колоректальный рак. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65(12): 793-800. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-793-800>

Toropovskiy A.N.¹, Pavlova O.N.¹, Viktorov D.A.¹, Nikitin A.G.¹, Maslyakov V.V.²

RESULTS OF *IN VITRO* TEST-KRAS-TISSUE REAGENT KIT TEST TO DETERMINE INDICATIONS FOR TARGET THERAPY OF PATIENTS DIAGNOSED WITH COLORECTAL CANCER

¹ООО «ТестГен», 432072, Ulyanovsk, 432072, Russia;

²Private institution educational organization of higher education «Saratov Medical University» «Reaviz», 410012, Saratov, Russia

As subjects of the clinical trial, 44 samples of paraffin-fixed tissue were used from patients diagnosed with "colorectal cancer." In the course of clinical trials, 44 samples of paraffin-fixed tissue were analyzed in two series of experiments, that is, 88 clinical-laboratory experiments were carried out, of which 48 experiments with genomic DNA samples with the established negative status of the presence of KRAS gene mutations and 40 experiments with genomic DNA samples with the established positive status of the presence of KRAS gene mutations.

Analysis and evaluation of the results of clinical laboratory tests of the medical product "Kit of Reagents for Determination of the Status of KRAS Gene Mutations by PCR-RV Method in a Sample of Human Genomic DNA from Samples of Paraffin-Fixed Tissue (Test-KRAS-tissue) according to TU 21.20.23-006-97638376-2016" confirmed that it allows to carry out qualitative determination of the status of six mutations of the twelfth codon (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) and one mutation of the thirteenth codon (Gly13Asp) the KRAS gene by real-time allele-specific PCR in human genomic DNA sample from paraffin-fixed tissue samples, with high diagnostic sensitivity rates of 90.9% and diagnostic specificity of 95.0% with a confidence probability of 90%. Reproducibility of results is 100%, which confirms the high reliability of the set.

Key words: colorectal cancer; KRAS gene; PCR-RV method; EGFR.

For citation: Toropovskiy A.N., Pavlova O.N., Viktorov D.A., Nikitin A.G., Maslyakov V.V. Results of *in vitro* test-KRAS-tissue reagent kit test to determine indications for target therapy of patients diagnosed with colorectal cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12): 793-800. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-793-800>

For correspondence: Pavlova Olga Nikolaevna, doctor of biological sciences, assistant professor, research associate, e-mail: casiopeya13@mail.ru

Information about authors:

Toropovskiy A.N., ORCID: <https://0000-0001-9779-5708>;
Pavlova O.N., ORCID: <https://0000-0002-8055-1958>;
Viktorov D.A., ORCID: <https://0000-0002-4012-875X>;
Nikitin A.G., ORCID: <https://0000-0001-9762-3383>;
Maslyakov V.V., ORCID: <https://0000-0002-0052-9401>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 16.03.2020
Accepted 15.05.2020

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований у человека и занимает 3-е место по заболеваемости как у мужчин, так и у женщин. Среди вариантов колоректального рака наиболее встречаемым и смертоносным является рак толстой кишки (РТК), так как это заболевание может значительное время протекать бессимптомно и, как следствие, у каждого третьего больного на момент установления диагноза отмечается генерализация опухолевого процесса. Высокая смертность при РТК объясняется частым метастазированием опухоли, в основном в печень и легкие, нередко даже на первых стадиях заболевания [1].

Проведенный анализ литературы показывает, что пусковым механизмом онкогенеза большинства новообразований толстой кишки являются нарушения генетического аппарата клетки. Рак толстой кишки (РТК) представляет собой гетерогенную группу опухолей, отличающихся как механизмами канцерогенеза и, следовательно, молекулярными изменениями, так и прогнозом течения болезни, и особенностями терапии. Уже сейчас для выбора тактики лечения необходимо учитывать не только клинические факторы, такие как распространение опухоли, функциональный статус пациента, но и молекулярный профиль заболевания.

Процессы жизнедеятельности раковых клеток во многом зависят от продукции ростовых факторов и их рецепторов. Одним из таковых является эпидермальный фактор роста (EGFR), представляющий собой тирозинкиназный рецептор мембран клеток. В норме связывание лигандов EGFR и трансформирующего фактора роста альфа (TGF α) индуцирует активацию рецепторов, что запускает ERK и PI3K сигнальные пути, контролируемые клеточную пролиферацию, миграцию, инвазию и множество других процессов. Установлено, что в 80% случаев колоректальный рак возникает в результате гиперэкспрессии EGFR, которая приводит к усиленному росту и делению клеток опухоли вследствие гиперактивации RAS-RAF-MEK-ERK сигнального каскада. Этот каскад является путем, который регулирует клеточную пролиферацию, клеточный цикл и миграцию клетки. При развитии рака у человека мутации семейства RAS/RAF наиболее часто являются причиной нарушения регуляции трансдукции сигнала через этот путь

KRAS является геном, кодирующим один из белков, играющих важную роль в сигнальной системе рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), а также регулирует белки, находящиеся далее в сигнальной системе EGFR, которые связаны с выживаемостью опухоли, ангиогенезом, пролиферацией и метастазированием [2].

При метастатическом колоректальном раке почти 60% пациентов имеют нормальную сигнальную систему EGFR и дикий тип гена KRAS; остальные 40 % имеют мутантный тип гена [3].

Мутации в гене KRAS в опухолях толстой кишки встречаются в 30-60% случаев. Наиболее часто мутации KRAS определяются в экзоне 2, кодонах 12 и 13 [4].

Хирургическое лечение КРР играет главную роль в излечении больных, однако пациенты с III стадией рака нуждаются в адъювантной химиотерапии (АХТ). Таргетная терапия, по сравнению с конвенциональной химиотерапией, имеет ряд преимуществ: индивидуализация назначения, более низкая токсичность, таблетированные формы большинства препаратов исключают необходимость госпитализации и позволяют больным радикально не менять образ жизни.

В качестве основных мишеней целенаправленной терапии могут выступать многочисленные элементы сигнальных путей, связанные с регуляцией клеточного цикла и апоптоза, нарушение которых ассоциировано со злокачественным ростом. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), или HER1, – трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 170 kD, обладающий тирозинкиназной активностью, является наиболее хорошо изученной мишенью.

Основные механизмы активации EGFR-зависимых сигнальных путей в опухолевых клетках обеспечиваются: мутацией тирозинкиназного домена гена EGFR и, как следствие этого, его аутоактивацией при отсутствии факторов роста, приводящей к неконтролируемой пролиферации; гиперэкспрессией EGFR; избыточной продукцией факторов роста – лигандов EGFR (TGF- α , EGF) [4].

Существует несколько вариантов блокирования онкогенного эффекта, реализуемого через активированный EGFR: 1) использование низкомолекулярных ингибиторов, способных воздействовать на внутриклеточный, несущий мутацию домен EGFR, и прерывать процесс тирозинкиназного фосфорилирования; 2) применение рекомбинантных пептидных лигандов EGF и/или TGF- α , конъюгированных с проникающими внутрь клетки цитотоксинами; 3) использование моноклональных антител, связывающих экстрацеллюлярный участок рецептора или образующих неактивный комплекс с его лигандами EGF и TGF- α . В настоящее время к клиническому применению разрешены 9 ингибиторов передачи сигнала в клетки (иматиниб, сунитиниб, сорафениб, лапатиниб, гефитиниб, эрлотиниб, дазатиниб, нилотиниб, пазопаниб) и 5 моноклональных антител (трастузумаб, ритуксимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, панитумумаб) [5].

Связывание антител с EGFR приводит к угнетению инвазии опухолевых клеток в нормальные ткани, препятствуя распространению опухоли в другие органы. У пациентов с диким типом гена KRAS определяют агрессивное поведение опухоли: КРР развивается в кратчайшие сроки, быстро метастазирует и плохо поддается химиотерапии. В случае мутации белок KRAS постоянно передает сигналы к делению, причем его состояние уже

не зависит от статуса белков-регуляторов, в частности EGFR. Соответственно, скорость деления подобных опухолей остается неизменной даже при терапевтической инактивации EGFR, поэтому эта разновидность карцином толстой кишки оказывается практически нечувствительной к анти-EGFR антителам. Именно поэтому все регистрационные документы по использованию таких препаратов, как цетуксимаб и панитумумаб требуют обязательного определения мутационного статуса KRAS; антитела к EGFR не могут назначаться пациентам с наличием мутации или неизвестным статусом KRAS.

Таким образом, рекомендуется обязательно определять мутации в гене KRAS у всех больных метастатическим КРР для решения вопроса об анти-EGFR терапии.

В настоящее время для обнаружения мутаций в опухолях толстой кишки применяется ПЦР-амплификация анализируемого участка с последующей детекцией аномалий различными методами: секвенирование, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ), анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP, Single-strand conformation polymorphism analysis), гибридизация с аллельспецифическими олигонуклеотидами, плавление высокого разрешения (HRM), аллель-специфическая ПЦР в режиме реального времени (ас-рв-ПЦР) и другие. У каждого из этих методов существуют как преимущества, так и недостатки. Так, преимуществом методов секвенирования является их способность выявлять все возможные точечные мутации и невысокая стоимость. Ограничение секвенирования заключается в недостаточной чувствительности: 5-10% мутантных аллелей KRAS на фоне последовательностей ДНК дикого типа для пиросеквенирования и от 10 до 30 % мутантных аллелей – для секвенирования по Сэнгеру. Преимуществом ас-рв-ПЦР является наличие закрытой системы, предохраняющей от контаминации, и высокая чувствительность, выявляющая до 1 % мутантных аллелей на фоне ДНК дикого типа. Недостатками ас-рв-ПЦР являются трудоемкость оптимизации аллель-специфических реакций и способность обнаруживать только выбранные мутации.

Компанией «ТестГен» разработан «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016», предназначенный для профессионального применения в медицинских организациях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля, для определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Целевой анализ – ген KRAS, исследуемый при обследовании пациентов с диагнозом «колоректальный рак» для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) исследуемого гена KRAS для определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Таким образом, целью работы являлась проверка функциональных свойств и эффективности набора реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS

методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016 для внедрения его в клинико-лабораторную практику с целью определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Для реализации поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- изучить соответствие набора реагентов своему назначению;
- определить эффективность медицинского изделия для диагностики *in vitro* в соответствии с предназначенным производителем применением медицинского изделия по назначению;
- определить качество набора реагентов, эффективность и безопасность его применения.

Материал и методы. Клинические испытания медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена KRAS методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-KRAS-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» производства ООО «ТестГен» проводились с 18.07. по 21.08. 2018 г. на базе ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России) в соответствии с приказом Минздрава РФ от 09.01.2014 г. № 2н.

Набор реагентов «Тест-KRAS-ткань» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля для качественного определения статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена KRAS методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для определения показаний к таргетной терапии препаратами на основе анти-EGFR моноклональных антител у пациентов с диагнозом «колоректальный рак» с диким типом гена KRAS.

Специфичность анализа данным набором реагентов определяется олигонуклеотидными затравками (прайм-мерами), подобранными к гомологичным участкам генов, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции. Общее время проведения анализа составляет 2-2,5 часа.

Аналитические характеристики набора приведены в табл. 1.

Список определяемых мутаций с указанием ID мутации представлен в табл. 2.

В качестве субъектов клинического испытания было использовано 44 образца фиксированной в парафине ткани от пациентов с диагнозом «колоректальный рак». Образцы фиксированной в парафине ткани (FFPE-блоки) были получены из банка остаточных аликвот фиксированных в парафине тканей, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Аналитические характеристики набора реагентов «Тест-KRAS-ткань»

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к шести мутациям двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена <i>KRAS</i>
Аналитическая чувствительность	10 копий гена <i>KRAS</i> в 1 мкл раствора ДНК

Таблица 2

Список определяемых мутаций с указанием ID мутации

Набор мутаций, определяемых с помощью «Тест-KRAS-ткань»	Изменения в нуклеотидах	Изменения в аминокислотах	COSMIC ID*
Gly12Asp	c.35G>A	p.G12D	521
Gly12Ala	c.35G>C	p.G12A	522
Gly12Arg	c.34G>C	p.G12R	518
Gly12Val	c.35G>T	p.G12V	520
Gly12Ser	c.34G>A	p.G12S	517
Gly12Cys	c.34G>T	p.G12C	516
Gly13Asp	c.38G>A	p.G13D	532

Примечание. * – идентификационный номер мутации согласно международной базе соматических мутаций при раковых заболеваниях COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer).

Для данных пациентов статус мутаций гена *KRAS* был известен и установлен на образцах фиксированных в парафине тканей до проведения клинических испытаний регистрируемого медицинского изделия в ходе лечебно-диагностического процесса с помощью зарегистрированного Набора реагентов для определения соматических мутаций в гене *KRAS* «KRAS RGQ PCR Kit (24)» на 24 образца, производства «Киagen Манчестер Лимитед» (Великобритания), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12826 от 05.09.2012.

В 24 предоставленных образцах у пациентов мутантная ДНК гена *KRAS* не обнаружена набором реагентов «KRAS RGQ PCR Kit (24)» и в 20 образцах – обнаружена.

Из каждого образца ткани, из банка остаточных аликвот, пациентов с установленным статусом мутаций гена *KRAS* было проведено 2 процедуры выделения геномной ДНК, которые были проанализированы с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» в двух сериях экспериментов:

1. В образцах ткани под номерами 1-24 статус мутаций гена *KRAS* был установлен с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» LOT: 201806-95 и LOT: 201806-97;

2. В образцах под номерами 25-44 с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» LOT: 201806-96 и LOT: 201806-98.

Выделение геномной ДНК человека из образцов ткани было проведено с помощью набора реагентов для экстракции ДНК из биологического материала и определения фрагментации ДНК (IsoFrag-DNA-FFPE) по ТУ 9398-001-7706721254-2011 (ЗАО «Протеинсинтез», Россия, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/12189 от 13.11.2017).

Полученная ДНК должна храниться при температуре от 2°C до 8°C и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 ч раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°C.

Для определения соматических мутаций в гене *KRAS* с помощью зарегистрированного набора реагентов

«KRAS RGQ PCR Kit (24)» при обследовании пациентов с диагнозом «колоректальный рак» в ходе лечебно-диагностического процесса ФГБУ ФНКЦ ФМБА России был использован прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени Rotor-Gene Q серии 5plex HRM.

Таким образом, в ходе проведения клинических испытаний было проанализировано 44 образца фиксированной в парафине ткани (FFPE-блоки) в двух сериях экспериментов, то есть проведено 88 клинико-лабораторных опытов, из которых 48 опытов с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена *KRAS* и 40 опытов с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена *KRAS*.

В случае расхождения данных наборов «Тест-KRAS-ткань» и «KRAS RGQ PCR Kit (24)» образцы повторно тестировали методом секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора (секвенатора) Applied Biosystems 3500 Dx, производства «Life Technologies Corporation» (США) (№ ФСЗ 2011/09862 от 25.01.2017 г.), используя те же праймеры, что и при ПЦР-аплификации.

Свидетельством правильности работы исследуемых медицинских изделий явилось совпадение результатов.

Критерии включения субъектов испытаний:

- образцы фиксированной в парафине ткани от пациентов с диагнозом «колоректальный рак».

Критерии исключения:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание). Анализируемая ДНК должна храниться при температуре от 2°C до 8°C и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 ч раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре -20°C.

- чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280nm), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4.

- концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-100 нг/мкл.

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

- для анализа необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенные из ткани опухоли, подтвержденной гистологически.

Количество образцов выбрано исходя из наличия образцов в банке остаточных аликвот ткани в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Качественное определение статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани включает в себя три этапа:

1) подготовку ПЦР;
2) ПЦР-амплификацию ДНК и гибридизационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

3) интерпретацию результатов.

С пробами геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани проводятся реакции амплификации участков гена *KRAS* в реакционном буфере при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации присутствуют аллель-специфичные флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются Taq-полимеразой, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

По каналу, соответствующему флуорофору HEX, детектируется продукт амплификации ДНК нормального варианта гена *KRAS*, по каналу, соответствующему флуорофору FAM, детектируется продукт амплификации ДНК мутантных вариантов гена *KRAS*.

Для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» использовали амплификатор планшетного типа «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия)

Далее провели анализ кривых накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

– по каналу FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК мутантных вариантов гена *KRAS*.

– по каналу HEX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормальных вариантов гена *KRAS* (выступает в качестве внутреннего контрольного образца – ВКО).

Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции пороговой линии.

Полученные результаты интерпретировали на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из исследуемых образцов. Интерпретация производилась с помощью программного обеспечения используемого амплификатора «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия).

После проведения анализа предоставленными образцами набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» и интерпретации результатов, полученные данные сравнивались с результатами ПЦР, проведенных в ходе лечебно-диагностического процесса с помощью Набора реагентов для определения соматических мутаций в гене *KRAS* «KRAS RGQ PCR Kit (24)» на 24 образца, производства «Киаген Манчестер Лимитед» (Великобритания), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12826 от 05.09.2012, по стандартной методике производителя.

В случае расхождения данных «Тест-KRAS-ткань» и «KRAS RGQ PCR Kit (24)» образцы были повторно протестированы методом секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора (секвенатора) Applied Biosystems 3500 Dx, производства «Life Technologies Corporation» (США) (№ ФСЗ 2011/09862 от

25.01.2017 г.) используя те же праймеры, что и при ПЦР-амплификации.

Для расчёта диагностической чувствительности и диагностической специфичности исследуемого набора использовали формулы, приведенные в п.5.5 ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»:

Истинноположительные

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{Истинноположительные}}{\text{Истинноположительные} + \text{Ложноотрицательные}} \times 100 \% . (1)$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{Истинноотрицательные}}{\text{Истинноотрицательные} + \text{Ложноположительные}} \times 100 \% . (2)$$

Оценку результатов исследований проводили согласно Приложению В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных научно-экспертным советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27.07.16 г.

Также была проведена статистическая обработка результатов исследования.

Результаты и обсуждение. При исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, при прохождении реакций «Gly12Asp», «Gly12Ala», «Gly12Arg», «Gly12Val», «Gly12Ser», «Gly12Cys» и «Gly13Asp» в пробирках с соответствующими положительными контрольными образцами (ПКО) по каналам FAM и HEX не позднее 35 цикла. Правильные результаты для отрицательных контрольных образцов (ОКО) – отсутствие роста сигнала флуоресценции в реакциях «Gly12Asp», «Gly12Ala», «Gly12Arg», «Gly12Val», «Gly12Ser», «Gly12Cys» и «Gly13Asp» с ОКО по каналам FAM и HEX.

Сводные результаты клинических испытаний представленных образцов медицинского изделия в сравнении с результатами ПЦР, проведенных с помощью зарегистрированного медицинского изделия, Набора реагентов для определения соматических мутаций в гене *KRAS* «KRAS RGQ PCR Kit (24)» на 24 образца, производства «Киаген Манчестер Лимитед» (Великобритания), регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12826 от 05.09.2012 г., приведены в табл. 3.

В ходе проведения клинических испытаний было проанализировано 88 образцов фиксированной в парафине ткани и был выявлен 1 ложноотрицательный результат. Образец №15, мутация в котором не была обнаружена с помощью набора «Тест- KRAS -ткань» (LOT: 201806-95), был повторно протестирован и подтверждено наличие определяемой мутации Gly12Asp методом секвенирования по Сэнгеру с помощью генетического анализатора (секвенатора) Applied Biosystems 3500 Dx, производства «Life Technologies Corporation» (США) (№ ФСЗ 2011/09862 от 25.01.2017 г.) используя те же праймеры, что и при ПЦР-амплификации. Результаты тестирования приведены в табл. 4.

Ложноотрицательный результат, полученный с помощью набора реагентов «Тест-KRAS-ткань» для клинического образца №15, может быть связан с несоответствующим качеством выделенной ДНК.

Ложноположительных результатов в ходе проведения клинических испытаний не выявлено.

По результатам проведенных клинических испытаний в серии из 40 опытов с образцами геномной ДНК

Сводные результаты клинических испытаний наборов реагентов «Тест-KRAS-ткань» и «KRAS RGQ PCR Kit (24)»

Образец	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-95	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-96	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-97	«Тест-KRAS-ткань», LOT: 201806-98	Статус мутаций в гене KRAS, установленный набором «KRAS RGQ PCR Kit (24)»	Совпадение/ не совпадение
1	Gly12Ser		Gly12Ser		Gly12Ser	совпадение
2	-		-		-	совпадение
3	-		-		-	совпадение
4	-		-		-	совпадение
5	Gly12Asp		Gly12Asp		Gly12Asp	совпадение
6	-		-		-	совпадение
7	-		-		-	совпадение
8	Gly13Asp		Gly13Asp		Gly13Asp	совпадение
9	Gly12Val		Gly12Val		Gly12Val	совпадение
10	-		-		-	совпадение
11	-		-		-	совпадение
12	Gly12Ala		Gly12Ala		Gly12Ala	совпадение
13	Gly12Asp		Gly12Asp		Gly12Asp	совпадение
14	-		-		-	совпадение
15	-		Gly12Asp		Gly12Asp	не совпадение
16	Gly12Arg		Gly12Arg		Gly12Arg	совпадение
17	-		-		-	совпадение
18	-		-		-	совпадение
19	Gly13Asp		Gly13Asp		Gly13Asp	совпадение
20	-		-		-	совпадение
21	-		-		-	совпадение
22	Gly12Cys		Gly12Cys		Gly12Cys	совпадение
23	-		-		-	совпадение
24	Gly12Arg		Gly12Arg		Gly12Arg	совпадение
25						совпадение
26		Gly12Val		Gly12Val	Gly12Val	совпадение
27		-		-	-	совпадение
28		-		-	-	совпадение
29		Gly12Cys		Gly12Cys	Gly12Cys	совпадение
30		Gly12Ala		Gly12Ala	Gly12Ala	совпадение
31		-		-	-	совпадение
32		Gly13Asp		Gly13Asp	Gly13Asp	совпадение
33		Gly12Asp		Gly12Asp	Gly12Asp	совпадение
34		-		-	-	совпадение
35		Gly12Arg		Gly12Arg	Gly12Arg	совпадение
36		-		-	-	совпадение
37		-		-	-	совпадение
38		Gly12Ala		Gly12Ala	Gly12Ala	совпадение
39		-		-	-	совпадение
40		-		-	-	совпадение
41		Gly12Cys		Gly12Cys	Gly12Cys	совпадение
42		-		-	-	совпадение
43		-		-	-	совпадение
44		Gly12Asp		Gly12Asp	Gly12Asp	совпадение

Таблица 4

Результаты определения статуса мутаций гена KRAS в образце с ложноотрицательным результатом

№ образца	Методы исследования		
	Набор реагентов «Тест- KRAS -ткань» LOT: 201806-95	«KRAS RGQ PCR Kit (24)»	Секвенирование
15	-	Gly12Asp	Gly12Asp

с установленным положительным статусом наличия мутаций гена KRAS регистрируемое медицинское изделие показало 39 истинноположительных результатов, 1 ложноотрицательный результат. Выявление ложноотри-

цательного результата может быть связано с несоответствующим качеством выделенной ДНК.

По результатам проведенных клинических испытаний в серии из 48 опытов с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена KRAS регистрируемое медицинское изделие показало 48 истинноотрицательных результатов. Ложноположительных результатов в ходе проведения клинических испытаний не выявлено.

По результатам статистической обработки полученных характеристик эффективности с доверительной вероятностью 90% диагностическая чувствительность исследуемого медицинского изделия составила 97,5%, диагностическая специфичность – 100%.

Полученные данные сопоставимы с результатами исследования Амосенко Ф.А. и его коллег, в ходе которых было проанализировано 63 образца ДНК, выделенных из замороженных карцином толстой кишки. При этом диагностическая специфичность и чувствительность для набора «KRAS-7M» составила 100% и 96,4%, соответственно [6]. Таким образом, данные, полученные в настоящем исследовании, соответствуют литературным и даже превосходят их.

В ходе обработки данных эксперимента была создана математическая модель для оценки эффективности набора реагентов при ограниченном числе опытов. Если истинная доля признака (под признаком будем понимать положительный результат применения изделия, то есть, совпадение результатов анализа) равна P , то вероятность того, что в повторной серии испытаний, состоящей из N опытов применения изделия к биологической пробе в m случаях будет положительный результат, определяется по формуле Бернулли:

$$P_{M,N} = C_n^m * P^m * (1-P)^{N-m} \quad (3)$$

т.е. распределение повторной выборки описывается биномиальным распределением.

Оценка результатов исследований проводится согласно Приложению В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных научно-экспертным советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27.07.2016 г.

При оценке результатов исследований стоит задача: в серии опытов размером N получено m положительных результатов, вопрос – какая минимальная истинная доля признака $P_{ист}$ (доля положительных результатов) соответствует экспериментально полученной доле m/N с доверительной вероятностью не менее 90%. Или, другими словами, при оценке результатов необходимо определять нижнюю границу интервала, в котором находится истинная доля признака $P_{ист}$ с доверительной вероятностью не менее 90%. В общем случае аналитического решения уравнения не существует, для целей практического применения рекомендуется использовать график на рисунке, приведенный в Приложении В «Методических рекомендаций по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», одобренных Научно-экспертным советом ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора 27 июля 2016 года. Для частного случая, когда доля признака, полученная в серии испытаний с числом опытов N , равна единице (все результаты опытов – положительные), уравнение имеет простое аналитическое решение:

$$P_{ист} = 0,1/N. \quad (4)$$

Обрабатываем полученный при клинических испытаниях исследуемого медицинского изделия результат диагностиче-

ской чувствительности. На рисунке по горизонтальной оси выбираем значение 0,975, соответствующее значению диагностической чувствительности 97,5%, полученному при испытаниях в 40 опытах с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена *KRAS*. Находим соответствующую точку на графике с $N=40$ и получаем для этой точки значение $P_{ист}$ на вертикальной оси. В данном случае $P_{ист} = 0,909$ (90,9%) с доверительной вероятностью 90%.

Таким образом, результат диагностической чувствительности 97,5%, полученный в 40 опытах с образцами геномной ДНК с установленным положительным статусом наличия мутаций гена *KRAS*, может рассматриваться как доказательство для показателя эффективности – диагностической чувствительности медицинского изделия – на уровне 0,909 (90,9%) с доверительной вероятностью 90%.

Обрабатываем полученный результат диагностической специфичности. На рисунке по горизонтальной оси выбираем значение 1, соответствующее значению диа-

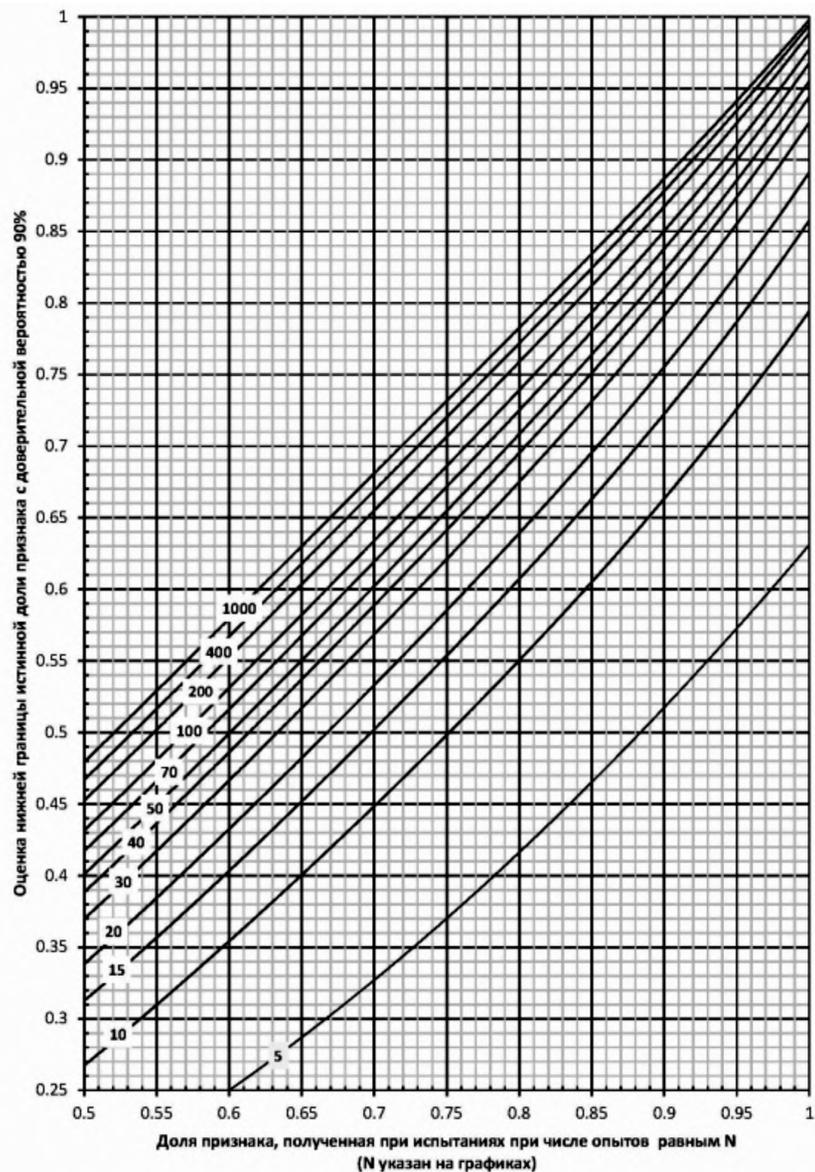


График оценки статистической достоверности результатов испытаний в зависимости от числа независимых опытов N при доверительной вероятности 90%.

гностической специфичности 100%, полученному при испытаниях в 48 опытах с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена *KRAS*. Находим соответствующую точку на графике с N=48 и получаем для этой точки значение $R_{ист}$ на вертикальной оси. В данном случае $R_{ист} = 0,950$ (95,0%) с доверительной вероятностью 90%.

Таким образом, результат диагностической специфичности 100 %, полученный в 48 опытах с образцами геномной ДНК с установленным отрицательным статусом наличия мутаций гена *KRAS* может рассматриваться как доказательство для показателя эффективности – диагностической специфичности медицинского изделия – на уровне 0,950 (95,0%) с доверительной вероятностью 90%.

Воспроизводимость результатов 100%. В процессе испытаний наборы продемонстрировали высокую надежность.

По результатам статистической обработки исследуемое медицинское изделие имеет высокие характеристики эффективности – диагностическая чувствительность (90,9%), диагностическая специфичность (95%) с доверительной вероятностью 90%, что подтверждает высокую диагностическую ценность регистрируемого набора реагентов.

Таким образом, анализ и оценка результатов проведенных клинико-лабораторных испытаний медицинского изделия подтвердили качество набора реагентов, эффективность и безопасность его применения.

Выводы. В результате проведенных клинических испытаний в форме клинико-лабораторных испытаний установлено, что набор реагентов для определения статуса мутаций гена *KRAS* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-*KRAS*-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016 безопасен и клинически эффективен при использовании по назначению, установленному производителем.

1. Результаты проведенных испытаний подтверждают эффективность и безопасность применения медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *KRAS* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-*KRAS*-ткань) по ТУ 21.20.23-006-97638376-2016» производства ООО «ТестГен».

2. Изделие может применяться в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях онкологического профиля. Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология, проктология.

3. Отклонения от алгоритма выполнения клинических испытаний отсутствовали.

В ходе клинических испытаний медицинского изделия были выявлены следующие достоинства:

1. При производстве изделия применены современные, безопасные, при использовании в клинических лабораторных условиях и соблюдении требований инструкции по применению, материалы.

2. Удобство при использовании: изделие представляет собой набор реагентов, готовых к использованию.

3. Медицинское изделие позволяет проводить качественное определение статуса шести мутаций двенадцатого кодона (Gly12Asp, Gly12Ala, Gly12Arg, Gly12Val, Gly12Ser, Gly12Cys) и одной мутации тринадцатого кодона (Gly13Asp) гена *KRAS* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксиро-

ванной в парафине ткани, с высокими показателями диагностической чувствительности 90,9% и диагностической специфичности 95,0 % с доверительной вероятностью 90%.

4. Воспроизводимость результатов 100%, что подтверждает высокую надежность набора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поспехова Н.И., Шубин В.П., Цуканов А.С., Фролов С.А., Шелыгин Ю.А. Молекулярно-генетические маркеры в онкоколопроктологии: помощь в диагностике, прогнозе, лечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 9: 46-7.
2. Ying H.-Q., Wang F., He B.-S., Pan Y.-Q., Gao T.-Y., Xu Y.-Q. et al. The involvement of Kras gene 3'-UTR polymorphisms in risk of cancer and influence on patient response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: a metaanalysis. *Oncotargets Ther.* 2014; 7: 1487–96.
3. Linardou H., Briasoulis E., Dahabreh I.J., Mountzios G., Papadimitriou C., Papadopoulos S. et al. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2011; 37: 221–33.
4. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Попова Н.О. Добродеев А.Ю., Тарасова А.С., Юмов Е.Л. и др. Проблемы и перспективы совершенствования молекулярно-генетической диагностики для назначения таргетных препаратов в онкологии. *Сибирский онкологический журнал*. 2014; 2 (62): 46-55.
5. Проценко С.А. Таргетная терапия при меланоме, гастроинтестинальных стромальных опухолях, дерматофибросаркоме протуберанс. *Практическая онкология*. 2010; 11 (3): 162–70.
6. Амосенко Ф.А., Карпов И.В., Поляков А.В., Коваленко С.П., Шаманин В.А., Любченко Л.Н. Сравнение различных методов молекулярно-генетического анализа соматических мутаций в гене K-ras при колоректальном раке. *Вестник РАМН*. 2012; 2: 35-42.

REFERENCES

1. Pospekhova N.I., Shubin V.P., Tsukanov A.S., Frolov S.A., Shelygin Yu.A. Molecular genetic markers in oncocoloproctology: assistance in diagnosis, prediction, treatment. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 9: 46-7. (in Russian)
2. Ying H.-Q., Wang F., He B.-S., Pan Y.-Q., Gao T.-Y., Xu Y.-Q. et al. The involvement of Kras gene 3'-UTR polymorphisms in risk of cancer and influence on patient response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: a metaanalysis. *Oncotargets Ther.* 2014; 7: 1487–96.
3. Linardou H., Briasoulis E., Dahabreh I.J., Mountzios G., Papadimitriou C., Papadopoulos S. et al. All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2011; 37: 221–33.
4. Gervas P.A., Litvyakov N.V., Popova N.O., Dobrodeev A.Yu., Tarasova A.S., Yumov E.L. et al. Problems and prospects for improving molecular genetic diagnostics for the administration of target drugs in oncology. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2014; 2 (62): 46-55. (in Russian)
5. Protsenko S.A. Target therapy in melanoma, gastrointestinal stromal tumors, dermatofibrosarcoma protuberance. *Prakticheskaya onkologiya*. 2010; 11 (3): 162–70. (in Russian)
6. Amosenko F.A., Karpov I.V., Polyakov A.V., Kovalenko S.P., Shamanin V.A., Lyubchenko L.N. Comparison of different methods of molecular genetic analysis of somatic mutations in the K-ras gene in colorectal cancer. *Vestnik Rossiyskoy Akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 2: 35-42. (in Russian)

Поступила 16.03.20

Принята к печати 15.05.20