



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«19» сентября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *BRAF* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-BRAF-ткань) по ТУ 21.20.23-007-97638376-2017

Содержание

Введение	3
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода	7
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	11
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-BRAF-ткань»	13
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	14
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	15
8. Анализируемые образцы	16
9. Подготовка компонентов набора для исследования	21
10. Проведение анализа	21
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	25
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	28
13. Утилизация	29
14. Гарантийные обязательства, контакты	30
Приложение А	31

Введение

Целевой анализ – ген *BRAF*, исследуемый при обследовании пациентов с диагнозом метастатическая меланома III- IV стадии для качественного определения статуса мутаций V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K исследуемого гена *BRAF* для определения показаний к таргетной терапии ингибиторами киназной активности BRAF и MEK у пациентов с диагнозом метастатическая меланома III- IV стадии с мутациями гена *BRAF*.

Научная обоснованность.

Меланома – наиболее опасное злокачественное заболевание кожи человека с высоким риском метастазирования. Метастазирующая меланома прогностически крайне неблагоприятна и резистентна ко всем видам традиционной химиотерапии и биологическим препаратам. В последнее время достигнуты значительные успехи в понимании патогенеза и лечении меланомы¹.

В 2002 году рядом ученых была выявлена высокая частота BRAF онкогенных мутаций при меланоме: от 62% до 72 %. Однако при ранней стадии заболевания мутации BRAF отмечены только в 10 % случаев, что позволило предположить, что BRAF мутации не могут участвовать в инициации большинства меланом, но отражают прогрессирование заболевания, что может иметь важное прогностическое значение.²

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

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

² Проценко С.А. Таргетная терапия при меланоме, гастроинтестинальных стромальных опухолях, дерматофибросаркоме протуберанс / С.А. Проценко // Практическая онкология. – 2010. - Т. 11, №3 - С. 162-170.

Мутация BRAF выявляется примерно у 50 % больных метастатической меланомой кожи и играет важную роль в пути MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK).³

В 80 % случаев выявляется нуклеотидная замена T1799A в 15-м экзоне BRAF, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E)¹. Второй по частоте является мутация V600K — ее частота может достигать 5-10%.

Начиная с 2002 г., когда была открыта мутация BRAF V600E, достигнут значительный прогресс в изучении молекулярных механизмов канцерогенеза меланомы. Это привело к созданию принципиально новых лекарственных веществ, молекулярно-направленных (таргетных) препаратов дабрафениб (Регистрационное удостоверение № ЛП-004295 от 17.05.2017 г., Торговое наименование: Тафинлар Комбо), вемурафениб (Регистрационное удостоверение № ЛП-002271 от 04.10.2013 г., Торговое наименование: Зелбораф), траметиниб (Регистрационное удостоверение № ЛП-002945 от 06.04.2015 г., Торговое наименование: Мекинист). Согласно клиническим рекомендациям «Меланома кожи и слизистых оболочек» от 2018 года (утверждено МЗ РФ) раздел 3.4 "Лечение больных метастатической и нерезектабельной меланомой кожи (III/С/D нерезектабельная -IV)" (уровень убедительности рекомендаций А), у пациентов с мутацией в гене BRAF V600 в первой линии терапии рекомендуется использовать комбинацию ингибиторов BRAF и MEK.⁴

Дабрафениб и вемурафениб — ингибиторы киназной активности BRAF, эффективные в лечении больных метастатической меланомой с мутациями BRAF V600E или V600K. Результаты исследований ингибиторов BRAF, показавшие их высокую эффективность при метастатической меланоме и благоприятный профиль безопасности, позволили рассчитывать на

³ Вемурафениб в лечении больных меланомой с метастазами в головной мозг / Д.Р. Насхлеташвили [и др.] // Опухоли головы и шеи. - 2016. - Т. 6, вып. 4 - С. 30-34.

⁴ Лечение больных метастатической и нерезектабельной меланомой кожи (III/С/D нерезектабельная-IV) // Клинические рекомендации. Меланома кожи и слизистых оболочек. – Год утверждения (частота пересмотра): 2018 (пересмотр каждый год). Версия 1.2019. – 42-56 с.

преимущества этих препаратов над стандартной химиотерапией и при церебральных метастазах. На сегодняшний день опубликованы данные нескольких исследований, подтверждающих эффективность вемурафениба при церебральных метастазах меланомы, имеющей активирующую мутацию BRAF V600⁵.

Таргетные препараты в зависимости от нюансов конкретной клинической ситуации назначаются докторами в виде монотерапии либо комплексно.

Ингибиторы MEK траметиниб и селуметиниб улучшают общее выживание пациентов с мутациями V600E/K в комбинации с ингибиторами BRAF. Двойное ингибирование сигнального пути MAPK, которое достигается при одновременном использовании ингибиторов BRAF и MEK, обладает более высокой эффективностью по сравнению с ингибитором BRAF в монорежиме. При применении дабрафениба и траметиниба не только повышается выживаемость, но и уменьшается частота вторичных карцином кожи, а также улучшается переносимость лечения¹.

Таким образом, использование BRAF/MEK ингибиторов у пациентов с метастатической меланомой кожи (мМК), имеющих BRAF мутацию, представляет первый успешный пример персонализированной терапии, изменившей представление о мМК как об опухоли, рефрактерной к лекарственному лечению. Эти препараты пришли на смену химиотерапии и стали новым стандартом лечения меланомы с BRAF мутацией, что подтверждает ранее сформулированный постулат о необходимости разработки различных подходов к лечению для различных молекулярно-генетических подтипов меланомы.⁶

Область применения набора реагентов - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению.

⁵ Вемурафениб в лечении больных меланомой с метастазами в головной мозг / Д.Р. Насхлеташвили [и др.] // Опухоли головы и шеи. - 2016. - Т. 6, вып. 4 - С. 30-34.

⁶ Мутации гена BRAF // Программа RUSSCO «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации». Практическое руководство для врачей. – С. 37–43

Показания к применению: Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань» рекомендуется при обследовании пациентов с диагнозом метастатическая меланома III- IV стадии для определения показаний к таргетной терапии ингибиторами киназной активности BRAF и MEK с мутациями V600E, V600E complex (набор реагентов обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K гена *BRAF*.

Противопоказания к применению: отсутствуют.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Тест-BRAF-ткань» предназначен для качественного определения статуса мутаций V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K гена *BRAF* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани для определения показаний к таргетной терапии ингибиторами киназной активности BRAF и MEK у пациентов с диагнозом метастатическая меланома III- IV стадии с мутациями гена *BRAF*.

Функциональное назначение - полученные результаты могут использоваться при обследовании пациентов с диагнозом метастатическая меланома III- IV стадии.

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

Анализ проводится методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

Принцип определения

Качественное определение статуса мутаций V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K гена *BRAF* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани включает в себя три этапа:

- 1) подготовку ПЦР;

2) ПЦР-амплификацию ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекцию продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

3) интерпретацию результатов.

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

Продукты ПЦР исследуемого гена *BRAF* идентифицируются в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зондов, меченных FAM и HEX.

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

Ограничения метода

Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань» предназначен для определения статуса мутаций V600E, V600E complex и V600K только у пациентов с диагнозом метастатическая меланома III-IV стадии.

Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань» обнаруживает статус мутаций V600E и V600E complex, но не различает их. Полученные данные используются только для определения показаний к таргетной терапии ингибиторами киназной активности BRAF и

МЕК согласно клиническим рекомендациям «Меланома кожи и слизистых оболочек» от 2018 года (утверждено МЗ РФ).

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 1,4. 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» не сможет выявить мутации гена *BRAF*.

Метод ПЦР крайне чувствителен к контаминации. Соблюдайте осторожность, чтобы избежать контаминации образцов исследуемой ДНК и реакционных смесей содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР.

Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань» предназначен только для качественного определения статуса мутаций V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K гена *BRAF* для определения показаний к таргетной терапии ингибиторами киназной активности BRAF и MEK у пациентов с диагнозом метастатическая меланома III- IV стадии с мутациями гена *BRAF*.

Общее время проведения анализа составляет 1 ч.

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации – «Тест-BRAF-ткань». Каждый набор «Тест-BRAF-ткань» содержит реагенты, рассчитанные на проведение анализа 24 исследуемых образцов при одновременной постановке.

Состав набора

Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань» включает:

Таблица 1 – Состав набора реагентов «Тест-BRAF-ткань»

№ пп	Название реагента	Маркировка на крышке пробирки	Описание	Количество пробирок, объём, мкл
1	ПЦР-смесь V600E/Ес	V600E/Ес	Прозрачная жидкость розового цвета	1 пробирка (120 мкл)
2	ПЦР-смесь V600K	V600K	Прозрачная жидкость розового цвета	1 пробирка (120 мкл)
3	ПКО	K+	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (120 мкл)
4	ОКО	K-	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (120 мкл)
5	Тақ-полимераза	Тақ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, (580 мкл)

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь геномной ДНК из культуры клеток человека линии Jurkat в концентрации 400 копий гена *BRAF* в 1 мкл и искусственно синтезированной вставки размером 300 п.н., содержащей эквимольную смесь мутаций V600E/V600E complex и V600K, в плазмидный вектор pAL-TA с концентрацией 20 копий гена *BRAF* в 1 мкл раствора ДНК. Содержит 5% мутантных и 95% нормальных копий ДНК.

В качестве ОКО используют воду деионизованную.

Все ПЦР-смеси содержат праймеры и зонды к внутреннему контрольному образцу (ВКО). Зонды к ВКО помечены HEX (см. раздел 11 «Регистрация и интерпретация результатов»). Это контроль эффективности экстракции ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

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 2 – Технические и функциональные характеристики набора реагентов «Тест-BRAF-ткань»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
ПЦР-смесь V600E/Ес, V600E/Ес	Прозрачная жидкость розового цвета
ПЦР-смесь V600K, V600K	Прозрачная жидкость розового цвета
ПКО, K+	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО, K-	Прозрачная бесцветная жидкость
Таq-полимераза, Таq	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-007-97638376-2017
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-007-97638376-2017
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-007-97638376-2017
2. Функциональные характеристики	
2.1. Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции с $Ct \leq 35$ в пробирках с ПКО по каналам FAM и HEX
2.2. Отрицательный результат с ОКО	Отсутствие роста сигнала флуоресценции в пробирках с ОКО по каналам FAM и HEX

4.2 Характеристики аналитической эффективности

Таблица 3 – Характеристики аналитической эффективности набора реагентов «Тест-BRAF-ткань»

Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к мутациям V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K гена <i>BRAF</i>
Аналитическая чувствительность	10 копий гена BRAF в 1 мкл раствора ДНК

Специфичность анализа определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам генов, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции.

Список определяемых мутаций с указанием ID мутации представлен в таблице 4 (набор реагентов обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их).

Таблица 4 - Список определяемых мутаций с указанием ID мутации

Набор мутаций, определяемых с помощью «Тест-BRAF-ткань»	Изменения в нуклеотидах	Изменения в аминокислотах	COSMIC ID*
V600E complex	c.1799_1800TG >AA (Complex)	p.V600E	475
V600E	c.1799T>A	p.V600E	476
V600K	c.1798_1799GT >AA	p.V600K	473

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

Для обеспечения аналитической достоверности была исследована прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости.

При оценке прецизионности в условиях повторяемости коэффициент вариации составил 7,51%. Значения показателей подтвердили высокую повторяемость результатов при последовательных измерениях образцов.

При оценке прецизионности в условиях воспроизводимости коэффициент вариации составил 7,62%. Значения показателей подтвердили высокую воспроизводимость результатов при проведении исследований в разных условиях.

4.3 Характеристики клинической эффективности:

Диагностическая специфичность – 94,4 % с доверительной вероятностью 90%.

Диагностическая чувствительность – 89,1 % с доверительной вероятностью 90%.

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-BRAF-ткань»

В пограничную зону риска вошли опасности:

- потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях,

- перекрестная контаминация образцов;

- загрязнение материалов ингибирующими веществами;

- контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО, или продуктами ПЦР;

- невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации, в следствии работы с набором неквалифицированным персоналом;

- использование непригодного для применения набора (использование по истечению 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* методом ПЦР-РВ в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-*BRAF*-ткань) по ТУ 21.20.23-007-97638376-2017», производства ООО «ТестГен» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б 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», 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», обладают низкой упругостью пара, и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Тест-*BRAF*-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-эпидемиологических правил СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». 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 п. 4.28 СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»;

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.

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал;

- не использовать набор по истечению срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть пораженное 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 взрыва или возгорания 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

Оборудование:

1. ПЦР-бокс (типа «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).

2. Вортекс (типа «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (типа «Eppendorf», Германия).

4. Холодильник от 2 °С до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

5. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, Real-Time CFX96 Touch («BioRad», США), «ДТпрайм» («ДНК – Технология», Россия) или эквивалентные.

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 200 мкл, до 100 мкл, до 20 и до 10 мкл (например, «Ахуген», США).

2. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

3. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

4. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

5. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной плоской крышкой (в случае детекции через крышку) или оптически прозрачными стенками (в случае детекции через стенку пробирки) для ПЦР объемом 0,2 мл; либо пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл в стрипах или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой (например, Ахуген, США).

8. Анализируемые образцы

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

8.1 Процедура получения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани

Для выделения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани, необходимой для проведения ПЦР-анализа концентрации и чистоты, рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных 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;

- - 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).

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

- По результатам морфологического исследования опухолевые комплексы должны занимать не менее 60 % площади ткани в срезе с FFPE-блока.

- 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.

Анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание).

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 в 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.

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-BRAF-ткань»,

на способность набора реагентов «Тест-BRAF-ткань» различать мутантные и нормальные варианты гена *BRAF*, была проведена с использованием компонентов набора реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2017, производства ООО «ТестГен» (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018).

Для того, чтобы оценить влияние потенциально интерферирующих веществ было выполнено исследование путем анализа воздействия каждого вещества на значения C_t и качественное определение статуса мутаций в анализируемом образце, в двух концентрациях (максимальной и минимальной), диапазон которых, как ожидается, будет встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-BRAF-ткань».

При применении в соответствии с назначением набора реагентов «Тест-BRAF-ткань», материалом для проведения ПЦР служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани.

Интерферирующие вещества в данном случае могут происходить от следующих источников:

1. Вещества, добавляемые во время подготовки образца (консерванты, стабилизаторы) – в данном случае парафин, который используется для приготовления FFPE-блоков.
2. Вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов – в данном случае, загрязнение образца ткани гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке во время выделения.
3. Компоненты набора для выделения ДНК из ткани. (Для выделения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани предполагается использование набора реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключенных в парафин тканей.)

Потенциально интерферирующие вещества и их концентрации приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Потенциально интерферирующие вещества и их концентрации

Интерферирующее вещество (Тип веществ)	Максимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)	Минимальная концентрация (мкл / 200 мкл раствора ДНК)
Парафин (в ксилоле)	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$
Ксилол	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$
Этиловый спирт (95%)	$1,35 \cdot 10^{-3}$	$3,38 \cdot 10^{-4}$
Буфера для связывания ДНК	$5,40 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$
Протеиназа К	$1,32 \cdot 10^{-5}$	$3,30 \cdot 10^{-6}$
Элюент	$1,33 \cdot 10^{-3}$	$3,33 \cdot 10^{-5}$
Раствор для промывки №1	0,50	$1,25 \cdot 10^{-1}$
Раствор для промывки №2	5,00	1,25
Гемоглобин, мг	0,19 мг	0,1 мг

Установлено, что ни одно из потенциально интерферирующих веществ, оцениваемых при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов, не влияет на способность набора реагентов «Тест-BRAF-ткань» различать мутантные и нормальные варианты гена *BRAF*.

В дополнение к исследованию интерферирующих веществ было оценено влияние некротической ткани в образцах опухолей на способность набора реагентов «Тест-BRAF-ткань» выдавать достоверные результаты. Исследование влияние некроза было проведено на 9 образцах, которые имели некроз на уровне >50%, как определено в обзоре патологии. После проведения анализа с помощью набора реагентов «Тест-BRAF-ткань» и интерпретации результатов, полученные данные сравнивались с результатами двунаправленного секвенирования данных образцов по Сэнгеру. В ходе проведения исследования был выявлен 1 ложноотрицательный результат, что может быть связано с недостаточным количеством ДНК.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

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

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

- Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-50 нг/мкл.

- Не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

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

8.3 Условия возможного хранения анализируемых образцов

Условия хранения пробы геномной ДНК человека, выделенной из образцов фиксированной в парафине ткани:

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

Условия хранения исходного клинического материала:

Наиболее доступным клиническим материалом для выделения ДНК является ткань, фиксированная в формалине и заключенная в парафин (FFPE-блоки). FFPE-блоки могут храниться при температуре комнатной температуре.

Парафиновые срезы могут храниться при комнатной температуре в течение 4 недель до выделения ДНК.

Условия хранения биопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК⁷:

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

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

Тщательно перемешать содержимое пробирок переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешать на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 сек, а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

ВНИМАНИЕ! Не встряхивать Taq-полимеразу (Taq) на вортексе, так как это может инактивировать фермент.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

А) Подготовка ПЦР;

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;

В) 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 объем реакции – 20 мкл.

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

⁷ МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности

Непосредственно перед проведением анализа необходимо приготовить реакционные смеси (мастермиксы) для анализируемой ДНК, ПКО и ОКО. Для этого в отдельных стерильных пробирках смешать все компоненты исходя из того, что для проведения одной реакции необходимо взять 4 мкл ПЦР-смеси и 10 мкл Таq-полимеразы. Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

Готовить мастермиксы необходимо согласно таблице 5. В таблице учтен запас реактивов (+1 объём каждого вида) для компенсации возможных потерь при раскапывании.

ВНИМАНИЕ! При работе с Таq-полимеразой отбирайте из пробирки нужный объем, не опуская наконечник глубоко в реагент, чтобы не взять избыточный объем фермента за счет его попадания на внешнюю поверхность наконечника.

Таблица 5 - Приготовление мастермиксов (в расчете на количество анализируемых образцов).

Количество образцов	ПЦР-смесь, мкл	Таq, мкл	Итого, мкл
1	16	40	56
2	20	50	70
3	24	60	84
4	28	70	98
5	32	80	112
6	36	90	126
7	40	100	140
8	44	110	154
9	48	120	168
10	52	130	182
11	56	140	196
12	60	150	210
13	64	160	224
14	68	170	238

Количество образцов	ПЦР-смесь, мкл	Тaq, мкл	Итого, мкл
15	72	180	252
16	76	190	266
17	80	200	280
18	84	210	294
19	88	220	308
20	92	230	322
21	96	240	336
22	100	250	350
23	104	260	364
24	108	270	378

1. Внести по 14 мкл каждого мастермикса в соответствующие пробирки согласно рекомендованному порядку расположения реакций (см. табл. 6).

2. Внести по 6 мкл ОКО в пробирки «ОКО».

3. Внести по 6 мкл ПКО в пробирки «ПКО».

4. Внести по 6 мкл образцов ДНК в пробирки «О».

5. Заклеить ПЦР-планшет/закрыть пробирки, убедиться, что все крышки или пленка прилегают плотно.

6. Открутить ПЦР-планшет/пробирки на центрифуге, чтобы собрать реакционную смесь на дне лунок, сохраняя правильную ориентацию планшета или серии пробирок.

Таблица 6 - Рекомендуемый порядок расположения реакций

96-луночный планшет

Тест	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
V600E/Es	ОКО	ПКО	О1	О2	О3	О4	О5	О6	О7	О8	О9	О10
V600K	ОКО	ПКО	О1	О2	О3	О4	О5	О6	О7	О8	О9	О10

О1 – ДНК, выделенная из анализируемого образца №1 и т.д.

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекция 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». Обратите внимание, что приборы для ПЦР в «реальном времени» должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 7, 8).

Таблица 7 - Программа амплификации для приборов производства «ДНК – Технология»

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 сек	50
3	64 _{30, 30, 30}	15 сек	

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

Таблица 8 - Программа амплификации для других приборов

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 сек	50
3	62 _{30, 30, 30}	15 сек	

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала на стадии 3.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов поводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

– 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 внутреннего контрольного образца – ВКО*).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «C_t» в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов в исследуемых образцах и контрольных образцах представлен в табл. 9 и табл. 10 соответственно.

ВНИМАНИЕ! 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 9 - Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Пробирки	Мутантная ДНК гена <i>BRAF</i> обнаружена	Мутантная ДНК гена <i>BRAF</i> не обнаружена	Сомнительный	Невалидный
V600E/Ес, V600К	Канал FAM : Ct ≤ 35 Канал HEX : подъём кривой амплификации (любой Ct) или отсутствие подъёма кривой.	Канал FAM : отсутствие кривой амплификации. Канал HEX : Ct ≤ 35	Канал FAM : подъём кривой амплификации, Ct > 35 Канал HEX : Ct ≤ 35	Канал FAM : отсутствие кривой амплификации, Канал HEX : отсутствие кривой амплификации или Ct > 35.

Таблица 10 - Интерпретация результатов в контрольных образцах

Контрольный образец	Выбранный флуорофор	
	FAM/Green	HEX/Yellow
ОКО	Отсутствует	Ct >35 или отсутствует
ПКО	Ct ≤35	Ct ≤35

Интерпретация результатов в контрольных образцах

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 10, 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 10, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 10, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Интерпретацию результатов для исследуемых образцов проводят только при правильных результатах для ОКО и ПКО данной постановки.

Интерпретация производится с помощью программного обеспечения используемого прибора. Пороговая линия устанавливается на уровне перехода кривых в экспоненциальную фазу роста.

Мутантная ДНК гена *BRAF* обнаружена, если кривая амплификации по каналу FAM поднимается выше установленной пороговой линии, и при этом $Ct \leq 35$. По каналу HEX подъем кривой амплификации (любой Ct) или отсутствие подъема кривой.

Мутантная ДНК гена *BRAF* не обнаружена, если кривая амплификации по каналу FAM не поднимается выше установленной пороговой линии. А кривая амплификации по каналу HEX поднимается выше установленной пороговой линии, $Ct \leq 35$ (то есть проходит ВКО).

Результат анализа сомнительный, если кривая амплификации по каналу FAM поднимается выше установленной пороговой линии, но при этом $Ct > 35$. Кривая амплификации по каналу HEX поднимается выше установленной пороговой линии и $Ct \leq 35$.

Результат анализа невалидный, если кривая амплификации по каналу FAM не поднимается выше установленной пороговой линии. Кривая амплификации по каналу HEX не поднимается выше установленной пороговой линии или поднимается выше установленной пороговой линии, но при этом $Ct > 35$.

Если для пробы получен невалидный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца ткани или отвергнуть образец, как непригодный для данного вида анализа.

Если для пробы получен сомнительный результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с повторного выделения ДНК из образца ткани.

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.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение.

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

После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- ПЦР-смеси V600E/Es, V600K следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

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

Транспортирование.

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

Набор реагентов транспортировать при температуре от -20 °С до +8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при комнатной температуре (15–25 °С) не более пяти суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. 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, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Срок годности. Срок годности набора «Тест-BRAF-ткань» 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 °С 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 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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. 4.28 СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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 остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «Тест-BRAF-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 соответствие набора «Тест-BRAF-ткань» требованиям технических условий при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и 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

Перечень применяемых национальных стандартов

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

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 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний.

ГОСТ Р ЕН 13612-2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*»;

ГОСТ Р 56894-2016 «Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий 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 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ ISO 13485-2017 «Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования».

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.