

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л.М. Халилова
(по доверенности №95/01 от 30 декабря 2022)
«12» января 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для определения статуса мутаций
гена *BRAF* методом мультиплексной ПЦР-РВ
в пробе геномной ДНК человека из образцов
фиксированной ткани «Тест-*BRAF*-ткань-мульти»
по ТУ 21.20.23-034-97638376-2020**

Содержание

Введение.....	4
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода	8
3. Состав набора реагентов	11
4. Характеристики набора реагентов.....	14
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.	20
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	20
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	22
8. Анализируемые образцы	24
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	28
10. Проведение анализа	30
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	32
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	37
13. Утилизация	39
14. Гарантийные обязательства, контакты	40
Приложение А	41
Приложение Б.....	43

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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

Введение

Ген *BRAF* входит в состав сигнального пути EGFR, отвечающего за процессы ангиогенеза и пролиферации клеток. В нормальной клетке этот сигнальный путь в управляемо-регулируемом состоянии, но при возникновении активирующей мутации в любом компоненте этого сигнального пути мутантный ген начинает непрерывно продуцировать постоянно активированный белок. Этот белок запускает механизм непрерывной клеточной пролиферации, в результате чего образуются опухоли.

Мутации в гене *BRAF* присутствуют примерно в 50% случаев меланомы, 40% – папиллярно-тиреоидных опухолей, 30% – опухолей яичника, 10% – колоректального рака и около 10% – опухолей простаты.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти», являются мутации в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), V600K, V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации V600R, V600D, V600Dc, но не различает их), V600M.

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

Ген *BRAF* (7q34) кодирует серин-треониновую киназу, мутации в активирующем домене которой вызывают стабильную каскадную гиперактивацию митоген-активированных протеинкиназ MEK и ERK¹.

Ген *BRAF* относится к протоонкогенам – примерно в 7-8% случаев злокачественных опухолей человека обнаруживаются активирующие соматические мутации в этом гене, которые чаще всего локализуются в 15 экзоне гена *BRAF* (кодоны 600 и 601). Мутационный статус гена *BRAF* может быть использован как прогностический и особенно как предикативный маркер – наличие мутации ассоциировано с потенциальной устойчивостью к любым

¹ Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи // Успехи молекулярной биологии. – 2014. – вып. 2. – С.26-35.

ингибиторам рецепторных тирозинкиназ, а также к монотерапии ингибиторами mTOR².

Наиболее часто встречающиеся мутации (более 97%) локализованы в кодоне 600. Из них около 90% мутации – замена валина на глутаминовую кислоту – V600E. Менее распространёнными считаются замены азотистых оснований – тимина – V600K (около 8-20%), аргинина V600R – 1%, лейцина V600M – 0,3%, аспарагиновой кислоты V600D – 0,1%³.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Показания к применению: Набор реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» рекомендуется применять при обследовании пациентов с опухолевыми заболеваниями (меланома, папиллярный рак щитовидной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак предстательной железы) с целью определения эффективной стратегии таргетной терапии ингибиторами киназной активности *BRAF* и *MEK* и прогнозирования эффективности лечения.

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*-ткань-мульти» не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

² Качко В.А., Зарецкий А.Р., Ванушко В.Э. Тестирование сматических мутаций: роль в дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы //Эндокринная хирургия. – 2019. – Т. 13. - №1. – С. 26-41.

³ 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.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» предназначен для качественного определения статуса мутаций в гене *BRAF* - V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), V600K, V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации V600R, V600D, V600Dc, но не различает их), V600M методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно-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 с опухолевыми заболеваниями (меланома, папиллярный рак щитовидной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак предстательной железы) с целью определения эффективной стратегии таргетной терапии ингибиторами киназной активности *BRAF* и *MEK* и прогнозирования эффективности лечения (Клинические рекомендации: «Меланома кожи и слизистых оболочек», С43, С51, С60.9, С63.2; «Рак щитовидной железы», С73; «Рак яичников/рак маточной трубы/первичный рак брюшины», С48, С56, С57; «Рак прямой кишки», С20; «Рак предстательной железы», С61. Взрослые. 2021. Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» (утв. Минздравом России).

Функциональное назначение: полученные результаты могут использоваться при обследовании пациентов с опухолевыми заболеваниями (меланома, папиллярный рак щитовидной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак предстательной железы) с целью определения эффективной стратегии таргетной терапии ингибиторами киназной активности *BRAF* и *MEK* и прогнозирования эффективности лечения.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-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), V600K, V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации V600R, V600D, V600Dc, но не различает их), V600M методом мультиплексной ПЦР в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробе геномной ДНК, выделенной из биологического материала, 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, урацил-ДНК-гликозилазу и оптимизированный буфер. Наличие фермента урацил-ДНК-гликозилазы препятствует получению ложноположительных результатов при контаминации продуктами амплификации, при этом фермент полностью инактивируется в процессе первого цикла денатурации ДНК и не препятствует амплификации продуктов текущей реакции.

В составе праймер-микса присутствуют флуоресцентно-меченые 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 V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), V600K, V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации V600R, V600D, V600Dc, но не различает их), V600M, а также нормальный вариант гена *BRAF*, используемому в качестве контроля взятия материала, далее KBM (табл. 1).

Таблица 1 – Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/Green	HEX/Yellow
600E/Ес	Мутации V600E, V600Eс в гене <i>BRAF</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>BRAF</i> человека)
600K	Мутация V600K в гене <i>BRAF</i>	KBM (ген <i>BRAF</i> человека)
600R/D/Dc	Мутации V600R, V600D, V600Dc в гене <i>BRAF</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>BRAF</i> человека)
600M	Мутация V600M в гене <i>BRAF</i>	KBM (ген <i>BRAF</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 ($A_{260}/A_{280\text{nm}}$), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4. 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*-ткань-мульти» не сможет выявить мутации гена *BRAF*.

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*-ткань-мульти» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» предназначен только для качественного определения статуса мутаций V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), V600K, V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации V600R, V600D, V600Dc, но не различает их), V600M гена *BRAF*.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

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

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

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

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» выпускается в 1 форме комплектации - «Тест-*BRAF*-ткань-мульти».

Количество анализируемых проб

Набор реагентов рассчитан на 28 определений каждого мультиплекса (600E/Ес – мутации V600E, V600Eс (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их); 600K – мутация V600K; 600R/D/Dc – мутации V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации V600R, V600D, V600Dc, но не различает их); 600M – мутация V600M), что соответствует определению 24 исследуемых образцов с отрицательным и положительным контролем в каждой постановке или 9 единичным постановкам с отрицательным и положительным контролями.

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав набора реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 450 мкл
2	Праймер-микс 600E/Ес	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл
3	Праймер-микс 600K	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл
4	Праймер-микс 600R/D/Dc	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл
5	Праймер-микс 600M	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл
6	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 220 мкл
7	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 220 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов для обеспечения соблюдения условий транспортирования помещается в термоконтейнер

пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

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

Праймер-микс 600E/Ес готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям V600E, V600Ec (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *BRAF* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к нормальному варианту гена *BRAF*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 600K готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутации V600K гена *BRAF* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к нормальному варианту гена *BRAF*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 600R/D/Dc готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *BRAF* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к нормальному варианту гена *BRAF*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 600M готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутации V600M гена *BRAF* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green)

и к нормальному варианту гена *BRAF*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

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

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

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: нормальный участок гена *BRAF* человека, специфичные фрагменты с мутациями гена *BRAF* человека: V600E, V600Eс, V600K, V600R, V600D, V600Dс, V600M, заключённые в плазмидный вектор pAl-TA. Содержит 12,5% мутантных и 87,5% нормальных копий ДНК.

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

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*-ткань-мульти»

Наименование показателя	Характеристики и нормы		Пункт ТУ
1.1 Технические характеристики			
Наименование реагента	Внешний вид	Количество, объем, мкл ($\pm 5\%$)	
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 450 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 600E/Ес	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 600К	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 600R/D/Dс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 600M	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 280 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 220 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 220 мкл	Раздел 7, пункт 7.6
1.2 Комплектность	Пункт 1.4		Раздел 7, пункт 7.10
1.3 Маркировка	Пункт 4		Раздел 7, пункт 7.10
1.4 Упаковка	Пункт 5		Раздел 7, пункт 7.10
2. Функциональные характеристики			
2.1. Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green Ct \leq 35 и HEX/Yellow Ct \leq 35		Раздел 7, пункт 7.8.2
2.2. Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует).		Раздел 7, пункт 7.8.2

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
2.3. Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM/Green Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует). По каналу HEX/Yellow Ct \leq 35.	Раздел 7, пункт 7.8.2

Примечание: При проведении контрольной ПЦР в качестве контрольного образца специфичности (КОС), используют смесь геномной ДНК человека, выделенной из клеточной линии U-937 с концентрацией 1 000 копий на 1 мкл.

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).

Метрологическая прослеживаемость контрольного образца – ПКО

Метрологическая прослеживаемость контрольного образца, ПКО, подтверждена спектрофотометрическим методом путем проведения проверки концентрации стокового раствора U-937 (производства «СибЭнзайм», Россия), выступающего в качестве копий ДНК с нормальный вариантом гена *BRAF*, и концентраций плазмид со вставкой последовательности гена *BRAF* с мутациями: V600E, V600Eс, V600K, V600R, V600D, V600Dс, V600M, выступающих в качестве копий ДНК с мутантным вариантом гена *BRAF* в ПКО.

Последующее проведение мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени подтвердило, что положительный контрольный образец (ПКО) обеспечивает стабильную работу Набора реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: нормальный участок гена *BRAF* человека, специфичные фрагменты с мутациями гена *BRAF* человека: V600E, V600Eс, V600K, V600R, V600D, V600Dс, V600M, заключённые в плазмидный вектор pAl-TA.

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к мутациям V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их), V600K, V600R, V600D, V600Dc (обнаруживает мутации V600R, V600D, V600Dc, но не различает их), V600M гена *BRAF* и к нормальному фрагменту гена *BRAF* человека.

Аналитическая специфичность целевых фрагментов гена *BRAF* 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- <i>BRAF</i> -ткань-мульти»			COSMIC ID*
локализация	замена аминокислоты	замена нуклеотида	
15 экзон	p.V600E	c.1799T>A	476
	p.V600E (Ec)	c.1799_1800TG>AA (complex)	475
	p.V600R	c.1798_1799GT>AG	474
	p.V600D	c.1799_1800TG>AT	477
	p.V600D (Dc)	c.1799_1800TG>AC (complex)	308550
	p.V600K	c.1798_1799GT>AA	473
	p.V600M	c.1798G>A	1130

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

4.2.2 Аналитическая чувствительность

10 копий гена *BRAF* в 1 мкл раствора ДНК.

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

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

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

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

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

4.2.4. Прецизионность в условиях воспроизводимости

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

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

4.2.5 Минимальное содержание опухоли для проведения анализа – 20 % по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом

4.2.6 Предел обнаружения (LoD), как наименьшая частота заявленных аллелей в образце в генах *BRAF*, которое способно выявить изделие – 5 %

4.2.7 Подтверждена специфичность изделия в отношении микрофлоры кожи с использованием ДНК штаммов:

- из коллекции «ГКПМ-ОБОЛЕНСК»: *Staphylococcus aureus* Wood 46 ATCC 10832 (номер штамма В-4442), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 (номер штамма В-4510),

- из коллекции «Thermo Fisher Scientific» (США): *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 PK/5 (лот: 251028),

- из коллекции «Microbiologics» (США): *Streptococcus agalactiae* Group В ATCC 13813 (кат. № 0370).

в максимальной концентрации патогена 10^6 клеток на мл.

Подтверждена специфичность изделия в отношении микрофлоры ободочной и прямой кишки с исследованием ДНК штаммов:

- из коллекции «ГКПМ-ОБОЛЕНСК»: *Escherichia coli* М-17 (номер штамма В-2929), *Shigella sonnei* «S-форма» (номер штамма В-4385), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* 79 (номер штамма В-4376), *Shigella flexneri* 1a 8516 (номер штамма В-4388), *Candida albicans* NCTC 885-653 (номер штамма В-7940),
- из коллекции Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)»: *Enterococcus faecium* (*Streptococcus faecium*) (номер штамма В-4954), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (номер штамма В-8837), *Salmonella typhimurium* TA102 (номер штамма В-5393).

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*-ткань-мульти» различать мутантные и нормальные варианты гена *BRAF*.

4.2.9. Проведено тестирование изделия на гомологичных белках *BRAF*. Набор реагентов ткани «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» не дает перекрестный реакций с гомологичными генами *BRAF* – *ARAF*, *RAF1*.

4.2.10 Влияние интерферирующих веществ

Результаты исследования по оценке влияния интерферирующих веществ представлены в разделе 8.3 Инструкции.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было использовано 62 образцов ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок), от пациентов с опухолевыми заболеваниями (меланома, папиллярный рак щитовидной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак предстательной железы).

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

Таким образом, проверка качества, безопасности и эффективности испытуемого медицинского изделия была проверена в 124 опытах.

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

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США);
- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия);
- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США).

Воспроизводимость результатов 100%.

Таблица 5 – Характеристики клинической эффективности

Мутация	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
V600E (c.1799T>A)	70	60	100% (95% ДИ:94,87%-100%)	100% (95% ДИ:94,04%-100%)
V600E complex (c.1799_1800T G>AA)	26	104	100% (95% ДИ:86,77%-100%)	100% (95% ДИ:96,52%-100%)
V600R (c.1798_1799de linsAG)	4	126	100% (95% ДИ:39,76%-100%)	100% (95% ДИ:97,11%-100%)
V600D (c.1799_1800de linsAT)	2	128	100% (95% ДИ:15,81%-100%)	100% (95% ДИ:97,16%-100%)
V600Dc (c.1799_1800de linsAC)	6	124	100% (95% ДИ:54,07%-100%)	100% (95% ДИ:97,07%-100%)
V600K (c.1798_1799G T>AA)	14	116	100% (95% ДИ:76,84%-100%)	100% (95% ДИ:96,87%-100%)
V600M (c.1798G>A)	2	128	100% (95% ДИ:15,81%-100%)	100% (95% ДИ:97,16%-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 Набора реагентов для определения статуса мутаций гена *BRAF* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной ткани «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» 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*-ткань-мульти», 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*-ткань-мульти», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

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

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

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;
2. набор реагентов по истечении срока годности или при нарушении упаковки применению не подлежит;
3. 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);
4. не использовать набор по истечении срока годности;
5. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

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

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

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

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты.
2. Вортекс.
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма.
4. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16°C.

5. Амплификатор⁴ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow:

- Амплификатор детектирующий ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011 г.);

- Амплификатор CFX 96 («Bio-Rad», США, Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 г.);

- Амплификатор Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010 г.);

- Амплификатор QuantStudio 5 («Thermo Fisher Scientific», США, Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019 г.).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

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

2. Одноразовые пробирки Эппендорф на 1,5 мл;

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

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

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

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором;

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

⁴ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

7. 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).

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 клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

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 60% 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;
- проводить процедуру в ПЦР-боксе или ламинарном шкафу;
- 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 транспортирования, хранения исходного биологического материала:

- при комнатной температуре - в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С - в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С - в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С - длительно.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Условия транспортирования, хранения FFPE-блоков:

- при температуре от 15 до 25 °С – не более 3-х лет.

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.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов,

- при температуре минус 20 °С – длительно.

8.3 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» 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

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	
Зелбораф (показан при неоперабельной или метастатической меланоме)	0,048 мг/мл
Тафинлар (применяется для лечения нерезектабельной или метастатической меланомы, распространенного немелкоклеточного рака легкого)	0,01 мг/мл
Котеллик(используется в качестве терапии неоперабельной или метастатической меланомы с BRAF V600 мутацией)	0,004 мг/мл
Тецентрик (применяется для лечения меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака молочной железы и др.)	0,168 мг/мл
Мекинист (показан при лечении пациентов с нерезектабельной или метастатической меланомы с мутацией гена BRAF V600)	0,0001 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*-ткань-мульти», 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 – 20 % по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

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 согласно таблице 6 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 образцов⁵ + 1 ПКО + 1 ОКО.

⁵ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторах.

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 шести мультиплексов.

Таблица 7– Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	Образец 1	Образец n	ПКО	ОКО
600E/Ес (статус мутаций V600E, V600Ec)	○	○	○	○
600K (статус мутации V600K)	○	○	○	○
600R/D/Dc (статус мутаций V600R, V600D, V600Dc)	○	○	○	○
600M (статус мутации V600M)	○	○	○	○

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.

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 4 мкл,
2. Соответствующий праймер-микс (600E/Ес, 600К, 600R/D/Dс, 600M) – 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 + 1 ПКО + 1 ОКО.

2. Внести в каждую пробирку по 4 мкл ПЦР-буфера⁶.

3. Внести по 10 мкл Праймер-миксов (600E/Ес, 600К, 600R/D/Dс, 600M) в пробирки для соответствующих мультиплексов.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК⁷. В пробирки для ПКО и ОКО ДНК не вносится.

⁶ 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.

⁷ Для предотвращения ингибирования ПЦР объём образца может быть снижен до 1-5 мкл, при этом объём реакции доводится до 20 мкл деионизованной водой из ОКО.

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

8. 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. Протокол ПЦР указан в таблице 8 и 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/Green, HEX/Yellow.

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

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

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

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

Таблица 9 – Протокол ПЦР для приборов других производителей

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

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 устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне перехода кривых в экспоненциальную фазу роста.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, HEX/Yellow (табл. 9).

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! В случае использования амплификатора Rotor-Gene Q активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction).

В случае использования амплификатора CFX 96 может возникнуть необходимость выравнивания некоторых графиков с некорректным уклоном с помощью настроек (Settings) базовых циклов (Baseline Threshold → Baseline Cycles).

Таблица 10 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green и HEX/Yellow

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/Green	HEX/Yellow
600E/Ес	Мутации V600E, V600Ec гена <i>BRAF</i> (определяет мутации, но не различает их)	КВМ (ген <i>BRAF</i> человека)
600K	Мутация V600K гена <i>BRAF</i>	КВМ (ген <i>BRAF</i> человека)
600R/D/Dc	Мутации V600R, V600D, V600Dc гена <i>BRAF</i> (определяет мутации, но не различает их)	КВМ (ген <i>BRAF</i> человека)
600M	Мутация V600M гена <i>BRAF</i>	КВМ (ген <i>BRAF</i> человека)

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 10).

Таблица 11 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Контрольный образец	Выбранный флуорофор	
	FAM/Green (мутации V600E, V600Ec, V600K, V600R, V600D, V600Dc, V600M)	HEX/Yellow (нормальный вариант гена <i>BRAF</i>)
ОКО	Отсутствует	Ct >35 или отсутствует
ПКО	Ct ≤35	Ct ≤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.

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 11-15):

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

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

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

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

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

Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 11-15.

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 600E/Ес (определяет мутации V600E, V600Eс гена *BRAF*, но не различает их)

Значения Ct	Результат
-------------	-----------

Каналы спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Ct FAM/Green ≤ 35	не учитывается	Мутации V600E, V600Eс гена <i>BRAF</i> обнаружены
Ct FAM/Green отсутствует	Ct ≤ 35	Мутации V600E, V600Eс гена <i>BRAF</i> не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct по обоим каналам спецификации >35 или отсутствует		Результат на наличие мутаций невалидный
Ct FAM/Green >35	Ct ≤ 35	Результат на наличие мутаций V600E, V600Eс в гене <i>BRAF</i> сомнительный

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 600K (определяет мутацию V600K гена *BRAF*)

Значения Ct		Результат
Каналы спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Ct FAM/Green ≤ 35	не учитывается	Мутация V600K гена <i>BRAF</i> обнаружена
Ct FAM/Green отсутствует	Ct ≤ 35	Мутация V600K гена <i>BRAF</i> не обнаружена или ниже предела обнаружения
Ct по обоим каналам спецификации >35 или отсутствует		Результат на наличие мутаций невалидный
Ct FAM/Green >35	Ct ≤ 35	Результат на наличие мутаций V600K гена <i>BRAF</i> сомнительный

Таблица 14 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 600R/D/Dс (определяет мутации V600R, V600D, V600Dс гена *BRAF*, но не различает их)

Значения Ct		Результат
Канал спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Ct FAM/Green ≤ 35	не учитывается	Мутации V600R, V600D, V600Dс гена <i>BRAF</i> обнаружены
Ct FAM/Green отсутствует	Ct ≤ 35	Мутации V600R, V600D, V600Dс гена <i>BRAF</i> не обнаружены или ниже предела обнаружения
Ct по обоим каналам спецификации >35 или отсутствует		Результат на наличие мутаций невалидный

Ct FAM/Green >35	Ct ≤35	Результат на наличие мутаций V600R, V600D, V600Dc гена <i>BRAF</i> сомнительный
------------------	--------	---

Таблица 15 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 600M (определяет мутацию V600M гена *BRAF*)

Значения Ct		Результат
Канал спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Ct FAM/Green ≤35	не учитывается	Мутация V600M в гене <i>BRAF</i> обнаружена
Ct FAM/Green отсутствует	Ct ≤35	Мутация V600M в гене <i>BRAF</i> не обнаружена или ниже предела обнаружения
Ct по обоим каналам спецификации >35 или отсутствует		Результат на наличие мутации невалидный
Ct FAM/Green >35	Ct ≤35	Результат на наличие мутаций V600M в гене <i>BRAF</i> сомнительный

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

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.

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

Получение положительного результата по каналу FAM по нескольким праймер-миксам (мультиплексам) у одного образца в рамках одной постановки возможно на некоторых приборах при высоком содержании мутации в образце. Небольшая кросс-специфичность может быть в реакционных смесях, детектирующих замену нуклеотида в той же позиции последовательности ДНК в рамках одного кодона. В этом случае неспецифичные подъемы на других праймер-миксах (мультиплексах) не учитываются при интерпретации результата и выдается только основная мутация, т.е.

валидный результат – на смеси с наименьшим показателем C_t по каналу FAM. Пример перекрестных результатов для образцов с высоким содержанием одной из детектируемых мутаций представлен в Приложении А.

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.

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* и прогнозирования эффективности лечения при обследовании пациентов с опухолевыми заболеваниями (меланома, папиллярный рак щитовидной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак предстательной железы) (Клинические рекомендации: «Меланома кожи и слизистых оболочек», С43, С51, С60.9, С63.2; «Рак щитовидной железы», С73; «Рак яичников/рак маточной трубы/первичный рак брюшины», С48, С56, С57; «Рак прямой кишки», С20; «Рак предстательной железы», С61. Взрослые. 2021. Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» (утв. Минздравом России).

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

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

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

Транспортирование

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

Набор реагентов «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 15 до 25 °С не более 5 суток.

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

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, 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*-ткань-мульти» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

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*-ткань-мульти» 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*-ткань-мульти» 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

Таблица 1. Пример кросс-специфического сигнала при высоком содержании отдельных мутаций гена BRAF в образце (данные с амплификатора CFX 96 («Bio-Rad»))

Реакционная смесь (праймер-микс)	ОКО	образец с высоким содержанием мутации													
		мутация V600E		мутация V600Eс		мутация V600K		мутация V600D		мутация V600Dс		мутация V600R		мутация V600M	
		FAM (Ct)	HEX (Ct)	FAM (Ct)	HEX (Ct)	FAM (Ct)	HEX (Ct)	FAM (Ct)	HEX (Ct)	FAM (Ct)	HEX (Ct)	FAM (Ct)	HEX (Ct)	FAM (Ct)	HEX (Ct)
600 E/Ec	-	24,1	24,2	23,3	24,4	-	24,5	33,6	24,3	33,1	24,7	-	24,6	-	24,5
600 K	-	33,6	24,4	-	24,6	25	24,6	-	24,5	-	24,9	27,1	24,8	26,3	24,5
600 D, Dс, R	-	-	24,4	34,8	24,8	-	24,6	26	24,5	25,1	24,7	23,2	24,8	-	24,5
600 M	-	-	24,5	-	24,5	33,8	24,6	-	24,3	-	24,9	33,6	24,9	22,9	24,8

Приложение Б

Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *BRAF* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной ткани «Тест-*BRAF*-ткань-мульти» по ТУ 21.20.23-034-97638376-2020 соответствует следующим межгосударственным стандартам на продукцию:

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования