



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Л-Сфера»
Р. Р. Халилов
«21» марта 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

для реагентов для определения статуса мутаций
гена *BRAF* методом аллель-специфической ПЦР
в режиме реального времени в пробе геномной ДНК
человека из образцов фиксированной в парафине
ткани (Тест-BRAF-ткань-5)
по ТУ 21.20.23-003-25226389-2020



Пропитано, пронумеровано и
скреплено печатью
на реактивы) листов
Должность: ген. директор
Халилов Р.Р.

3 от 21.03.2022

Содержание

Введение	4
1. Назначение.....	8
2. Принцип метода	9
3. Состав набора реагентов	12
4. Характеристики набора реагентов	13
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5»	14
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	18
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	20
8. Анализируемые образцы	22
9. Подготовка компонентов набора для исследования	27
10. Проведение анализа	27
11. Регистрация и интерпретация результатов	30
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора	33
13. Утилизация	34
14. Гарантийные обязательства, контакты	35
Приложение А	37

Введение

Целевой анализ – ген *BRAF*, исследуемый при диагностике пациентов с диагнозом «метастатическая меланома III-IV стадии» и проведении молекулярно-генетического исследования для качественного определения статуса мутаций V600E, V600K, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K гена *BRAF*.

Материалом для проведения исследования служат пробы геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафин ткани.

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.

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

В соответствии с Клиническими рекомендациями «Меланома кожи и слизистых оболочек» С43, С51, С60.9, С63.2, С69.0, С00.26, С30-С32, С52, С53, С77, С78, С79, D03.0-D03.09. Взрослые. 020 (Разработчики: Ассоциация онкологов России, Ассоциация специалистов по проблемам меланомы, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Одобрено Научно-практическим советом Минздрава РФ):

«Рекомендуется пациентам с меланомой кожи, если диагностированы или заподозрены регионарные и отдаленные метастазы меланомы, и при метастазах меланомы без выявленного первичного очага выполнить молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *BRAF* (экзон 15) в биопсийном материале (или ранее удаленных лимфатических узлов, или первичной опухоли (если материал удовлетворяет требованиям лаборатории для достоверного определения наличия или отсутствия молекулярно-генетических изменений)) – это может повлиять на выбор таргетного агента (ингибитора протеинкиназы) в лечении метастатического процесса».

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

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.

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.

(Регистрационное удостоверение № ЛП-002271 от 04.10.2013 г. препараты пришли на смену химиотерапии и стали новым Торговое наименование: Зелбораф), траметиниб (Регистрационное удостоверение № ЛП-002945 от 06.04.2015 г., Торговое наименование: Мекинист).

Дабрафениб и вемурафениб — ингибиторы киназ молекулярно-генетических подтипов меланомы.⁵ активности BRAF, эффективные в лечении больных метастатической меланомой с мутациями BRAF V600E или V600K. **Область применения набора реагентов** - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Результаты исследований ингибиторов BRAF, показавшие высокую эффективность при метастатической меланоме, благоприятный профиль безопасности, позволили рассчитывать на преимущества этих препаратов над стандартной химиотерапией при церебральных метастазах. На сегодняшний день опубликовано несколько исследований, подтверждающих эффективность вемурафениба при церебральных метастазах меланомы, имеющей активирующую мутацию BRAF V600⁴.

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 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

Показания и противопоказания к применению.

Показания к применению: набор реагентов «Тест-BRAF-комплекс (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 выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса, в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Меланома кожи и слизистых оболочек» С43, С51, С60.9, С63.2, С69.0, С00-С26, С30-С32, С52, С53, С77, С78, С79, D03.0-D03.09. Взрослые. 2020 (Разработчики: Ассоциация онкологов России, Ассоциация специалистов по проблемам меланомы, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Одобрено Научно-практическим советом Минздрава РФ).

Противопоказания к применению: отсутствуют.

⁴ 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.

⁵ Мутации гена BRAF // Программа RUSSCO «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации». Практическое руководство для врачей. - С. 37-43

1. Назначение

1.1 Назначение: набор реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях онкологического профиля при диагностике пациентов с диагнозом «метастатическая меланома III-IV стадии» при проведении молекулярно-генетического исследования 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 выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса, в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Меланома кожи и слизистых оболочек» С43, С51, С60.9, С63.2, С69.0, С00-С26, С30-С32, С52, С53, С77, С78, С79, D03.0-D03.09. Взрослые. 2020 (Разработчики: Ассоциация онкологов России, Ассоциация специалистов по проблемам меланомы, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Одобрено Научно-практическим советом Минздрава РФ).

1.2. Количество реакций

Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» представлен в одном варианте исполнения рассчитанный на проведение 5 определений.

1.3 Область применения - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

1.4 Требования к квалификации пользователей: для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных потребителей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

1.5 Функциональное назначение - набор реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» используется при диагностике пациентов с диагнозом «метастатическая меланома III-IV стадии» при проведении молекулярно-генетического исследования 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.

различает их) и V600K гена *BRAF* для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса, в соответствии с Клиническими рекомендациями: «Меланома кожи и слизистых оболочек» С43, С51, С60.9, С63.2, С69.0, С00-С26, С30-С32, С52, С53, С77, С78, С79, D03.0-D03.09. Взрослые. 2020 (Разработчики: Ассоциация онкологов России, Ассоциация специалистов по проблемам меланомы, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Одобрено Научно-практическим советом Минздрава РФ).

1.6 Показания к применению

Рекомендуется к применению при диагностике пациентов с диагнозом «метастатическая меланома III-IV стадии» при проведении молекулярно-генетического исследования 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 выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса.

1.7 Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений

1.8 Противопоказаний к применению нет.

1.9 Стерильность: изделие не стерильно.

2. Принцип метода

Метод

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

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 анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптических из образцов фиксированной в парафине ткани включает в себя три этапа: исследования, должна составлять не менее 1,6-1,8. Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять

1) подготовку ПЦР;

2) ПЦР-амплификацию ДНК и гибридизационно-не менее 5 нг/мкл.

флуоресцентная детекцию продуктов амплификации в режиме «реального времени»; 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.

3) интерпретацию результатов.

С пробами геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани проводятся реакции (неопухолевую ткань). При использовании пробы геномной ДНК, амплификации участков гена *BRAF* в реакционном буфере определенной из ткани, не содержащей опухоль, набор «Тест-BRAF-помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и ферментаткань-5» не сможет выявить мутации гена *BRAF*.

Тaq-полимеразы. В составе реакционной смеси для амплификации Минимальное содержание опухоли в образце для проведения присутствуют аллель-специфичные флуоресцентно-мечены теста - 20% по результатам морфологического исследования олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с опухолевого материала врачом-гистологом.

комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и Метод ПЦР крайне чувствителен к контаминации. разрушаются Тaq-полимеразой, в результате чего происходит Соблюдайте осторожность, чтобы избежать контаминации нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет образцов исследуемой ДНК и реакционных смесей содержащим из регистрировать накопление специфического продукта пробирки ПКО или продуктами ПЦР.

амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» не может сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» предназначен только для системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального качественного определения статуса мутаций V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не времени».

Продукты ПЦР исследуемого гена *BRAF* идентифицируются различает их) и V600K гена *BRAF*.

в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью зондов, меченных FAM и HEX.

Общее время проведения анализа составляет 2-2,5 ч.

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

Обнаружение мутаций зависит от целостности образца и количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце Минимальное количество ДНК, которое необходимо для проведения анализа – 60 нг (30 нг ДНК на реакцию). Чистота

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации – «Тест-BRAF-ткань-5». Каждый набор «Тест-BRAF-ткань-5» содержит реагенты, рассчитанные на проведение анализа 5 определений.

Состав набора

Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» включает:

Таблица 1 – Состав набора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество пробирок, объем, мкл
1	ПЦР-смесь V600E/Ес	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь отенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
2	ПЦР-смесь V600K	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь отенок розового цвета	1 пробирка (60 мкл)
3	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (60 мкл)
4	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (60 мкл)
5	Тaq- полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка (300 мкл)

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь геномной ДНК и 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-5»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
ПЦР-смесь V600E/Ес	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПЦР-смесь V600K	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок розового цвета
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
Тaq-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-003-25226389-2020
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-003-25226389-2020
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-003-25226389-2020
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции с $Ct \leq 35$ в пробирках с ПКО по каналам FAM и HEX

Наименование показателя	Характеристики и нормы
Отрицательный результат с ОКО	Отсутствие роста сигнала флуоресценции в пробирках с ОКО по каналам FAM и HEX

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к мутации V600E, V600E complex (обнаруживает мутации V600E, V600E complex, но не различает их) и V600K гена *BRAF*.

Список определяемых мутаций с указанием ID мутации представлен в таблице 3.

Таблица 3 - Список определяемых мутаций с указанием ID мутации

Набор мутаций, определяемых с помощью «Тест-BRAF-ткань-5»	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).

4.2.2 Аналитическая чувствительность

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

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости были проведены последовательные исследования следующих образцов:

- СОП-ПКО-N, представляющий собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК - нормальные варианты гена *BRAF*, заключённых в плазмидный вектор pAI-TA с концентрацией 10 000 коп в 1 мкл ТЕ буфера. (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА). Содержит 100% нормальных копий ДНК (образец «дикого типа»).

- СОП-ПКО-M, представляющий собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК - специфические фрагменты с гомозиготным содержанием мутаций в гене *BRAF* - мутации V600E, V600E complex и V600K, заключённых в плазмидный вектор pAI-TA с концентрацией 10 000 коп плазмидной ДНК в 1 мкл в ТЕ буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА). Содержит 100% мутантных копий ДНК.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости контрольные образцы были исследованы в 10 повторях.

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

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

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет: 1) для мутантных вариантов гена *BRAF* не более 3%; 2) для нормальных вариантов гена *BRAF* не более 3%.

4.2.4. Прецизионность в условиях воспроизводимости

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

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях воспроизводимости набора составляет: 1) для мутантных вариантов гена *BRAF* не более 3%; 2) для нормальных вариантов гена *BRAF* не более 3%.

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

4.2.6 Предел обнаружения (LoD), как наименьшая частота реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении заявленных аллелей в образце в гене *BRAF*, которое способно средств измерений US.C.31.004.A №53590.

4.2.7 Подтверждена специфичность изделия в отношении микрофлоры кожи в максимальной концентрации патогена. При исследовании ДНК штаммов:

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

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

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

в концентрации 10^6 клеток на мл неспецифических реакций выявлено не было. Данные микроорганизмы не оказывают влияние на способность набора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» различать мутантные и нормальные варианты гена *BRAF*.

4.2.8. Проведено тестирование изделия на гомологичных генах *BRAF* – *ARAF*, *RAF1*. Набор реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» не дает перекрестный реакций с гомологичными генами *BRAF* – *ARAF*, *RAF1*.

4.2.9 Минимальное количество ДНК, которое необходимо для проведения анализа – 60 нг (30 нг ДНК на реакцию).

Набор рекомендован для работы с образцами ДНК с концентрацией не менее 5 нг/мкл.

Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения оптических плотностей раствора выделенной ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8.

Проверку чистоты выделения нуклеиновых кислот выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК (A260/280нм), и концентрации выделенной ДНК рекомендуется проводить с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Спектрофотометр Nanodrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) внесён в Государственный

реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590.

4.2.10. Информация об **интерферирующих веществах** указана в разделе «8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала».

4.3. Характеристики клинической эффективности

В ходе проведения клинических испытаний было отобрано 53 образца фиксированной в парафине ткани, от пациентов с диагнозом метастатическая меланома III-IV стадии.

Каждый образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5», производства ООО «Л-сфера».

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

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

Воспроизводимость результатов 100%. Результаты изучения диагностических характеристик исследуемого медицинского изделия по отношению к каждой выявляемой мутации в гене *BRAF* приведены в таблице 4.

Таблица 4

Мутация	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с достоверностью 95 %	Диагностическая специфичность с достоверностью 95 %
V600E/V600Ec	44	62	100% (95% ДИ: 91,96%-100%)	100% (95% ДИ: 94,22%-100%)
V600K	50	56	100% (95% ДИ: 92,89%-100%)	100% (95% ДИ: 93,62%-100%)

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

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;
3. проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
4. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
5. 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 аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной в парафине ткани (Тест-BRAF-ткань-5) по ТУ 21.20.23-003-25226389-2020», производства ООО «Л-сфера» 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-5», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». Меры предосторожности против любых

специальных, несвойственных экологических рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

Реагенты, входящие в набор «Тест-BRAF-ткань-5», обладают низкой упругостью пара, и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «Тест-BRAF-ткань-5» не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий". Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

2. допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским или биологическим образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III-IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также со средним специальным медицинским образованием);
3. не использовать набор по истечении срока годности;
4. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников 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 «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (типа «Eppendorf», Германия).
4. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.
5. Амплификатор⁶ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам

FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Rad, Cy5.5/Crimson: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

6. Спектрофотометр NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Внесён в Государственный реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590.

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. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).
 - б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «CFX96», «ДТ-Прайм»).
6. ПЦР-планшеты (могут использоваться вместо пробирок, указанных в пункте 5).
7. Оптически прозрачная пленка для заклеивания планшетов.
8. Для выделения пробы геномной ДНК человека из фиксированной в парафине ткани, необходимой для проведения

⁶ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

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 заключенных 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.

8. Анализируемые образцы

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка и 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 заключенных 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.

Набор рекомендован для работы с образцами ДНК с концентрацией не менее 5 нг/мкл. Минимальная валидированная концентрация ДНК – 5 нг/мкл.

Дополнительно рекомендуется для оценки степени чистоты выделенного образца ДНК из парафиновых блоков использовать значение соотношения оптических плотностей раствора выделенной ДНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260/280). Рекомендуемое значение соотношения – не менее 1.6 – 1.8.

Проверку чистоты выделения нуклеиновых кислот, выраженную в отношении оптических плотностей раствора выделенной ДНК (A260/280нм), и концентрации выделенной ДНК рекомендуется проводить с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) с диапазоном излучения 220-350 нм. Спектрофотометр Nanodrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) внесён в Государственный реестр средств измерений, имеет Свидетельство об утверждении средств измерений US.C.31.004.A №53590

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.

нerezектабельной или метастатической меланомы)	
Котеллик(используется в качестве терапии неоперабельной или метастатической меланомы с BRAF V600 мутацией)	0,004 мг/мл
Тецентрик (применяется для лечения меланомы и др.)	0,168 мг/мл
Мекинист (показан при лечении пациентов с нerezектабельной или метастатической меланомы с мутацией гена BRAF V600)	0,0001 мг/мл

8.2 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

- 1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);
- 2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов - в данном случае, загрязнение образца ткани гемоглобином крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК.

Исследуемые концентрации интерферирующих веществ, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5», приведены в таблице 5.

Таблица 5

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Зелбораф (показан при неоперабельной или метастатической меланоме, болезни Эрдгейма-Честера (БЭЧ) с BRAF V600 мутацией)	0,048 мг/мл
Тафинлар (применяется для лечения	0,01 мг/мл

На основании результатов исследования данные вещества не оказывают интерферирующего воздействия на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия клинического материала.

В дополнение к исследованию интерферирующих веществ было оценено влияние некротической ткани в образцах опухолей на способность набора реагентов «Тест-BRAF-ткань-5» выдавать достоверные результаты. Исследование влияния 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-5» и интерпретации результатов, полученные данные сравнивались с результатами направленного 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 до 8 °C и использоваться для анализа в течение 24 часов. Для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре минус 20 °C.

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

- минимальное содержание опухоли в образце для проведения теста - 20% по результатам морфологического исследования опухолевого материала врачом-гистологом.

- минимальное количество ДНК, которое необходимо для проведения анализа – 60 нг (30 нг ДНК на реакцию). Чистота анализируемой ДНК, выраженная в отношении оптической плотности (A260/280nm), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,6-1,8. Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять не менее 5 нг/мкл.

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 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 температуры.

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;

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

- 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 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 гибридационно-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 скапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 20 мкл.

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

Непосредственно перед проведением анализа необходимо приготовить реакционные смеси (мастермиксы) для анализируемой НК, 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 Taq-полимеразы. Обязательно использовать отдельный наконечник с розольным барьером для каждого компонента реакции каждой пробы.

Готовить мастермиксы необходимо согласно таблице 6. В таблице учтен запас реактивов (+1 объем каждого вида) для компенсации возможных потерь при раскапывании.

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

Таблица 6 - 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

1. Внести по 14 мкл каждого мастермикса в соответствующие пробирки согласно рекомендованному порядку расположения реакций (см. табл. 7).

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/заккрыть 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 7 - Рекомендуемый порядок расположения реакций

96-луночный планшет											
Тест	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
V600E/	ОКО	ПКО	О1	О2	О3	О4	О5	О6	О7	О8	О9

Ес													
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. 8, 9).

Таблица 8 - Программа амплификации для приборов производства «ДНК – Технология»

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 сек	50
3	64	15 сек	

Таблица 9 - Программа амплификации для других приборов

Стадия	Температура, °C	Время	Всего циклов
1	95	2 мин	1

2	95	5 сек	50
3	62	15 сек	

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

4. По окончании выполнения программы приступить анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР 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 «С_т» в соответствующей графе в таблице результатов.

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

Таблица 10 - Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Пробирки	Мутантная ДНК гена <i>BRAF</i>	Мутантная ДНК гена <i>BRAF</i> не	Сомнительный	Невалидный
----------	--------------------------------	-----------------------------------	--------------	------------

	обнаружена	обнаружена		
V600E/Ес, V600K	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 11 - Интерпретация результатов в контрольных образцах

Пробирки	Правильный результат	Невалидный результат
ПКО	Канал FAM и HEX : Ct ≤ 35	Отсутствие подъёма кривой амплификации по HEX и/или FAM
ОКО	Канал FAM и HEX : отсутствие подъёма кривой амплификации	Подъём кривой амплификации по каналу FAM и/или HEX (любой Ct)

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, при прохождении реакций V600E/Ес, V600K в пробирках с ПКО по каналам **FAM** и **HEX** не позднее 35 цикла и при отсутствии подъёма кривой амплификации в пробирках с ОКО по каналам **FAM** и **HEX**.

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-5» в упаковке предприятия-изготовителя должен храниться при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора.

После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение всего срока годности набора;
- ПЦР-смеси V600E/Ес, V600K следует хранить в защищенном 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-5» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор реагентов транспортировать при температуре от минус 20 до 8 °C в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при комнатной температуре (15–25 °C) 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, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

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

Срок годности. Срок годности набора «Тест-BRAF-ткань-5» 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора. 1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиНом 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого 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-5» 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.

15. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Тест-BRAF-ткань-5» требованиям технических условий при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

Организация-производитель:

Общество с Ограниченной Ответственностью «Л-сфера»
ООО «Л-сфера»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, помещение 39

Тел.: +7 (903)320-00-84

E-mail: info@l-sfera.com

Наименование, юридический, (фактический) адрес и контактные данные (телефон, факс, электронная почта) уполномоченного представителя производителя на территории Российской Федерации:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен» (ООО «ТестГен»),

432072 Россия

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

Наименование и контактные данные (телефон, факс, электронная почта) организации, принимающей, претензии (предложения) по медицинскому изделию для диагностики *in vitro* от потребителей на территории Российской Федерации:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен» (ООО «ТестГен»),

432072 Россия

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 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 15223-1-2020 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».

П р и м е ч а н и е – 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.

