

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»

Л.М. Халилова
(по доверенности №95/01 от 30 декабря 2022)
«26» июня 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для определения статуса мутаций
гена *BRAF* и гена *KRAS* методом мультиплексной
ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов
фиксированной ткани «Тест-BRAF-KRAS-ткань»
по ТУ 21.20.23-063-97638376-2022**

Содержание

Введение.....	4
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода	7
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	12
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	21
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	21
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	24
8. Анализируемые образцы	26
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	28
10. Проведение анализа	29
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	32
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	37
13. Утилизация	38
14. Гарантийные обязательства, контакты	39
Приложение А	40
Приложение Б.....	401

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КВМ	контроль взятия материала
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
COSMIC	Catalog of Somatic Mutations in Cancer (международная база соматических мутаций при раковых заболеваниях)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (рецептор эпидермального фактора роста)
FFPE-блок	парафиновый блок, содержащий фиксированные формалином и залитые парафином фрагменты ткани
ID	идентификационный номер
МАРК-путь	сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы

Введение

Рак легкого по сей день остается наиболее распространенной причиной смертности от злокачественных новообразований. Высокая социальная значимость заболевания привела к значительному продвижению в понимании молекулярной биологии опухоли, в частности, наиболее распространенного типа - немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). НМРЛ составляет до 85% всех случаев рака легкого.

Идентифицированы молекулярные профили различных гистологических типов НМРЛ, включающие дифференциальную экспрессию генов и их мутантный статус. При аденокарциноме легкого наибольшее клиническое значение имеет активация онкогенов *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *HER2*, *C-MET*, *PI3K*, *MEK1*, *ALK*, *ROS1* за счет мутаций. Именно белковые продукты этих генов чаще всего являются мишенью для индивидуализированной таргетной терапии.

Целевым анализом, выявляемым при помощи Набора реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань», являются мутации в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), мутация в гене *KRAS* – G12C.

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности ДНК) в отношении соматических мутаций гена *BRAF* и мутации гена *KRAS*.

При раке легкого независимо от мутантного статуса *EGFR* часто происходит активация MAPK-пути за счет мутации гена *KRAS* или гена *BRAF*.

Мутации *KRAS* чаще встречаются в аденокарциноме у европеоидов (15-35%), чем у пациентов из Восточной Азии (0-17%) и редко - при плоскоклеточном раке легкого¹. У курящих в 80% случаев выявляются трансверсии G>T/C (G12C и G12V), что характерно для мутаций, образующихся вследствие экспозиции полициклическими ароматическими углеводородами сигаретного

¹ Мазуренко Н.Н., Кушлинский Н.Е. Молекулярно-генетические маркеры немелкоклеточного рака легкого // Молекулярная медицина. 2014. №4. С.4-13.

дыма. Мутация *KRAS*-G12C - самая частая у больных НМРЛ, обусловленным геном *KRAS*^{2,3}.

Ген *BRAF* кодирует серин-треониновую киназу и активирует MAPK-сигнальный каскад. Активирующие мутации *BRAF* встречаются в 2,6-3% опухолей при НМРЛ, почти всегда - в аденокарциноме с диким типом *EGFR* и *KRAS*, чаще в опухолях у пожилых пациентов⁴.

Наиболее часто встречающиеся мутации гена *BRAF* (более 97%) локализованы в кодоне 600. Из них около 90% мутации – замена валина на глутаминовую кислоту – V600E⁵.

Поскольку мутации *EGFR* и *KRAS/BRAF* взаимоисключающие, наличие мутации *KRAS/BRAF* является маркером резистентности опухоли легкого к ингибиторам *EGFR*⁶.

Литература, содержащая рекомендации по диагностике мутантных статусов гена *KRAS*, гена *BRAF* при раке легкого:

- клинические рекомендации: «Злокачественное новообразование бронхов и легкого» (2022 г.);

- немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Рекомендации ESMO (и European Society for Medical Oncology) для пациентов (2019 г.);

- NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guidelines for Patients: Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (2023 г.).

² Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Гагарин И.М., Чуев Ю.В., Мочальникова В.В., Коломейцева А.А., Горбунова В.А. Мутации *EGFR* и *KRAS*, важные для таргетной терапии немелкоклеточного рака легких // Молекулярная медицина. 2013. №6. С. 55-59.

³ Fiala O., Pesek M., Finek J., Benesova L., Belsanova B., Minarik M. The dominant role of G12C over other *KRAS* mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer // Cancer Genet. 2013. Vol.206 №1-2. P.26-31.

⁴ Jernal A., Bray F., Center M.M. et al. Global cancer statistics // CA J. Clin. 2011. Vol.61. № 2. P. 69-90.

⁵ In G.K., Poorman K., Saul M. et al. Molecular profiling of melanoma brain metastases compared to primary cutaneous melanoma and to extracranial metastases // Oncotarget. 2020. Vol. 11. № 33. P. 3118–3128.

⁶ Takayuki Kosaka, Yasushi Yatabe, Hideki Endoh, Hiroyuki Kuwano, Takashi Takahashi, Tetsuya Mitsudomi; Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications // Cancer Res. 2004. Vol. 64. № 24. P. 8919–8923.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» рекомендуется применять при обследовании пациентов со злокачественными опухолевыми заболеваниями, преимущественно раком легкого, с целью определения эффективной стратегии таргетной терапии, прогнозирования или мониторинга ответной реакции на терапию рака и риска рецидива или метастазирования вне зависимости от стадии заболевания всех групп населения.

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

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

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» предназначен для качественного определения статуса мутаций в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), мутации в гене *KRAS* – G12C методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробе геномной ДНК человека, выделенной из ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), при обследовании пациентов со злокачественными опухолевыми заболеваниями, преимущественно раком легкого, с целью определения эффективной стратегии таргетной терапии, прогнозирования или мониторинга ответной реакции на терапию рака и риска рецидива или метастазирования.

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться при обследовании пациентов со злокачественными опухолевыми заболеваниями, преимущественно раком легкого, с целью определения эффективной стратегии таргетной терапии, прогнозирования или мониторинга ответной реакции на терапию рака и риска рецидива или метастазирования.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная полимеразная цепная реакция в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека, выделенные из ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок).

Принцип определения

Выявление статуса мутаций в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), мутации в гене *KRAS* - G12C методом мультиплексной ПЦР в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробе геномной ДНК, выделенной из ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), 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 ДНК проводятся реакции амплификации участков генов при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», смесь dNTP и оптимизированный буфер.

В составе праймер-миксов присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушител, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для мультиплексного качественного определения статуса мутаций в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), мутации в гене *KRAS* - G12C, а также нормальные варианты гена *BRAF* и гена *KRAS*, используемые в качестве контроля взятия материала (КВМ) (табл. 1).

Таблица 1. Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Мишени по каналам детекции	
	FAM	HEX
BRAF-600E/Ес	Мутации V600E, V600Ес в гене <i>BRAF</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>BRAF</i> человека)
KRAS-G12C	Мутация G12C в гене <i>KRAS</i>	KBM (ген <i>KRAS</i> человека)

KBM позволяет подтвердить факт взятия материала от человека, оценить качество, эффективность выделения ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

Обнаружение мутаций зависит от целостности образца и количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце. Чистота выделенной ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280нм), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,8. Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-50 нг/мкл.

Ткань опухоли не является гомогенной, в связи с этим результаты анализа, полученные из образца ткани, могут не совпадать с результатами других секций той же самой опухоли. Кроме того, образцы опухоли могут содержать и нормальную (неопухолевую ткань). При использовании пробы геномной ДНК, выделенной из ткани, не содержащей опухоль, набор «Тест-BRAF-KRAS-ткань» не сможет выявить детектируемые мутации.

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

Набор реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии, он предназначен только для качественного определения статуса мутаций *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации

V600E, V600E complex, но не различает их), мутации в гене *KRAS* - G12C.

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Время проведения реакции мультиплексной ПЦР составляет около 60 мин. (без учета пробоподготовки), время зависит от типа амплификатора.

3. Состав набора реагентов

Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 28 определений каждого мультиплекса (*BRAF*-600E/Ес – мутации гена *BRAF* – V600E, V600Ес (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их); *KRAS*-G12C – мутация гена *KRAS* – G12C), что соответствует определению 24 исследуемых образцов с отрицательным и положительным контролем в каждой постановке или 9 единичным постановкам с отрицательным и положительным контролями.

Таблица 2. Состав набора реагентов «Тест-*BRAF*-*KRAS*-ткань»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 230 мкл
2	Праймер-микс <i>BRAF</i> -600E/Ес	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл
3	Праймер-микс <i>KRAS</i> -G12C	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл
4	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 110 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 250 мкл

ПЦР-буфер готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты и оптимизированный буфер.

Праймер-микс BRAF-600E/Ес готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям V600E, V600E complex (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *BRAF* (детекция осуществляется по каналу FAM) и к нормальному варианту гена *BRAF*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX).

Праймер-микс KRAS-G12C готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутации G12C гена *KRAS* (детекция осуществляется по каналу FAM) и к нормальному варианту гена *KRAS*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX).

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: фрагменты нормального участка гена *BRAF* человека, нормального участка гена *KRAS* человека, специфичные фрагменты с мутациями гена *BRAF* человека - V600E и V600E complex, мутацией гена *KRAS* человека - G12C, каждый из которых заключен в плазмидный вектор pAl-TA. Содержит 12,5% мутантных и 87,5% нормальных копий ДНК. ПКО находятся в 10% ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА) и содержит азид натрия 0,05% в качестве консерванта.

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

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

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 3. Набор реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань»

Наименование показателя	Характеристики и нормы		Пункт ТУ
1 Технические характеристики			
1.1 Внешний вид			
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 230 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс BRAF-600E/Ес	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс KRAS-G12C	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 110 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 250 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
1.2 Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-063-97638376-2022		Раздел 7, пункт 7.9
1.3 Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-063-97638376-2022		Раздел 7, пункт 7.9
1.4 Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-063-97638376-2022		Раздел 7, пункт 7.9
2. Функциональные характеристики			
2.1. Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM Ct≤35 и HEX Ct≤35		Раздел 7, пункт 7.7.2
2.2. Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM, HEX Ct не указан (график накопления флуоресценции отсутствует), либо HEX Ct >35.		Раздел 7, пункт 7.7.2
2.3. Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует либо ниже пороговой линии (Threshold)). По каналу HEX Ct≤35.		Раздел 7, пункт 7.7.2
2.4. Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналу FAM Ct ≤40. По каналу HEX Ct≤35.		Раздел 7, пункт 7.7.2

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

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к мутациям в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), мутации в гене *KRAS* - G12C, а также нормальным вариантам гена *BRAF* и гена *KRAS* человека.

Аналитическая специфичность целевых фрагментов гена *BRAF* и гена *KRAS* подтверждалась *in silico* с помощью ресурса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Список определяемых мутаций с указанием COSMIC ID* мутации представлен в таблице 4.

Таблица 4. Список определяемых мутаций с указанием ID*

Набор мутаций, определяемых с помощью набора реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань»			COSMIC ID*
Ген	Замена аминокислоты	Замена нуклеотида	
<i>BRAF</i>	p.V600E	c.1799T>A	476
	p.V600E (Ec)	c.1799_1800TG>AA (complex)	475
<i>KRAS</i>	p.G12C	c.34G>T	516

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

4.2.2 Аналитическая специфичность: оценка кросс-реактивности

Проведено тестирование изделия на гомологах генов *BRAF* и *KRAS*. Набор реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» не дает перекрестный реакций с гомологичными генами *BRAF* – *ARAF*, *RAF1*, гомологичными генами *KRAS* – *NRAS*, *HRAS*.

Также подтверждена специфичность изделия в отношении микрофлоры легкого в максимальной концентрации патогена. При исследовании ДНК штаммов из коллекции ATCC (American Type

Culture Collection, США): *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 49619™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, Strain Seattle 1945 (ATCC® 25923™), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® BAA-1705™), *Mycoplasma pneumoniae*, Strain PI 1428 (ATCC® 29085™), *Chlamydomonas pneumoniae*, Strain CM-1 (ATCC® VR-1360™), *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*, Strain Philadelphia 1 (ATCC® 33152™), *Staphylococcus epidermidis*, FDA Strain PCI 1200 (ATCC® 12228™) в концентрации от 10^6 до 10^7 клеток на мл неспецифических реакций выявлено не было.

Вышеперечисленные микроорганизмы не оказывают влияние на способность Набора реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» различать мутантные и нормальные варианты гена *BRAF* и гена *KRAS*.

4.2.3 Предел обнаружения (аналитическая чувствительность)

Предел обнаружения мутации в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) в образцах объемом 1 мкл с частотой выявления 95 % для каждого амплификатора, подтвержденный результатами клинических испытаний, составляет:

Используй- мый амплифи- катор	Уравнение регрессии	Пересе- чение	Наклон	Концентрация (LOD) мутаций гена <i>BRAF</i> с доверительной вероятностью 95%		Доверительный интервал с доверительной вероятностью 95%
				log10 копий/ мкл	копий/ мкл	
Набор выделения «ДНК-Ткань-Ф»						
ДТпрайм	y = 1,5115x + 3,7129	3,7129	1,5115	1,937	86	32,32-139,68
CFX 96	y = 1,5492x + 3,6528	3,6528	1,5492	1,928	85	31,32-138,68
Quant Studio 5	y = 1,4432x + 3,7638	3,7638	1,4432	1,993	98	44,32-151,68
Набор выделения «ДНК-Ткань-М»						
ДТпрайм	y = 1,5238x + 3,6052	3,6052	1,5238	1,992	98	44,32-151,68
CFX 96	y = 1,5935x + 3,6386	3,6386	1,5935	1,884	76	22,32-129,68
Quant Studio 5	y = 1,6106x + 3,5579	3,5579	1,6106	1,914	82	28,32-135,68

Предел обнаружения мутации в гене *KRAS* – G12C в образцах объемом 1 мкл с частотой выявления 95 % для каждого амплификатора, подтвержденный результатами клинических испытаний, составляет:

Используй- мый амплифи- катор	Уравнение регрессии	Пересе- чение	Наклон	Концентрация (LOD) мутаций гена <i>KRAS</i> с доверительной вероятностью 95%		Доверительный интервал с доверительной вероятностью 95%
				log10 копий/ мкл	копий/ мкл	
Набор выделения «ДНК-Ткань-Ф»						
ДТпрайм	y = 1,4292x + 3,7803	3,7803	1,4292	2,001	100	46,32-153,68
CFX 96	y = 1,6536x + 3,4232	3,4232	1,6536	1,945	88	34,32-141,68
Quant Studio 5	y = 1,6817x + 3,4285	3,4285	1,6817	1,910	81	27,32-134,68
Набор выделения «ДНК-Ткань-М»						
ДТпрайм	y = 1,5495x + 3,6224	3,6224	1,5495	1,947	89	35,32-142,68
CFX 96	y = 1,6504x + 3,4166	3,4166	1,6504	1,953	90	36,32-143,58
Quant Studio 5	y = 1,5491x + 3,6904	3,6904	1,5491	1,904	80	26,32-133,68

Выделение ДНК из исследуемых образцов осуществлялось с помощью наборов для экстракции ДНК:

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018 г),

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-М) по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14273 от 06.05.2021 г).»

4.2.4 Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости:

1. Коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%;

2. Коэффициент вариации в условиях воспроизводимости набора составляет не более 5%.

4.2.5 Влияние интерферирующих веществ

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

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение образца ткани гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;

3) вещества, добавляемые во время подготовки образца - в данном случае парафин, который используется для приготовления FFPE-блока.

Исследованные концентрации интерферирующих веществ, которые приведены в таблице 6.

Таблица 6. Концентрация интерферирующих веществ

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Вещества, добавляемые во время подготовки образца	
Парафин	$1 \cdot 10^{-4}$ мкл/мкл
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Гемцитабин (рекомендуется в рамках проведения неоадьювантной химиотерапии при раке легкого)	0,04 мг/мл

Цисплатин (рекомендуется в рамках проведения неоадьювантной химиотерапии при раке легкого)	0,0027 мг/мл
Винорелбин (рекомендуется в рамках проведения неоадьювантной химиотерапии при раке легкого)	0,002 мг/мл
Паклитаксел (рекомендуется в рамках проведения неоадьювантной химиотерапии при раке легкого)	0,006 мг/мл
Карбоплатин (рекомендуется в рамках проведения неоадьювантной химиотерапии при раке легкого)	0,002 мг/мл
Доцетаксел (рекомендуется в рамках проведения неоадьювантной химиотерапии при раке легкого)	0,008 мг/мл
Мекинист (показан при лечении пациентов с немелкоклеточным раком легкого с мутацией гена <i>BRAF-V600E</i>)	0,0001 мг/мл
Тафинлар (показан при лечении пациентов с немелкоклеточным раком легкого с мутацией гена <i>BRAF-V600E</i>)	0,01 мг/мл

На основании результатов исследования потенциально интерферирующие вещества, встречающиеся при процедуре выделения ДНК из клинического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань», не оказывают влияние на результат анализа.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);
- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом;
- для анализа необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенные из ткани опухоли, подтвержденной гистологически;

- минимальное содержание опухоли для проведения анализа – 40% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

4.3. Характеристики клинической эффективности

В ходе проведения клинических испытаний было использовано 103 образца ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), от пациентов со злокачественными опухолевыми заболеваниями, преимущественно раком легкого, которые были получены из банка остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России.

Статус мутаций генов *BRAF* и *KRAS* был установлен в ходе проведения клинических испытаний регистрируемого медицинского изделия в ходе лечебно-диагностического процесса с помощью зарегистрированного МИ «Набор реагентов для качественного определения мутаций в генах человека: EGFR (экзоны 18, 19, 20, 21), KRAS (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146)), NRAS (экзоны 2 (с.12, 13), 3 (с.59, 61), 4 (с.117, 146) и BRAF (экзон 15 (с.600)) методом ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК, выделенной из FFPE-блоков, для диагностики *in vitro* ("Инсайдер") по ТУ 21.20.23-018-11248074-2018», производства ООО "НОМОТЕК", Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14479 от 01.06.2021 г.) и результатами секвенирования данных образцов по Сэнгеру.

Количество образцов выбрано исходя из наличия образцов в банке остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, достаточных по объемам и удовлетворяющих параметрам программы клинического испытания, а также с учетом требований ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом рекомендаций Международного руководства CLSI EP09-A3.

Испытания проводились по средствам проспективного исследования диагностических характеристик набора реагентов «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *BRAF* и гена *KRAS* методом мультиплексной ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной ткани «Тест-*BRAF-KRAS*-

ткань» по ТУ 21.20.23-063-97638376-2023» на основании сопоставления результатов тестирования одних и тех же проб клинического материала испытуемым набором реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» с результатами полученными набором сравнения "Инсайдер" (ПУ № РЗН 2021/14479 от 01.06.2021 г.) и результатами секвенирования данных образцов по Сэнгеру.

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия стало совпадение результатов.

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

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018 г),

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-М) по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14273 от 06.05.2021 г).

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

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

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

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

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100%.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань», производства ООО «ТестГен», для оценки межсерийной сходимости.

Из 103 протестированных образцов ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-

блок) испытуемым набором, набором сравнения и секвенированием по Сэнгеру - ложноположительных и ложноотрицательных результатов не выявлено.

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

*Результаты изучения диагностических характеристик
испытуемого набора*

Исследуемый ген	Мутация	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
BRAF	p.V600E (c.1799T>A)	74	132	100% (95% ДИ:96,03%-100%)	100% (95% ДИ:97,75%-100%)
	p.V600E complex (c.1799_1800 TG>AA)	42	164	100% (95% ДИ:93,11%-100%)	100% (95% ДИ:98,18%-100%)
KRAS	p.G12C (c.34G>T)	90	116	100% (95% ДИ:96,72%-100%)	100% (95% ДИ:97,45%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

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

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для определения статуса мутаций гена BRAF и гена KRAS методом мультиплексной ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной ткани «Тест-BRAF-KRAS-ткань» по ТУ 21.20.23-063-97638376-2022» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

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

Реагенты, входящие в набор «Тест-BRAF-KRAS-ткань», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Тест-BRAF-KRAS-ткань», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (МУ 287-113), МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

1. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с действующими правилами и нормативами;

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

- лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует

начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса;

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

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

2. Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

3. Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит;

4. Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию;

5. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

6. Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно мыть руки по окончании работы;

7. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

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

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

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

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

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, Боксы микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С» по ТУ 32.50.50-010-51495026-2020, производства ЗАО «Ламинарные системы», РУ № ФСР 2012/13259 от 29.07.2021 или Бокс для стерильных работ DNA/RNA UV-Cleaner Box UVC/T-M-AR, Biosan, Латвия, РУ № РЗН 2023/19369 от 18.01.2023);

2. Вортекс (например, Высокоскоростная мини-центрифуга Microspin 12, BIOSAN SIA, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/10116 от 11.07.2011 или центрифуга-встряхиватель CM-70M, производства SIA «ELMI», Латвия, РУ № РЗН 2016/4616 от 31.05.2023);

3. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5–10 мкл, 10–100 мкл или 20–200 мкл, 100–1000 мкл (например, Eppendorf Research Plus, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011 или «Biohit», Финляндия, РУ № ФСЗ 2012/12201 от 18.05.2012);

4. Холодильник от +2 °C до +8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C (например, Холодильник комбинированный лабораторный ХЛ-250 «POZIS», ХЛ-250-1 «POZIS» по ТУ 9452-203-07503307-2012, производства АО «ПОЗИС», РУ № РЗН 2016/4043 от 08.05.2019);

5. Амплификатор⁷ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM и HEX:

⁷ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в

- CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016),
- ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011),
- QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/12077 от 27.02.2014);
2. Одноразовые пробирки типа Эппендорф на 1,5–2,0 мл («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/11892 от 26.08.2014);
3. Планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой **и прозрачными стенками** или тонкостенные одноразовые пробирки для ПЦР с оптически прозрачной плоской крышкой **и прозрачными стенками** («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/11892 от 26.08.2014):
 - пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл,
 - пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл в стрипах.
4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька;
5. Емкость с дезинфицирующим раствором;
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
8. Набор для выделения ДНК из образцов ткани, фиксированной в 10% растворе нейтрального формалина и заключённой в парафиновый блок – FFPE-блок (см. п. 8.2 Инструкции).

неоткалиброванным приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека, выделенные ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок).

8.1 Процедура получения биологического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2021.

Забор биологического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами I-IV группы патогенности.

Забор материала на исследование

Биопсийный и (или) операционный материал.

Материал забирают из патологически изменённого очага: из его центральной зоны и зоны, граничащей с неизменёнными тканями. Взятый материал помещают в ёмкость с 10% раствором нейтрального формалина. После фиксации проводят процедуру лабораторной обработки биологического материала, которая включает в себя следующие процедуры – проводка (обезвоживание и пропитывание парафином); заливка в парафин с изготовлением парафиновых блоков – FFPE-блоков); микротомия (изготовление парафиновых срезов).

Критерии пригодности гистологических препаратов для выделения ДНК для последующего молекулярно-генетического анализа опухолевых клеток:

1. По результатам морфологического исследования опухолевые зоны должны занимать не менее 40% площади ткани в срезе с FFPE-блока;
2. По результатам морфологического исследования зоны некроза и кровоизлияния в совокупности должны занимать не более 15% площади ткани в срезе с FFPE-блока.

В случае, если образец не соответствует хотя бы одному из перечисленных критериев, рекомендуется использовать другой образец.

При подготовке срезов с парафиновых блоков необходимо минимизировать риск кросс-контаминации образцов, для чего необходимо:

- работать в одноразовых неопудренных перчатках;
- использовать одноразовые лезвия для микротомы и стерильные пинцеты;
- первые два среза с каждого блока утилизировать, а для молекулярного исследования использовать срезы, начиная с третьего;
- не помещать срезы на водяную баню.

Условия хранения и транспортировки нативного материала (тканевой биопсийный и (или) операционный материал):

- при температуре 2-8 °С – в течение 24 ч;
- при температуре от -24 до -16 °С – в течение 3 мес;
- при температуре не выше -68 °С – 3 года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения и транспортировки тканевого биопсийного и (или) операционного материала в парафиновых блоках:

1) образцы тканевого материала в парафиновых блоках:

- при температуре 18-25°С – 3 года, не допуская плавления парафина;

2) образцы тканевого материала после депарафинизации:

- при температуре 2-8 °С – в течение 1 мес;
- при температуре от -24 до -16 °С – 1 год.

Допускается двукратное замораживание-оттаивание материала.

Утилизация клинического материала (класс Б) осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

8.2 Процедура получения пробы ДНК человека, выделенной из биологического материала

Для выделения геномной ДНК человека из образцов ткани, фиксированной в 10% растворе нейтрального формалина и заключённой в парафиновый блок – FFPE-блок, рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018 г).

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-М) по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14273 от 06.05.2021 г).

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Также для предотвращения ингибирования ПЦР небольшую часть образца (исходя из объема, необходимого для подготовки ПЦР) после выделения рекомендуется развести в 2-5 раз элюентом из используемого набора для выделения.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов,
- при температуре минус 20 °С – 1 год.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

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

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером, Праймер-миксами, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек., затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,2 мл для ПЦР из расчёта для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов (при использовании двух пробирок для одного образца – $x2$)⁸ + 1 ПКО + 1 ОКО.

В зависимости от необходимости выявления конкретных мутаций, каждый образец ставится с одним или несколькими мультиплексами (праймер-миксами).

В таблице 7 приведена схема расположения ПЦР-пробирок при использовании двух мультиплексов.

Таблица 7. Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	Образец 1	Образец n	ПКО	ОКО
BRAF-600E/Ес (статус мутаций <i>BRAF</i> - <i>V600E</i> / <i>V600Ec</i>)	○	○	○	○
KRAS-G12C (статус мутации <i>KRAS</i> – <i>G12C</i>)	○	○	○	○

⁸ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторях.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

А) Подготовка ПЦР

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

Общий объём реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объём реакции. При изменении объёма чувствительность метода резко снижается!

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 4 мкл,
2. Соответствующий праймер-микс (BRAF-600E/Ес, KRAS-G12C) – 10 мкл,
3. Образец (исследуемый образец ДНК, ПКО, ОКО) – 6 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 7 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,2 мл для ПЦР. Для каждого мультиплекса берётся необходимое количество пробирок для исследуемых образцов (при использовании двух пробирок для одного образца – х2) + 1 ПКО + 1 ОКО.

2. Внести в каждую пробирку по 4 мкл ПЦР-буфера⁹.

3. Внести по 10 мкл Праймер-миксов (BRAF-600E/Ес, KRAS-G12C) в пробирки для соответствующих мультиплексов.

⁹ Рекомендуются сначала приготовить смесь праймер-микса и ПЦР-буфера для каждого мультиплекса в отдельной пробирке на 1,5-2,0 мл из расчёта: $(n+3) \times 4$ мкл ПЦР-буфера + $(n+3) \times 10$ мкл соответствующего праймер-микса, где n – количество образцов. Перемешать на вортексе, осадить капли коротким центрифугированием и внести по 14 мкл в ПЦР-пробирки для соответствующего мультиплекса согласно таблице 7.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК¹⁰. В пробирки для ПКО и ОКО ДНК не вносится.

5. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ПКО.

6. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ОКО.

7. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1-3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

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

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

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

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протоколы ПЦР для разных приборов указаны в таблице 8-9.

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

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM, HEX.

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

¹⁰ Для предотвращения ингибирования ПЦР объем образца при внесении в ПЦР-пробирку может быть снижен до 1-5 мкл, при этом объем реакции доводится до 20 мкл деионизованной водой из ОКО, либо предварительно небольшую часть образца после выделения рекомендуется развести в 2-5 раз элюентом из используемого набора для выделения.

Таблица 8. Протокол ПЦР для приборов производства ООО «ДНК-Технология»

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:05	-	50
	64	00:15	FAM, HEX	

ВНИМАНИЕ! Для приборов производства «ДНК-Технология» следует использовать заводские параметры экспозиции оптических измерений для каждого канала.

Таблица 9. Протокол ПЦР для приборов планшетного типа других производителей

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:05	-	50
	62	00:15	FAM, HEX	

ВНИМАНИЕ! В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (стандартная настройка может привести к получению ложноотрицательных результатов). Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x1 – m2, x2 – m2. Также следует убрать пассивный референс («Passive Reference» → «None») во вкладке «Plate» - «Quick Setup».

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия (Threshold) устанавливается индивидуально для каждого канала. Уровень пороговой линии обычно соответствует 5-10% от среднего значения уровней флюоресценции ПКО всех мультиплексов.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM, HEX.

Сначала оценивают прохождение реакции и значения C_t в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

ВНИМАНИЕ! Перед интерпретацией результатов для некоторых приборов необходимо сделать следующие настройки анализа данных:

- ДТпрайм: метод «Пороговый (C_t)»;
- CFX 96: может возникнуть необходимость выравнивания графиков с некорректным уклоном с помощью настроек (Settings) базовых циклов (Baseline Threshold → Baseline Cycles).

Таблица 10. Интерпретация результатов по каналам детекции

Мультиплекс (праймер-микс)	Мишени по каналам детекции	
	FAM	HEX
BRAF-600E/Ес	Мутации V600E, V600E complex в гене <i>BRAF</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>BRAF</i> человека)
KRAS-G12C	Мутация G12C в гене <i>KRAS</i>	KBM (ген <i>KRAS</i> человека)

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 11).

Таблица 11. Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Выбранный флуорофор	
	FAM (мутации BRAF-V600E, V600E complex)	HEX (нормальный вариант гена <i>BRAF</i> , гена <i>KRAS</i>)
ОКО	Отсутствует	$C_t > 35$ или отсутствует
ПКО	$C_t \leq 35$	$C_t \leq 35$

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, результаты всей

постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, необходимо заменить реагенты.

Набор непригоден к дальнейшему использованию, если кривые амплификации по каналам FAM и HEX в пробирках ПКО ниже установленной пороговой линии, и этот результат устойчиво воспроизводится.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам (таблица 10):

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

- по каналу HEX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продуктов амплификации ДНК нормальных вариантов гена *BRAF* / гена *KRAS* (выступает в качестве контроля взятия материала – KBM).

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

Прохождение реакции по HEX $Ct \leq 35$ говорит о достаточном качестве забора материала, эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

При отсутствии реакции по каналу HEX или $Ct > 35$ и одновременном отсутствии реакции по каналам спецификации FAM, результат следует считать невалидным, для данного исследуемого образца следует провести повторное исследование, начиная с выделения ДНК.

13. Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 12-

Таблица 12. Принцип интерпретации результатов для мультиплекса BRAF-600E/Ес (определяет мутации V600E, V600E complex гена BRAF, но не различает их)

Значения Ct		Результат
Канал KBM (HEX)	Канал спецификации (FAM)	
Ct ≤ 35	Ct ≤ 35	Мутация V600E/V600Eс гена BRAF обнаружена
	Ct отсутствует	Мутации V600E, V600Eс гена BRAF не обнаружены или ниже предела обнаружения
	Ct > 35	Результат на наличие мутаций V600E, V600Eс в гене BRAF сомнительный
Ct > 35 или отсутствует	не учитывается	Результат на наличие мутаций невалидный

Таблица 13. Принцип интерпретации результатов для мультиплекса KRAS-G12C (определяет мутацию G12C гена KRAS)

Значения Ct		ΔCt(FAM-HEX)	Результат
Канал KBM (HEX)	Канал спецификации (FAM)		
Ct ≤ 35	Ct ≤ 42	≤ 15	Мутация G12C гена KRAS обнаружена
	Ct ≤ 42	> 15	Мутация G12C гена KRAS не обнаружена или ниже предела обнаружения
	Ct отсутствует	не учитывается	
	Ct > 42	не учитывается	Результат на наличие мутации G12C гена KRAS сомнительный
Ct > 35 или отсутствует	не учитывается	не учитывается	Результат на наличие мутаций невалидный

Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ПЦР выделенного препарата ДНК.

Если образец проверялся на одном мультиплексе в двух пробирках, и один из дублей имеет отрицательный или сомнительный результат, другой – положительный, то необходимо заново провести анализ.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо заново провести анализ и при возможности образец поставить на одном мультиплексе в двух пробирках.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный положительный или отрицательный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом-онкологом), с учётом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, для определения эффективной стратегии таргетной терапии ингибиторами киназной активности BRAF и MEK, ингибиторами KRAS-G12C, ингибиторами EGFR и прогнозирования эффективности лечения при обследовании пациентов с опухолевыми заболеваниями, преимущественно раком легкого.

Литература с рекомендациями по диагностике мутантных статусов гена *KRAS*, гена *BRAF* при раке легкого:

- клинические рекомендации: «Злокачественное новообразование бронхов и легкого» (2022 г.);
- немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Рекомендации ESMO (и European Society for Medical Oncology) для пациентов (2019 г.);
- NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guidelines for Patients: Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (2023 г.).

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от -24 до -16 °С до вскрытия в течение всего срока годности набора.

После вскрытия хранить при температуре от -24 до 8 °С в течение 6 месяцев.

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

Транспортирование

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

Набор реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» транспортировать при температуре от -24 до 8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре 15–25 °С не более 3 суток.

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

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

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и

эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

Срок годности набора реагентов «Тест-BRAF-KRAS-ткань» в процессе использования - 6 месяцев после первого открытия первичной упаковки, при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме жёлтого и красного).

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

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента

водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

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

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

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

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

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

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

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023	Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования.

Приложение Б

Символы маркировки

Символ	Расшифровка
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Температурный диапазон
	Код партии
	Использовать до...
	Дата изготовления
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Пиктограмма «Верх» показывает правильное положение груза в пространстве. Стрелки указывают на верхнюю часть содержимого. Транспортную упаковку с этим символом нельзя переворачивать или сваливать на бок. Ее нужно хранить и перевозить исключительно вертикально.