



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А.Н. Тороповский
«08» апреля 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для определения статуса мутаций
гена *KRAS* методом мультиплексной ПЦР-РВ с
детекцией кривых плавления
в пробе геномной ДНК человека из образцов
фиксированной ткани
«Тест-*KRAS*-ткань-мульти»**

ТУ 21.20.23-035-97638376-2020

Версия 3 от 08.04.2022.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью
«08 (Восемь) 08») лист
Должность: ген. директор
Тороповский А.Н.



Содержание

Список сокращений	4
Введение.....	5
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода	8
3. Состав набора реагентов	11
4. Характеристики набора реагентов	15
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	20
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	21
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	23
8. Анализируемые образцы	24
9. Подготовка компонентов набора для исследования.....	28
11. Регистрация и интерпретация результатов.....	31
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов	36
13. Утилизация	38
14. Гарантийные обязательства, контакты	39
Приложение А	40

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КВМ	контроль взятия материала
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
КОС	контрольный образец специфичности

Введение

Колоректальный рак (рак толстой кишки) включает в себя различные по форме, локализации и гистологической структуре злокачественные эпителиальные опухоли ободочной и прямой кишки и является одной из самых частых злокачественных опухолей в мире.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти», является ген *KRAS*, исследуемый при обследовании пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» для качественного определения статуса мутаций 12 кодона (определяет G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), мутаций 13 кодона (определяет G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, но не различает их), мутаций 59 кодона (определяет A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), мутаций в 61 кодоне (определяет Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), мутаций в 117 кодоне (определяет K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их) и мутаций в 146 кодоне (определяет A146T, A146P, A146V, но не различает их) гена *KRAS* для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса.

Научная обоснованность

В соответствии с Клиническими рекомендациями: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020¹:

«Рекомендуется пациентам с метастатическим раком прямой кишки выполнять молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и определение микросателлитных повторов ДНК в биопсийном (операционном) материале методом ПЦР, если диагностированы отдаленные метастазы, что может повлиять на выбор таргетного агента в лечении метастатического процесса».

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности ДНК) в

¹ Клинические рекомендации: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020, Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г.).

отношении соматических мутаций гена *KRAS*, обнаруживаемых у больных с диагнозом «метастатический рак прямой кишки».

В состав семейства белков Ras входят H-Ras, K-Ras, N-Ras, R-Ras и другие гомологичные белки. Каскадная последовательность реакций сигнального пути Ras действует как включатель, определяющий регуляцию генной экспрессии, требующуюся для решения клетки делиться или дифференцироваться. Постоянная активация Ras ведет к злокачественному перерождению клеток. Характерный механизм перерождения - точечные активирующие мутации. Наиболее известными онкогенными мутациями являются мутации в генах *KRAS* и *NRAS* в 12, 13 кодонах (2 экзон), 59, 61 кодонах (3 экзон), 117, 146 кодонах (4 экзон). Мутации *KRAS*, *NRAS* приводят к постоянной активации белка и передаче митотического сигнала независимо от стимуляции и медикаментозного ингибирования *EGFR*, поэтому у больных с мутированными генами *KRAS*, *NRAS* терапия ингибиторами *EGFR* и тирозинкиназ неэффективна².

Мутации *KRAS* обнаружены у 30-40% больных метастатическим КРР (колоректальным раком)³.

В настоящее время для лечения метастатического КРР применяют таргетные препараты на основе моноклональных антител - ингибиторы *EGFR* цетуксимаб (cetuximab) и панитумумаб (panitumumab). Связывание антител с *EGFR* приводит к угнетению инвазии опухолевых клеток в нормальные ткани, препятствуя распространению опухоли в другие органы. У пациентов с диким типом гена *KRAS* анти-*EGFR* препараты достоверно увеличивают медиану выживаемости. Мутации гена *KRAS* определяют агрессивное поведение опухоли: КРР развивается в кратчайшие сроки, быстро метастазирует и плохо поддается химиотерапии. Поэтому было рекомендовано определять мутации в гене *KRAS* у

² Торопова Н.Е., Закамова Е.В., Тетерина Ю.Ю. Молекулярно-генетические исследования в практике онкологической клиники // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2015. - Т. 17, вып. 2 (3). - С. 690-696

³ Виноградов А.В. Детекция точечных мутаций генов *KRAS* и *NRAS* при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования // Вестник Башкирского университета. - 2014. - Т.19. - № 3. - С. 845-847.

всех больных метастатическим КРР для решения вопроса об анти-*EGFR* терапии.

Область применения набора реагентов - клиническая лабораторная диагностика, онкология.

Показания и противопоказания к применению

Набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» рекомендуется при обследовании пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» для качественного определения статуса мутаций 12 кодона (определяет G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), мутаций 13 кодона (определяет G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, но не различает их), мутаций 59 кодона (определяет A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), мутаций в 61 кодоне (определяет Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), мутаций в 117 кодоне (определяет K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их) и мутаций в 146 кодоне (определяет A146T, A146P, A146V, но не различает их) гена *KRAS* для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса.

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

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

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» предназначен для качественного определения статуса мутаций 12 кодона (определяет G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), мутаций 13 кодона (определяет G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, но не различает их), мутаций 59 кодона (определяет A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), мутаций в 61 кодоне (определяет Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), мутаций в 117 кодоне (определяет K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их) и мутаций в 146 кодоне (определяет A146T, A146P, A146V, но не различает их) гена *KRAS* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме

реального времени с детекцией кривых плавления в пробе геномной ДНК человека, выделенной из ткани, фиксированной в 10% растворе формалина и заключённой в парафиновый блок (FFPE-блок) при обследовании пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса. (Клинические рекомендации: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020, Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г).

Функциональное назначение. Полученные результаты могут использоваться при проведении обследования пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса.

Потенциальные потребители медицинского изделия

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

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с детекцией кривых плавления.

Тип анализируемого образца

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

Принцип определения

Качественное определение статуса мутаций 12 кодона (определяет G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), мутаций 13 кодона (определяет G13S, G13C, G13R, G13D, G13V,

G13A, но не различает их), мутаций 59 кодона (определяет A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), мутаций в 61 кодоне (определяет Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), мутаций в 117 кодоне (определяет K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их) и мутаций в 146 кодоне (определяет A146T, A146P, A146V, но не различает их) гена *KRAS* методом мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией кривых плавления в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной ткани, включает в себя три этапа:

1. Подготовку ПЦР;
2. ПЦР-амплификацию ДНК и гибридационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени с детекцией кривых плавления;
3. Интерпретацию результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, смесь dNTP, ионы магния и оптимизированный буфер.

В составе праймер-микса присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени. По окончании ПЦР проводится этап температурного плавления дуплексов, вследствие чего происходит изменение уровня флуоресценции, который фиксируется программным обеспечением прибора и представляется в виде графиков.

Набор содержит реагенты для качественного определения статуса мутаций 12 кодона (определяет G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), мутаций 13 кодона (определяет G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, но не различает их), мутаций 59 кодона (определяет A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), мутаций в 61 кодоне (определяет Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), мутаций в 117 кодоне (определяет K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их) и мутаций в 146 кодоне (определяет A146T, A146P, A146V, но не различает их) гена *KRAS*, а также ген *COMT*, используемый в качестве контроля взятия материала, далее KBM (табл. 1).

Таблица 1 – Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/Green	HEX/Yellow
12	Мутации G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A в 12 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	КВМ (ген <i>COMT</i> человека)
13	Мутации G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A в 13 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет, но не различает их)	КВМ (ген <i>COMT</i> человека)
59	Мутации A59T, A59E, A59G, A59S в 59 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	КВМ (ген <i>COMT</i> человека)
61	Мутации Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E в 61 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	КВМ (ген <i>COMT</i> человека)
117	Мутации K117E, K117R, K117Nc, K117Nt в 117 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	КВМ (ген <i>COMT</i> человека)
146	Мутации A146T, A146P, A146V в 146 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	КВМ (ген <i>COMT</i> человека)

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

Ограничения метода

Обнаружение мутаций зависит от целостности образца и количества амплифицируемой ДНК, присутствующей в образце. Чистота выделенной ДНК, выраженная в отношении оптических плотностей (A260/280nm), необходимая для проведения исследования, должна составлять не менее 1,4. Концентрация ДНК, достаточная для проведения исследования должна составлять 1-50 нг/мкл.

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

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

Набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» не может использоваться для диагностики какой-либо патологии. Набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» предназначен только для качественного определения статуса мутаций 12 кодона (определяет G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), мутаций 13 кодона (определяет G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, но не различает их), мутаций 59 кодона (определяет A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), мутаций в 61 кодоне (определяет Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), мутаций в 117 кодоне (определяет K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их) и мутаций в 146 кодоне (определяет A146T, A146P, A146V, но не различает их) гена *KRAS*.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

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

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Время проведения реакции мультиплексной ПЦР составляет 90 мин. (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» выпускается в 1 форме комплекта.

Количество анализируемых проб

Набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» рассчитан для проведения 28 определений каждого мультиплекса, что

соответствует определению 24 исследуемых образцов с отрицательным и положительным контролем в каждой постановке.

Состав набора

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

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 840 мкл
2	Праймер-микс 12	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 112 мкл
3	Праймер-микс 13	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 112 мкл
4	Праймер-микс 59	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 112 мкл
5	Праймер-микс 61	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 112 мкл
6	Праймер-микс 117	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 112 мкл
7	Праймер-микс 146	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 112 мкл
8	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 324 мкл
9	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 324 мкл

Примечание: Эксплуатационная документация (инструкция по применению и паспорт качества) не входит в состав изделия, но входят в комплект поставки изделия. Набор реагентов, для обеспечения соблюдения условий транспортирования, помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными холодоэлементами. Термоконтейнер вкладывается в коробку из картона, туда же помещается инструкция по применению и паспорт качества на каждую поставляемую партию изделия.

ПЦР-буфер готов к использованию и представляет собой буфер 2X Blitz mastermix, содержащий все основные компоненты, включая термостабильную ДНК-полимеразу, смесь дНТФ и оптимизированный буфер.

Праймер-микс 12 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *KRAS* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к гену *COMT*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 13 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *KRAS* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к гену *COMT*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 59 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям A59T, A59E, A59G, A59S (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *KRAS* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к гену *COMT*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 61 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые зонды к мутациям Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *KRAS* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к гену *COMT*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 117 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям K117E, K117R, K117Nc, K117Nt (обнаруживает мутации, но не

различает их) гена *KRAS* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к гену *COMT*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Праймер-микс 146 готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов - праймеры и флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды к мутациям A146T, A146P, A146V (обнаруживает мутации, но не различает их) гена *KRAS* (детекция осуществляется по каналу FAM/Green) и к гену *COMT*, используемому в качестве контроля взятия материала - KBM (детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow).

Прохождение реакции по HEX/Yellow (наличие пиков плавления) говорит о достаточном качестве забора материала, эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

При отсутствии реакции по каналу HEX/Yellow (отсутствие пиков плавления) и одновременном отсутствии реакции по каналам спецификации FAM/Green, результат следует считать невалидным, для данного исследуемого образца провести повторное исследование, начиная с выделения ДНК.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: участок гена *COMT* человека, специфичные фрагменты с мутациями гена *KRAS* человека в 12 кодоне (G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A), в 13 кодоне (G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A), в 59 кодоне (A59T, A59E, A59G, A59S), в 61 кодоне (Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61H, Q61N, Q61E), в 117 кодоне (K117E, K117R, K117N, K117T), в 146 кодоне (A146T, A146P, A146V), заключенные в плазмидный вектор pAl-TA с концентрацией 20 копий плазмидной ДНК в 1 мкл в ТЕ буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА). Содержит 12,5% мутантных и 87,5% нормальных копий ДНК.

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

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

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти».

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Пункт ТУ
1.1 Технические характеристики		
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 12	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 13	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 59	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 61	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 117	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
Праймер-микс 146	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	Раздел 7, пункт 7.6
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	Раздел 7, пункт 7.6
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-035-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-035-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-035-97638376-2020	Раздел 7, пункт 7.12
2. Функциональные характеристики		
Положительный результат с ПКО	Регистрация наличия пика плавления и определение температуры плавления в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green и HEX/Yellow.	Раздел 7, пункт 7.8.2
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow отсутствуют пики плавления и температуры плавления, либо $T_m \leq 40$.	Раздел 7, пункт 7.8.2
Прохождение реакции в пробирках с КОС	По каналу FAM/Green отсутствуют пики плавления и не определяется температура плавления, по каналу HEX/Yellow	Раздел 7, пункт 7.8.2

присутствует пик плавления и определяется температура плавления
--

Примечание: При проведении контрольной ПЦР в качестве КОС используют геномную ДНК Jurkat с концентрацией 1 000 коп/1 мкл;

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

Метрологическая прослеживаемость контрольного образца – ПКО

Метрологическая прослеживаемость контрольного образца – ПКО подтверждена спектрофотометрическим методом, путем проведения проверки концентрации плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК, составляющих нормальные варианты гена *KRAS* - участок гена *COMT* человека, и концентрации плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК, составляющих специфические фрагменты с мутациями гена *KRAS*: G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, A59T, A59E, A59G, A59S, Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, A146T, A146P, A146V.

Последующее проведение мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления подтвердило, что положительный контрольный образец (ПКО) обеспечивает стабильную работу Набора реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: участок гена *COMT* человека, специфичные фрагменты с мутациями гена *KRAS* человека в 12 кодоне (G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A), в 13 кодоне (G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A), в 59 кодоне (A59T, A59E, A59G, A59S), в 61 кодоне (Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E), в 117 кодоне (K117E, K117R, K117Nc, K117Nt), в 146 кодоне (A146T, A146P, A146V), заключённые в плазмидный вектор pAl-TA с концентрацией 20 копий плазмидной ДНК в 1 мкл в ТЕ буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА).

4.2 Характеристики аналитической эффективности

4.2.1 Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к мутациям гена *KRAS* человека в 12 кодоне (обнаруживает мутации G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), в 13 кодоне (обнаруживает мутации G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, но не различает их), в 59 кодоне (обнаруживает мутации A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), в 61 кодоне (обнаруживает мутации Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), в 117 кодоне (обнаруживает мутации K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их), в 146 кодоне (обнаруживает мутации A146T, A146P, A146V, но не различает их) и к гену *COMT* человека.

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

4.2.2 Аналитическая чувствительность

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

4.2.3 Прецизионность в условиях повторяемости

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

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

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

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

4.2.4 Прецизионность в условиях воспроизводимости

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

Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 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 заявленных аллелей в образце в генах *KRAS*, которое способно выявить изделие – 5 %.

4.2.7 При исследовании ДНК штаммов:

– из коллекции «ГКПМ-ОБОЛЕНСК»: *Escherichia coli* M-17(номер штамма B-2929), *Shigella sonnei* «S-форма» (номер штамма B-4385), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 79 (номер штамма B-4376), *Shigella flexneri* 1a 8516 (номер штамма B-4388), *Candida albicans* NCTC 885-653 (номер штамма B-7940),

– из коллекции Национального биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРИЦ ВКПМ)»: *Enterococcus faecium* (*Streptococcus faecium*) (номер штамма B-4954), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (номер штамма B-8837), *Salmonella typhimurium* TA102 (номер штамма B-5393).

в концентрации от 10^6 до 10^7 клеток на мл неспецифических реакций выявлено не было. Вышеперечисленные микроорганизмы не оказывают влияние на способность набора реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» различать мутантные и нормальные варианты гена *KRAS*.

4.2.8. Проведено тестирование изделия на гомологичных белках *KRAS*. Набор реагентов ткани «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» не дает перекрестный реакций с гомологичными генами *KRAS* – *NRAS*, *HRAS*.

4.2.9 Влияние интерферирующих веществ

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

3.3 Характеристики клинической эффективности

Таблица 4 – Характеристики клинической эффективности

Исследуемый код	Мутация	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
12	G12S	10	176	100% (95% ДИ:96,52%-100%)	100% (95% ДИ:99,64%-100%)
	G12C	8	178		
	G12R	2	184		
	G12D	44	142		
	G12V	34	152		
	G12A	6	180		
13	G13S	4	182	100% (95% ДИ:89,11%-100%)	100% (95% ДИ:99,66%-100%)
	G13C	6	180		
	G13R	4	182		
	G13D	10	176		
	G13V	6	180		
	G13A	2	184		
59	A59T	2	184	100% (95% ДИ:69,15%-100%)	100% (95% ДИ:99,5%-100%)
	A59E	2	184		
	A59G	4	182		
	A59S	2	184		
61	Q61K	2	184	100% (95% ДИ:83,16%-100%)	100% (95% ДИ:99,71%-100%)
	Q61L	4	182		
	Q61P	4	182		
	Q61R	2	184		
	Q61Ht	2	184		
	Q61He	2	184		
117	Q61E	4	182	100% (95% ДИ:69,15%-100%)	100% (95% ДИ:99,5%-100%)
	K117E	2	184		
	K117R	4	182		
	K117Nc	2	184		
146	K117Nt	2	184	100% (95% ДИ:69,15%-100%)	100% (95% ДИ:99,33%-100%)
	A146T	4	182		
	A146P	2	184		
	A146V	4	182		

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

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

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набора реагентов для качественного определения статуса мутаций 12 кодона (определяет G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, но не различает их), мутаций 13 кодона (определяет G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, но не различает их), мутаций 59 кодона (определяет A59T, A59E, A59G, A59S, но не различает их), мутаций в 61 кодоне (определяет Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, но не различает их), мутаций в 117 кодоне (определяет K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, но не различает их) и мутаций в 146 кодоне (определяет A146T, A146P, A146V, но не различает их) гена *KRAS* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

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

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

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

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

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

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

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

- применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- набор реагентов по истечении срока годности или при нарушении упаковки применению не подлежит;

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

не использовать набор по истечении срока годности;

- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

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

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

Работа с набором реагентов для мультиплексной ПЦР «Тест-KRAS-ткань-мульти» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. ПЦР-бокс биологической безопасности II и III класса защиты
2. Вортекс;
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объёма;
4. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.
5. Амплификатор⁴ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green и HEX/Yellow: CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

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

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл.
2. Одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой для ПЦР: пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл⁵, или пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл в стрипах, или планшеты для ПЦР с оптически прозрачной плёнкой, совместимые с используемым амплификатором.
4. Халат и одноразовые перчатки без талька.

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

⁵ Убедитесь в совместимости пробирок для ПЦР с используемым амплификатором.

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.
6. Штативы «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл.
7. Набор для выделения ДНК из плазмы крови (см. п. 8.2 Инструкции).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

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

8.1 Процедура получения биологического материала

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

Забор материала на исследование

Биопсийный и (или) операционный материал.

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

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

1. по результатам морфологического исследования опухолевые зоны должны занимать не менее 60% площади ткани в срезе с FFPE-блока;
2. по результатам морфологического исследования зоны некроза и кровоизлияния в совокупности должны занимать не более 15% площади ткани в срезе с FFPE-блока.

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

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

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

Условия транспортирования, хранения исходного клинического материала:

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

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Условия транспортирования, хранения FFPE-блоков:

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

8.2 Процедура получения пробы ДНК человека, выделенной из биологического материала

Для выделения пробы геномной ДНК человека из биологического материала рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-Ф) по ТУ 21.20.23-009-97638376-2016, производства ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7772 от 30.10.2018 г);
- Набор реагентов для выделения геномной ДНК человека из фиксированных в формалине и заключённых в парафин тканей (ДНК-Ткань-М) по ТУ 21.20.23-012-97638376-2019, производства

ООО «ТестГен», Россия (регистрационное удостоверение № РЗН 2021/14273 от 06.05.2021 г),

или других аналогичных наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала.

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

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

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

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК:

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

8.3 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

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

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

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

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

Таблица 5 - Исследованные концентрации интерферирующих веществ:

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
Вещества, добавляемые во время подготовки образца	
Парафин	1*10 ⁻⁴ мкл/мкл
Препараты, назначаемые для лечения онкологических заболеваний	
Ропивакаин (обезболивающее средство)	0,004 мг/мл
Бевацизумаб (применяется для терапии колоректального рака)	0,02 мг/мл
Капецитабин (препарат для лечения колоректального рака)	0,1 мг/мл
Цисплатин (противоопухолевое средство)	0,002 мг/мл

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

Ограничения по использованию анализируемого материала:

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

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом;

- для анализа необходимо использовать пробы геномной ДНК, выделенные из ткани опухоли, подтверждённой гистологически;

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

9. Подготовка компонентов набора для исследования

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

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

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать согласно таблице 6 непосредственно перед проведением анализа.

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

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

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,2 мл для ПЦР из расчёта для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов⁶ + 1 ПКО + 1 ОКО.

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

В таблице 6 приведена схема расположения ПЦР-пробирок при использовании шести мультиплексов.

Таблица 6 – Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	Образец 1	Образец n	ПКО	ОКО
12	○	○	○	○

⁶ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторях.

(статус мутаций G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A)				
13 (статус мутаций G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A)	○	○	○	○
59 (статус мутаций A59T, A59E, A59G, A59S)	○	○	○	○
61 (статус мутаций Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E)	○	○	○	○
117 (статус мутаций K117E, K117R, K117Nc, K117Nt)	○	○	○	○
146 (статус мутаций A146T, A146P, A146V)	○	○	○	○

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

А) Подготовка ПЦР

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

Общий объём реакции – 20 мкл.

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

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 10 мкл,
 2. Соответствующий праймер-микс (12, 13, 59, 61, 117, 146) – 4 мкл,
 3. Образец (исследуемый образец ДНК, ПКО, ОКО) – 6 мкл.
- Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 6 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,2 мл для ПЦР. Для каждого мультиплекса берётся необходимое количество пробирок для исследуемых образцов + 1 ПКО + 1 ОКО (таблица 6).

2. Внести в каждую пробирку по 10 мкл ПЦР-буфера⁷.

3. Внести по 4 мкл Праймер-миксов (12, 13, 59, 61, 117, 146) в пробирки для соответствующих мультиплексов (таблица 6).

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК⁸. В пробирки для ПКО и ОКО ДНК не вносится.

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

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

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

Б) ПЦР-амплификация ДНК и гибридизационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени с детекцией кривых плавления

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

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

⁷ Рекомендуется сначала приготовить смесь праймер-микса и ПЦР-буфера для каждого мультиплекса в отдельной пробирке на 1,5-2,0 мл из расчёта: $(n+3) \times 10$ мкл ПЦР-буфера + $(n+3) \times 4$ мкл соответствующего праймер-микса, где n – количество образцов. Перемешать на вортексе, осадить капли коротким центрифугированием и внести по 14 мкл в ПЦР-пробирки для соответствующего мультиплекса согласно таблице 6.

⁸ Для предотвращения ингибирования ПЦР объём образца может быть снижен до 1-5 мкл, при этом объём реакции доводится до 20 мкл деионизованной водой из ОКО.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 7.

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

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

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

Таблица 7 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	94	00:15		5
	67	00:30		
3	94	00:05	-	45
	67	00:30		
4	95	00:10	-	1
5	25	00:30	-	1
6	25	00:15	FAM/Green, HEX/Yellow, Δt	50 (1,0)

11. Регистрация и интерпретация результатов

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

Интерпретация результатов выполняется по значениям температуры плавления по каналам FAM/Green, HEX/Yellow (табл. 8)

Таблица 8 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green и HEX/Yellow

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/Green	HEX/Yellow

12	Мутации G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A в 12 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
13	Мутации G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A в 13 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет, но не различает их)	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
59	Мутации A59T, A59E, A59G, A59S в 59 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
61	Мутации Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E в 61 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
117	Мутации K117E, K117R, K117Nc, K117Nt в 117 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
146	Мутации A146T, A146P, A146V в 146 кодоне гена <i>KRAS</i> (определяет мутации, но не различает их)	KBM (ген <i>COMT</i> человека)

Интерпретация результатов в контрольных образцах

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

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 9).

Таблица 9 – Результаты исследования для ОКО и ПКО

Внесенный материал	Выбранный флуорофор	
	FAM/Green (мутации G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A, G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, A59T, A59E, A59G, A59S, Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E, K117E, K117R, K117Nc, K117Nt, A146T, A146P, A146V)	HEX/Yellow (KBM, ген <i>COMT</i> человека)
ОКО	Отсутствует, либо $T_{\text{плав}} \leq 40$	Отсутствует, либо $T_{\text{плав}} \leq 40$
ПКО	Должно фиксироваться наличие пика плавления и определяться температура плавления	

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, результаты всей

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

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 9, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 10-15.

Таблица 10 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 12 (определяет мутации G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A в 12 кодоне гена *KRAS*, но не различает их)

Значения $T_{\text{плав}}$		Результат
Каналы спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Наличие пика плавления	Не учитывается	Обнаружена одна из мутаций G12X (G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A) в 12 кодоне гена <i>KRAS</i>
Отсутствие пика плавления	Наличие пика плавления	Мутации G12X (G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A) в 12 кодоне гена <i>KRAS</i> не обнаружены
Отсутствие пиков плавления по обоим каналам		Результат на наличие мутаций невалидный
Наличие пиков плавления с $T_{\text{плав}} \leq 40$ или $T_{\text{плав}} \geq 65$		Результат на наличие мутации сомнительный

Таблица 11 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 13 (определяет мутации G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A в 13 кодоне гена *KRAS*, но не различает их)

Значения $T_{\text{плав}}$		Результат
Каналы спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	

Наличие пика плавления	Не учитывается	Обнаружена одна из мутаций G13X (G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A) в 13 кодоне гена <i>KRAS</i> .
Отсутствие пика плавления	Наличие пика плавления	Мутации G13X (G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A) в 13 кодоне гена <i>KRAS</i> не обнаружены
Отсутствие пиков плавления по обоим каналам		Результат на наличие мутаций невалидный
Наличие пиков плавления с $T_{\text{плав}} \leq 40$ или $T_{\text{плав}} \geq 65$		Результат на наличие мутации сомнительный

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 59 (определяет мутации A59T, A59E, A59G, A59S в 59 кодоне гена *KRAS*, но не различает их)

Значения $T_{\text{плав}}$		Результат
Канал спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Наличие пика плавления	Не учитывается	Обнаружена одна из мутаций A59X (A59T, A59E, A59G, A59S) в 59 кодоне гена <i>KRAS</i>
Отсутствие пика плавления	Наличие пика плавления	Мутации A59X (A59T, A59E, A59G, A59S) в 59 кодоне гена <i>KRAS</i> не обнаружены
Отсутствие пиков плавления по обоим каналам		Результат на наличие мутаций невалидный
Наличие пиков плавления с $T_{\text{плав}} \leq 40$ или $T_{\text{плав}} \geq 65$		Результат на наличие мутации сомнительный

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 61 (определяет мутации Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E в 61 кодоне гена *KRAS*, но не различает их)

Значения $T_{\text{плав}}$		Результат
Канал спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Наличие пика плавления	Не учитывается	Обнаружена одна из мутаций Q61X (Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E) в 61 кодоне гена <i>KRAS</i>
Отсутствие пика плавления	Наличие пика плавления	Мутации Q61X (Q61K, Q61L, Q61P, Q61R, Q61Ht, Q61Hc, Q61E) в 61 кодоне гена <i>KRAS</i> не обнаружены

Отсутствие пиков плавления по обоим каналам	Результат на наличие мутаций невалидный
Наличие пиков плавления с $T_{\text{плав}} \leq 40$ или $T_{\text{плав}} \geq 65$	Результат на наличие мутации сомнительный

Таблица 14 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 117 (определяет мутации K117E, K117R, K117Nc, K117Nt в 117 кодоне гена *KRAS*, но не различает их)

Значения $T_{\text{плав}}$		Результат
Канал спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Наличие пика плавления	Не учитывается	Обнаружена одна из мутаций K117X (K117E, K117R, K117Nc, K117Nt) в 117 кодоне гена <i>KRAS</i>
Отсутствие пика плавления	Наличие пика плавления	Мутации K117X (K117E, K117R, K117Nc, K117Nt) в 117 кодоне гена <i>KRAS</i> не обнаружены
Отсутствие пиков плавления по обоим каналам		Результат на наличие мутации невалидный
Наличие пиков плавления с $T_{\text{плав}} \leq 40$ или $T_{\text{плав}} \geq 65$		Результат на наличие мутации сомнительный

Таблица 15 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса 146 (определяет A146T, A146P, A146V в 146 кодоне гена *KRAS*, но не различает их)

Значения $T_{\text{плав}}$		Результат
Канал спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Наличие пика плавления	Не учитывается	Обнаружена одна из мутаций A146X (A146T, A146P, A146V) в 146 кодоне гена <i>KRAS</i>
Отсутствие пика плавления	Наличие пика плавления	Мутации A146X (A146T, A146P, A146V) в 146 кодоне гена <i>KRAS</i> не обнаружены
Отсутствие пиков плавления по обоим каналам		Результат на наличие мутации невалидный
Наличие пиков плавления с $T_{\text{плав}} \leq 40$ или $T_{\text{плав}} \geq 65$		Результат на наличие мутации сомнительный

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате

ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

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

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный положительный или отрицательный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом-онкологом), с учётом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, для выбора таргетного агента в лечении метастатического процесса при обследовании пациентов с диагнозом «метастатический рак прямой кишки» (Клинические рекомендации: «Рак прямой кишки» С 20. Взрослые. 2020. Разработчики: Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по колоректальному раку», Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» (Одобрено на заседании научного совета Министерства здравоохранения Российской Федерации 22.11.2019 г).

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

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

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

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

Транспортирование

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

Набор «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» транспортировать при температуре от минус 16 до минус 24 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 30 суток, или при температуре от 15 до 25 °С не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

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

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

Срок годности

Срок годности набора реагентов «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 16 до минус 24 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

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

13. Утилизация

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

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 4 п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме жёлтого и красного).

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

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

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

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

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «Тест-KRAS-ткань-мульти» требованиям ТУ при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

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

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

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

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Набор реагентов для определения статуса мутаций гена *KRAS* методом мультиплексной ПЦР-РВ с детекцией кривых плавления в пробе геномной ДНК человека из образцов фиксированной ткани «Тест-*KRAS*-ткань-мульти» соответствует следующим межгосударственным стандартам на продукцию

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
ГОСТ Р EN 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р 56894-2016	Сводный комплект технической документации для демонстрации соответствия общим принципам обеспечения безопасности и основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем(маркировка). Часть 2.

	Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ Р 1.3-2018	Стандартизация в Российской Федерации. Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению

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.