

Организация-разработчик 1

УТВЕРЖДАЮГенеральный директор
ООО «НПФ ДНК-Технология»

С.П. Левичев

2019 г.

Организация - разработчик 2

УТВЕРЖДАЮГенеральный директор
ООО «Гамма Глобал РД»

И.А. Быков

2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Набор реагентов для определения профиля экспрессии генов****с целью оценки прогностического индекса рецидивирования рака молочной железы****методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени****(Глобал Индекс РМЖ) по ТУ 9398-092-46482062-2017**

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНОГенеральный директор
ООО «ДНК-Технология ТС»

С.А. Самарин

2019 г.

2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре онкологических заболеваний и составляет 20% от общей заболеваемости женщин злокачественными опухолями. В структуре смертности от злокачественных новообразований у женщин удельный вес РМЖ составляет 17,4%. Распространенность заболевания в России составляет 43,8 человека (15,9 %) на 100 тыс. населения, тенденция увеличения этого показателя сохраняется [1].

Важную роль в выявлении группы риска и лечении больных РМЖ играют молекулярно-генетические маркеры. В частности определение мутаций в генах BRCA1 и BRCA 2 используется для оценки риска развития рака молочной железы и рака яичников в семьях с наследственными формами заболевания [2]. Определение профилей экспрессии генов позволяет прогнозировать развитие рецидивов РМЖ и определять тактику терапии.

После хирургического лечения для больных РМЖ I-II стадии в случае эстроген-позитивного и HER2-негативного фенотипа опухоли стандартом адъювантной терапии является эндокринотерапия в сочетании с лучевой и химиотерапией при наличии показаний. Выбор тактики терапии осуществляется на основании рекомендаций российских и международных клинических руководств [3-6]. Традиционные клинико-морфологические характеристики заболевания, такие как размер первичной опухоли, характер местного распространения, степень злокачественности и др. не всегда способны обеспечить необходимую прецизионность выбора терапии [7]. Подобная ситуация диктует необходимость создания диагностического инструмента, способного на основе многопараметрической оценки фенотипических особенностей РМЖ обеспечить обоснованный выбор адъювантной терапии, в особенности у пациентов, для которых сочетание классических факторов прогноза невозможно трактовать однозначно. То есть на основании про/ретроспективной оценки клинико-морфологических критериев невозможно выделить группу пациентов, которым, несмотря на благоприятное сочетание факторов прогноза, показано проведение адъювантной химиотерапии, а также пациентов, не нуждающихся в дополнительном цитостатическом лечении несмотря на неблагоприятное сочетание "классических" факторов прогноза [8-10]. В связи с тем, что используемые в настоящее время в клинике прогностические модели формируют достаточно гетерогенную группу больных в отношении риска прогрессирования, достаточно трудно оценить эффективность отдельных видов терапии. В частности, влияние адъювантной химиотерапии (АХТ) на десятилетнюю выживаемость без прогрессирования у больных без метастазов в регионарные лимфоузлы (N0) оценивается как низкое (абсолютный эффект составляет 4%) [16]. Несмотря на это приблизительно 50% больных ранним РМЖ (I-II



стадия заболевания) получают АХТ, которая характеризуется выраженными токсическими эффектами, что в значительной степени снижает качество жизни [10-13].

Эксперты 14 конференции Санкт-Галлен 2015 признают, что профили экспрессии мРНК функциональных генов человека адекватно отражают биологическую гетерогенность рака молочной железы и могут применяться для определения прогноза рецидива заболевания и рекомендаций назначения химиотерапии [14].

В основе предлагаемой технологии лежит анализ экспрессии генов методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР). Панель включает 24 гена (21 функциональный и 3 референсных гена). РНК извлекается из клеток, после чего преобразуется в кДНК, которая может быть амплифицирована и количественно оценена методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Полученный транскрипционный профиль сравнивается с транскрипционным профилем, характерным для риска рецидива заболевания. Мерой сходства исследуемого профиля с профилем, характерным для высокого риска рецидива заболевания является Индекс рецидивирования (ИР). По величине ИР делается заключение о наличии или отсутствии высокого риска рецидива РМЖ.

Для оценки транскрипционных профилей использован метод сравнения индикаторных циклов с нормировочным фактором, рассчитанным на основе уровней экспрессии референсных генов B2M, HPRT1 и GUSB.

ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е. М. Давыдов М. И., Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных образований в 2008 г. // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, т. 21, №2s, 2010, с.87-117.
2. Любченко Л.Н., Батенева Е.И. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Пособие для врачей. // ФГБНУ “Российский научный онкологический центр имени Н.Н. Блохина”, Москва, 2014, 63 с.
3. Харченко В.П., Рожкова Н.И. Маммалогия: национальное руководство// ГЭОТАР-Медиа, 2009, С. 56.
4. Aebi S, Davidson T, Gruber G, Castiglione M. ESMO Guidelines Working Group. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann. Oncol. 2014, T. 21, 5, стр. v9–v14.

5. Harris L, Fritsche H, Mennel R et al. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. J. Clin. Oncol. 2014 r., T. 25, 33, стр. 5287–5312 .
6. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ Breast Cancer (Version 1.2011). [ВИнтернете] 19 ноября 2015 г. www.nccn.org.
7. Dignam JJ, Dukic V, Anderson SJ, Mamounas EP, Wickerham DL, Wolmark N. Hazard of recurrence and adjuvant treatment effects over time in lymph node-negative breast cancer. BreastCancerRes. Treat. 2009 r., T. 116, 3, стр. 595–602.
8. Goldhirsch A, Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M, Thürlimann B., Senn H.-J. & Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Annals of Oncology. 2013 r., стр. 1-18.
9. Мухамадиева С.М., Золотенко И.В., Маджар О.В. Современные представления об опухолевых заболеваниях молочной железы и принципы их диагностики. // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук, 2008, Т. 2, стр. 79-85.
10. Семиглазов В.Ф. Стратегические и практические подходы к решению проблемы рака молочной железы. Вопросы онкологии. 2012 г., Т. 158, стр. 148-152.
11. (EBCTCG), Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. Lancet. 2005., Vol. 365, p. 1687-1717.
12. Goldhirsch A., Wood W. C., Coates A. S., Gelber R. ., Thürlimann B., Senn H.-J. .&Panel members.. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Annals of Oncology. 2011 r., стр. 1-12.
13. Gnant M., Harbeck N., Thomssen C.. Summary of the Consensus Discussion Breast Care. Journal of clinical oncology. 2011 r., стр. 136–141.
14. Coates A.S., Winer E.P., Goldhirsch A., Gelber R. D., Gnant M., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.-J. & Panel Members Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Annals of Oncology 26: 1533–1546, 2015.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для определения профиля экспрессии генов с целью оценки прогностического индекса рецидивирования рака молочной железы методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Глобал Индекс РМЖ) по ТУ 9398-092-46482062-2017.

1.2 Набор реагентов Глобал Индекс РМЖ предназначен для определения профиля экспрессии мРНК функциональных генов человека в парафиновых срезах и нативной ткани молочной железы с целью оценки прогностического индекса рецидивирования рака молочной железы в течение 10 лет у женщин всех возрастных категорий (репродуктивного, пре- и постменопаузального возраста) больных эстроген-позитивным и HER2-негативным (ER+/Her2-) раком молочной железы I-II стадии (T1-2, N0-1, M0), не получавших неоадьювантную химиотерапию, методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Оценку прогностического Индекса рецидивирования рака молочной железы проводят с учётом планируемой послеоперационной терапии (только гормонотерапия или гормонотерапия и адьювантная полихимиотерапия).

Функциональное назначение изделия: Изделие предназначено для диагностики *in vitro* (определения профиля экспрессии мРНК функциональных генов человека с целью оценки прогностического индекса рецидивирования рака молочной железы).

1.3 В качестве биологического материала используют образцы парафиновых срезов и нативной ткани молочной железы, полученные в результате оперативного вмешательства.

1.4 Показания к проведению исследования: женщины всех возрастных категорий (репродуктивного, мено- и постменопаузального возраста), с впервые диагностируемым эстроген-позитивным и HER2-негативным (ER+/Her2-) раком молочной железы, I-II стадии (T1-2, N0-1, M0), не получавших неоадьювантную химиотерапию, с целью оценки прогностического индекса рецидивирования рака молочной железы в течение 10 лет.

Ограничения метода: Метод не предназначен для пациенток, получивших неоадьювантную химиотерапию, так как результаты неоадьювантной химиотерапии могут оказать влияние на уровень экспрессии генов.

Тип адьювантной терапии в исследовании не учитывается, включает весь спектр стандартных схем, применяемых в Российской Федерации, и не является ограничением к проведению исследования.

1.5 Набор может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

1.6 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.1 Состав набора

2.1.1 Набор в стандартной фасовке (фасовка S) включает следующие компоненты:

REF R3-H203-S3/7, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
ОТ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	100 мкл
Праймеры ОТ-Глобал Индекс РМЖ +дНТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	- 32 мкл
Обратная транскриптаза	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	25 мкл
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип № 1	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	16 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип № 2	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	16 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип № 3	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	16 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Тaq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 флакон	8,64 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	240 мкл
Крышки для стрипов	48 шт.		

2.1.2 Набор в фасовке для автоматизированного дозирования (фасовка А) включает следующие компоненты:

REF R3-H203-XA/7, фасовка А			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
ОТ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	100 мкл
Праймеры ОТ-Глобал Индекс РМЖ+дНТФ	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	32 мкл
Обратная транскриптаза	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	25 мкл
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Смеси для амплификации Стрим	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость	тройной стрип по 8 пробирок	по 90 мкл
ПЦР-буфер Стрим	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноТaq МАХ	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 60 мкл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	3 шт.		
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.		

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан на 16 образцов (рекомендуется проведение реакции обратной транскрипции 8 клинических образцов в двух повторях).

2.3 Принцип действия набора

Метод: Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с определением уровня экспрессии мРНК исследуемых генов методом сравнения индикаторных циклов (дельта С_p) относительно референсных генов В2М, HPRT1, GUSB, экспрессируемых в образце.

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах: температурной денатурации кДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается в формате автоматического раскапывания использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, либо в формате ручного раскапывания методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина. При использовании полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 95°C в течение 5 минут. Это исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для проведения ПЦР введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени. Для анализа продуктов ПЦР используют детектирующий амплификатор.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой кДНК, помечены флуоресцентной меткой Fam.

В таблице 1 представлен перечень выявляемых мРНК генов, канал детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка для набора реагентов Глобал Индекс РМЖ.

В определенную пробирку набора реагентов добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в планшете. После прохождения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора о несоответствии.

Исследование с использованием набора состоит из следующих этапов: выделение нуклеиновых кислот (пробоподготовка); реакция обратной транскрипции; ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

Таблица 1 – Перечень выявляемых мРНК генов, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка для набора реагентов

N пробирки	Канал детекции				Цвет смеси* /парафина**
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
Стрип № 1					
1	SCGB2A2	-	маркер	-	Голубой*/белый
2	BCL2	-	-	-	
3	BIRC5	-	-	-	
4	NDRG1	-	-	-	
5	MKI67	-	-	-	
6	ERBB2	-	-	-	
7	BAG1	-	-	-	
8	CCNB1	-	-	-	
Стрип № 2					
9	CTSL2	-	-	-	Бесцветный/белый
10	MYC	-	маркер	-	Голубой*/белый
11	CCND1	-	-	-	Бесцветный/белый
12	CD68	-	-	-	
13	TERT	-	-	-	
14	PTEN	-	-	-	
15	PGR	-	-	-	
16	ESR1	-	-	-	
Стрип № 3					
17	GRB7	-	-	-	Бесцветный/белый
18	AURKA	-	-	-	Голубой*/белый
19	MYBL2	-	маркер	-	
20	CDKN2A	-	-	-	
21	MMP11	-	-	-	
22	B2M	-	-	-	
23	HPRT1	-	-	-	
24	GUSB	-	-	-	
*В фасовке А голубой смесью маркирована только 1 пробирка 1 стрипа (SCGB2A2)					
** Парафин присутствует только в пробирках со смесью для амплификации фасовки S					

Примечание Необходимо учитывать, что некоторые гены в литературе имеют различные обозначения. Исторически ранее сложившиеся обозначения маркеров, такие как KI67, ER, PR, Her2, являются альтернативными названиями генов MKI67, ESR1, PGR и ERBB2 соответственно.

Названия гена в наборе Глобал Индекс РМЖ (официальные символы генов)*	Альтернативные обозначения, используемые в литературе
AURKA	STK15
CDKN2A	P16INK4A
ERBB2	HER2
SCGB2A2	MGB1
MKI67	KI67
ESR1	ER
PGR	PR
BIRC5	survivin

* в соответствии с <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

В основе оценки прогностического Индекса рецидивирования лежит метод сравнения индикаторных циклов исследуемых генов (ΔC_p). Экспрессия мРНК функциональных генов измеряется в относительных единицах и отражает соотношение уровня представленности транскриптов по отношению к референсным генам (B2M, GUSB, HPRT1).

Для оценки валидности полученных результатов учитывается показатель амплификации кДНК референсного гена B2M (см.п. 3.2, 9.3), а также генов GUSB и HPRT1 (см. п.9.5).

Праймеры и ДНК-зонды подобраны с учетом структуры генов, кодирующих мРНК, и не дают положительного результата на матрице геномной ДНК. Для некоторых генов (SCGB2A2, ERBB2, CCNB1, BAG1, CD68, ESR1, GRB7, MMP11, B2M, GUSB) фоновая амплификация на матрице геномной ДНК в пределах 1-2 lg не вносит вклад в конечный результат исследования (см. п.3.1).

Заключение о риске рецидива рака молочной железы проводится на основании значения величины Индекса рецидивирования¹ с учётом планируемой послеоперационной терапии (только гормонотерапия или гормонотерапия и адъювантная полихимиотерапия).

В связи с погрешностью измерения Индекса рецидивирования выделена «серая зона». «Серая зона» представляет собой диапазон значений Индекса рецидивирования, в который могут попадать как пациенты с риском рецидива, так и без риска рецидива. В качестве погрешности измерения Индекса рецидивирования использовано среднее значение среднеквадратичного отклонения с учётом 95% доверительного интервала.

Примечание - Граница «серой зоны» установлена как $\pm 10\%$ от разделяющего значения 50%.

Для «серой» зоны выдаётся заключение «умеренный риск». Любое сомнение должно расцениваться в пользу пациента и, соответственно, разумнее этим пациентам назначать химиотерапию, в связи с этим по клиническому принципу данные пациенты отнесены в группу высокого риска.

Алгоритм вычисления Индекса рецидивирования приведён в Приложении 3 к данной Инструкции.

2.4 Время проведения анализа – от 6 ч (с учётом пробоподготовки).

¹С математической точки зрения Индекс рецидивирования является значением граничной функции уровней представленности транскриптов ключевых генов. Общее назначение данной функции состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными. Значением функции является вероятность того, что полученный профиль экспрессии соответствует профилю экспрессии при высоком риске рецидива заболевания. Для вычисления Индекса рецидивирования используются методы многофакторного анализа, при которых разделяющее значение вероятности рецидивирования рака молочной железы, классифицирующее образцы высокого и низкого риска, соответствует уровню 50%. В частности, разделяющее значение при использовании метода логистической регрессии составляет 0,5 или 50%; при использовании дискриминантного анализа разделяющее значение классифицирующей линейной дискриминантной функции составляет 0, что в пересчете на вероятность, как функцию сигмоиды, составляет 50%.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Специфичность анализа

В таблице 2 приведен перечень мРНК генов, выявляемых с помощью набора реагентов Глобал Индекс РМЖ.

Таблица 2 – Перечень мРНК генов, выявляемых с помощью набора реагентов Глобал Индекс РМЖ.

Номер пробирки в стрипе	1	2	3	4	5	6	7	8
Стрип № 1								
Наименование мРНК гена	SCGB2A2	BCL2	BIRC5	NDRG1	MKI67	ERBB2	BAG1	CCNB1
Стрип № 2								
Наименование мРНК гена	CTSL2	MYC	CCND1	CD68	TERT	PTEN	PGR	ESR1
Стрип № 3								
Наименование мРНК гена	GRB7	AURKA	MYBL2	CDKN2A	MMP11	B2M	HPRT1	GUSB

В образцах биологического материала человека, содержащих мРНК исследуемого гена, после реакции обратной транскрипции и после завершения реакции амплификации программное обеспечение детектирующих амплификаторов определяет индикаторный цикл и концентрацию транскрипта.

Вклад геномной ДНК в результат исследования. В образцах биологического материала человека, содержащих геномную ДНК человека, без реакции обратной транскрипции после завершения реакции амплификации программное обеспечение прибора не определяет индикаторный цикл и наличие транскрипта. Фоновая амплификация на матрице геномной ДНК в пределах 1-2 lg не вносит вклад в конечный результат исследования.

Риск интерференции

На результат исследования может оказать влияние наличие в образце большого количества здоровой ткани, некротизированной ткани, значительное количество примесей крови. Допускается присутствие в образце 10-20 % клеток стромы нормальной и некротизированной ткани молочной железы и примесей крови. В образцах должно присутствовать не менее 80 % опухолевых клеток.

3.2 Чувствительность анализа

Чувствительность набора реагентов составляет 1000 копий/мл.

Для достоверного определения уровня экспрессии всех генов количество мРНК гена B2M должно быть не менее 10000 копий/мл (что соответствует показанию прибора более 4,0 lg, Ср не более 31,5). При меньшем количестве мРНК гена B2M результат определения уровня экспрессии всех генов считается недостоверным.

В случае отрицательного результата на наличие экспрессии кДНК референсных генов GUSB и HPRT1 или значении Ср более 37 цикла результат также считают недостоверным.

3.3 Диагностические характеристики

Группа пациенток с программой послеоперационного лечения, включавшей только гормонотерапию (тамоксифен) (88 образцов):

Чувствительность (95%ДИ) = 87,5% (76,0-98,9);

Специфичность (95%ДИ) = 89,3% (81,2-97,3);

Предсказательная ценность положительного результата (95%ДИ) = 82,3% (69,5-95,1);

Предсказательная ценность отрицательного результата (95%ДИ) = 92,6% (85,6-99,6).

Группа пациенток, пациента с программой адъювантной терапии, включавшей комбинацию гормонотерапии и адъювантной полихимиотерапии (124 образца):

Чувствительность (95% ДИ) = 87,2% (76,7-97,7);

Специфичность (95% ДИ) = 90,6% (84,4-96,8);

Предсказательная ценность положительного результата (95% ДИ) = 81,0% (69,0-92,8);

Предсказательная ценность отрицательного результата (95% ДИ) = 93,9% (88,7-99,0).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», требований ГОСТ Р 52905 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории.

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

Этап ПЦР в реальном времени следует проводить в помещении, снабженном комплектами полуавтоматических или автоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

ВНИМАНИЕ! Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с

требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов необходимо оборудование и материалы, приведенные в таблице 3.

Т а б л и ц а 3 – Материалы, оборудование и реагенты

Оборудование и материалы	Вариант фасовки	
	S	A
ПЦР-бокс	да	да
детектирующий амплификатор: «ДТпрайм» или «ДТлайт», или «ДТ-96»*	да да	да нет
устройство дозирующее, например ДТстрим	нет	да
устройство герметизирующее, например ДТпак	нет	да
термостат программируемый, например ТТ-1-«ДНК-Техн.»	да	да
холодильник с морозильной камерой	да	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
центрифуга для микропланшет ПЦР	нет	да
центрифуга типа Eppendorf	да	да
дозаторы переменного объёма со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2,0-20 мкл, 20-200мкл, 100-1000 мкл	да	да
наконечники вместимостью 1,0-20 мкл с фильтром	да	нет
наконечники вместимостью 20-200 мкл с фильтром	да	да
микропланшет ПЦР (384 лунки)	нет	да
полимерная термопленка для запаивания микропланшета	нет	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да
ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
комплект для выделения РНК из биологического материала	да	да
вода деионизованная (используется в качестве отрицательного контрольного образца)	да	да
перчатки медицинские (неопудренные /текстурированные /одноразовые)	да	да
программное обеспечение для амплификаторов детектирующих	да	да
ini файл с параметрами анализа «Global Index BC.ini»	да	да

* указаны детектирующие амплификаторы, на которых были проведены испытания набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве биологического материала используют образцы парафиновых срезов и нативной ткани молочной железы, полученные в результате оперативного вмешательства.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкциями к комплектам реагентов для хранения и выделения РНК из биологического материала.

6.1 Взятие образцов и требования к биоматериалу

Взятие материала осуществляется только врачом патоморфологом. Для приготовления срезов используют чистое, острое лезвие микротомы, отрезают 2 участка толщиной 10 мкм или 3-5 участка толщиной 5 мкм из предварительно обрезанного блока ткани, заключенной в парафин (приблизительная площадь среза 0,5-1,5 см²). Парафиновые срезы помещают в сухие пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Не следует превышать рекомендуемое количество ткани, т.к. избыток ткани, заключенной в парафин может снизить выход тотальной РНК.

Для диагностики можно использовать образцы нативной ткани молочной железы. Взятие материала осуществляется только врачом патоморфологом. Удаленную оперативным путем опухоль визуально анализируют, выбирают фрагменты только из очага опухоли размером около 0,2-0,3 x 0,5-1,0 см. В образце должна отсутствовать нормальная и некротизированная ткань, посторонние примеси крови. Образцы нативной ткани опухоли молочной железы помещают в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл, которые содержат транспортную среду для стабилизации мРНК.

Материал соседних срезов и кусочков нативной ткани опухоли, предоставленный врачом патоморфологом, обязательно гистологически исследуется. В образцах должно присутствовать не менее 80% опухолевых клеток. Допускается присутствие в образце 10-20% клеток стромы нормальной и некротизированной ткани молочной железы, примесей крови. Как правило, примеси крови в ткани молочной железы отсутствуют.

6.2 Выделение РНК

Для выделения тотальной РНК из биологического материала рекомендуется использовать комплекты реагентов, обеспечивающие параметры качества выделенной тотальной РНК, указанные в п.6.3. (например, набор реагентов «ПРОБА-МЧ» в комплектации «ПРОБА-МЧ-НК», производства ООО «ДНК-Технология ТС», РУ № РЗН 2017/5753 от 22.05.2017г, или аналоги). При выделении из парафинизированной ткани обратите внимание на необходимость удаления парафина и последующей обработки образца протеиназой К, свободной от РНКаз. При выделении тотальной ткани используйте гомогенизацию в лизирующем растворе. Выделение проводят в соответствии с Инструкциями производителя. Рекомендуемый объем элюирующего раствора 100 мкл.

6.3 Оценка качества РНК

При рутинном использовании набора качество выделенной РНК оценивают на основании значений пороговых циклов референсных генов (см. п.9.3, п.9.5). В случае несоответствия значений пороговых циклов результат интерпретируют как недостаточное количество материала или присутствие ингибиторов.

Перед первым использованием набора в лаборатории или при повторяющихся недостоверных результатах исследования (см. п.9.3, п.9.5) рекомендуется провести оценку чистоты препарата тотальной РНК.

Чистоту препарата тотальной РНК оценивают путём определения отношения A_{260}/A_{280} (примеси белка) и A_{260}/A_{230} (примеси органических соединений). В препарате хорошего качества соотношение A_{260}/A_{280} составляет 1,8-2,2, соотношение $A_{260}/A_{230} \geq 2$. Оптическую плотность при 260, 280 и 230 нм измеряют, проанализировав небольшую аликвоту образца (1-2 мкл) с использованием спектрофотометра, например NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Размер молекул тотальной РНК не имеет критического значения. Длина ампликонов, получаемых в амплификации с использованием предлагаемого набора реагентов, составляет около 100 нуклеотидов, в реакции обратной транскрипции используются специфические олигонуклеотиды. В результате деградации в парафинизированных образцах большая часть РНК имеет длину 100-300 оснований, пики 18S и 28S рРНК не детектируются, что приемлемо для ОТ-ПЦР с короткими ампликонами.

Реакцию обратной транскрипции рекомендуется поставить сразу после выделения РНК. Остаток образца РНК рекомендуется хранить при температуре минус 20 °С в течение одного месяца или минус 70 °С в течение одного года.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка и проведение обратной транскрипции

7.1.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца по две пробирки объемом 0,5 мл и одну пробирку для отрицательного контрольного образца (К-).

7.1.2 Разморозьте содержимое пробирок ОТ-буфер и Праймеры ОТ-Глобал Индекс РМЖ + дНТФ для обратной транскрипции при комнатной температуре от 18°C до 25 °C, затем встряхните пробирки в течение 3-5 с и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.3 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

4,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера,

2,0 x (N+1) мкл праймеров ОТ-Глобал Индекс РМЖ +дНТФ,

1,0 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом дублей и К-.

Примечание – В связи с вязкостью раствора и его малым количеством комплектация осуществляется с запасом обратной транскриптазы. При приготовлении ОТ-смеси строго следуйте Инструкции, не допуская переизбытка отдельных компонентов смеси.

7.1.4 Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000 – 3000 об/мин в течение 3-5 с.

7.1.5 Добавьте в промаркированные пробирки по 7,0 мкл ОТ-смеси.

7.1.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 33 мкл соответствующего образца РНК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку К- РНК не вносится.

7.1.7 В пробирку, маркированную «К-», внесите 33 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

Примечание – во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы РНК наконечниками с фильтром.

7.1.8 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

7.1.9 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °C в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °C в течение 5 минут.

Примечание – рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, ТТ-1-«ДНК-Техн.» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

7.1.10 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

7.1.11 Добавьте к полученному препарату кДНК 100 мкл (формат стандартной фасовки) или 200 мкл (формат фасовки для автоматизированного дозирования) буфера для разведения ДНК. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР (фасовка S).

7.2.1 Промаркируйте стрипы с запечатанной парафином смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца К+ и отрицательного контрольного образца К-.

7.2.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Таq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 240 x N + 10 мкл ПЦР-буфера,
- 12 x N + 0,5 мкл Таq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом К- и К+.

Например, необходимо проанализировать 2 образца кДНК, один К- и один К+.

Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Таq-полимеразы для 4 образцов, т.е. $240 \times 4 + 10 = 970$ мкл ПЦР-буфера и $12 \times 4 + 0,5 = 48,5$ мкл Таq-полимеразы.

7.2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Таq-полимеразой в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (примерно 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

7.2.6 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только тех стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата кДНК в соответствующие стрипованные пробирки для исследуемых образцов (п.7.1.11).

7.2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и обратной транскрипции (п.7.1.11), в стрипованные пробирки, маркированные «К-».

7.2.9 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипованные пробирки, маркированные «К+».

7.2.10 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

7.2.11 Установите все стрипы в амплификатор детектирующий.

7.2.12 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «Global Index_BC.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «Global Index_BC.ini», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (объем реакционной смеси 35 мкл) и проведите ПЦР. Программа амплификации приведена в Приложении 2 (Таблица 2.1).

7.3 Подготовка и проведение ПЦР (фасовка А)

7.3.1 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ следует доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.2 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ, используя две пробирки с ПЦР-буфером Стрим и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ при постановке «Планшет 384» (16 определений одновременно). В пробирку с ПЦР-буфером Стрим (600 мкл) добавьте весь объем пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ (60 мкл).

7.3.3 Встряхните пробирку со смесью в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.3.4 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в восемь пробирок пустого стрипа из набора по 140 мкл полученной смеси при постановке «Планшет 384» (16 определений одновременно).

7.3.5 Поместите стрип на рабочий стол ДТстрим в соответствии со схемой расстановки компонентов набора реагентов на рабочем столе ДТстрим (см. Приложение 1).

7.3.6 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.7 Поместите стрипы со смесями для амплификации Стрим на рабочий стол ДТСтрим в соответствии со схемой.

7.3.8 Откройте стрипы со смесью для амплификации.

7.3.9 Поставьте три новых пустых стрипа на рабочий стол ДТСтрим в соответствии со схемой.

7.3.10 Промаркируйте 2 пустых стрипа для образцов препарата исследуемой кДНК, одного отрицательного контрольного образца и одного положительного контрольного образца. Допускается однократная постановка отрицательного и положительного образца для реактивов одной серии.

7.3.11 Внесите в пробирки пустых стрипов по 180 мкл образца кДНК и отрицательного контрольного образца в соответствии со схемой. В пробирку для положительного контрольного образца добавьте 30 мкл буфера для разведения ДНК и 150 мкл положительного контрольного образца.

7.3.12 Центрифугируйте стрипы с препаратами кДНК на центрифуге.

7.3.13 Запустите программу раскапывания.

7.3.14 Запечатйте планшет на 384 лунки на ламинаторе ДТпак в соответствии с инструкцией к прибору.

7.3.15 Поместите планшет на 384 лунки в детектирующий амплификатор.

7.3.16 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini-файл. При последующих постановках добавьте в протокол тест «Global Index_BC.ini», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой, объём реакционной смеси (12 мкл) и проведите ПЦР. Программа амплификации приведена в Приложении 2 (Таблица 2.2).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

8.2 Детекция и учёт результатов осуществляется детектирующим амплификатором автоматически.

8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

8.4 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (Cp) по каждому исследованию, указана концентрация РНК исследуемых и референсных генов (lg копий/мл).

8.5 По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт, содержащий всю выше перечисленную информацию.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

9.3 В результатах анализа необходимо учитывать уровень экспрессии гена B2M. Значение концентрации мРНК гена B2M должно быть более 4,0 lg копий/мл (значение Cp для B2M не более 31,5 цикла), что соответствует значению концентрации 10000 копий/мл. Если значение менее 4,0 lg копий/мл (значение Cp более 31,5 цикла), то результаты следует интерпретировать как недостаточное количество материала или присутствие ингибиторов в материале. В этом случае может потребоваться повторное взятие клинического материала. Результат исследования считается недостоверным.

9.4 При наличии в исследуемом образце мРНК исследуемых генов, в строке с названием этого гена указано значение индикаторного цикла (Cp) и концентрация (lg копий/мл).

9.5 В случае отрицательного результата на наличие экспрессии кДНК референсных генов GUSB и HPRT1 (отсутствие индикаторного цикла) или значения C_r более 37 цикла результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца. Недостоверный результат может быть связан с недостаточным количеством материала, присутствием ингибиторов в препарате мРНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение мРНК (выполняется последовательно).

9.6 Для положительных контрольных образцов должен регистрироваться экспоненциальный рост флуоресценции по каналу Fam (указано значение индикаторного цикла). При отсутствии экспоненциального роста флуоресценции (отсутствие индикаторного цикла) результаты считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7 В отрицательных контрольных образцах экспоненциальный рост флуоресценции по каналу Fam должен отсутствовать. При регистрации экспоненциального роста флуоресценции по каналу Fam (указано значение индикаторного цикла), результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значения индикаторных циклов мРНК исследуемых генов (п.9.4), полученных в результате исследования, используют для расчёта прогностического Индекса рецидивирования.

Расчёт прогностического Индекса рецидивирования рака молочной железы проводят с учётом планируемой послеоперационной терапии (только гормонотерапия или гормонотерапия и адъювантная полихимиотерапия) в соответствии с алгоритмом, приведённом в Приложении 3 к Инструкции (разработан ООО «Гамма Глобал РД»).

Оценку прогностического Индекса рецидивирования рака молочной железы проводят с учётом планируемой послеоперационной терапии (только гормонотерапия или гормонотерапия и адъювантная полихимиотерапия) в соответствии с таблицей 5.

Пример полученных результатов и заключения о риске рецидива приведены в таблице 6.

Таблица 5 – Интерпретация Индекса рецидивирования с учётом планируемой послеоперационной терапии

Только гормонотерапия (ГТ)		Гормонотерапия и адъювантная полихимиотерапия (ГТ+АПХТ)	
Индекс рецидивирования, %	Заключение о риске рецидива	Индекс рецидивирования, %	Заключение о риске рецидива
<40	Низкий	<40	Низкий
40-60	Умеренный*	40-60	Умеренный*
>60	Высокий	>60	Высокий

* - Пациентов с «умеренным риском» рекомендуется относить к группе высокого риска, так как любое сомнение должно расцениваться в пользу пациента. Решение о планируемой терапии принимает врач на основании совокупных клинико-лабораторных данных о состоянии пациента. Значение прогностического Индекса рецидивирования является дополнительным фактором для принятия решения о выборе послеоперационной терапии.

Таблица 6 – Пример полученных результатов и заключения о риске рецидива

1. Получены следующие значения индикаторных циклов при исследовании образца (для двух дублей):

Параметр	Ср	Ср
SCGB2A2	27,2	26,6
CTSL2	35,1	35,3
BCL2	35,7	35
MYC	29,7	29,7
BIRC5	37,1	41,8
CCND1	29,7	29,6
NDRG1	-	-
CD68	33,5	33,8
MKI67	35,1	35,3
TERT	35,4	36,7
ERBB2	25,6	25,4
PTEN	31,5	31,9
BAG1	32,4	32,6
PGR	34,6	34,5
CCNB1	33,6	33,9
ESR1	28,7	28,9
GRB7	28,1	27,6
MMP11	31,1	31,2
AURKA	36,1	37,1
B2M	24,8	25,2
MYBL2	31,6	31,6
HPRT1	33,3	33,8
CDKN2A	32,6	32,2
GUSB	32,6	32

2. Перед проведением расчёта необходимо проверить выполнение условия валидности исследования по значениям референсных генов:

B2M (Ср)<31,5,
GUSB(Ср)<37,
HPRT1(Ср)<37 (п.9.3, 9.5)

3. По алгоритму, приведённому в Приложении 3, получены следующие значения Индекса рецидивирования для указанного образца:

Индекс рецидивирования ГТ, %	Индекс рецидивирования ГТ+АПХТ, %
88,6	16,1

В соответствии с таблицей 5 результат интерпретируется следующим образом:

**Индекс рецидивирования
ГТ = 88,6% (>60%)**

**Индекс рецидивирования
ГТ+АПХТ = 16,1% (<40%)**

Заключение:

Высокий риск рецидива, если пациентке будет назначена только гормонотерапия.

Низкий риск рецидива, если пациентке будет назначена гормонотерапия в сочетании с адъювантной полихимиотерапией.

11 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

11.1 Транспортирование

11.1.1 Транспортирование набора осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

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

11.2 Хранение

11.2.1 Компоненты набора в фасовке S следует хранить:

- смеси для амплификации, запечатанные парафином Стрип №1, Стрип №2, Стрип №3, буфер для разведения ДНК, положительный контрольный образец и крышки для стрипов при температуре от 2°C до 8°C в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности;

- праймеры ОТ-Глобал Индекс РМЖ + дНТФ, ОТ-буфер, обратную транскриптазу, Таq-полимеразу, ПЦР-буфер и минеральное масло при температуре от минус 18°C до минус 22°C в морозильных камерах в течение всего срока годности.

11.2.2 Компоненты набора в фасовке А следует хранить:

- смеси для амплификации Стрим, ПЦР-буфер Стрим, буфер для разведения ДНК, положительный контрольный образец, стрипы по 8 пробирок и крышки для стрипов при температуре от 2°C до 8°C в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности;

- праймеры ОТ-Глобал Индекс РМЖ + дНТФ, ОТ-буфер, обратную транскриптазу, полимеразу ТехноТаq МАХ при температуре от минус 18°C до минус 22°C в морозильных камерах в течение всего срока годности.

11.3 Указания по эксплуатации

11.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

11.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- смеси для амплификации, запечатанные парафином, смеси для амплификации Стрим следует хранить в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора при температуре от 2 °C до 8 °C в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности набора;

- буфер для разведения ДНК, ПЦР-буфер, минеральное масло, положительный контрольный образец, стрипы по 8 пробирок и крышки для стрипов следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках в течение всего срока годности набора.
- праймеры ОТ-Глобал Индекс РМЖ + дНТФ, ОТ-буфер, обратную транскриптазу, Таq-полимеразу, полимеразу ТехноТаq МАХ, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в морозильных камерах в течение всего срока годности набора.

Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора и их многократное замораживание/оттаивание.

12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.1 При использовании набора в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

12.2 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790 и МУ 1.3.2569.

12.3 Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

13.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных настоящими техническими условиями.

13.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

14 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

14.1 Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

15 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Только для in vitro диагностики		Дата производства
	Температурный диапазон		Содержит инструкцию по применению
	Количество определений		Каталожный номер
	Годеи до		Адрес производителя
	Серия набора		Не допускается воздействие солнечного света

16 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

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 ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

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 Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

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).

7 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандартов систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»; ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов Глобал Индекс РМЖ, следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6., тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании

«ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Старший научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
д.б.н.



О.В. Бурменская

«17» 01 2019г.

Заведующий отделом молекулярной
биологии и экспериментальной терапии
опухолей ФГБУ «РНЦРР» Минздрава РФ,
д.м.н., профессор



В.К. Боженко

«24» 01 2019г.

СОГЛАСОВАНО

Директор
ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России
Академик РАН, д.м.н., профессор



В.А. Солодкий

«24» 01 2019г.

Приложение 1

Схема расстановки компонентов набора реагентов на рабочем столе ДТстрим, 24 смеси

Способ дозирования: **БАЗОВЫЙ**

вариант: **Планшет 384**

Сценарий: **PCR-Setup_24Tx16D_v1**

* количество смесей для амплификации

24*

A1

НЕ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

A2

Наконечники

[illegible]

A3

НЕ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

A4

Реагенты

ряд 1	1	Смесь для амплификации Стрим									
ряд 2		Смесь для амплификации Стрим									
ряд 3		Смесь для амплификации Стрим									
ряд 4		ПЦР-буфер Стрим ТехноТАС MAX									
ряд 10		Пустой стрип									
ряд 11		Пустой стрип									
ряд 12		Пустой стрип									

B1

НЕ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

контейнер для сброса
наконечников

B2

НЕ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

B3

Стрипы с разведенными образцами

[illegible]

B4

Планшет 384 формата

A blank coordinate grid with a horizontal axis labeled A through O and a vertical axis labeled 1 through 24. The grid is 15 columns wide and 24 rows high.

Приложение 2
Описание теста «Global Index_BC.ini»
Тип анализа: Мультиплекс q+

Метод: Геометрический (Cp)

Количество пробирок в тесте: 24

Каналы детекции в тесте представлены в Таблице 1.

Объём реакционной смеси: 35 мкл (фасовка S) , 12 мкл (фасовка A)

Таблица 2.1 – Программа амплификации (фасовка S)

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерения
		мин	с		
1	80,0	00	30	1	
	94,0	01	30		
3	94,0	00	30	5	
	64,0	00	15		√
4	94,0	00	10	45	
	64,0	00	15		√
5	94,0	00	05	1	
6	10,0	...	...	Хранение	

Таблица 2.2 – Программа амплификации (фасовка A)

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерения
		мин	с		
1	80,0	00	05	15	
	94,0	00	05		
2	94,0	05	00	1	
3	94,0	00	30	5	
	64,0	00	15		√
4	94,0	00	10	45	
	64,0	00	15		√
5	94,0	00	05	1	
6	10,0	...	...	Хранение	

Приложение 3

Алгоритм расчёта уровня экспрессии и риска отдаленного метастазирования с использованием набора Глобал Индекс РМЖ

Уровень экспрессии мРНК рассчитывают в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов. Данные нормализуют относительно трех нормировочных генов (GUSB, HPRT1, B2M), которые используют в качестве внутреннего контроля для расчета уровней мРНК между различными образцами. Контрольные гены имеют относительно устойчивый уровень экспрессии в клетке, что является необходимым условием для расчета нормировочного фактора (NF).

Порядок вычислений

1. Для каждого гена в эксперименте рассчитывают среднее арифметическое значение индикаторных циклов из двух (или больше) повторов.
2. Далее рассчитывают $C_{p\min}$ – минимальное значение из всех значений индикаторных циклов для каждого гена в эксперименте, в том числе и для нормировочных генов.
3. Далее вычисляют нормировочный фактор (NF) для каждого образца. Для этого для каждого (в нашем случае для трех) нормировочного гена применяют формулу:

$$NF_{HKG1} = E^{(C_{p\min} - C_{pHKG1})}, \text{ где}$$

E – эффективность амплификации, характеризующая прирост матрицы на каждом цикле. Теоретически на каждом цикле происходит удвоение ДНК, т.е.

$$E = 2.$$

NF_{HKG1} – нормировочный фактор для одного нормировочного гена,

$C_{p\min}$ – минимальное значение индикаторного цикла нормировочного гена (соответствует максимальному уровню экспрессии данного гена) среди всех значений для данного гена в эксперименте.

C_{pHKG1} – значение индикаторного цикла нормировочного гена для исследуемого образца

На следующем этапе NF – нормировочный фактор рассчитывается с учетом всех нормировочных генов как среднее геометрическое по формуле:

$$\sqrt[3]{NF_{HKG1} \times NF_{HKG2} \times NF_{HKG3}}$$

4. Далее считают уровень экспрессии каждого исследуемого гена (C_{NF}) для каждого образца с учетом нормировочного фактора по формуле:

$C_{NF} = E^{(C_{p\min} - C_p)/NF}$, где E – эффективность амплификации (теоретически равно 2), $C_{p\min}$ – минимальное значение индикаторного цикла исследуемого гена (соответствует максимальному уровню экспрессии данного гена) среди всех значений для данного гена в эксперименте.

C_p – значение данного гена для исследуемого образца

5. На заключительном этапе для каждого образца и каждого исследуемого гена вычисляется образец с минимальным значением экспрессии (это значение приравнивается к «1») среди всей исследуемой в эксперименте группы. Относительно него рассчитывают, насколько выше уровень экспрессии в остальных образцах.

$$\text{Уровень экспрессии} = [C_{NF}] / [C_{NF\min}]$$

где C_{NF} – уровень экспрессии гена с учетом нормировочного фактора,

$C_{NF\min}$ – минимальное значение исследуемого гена из всех нормированных значений этого гена (C_{NF}) в группе образцов.

Полученные уровни экспрессии используют для расчета индекса и вероятности риска рецидивирования.

Уровень риска рассчитывается по формуле:

Уровень риска = константа + сумма (коэффициент для соответствующих генов • уровень экспрессии)

Для группы ГТ (гормонотерапия)

Уровень риска = 0,000009 + $\sum$ (коэффициент для соответствующих генов • $[C_{NF}] / [C_{NF \text{ min}}]$)

Для группы Группа ГТ+АПХТ (Гормонотерапия и адъювантная полихимиотерапия)

Уровень риска = -0,53601 + $\sum$ (коэффициент для соответствующих генов • $[C_{NF}] / [C_{NF \text{ min}}]$)

Коэффициенты для соответствующих генов приведены в таблице 1.

Группа, для которой планируется только гормонотерапия, указана в столбце «Группа ГТ».
(где ГТ – гормонотерапия, АПХТ - адъювантная химиотерапия)

Вариант расчета индекса и риска рецидивирования, если получен высокий риск при планировании только ГТ, выполняется по той же формуле с использованием коэффициентов, приводимых в столбце «Группа ГТ+АПХТ».

Таблица 1. Коэффициенты для соответствующих генов

Ген	Группа ГТ	Группа ГТ+АПХТ
	коэффициент	коэффициент
KI67	0,003315	-0,00193
STK15	0,001113	-8,5E-05
CCNB1	-0,000151	-0,01486
CCND1	-0,001334	0,007612
MYC	-0,009230	-0,00334
MYBL2	-0,004068	0,003211
P16INK4A	0,003969	0,005475
PTEN	0,002559	0,007005
BIRC5	0	0,003617
BCL2	0,000075	0,007437
BAG1	-0,001241	0,012431
TERT	0	-0,00026
NDRG1	0	-0,00062
ESR1	0,018800	0,000029
PGR	-0,000032	0,000274
HER2	-0,000118	-0,0049
GRB7	-0,000212	0,000674
MGB1	0,000496	0,000000
MMP11	-0,000192	-2,2E-05
CTSL2	0,000034	-0,00188
CD68	-0,000000	0,003191
Константа	0,000009	-0,53601
ГТ – гормонотерапия, АПХТ - адъювантная химиотерапия		

Трактовка результатов

Получаемые значения лежат в пределах от -5 до +5.

Для группы ГТ

Более 0,4 – высокий риск рецидива (вероятность более 60%)

Менее -0,3 – низкий риск (вероятность менее 40%)

Промежуточные значения – средний риск.

Если получен высокий риск при планировании только ГТ, выполняется расчёт с использованием коэффициентов, приводимых в столбце «Группа ГТ+АПХТ».

Для группы ГТ+АПХТ

Более 1,17 – высокий риск рецидива (вероятность более 60%)

Менее 0,67 – низкий риск (вероятность менее 40%)

Промежуточные значения – средний риск.

Интерпретация			
Только гормонотерапия (ГТ)		Гормонотерапия и адъювантная полихимиотерапия (ГТ+АПХТ)	
Индекс рецидива, %	Заключение о риске рецидива	Индекс рецидива, %	Заключение о риске рецидива
<40	Низкий	<40	Низкий
40-60	Умеренный	40-60	Умеренный
>60	Высокий	>60	Высокий

Примечание – Для исключения ошибки в расчёте данный алгоритм рекомендуется внести в электронную таблицу для расчёта или другие автоматизированные способы вычисления.

Рекомендуется обучение по вычислению Индекса рецидивирования. Обучающие материалы по расчёту Индекса рецидивирования предоставляются разработчиком ООО «Гамма Глобал РД». Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 17 Инструкции по применению.

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью
Директор ФГБУ «РНИЦРР»
Минздрава России



33 листа

В.А. Солодкий

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 33
(графический) листа (ов)
специалист по регистрации
Щербаков Н.И.

