УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

_____ Корниенко А.А.

«05» ноября 2024 г.

Набор реагентов для выявления мутаций гена *KRAS* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени **"Real-time-PCR-KRAS-4R"** по ТУ 20.59.52-014-57201404-2023

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Содержание

Содержание 1
Введение 3
1 Назначение набора 3
2 Характеристика набора 4
2.1 Варианты исполнения 4
2.2 Комплектность 4
2.3 Состав набора реагентов 4
2.4 Число анализируемых проб 5
2.5 Принцип действия набора реагентов 6
3 Аналитические и диагностические характеристики набора 8
3.1 Предел обнаружения 8
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ 8
3.3 Характеристики аналитической эффективности 9
3.4 Диагностическая специфичность 9
3.5 Диагностическая чувствительность 9
3.6 Ограничения при применении 9
3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа 10
4 Риски, связанные с применением набора реагентов 10
5 Меры предосторожности 11
6 Оборудование и материалы 12
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов 12
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов 13
7 Анализируемые пробы 13
8 Подготовка компонентов для анализа 14
8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой 14
8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений 15
9 Проведение анализа 15
9.1 Постановка контрольной ПЦР 15
9.2 Программирование и запуск амплификатора 17
9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР 17
9.4 Постановка мультиплексных ПЦР на мутации гена *KRAS* 19
9.5 Программирование и запуск амплификатора 20

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10 Анализ результатов 21
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР 21
10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *KRAS* 23
11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации 23
11.1 Условия хранения 23
11.2 Условия транспортирования 24
11.3 Условия эксплуатации 24
11.4 Условия утилизации 24
12 Гарантийные обязательства 25
12.1 Гарантии производителя 25
12.2 Рекламации 25
13 Маркировка 26
Библиография 27
Приложение А (справочное) Список определяемых мутаций гена *KRAS* 28
Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков 29
Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel» 30

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Введение

Ген *KRAS* кодирует одноимённый белок, представитель семейства RAS, который является компонентом сигнальных каскадов RAS-MAPK и RAS-MEK-ERK, контролирующих пролиферацию и дифференциацию клеток в ответ на внешние митогенные стимулы. Активирующие соматические мутации гена *KRAS* приводят к постоянной гиперактивации внутриклеточных сигнальных путей [1]. Мутации в гене *KRAS* наиболее распространены при аденокарциноме лёгких, раке поджелудочной железы, раке толстой и прямой кишки. Наиболее часто встречаются мутации в 12-м кодоне гена *KRAS*, реже – мутации в 13, 61 и 146-м кодонах [2].

Препараты цетуксимаб и панитумумаб на основе моноклональных антител к рецептору эпидермального фактора роста EGFR применяются для таргетной терапии метастазирующего колоректального рака и рака прямой кишки. Наличие мутаций в гене *KRAS* ассоциировано с резистентностью к терапии анти-EGFR антителами [3,4].

В соответствии с клиническими рекомендациями «Злокачественное новообразование ободочной кишки» и «Рак прямой кишки» рекомендуется выполнять молекулярно-генетическое исследование для выявления мутаций в гене *KRAS* в биопсийном (операционном) материале методом ПЦР, если обнаружены отдаленные метастазы, что может повлиять на выбор таргетного препарата для лечения метастатического процесса [5,6].

Показания и противопоказания к применению

Показания: набор реагентов рекомендуется к применению у пациентов с метастатическим раком ободочной и прямой кишки для сопутствующей диагностики: определения показаний к таргетной терапии анти-EGFR антителами. Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций в 12-м, 13-м, 61-м и 146-м кодонах (G12X, G13X, Q61X и A146X) гена *KRAS* методом ПЦР в режиме реального времени с подавлением амплификации ДНК дикого типа. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика, определение показаний к таргетной терапии анти-EGFR антителами (цетуксимабом или панитумумабом) у пациентов с метастатическим раком ободочной и прямой кишки.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Материалом для проведения ПЦР является ДНК, выделенная из фиксированной формалином и заключенной в парафин (FFPE) опухолевой ткани. Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*.

Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

Требования к квалификации пользователей: только квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики (врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник).

2 Характеристика набора

2.1 Варианты исполнения

«Набор реагентов для выявления мутаций гена *KRAS* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-KRAS-4R" по ТУ 20.59.52-014-57201404-2023» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-KRAS-4R (12)";
2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-KRAS-4R (36)".

2.2 Комплектность

В комплект поставки входят: набор реагентов (таблица 1), инструкция по применению, паспорт качества.

2.3 Состав набора реагентов

Таблица 1. Состав набора реагентов

№	Цвет крышки	Наименование реагента	Объём реагента	
			на 12 реакций	на 36 реакций
1	Зеленый	Контрольная ПЦР-смесь	470 мкл	1.4 мл
2	Жёлтый	ПЦР-смесь KRAS G12/13 Mut	280 мкл	840 мкл
3	Жёлтый	ПЦР-смесь KRAS Q61 Mut	280 мкл	840 мкл
4	Жёлтый	ПЦР-смесь KRAS A146 Mut	280 мкл	840 мкл
5	Синий	Taq ДНК-полимераза	25 мкл	65 мкл
6	Красный	ПКО[2]	110 мкл	330 мкл
7	Белый	ОКО[3]	1.4 мл	4 мл
8	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
9	Бесцветный	UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	9 мкл	27 мкл

Вариант 1: REF 21503, Вариант 2: REF 21504

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Контрольная ПЦР-смесь – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации константного фрагмента гена *KRAS*.

ПЦР-смесь KRAS G12/13 Mut – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента второго экзона гена *KRAS* в присутствии олигонуклеотидов-блокеров, подавляющих амплификацию ДНК с кодонами дикого типа в положениях 12, 13 относительно белка KRAS.

ПЦР-смесь KRAS Q61 Mut – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента третьего экзона гена *KRAS* в присутствии олигонуклеотидов-блокеров, подавляющих амплификацию ДНК с кодонами дикого типа в положении 61 относительно белка KRAS.

ПЦР-смесь KRAS A146 Mut – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента четвёртого экзона гена *KRAS* в присутствии олигонуклеотидов-блокеров, подавляющих амплификацию ДНК с кодонами дикого типа в положении 146 относительно белка KRAS.

Taq ДНК-полимераза – высокоочищенный рекомбинантный фермент Taq ДНК-полимераза.

ПКО – положительный контрольный образец, содержащий смесь ДНК с фрагментами гена *KRAS* с мутациями G13D, Q61R, A146T и ДНК человека без мутаций гена *KRAS*;

ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

10x UDG буфер – десятикратный буфер для UDG.

UDG – фермент урацил-ДНК-гликозилаза.

Набор реагентов не содержит опасных химических веществ, не содержит биологических материалов человеческого и животного происхождения.

Компоненты набора в рабочих концентрациях не токсичны, не обладают канцерогенным и мутагенным действием.

2.4 Число анализируемых проб

Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-KRAS-4R (12)" содержит реактивы для проведения 12 реакций, что позволяет проанализировать в одной постановке четыре клинических образца, положительный и отрицательный контроль (все образцы в дублях) или десять клинических образцов, положительный и отрицательный контроль (все образцы без дублей).

Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-KRAS-4R (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 14 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы в дублях) или 32 клинических образца с положительным и отрицательным контролем в двух постановках (все образцы без дублей).

2.5 Принцип действия набора реагентов

Принцип действия набора реагентов основан на методе ПЦР в режиме реального времени с подавлением амплификации ДНК дикого типа.

Набор содержит четыре смеси для ПЦР (таблица 1): контрольную ПЦР-смесь и три мультиплексные ПЦР-смеси для амплификации фрагментов гена *KRAS* с мутациями в 12, 13, 61 и 146-м кодонах. ПЦР-смеси содержат все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке. Список определяемых мутаций гена *KRAS* согласно номенклатуре HGVS (Human genome variation society) приведён в приложении А.

Для контроля в состав набора входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит смесь ДНК ампликонов с фрагментами гена *KRAS* с мутациями G13D, Q61R, A146T и ДНК человека без мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS*. ОКО содержит воду без нуклеаз. В каждом эксперименте используют ПКО и ОКО. Для контроля качества работы оператора все исследуемые и контрольные образцы рекомендуется тестировать в дублях.

Анализ на наличие мутации в гене *KRAS* состоит из двух этапов:

1) проверка образцов ДНК в контрольной ПЦР;
2) ПЦР на наличие мутаций в гене *KRAS*.

На первом этапе проводят ПЦР с контрольной смесью для оценки пригодности и выбора подходящего разведения образцов ДНК. Мишенью для контрольной ПЦР является константный участок ДНК гена *KRAS*. Продукты этой реакции детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM. Контрольная ПЦР-смесь также содержит реагенты для ПЦР внутреннего контроля (ВК). Мишенью ПЦР ВК является синтетическая последовательность, не имеющая гомологии с геномом человека. Продукты ПЦР ВК детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Амплификация ВК служит контролем правильности постановки и отсутствия ингибиторов ПЦР, которые могут приводить к ложноотрицательным результатам.

Пригодность образца ДНК оценивают по величине Cq по каналу FAM (Cq_{FAM}), соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором уровень флуоресценции

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

превышает фоновый. Значения Cq_{FAM} разведений клинических образцов ДНК сравнивают с Cq_{FAM} ПКО. Для последующих ПЦР на мутации гена *KRAS* выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину Cq_{FAM} относительно Cq_{FAM} ПКО.

На втором этапе выбранные разведения образцов ДНК анализируют одновременно в трёх мультиплексных ПЦР с подавлением амплификации гена *KRAS* дикого типа. ПЦР-смеси KRAS G12/13 Mut, KRAS Q61 Mut и KRAS A146 Mut содержат олигонуклеотиды-блокеры, которые имеют последовательность ДНК дикого типа для 12/13, 61 и 146-го кодонов гена *KRAS*, соответственно, и модифицированные нуклеотиды, повышающие температуру плавления. Олигонуклеотиды-блокеры прочно связываются с ДНК гена *KRAS* дикого типа и подавляют её амплификацию. Если в любом из этих участков есть мутация, то блокеры связываются непрочно, в результате амплификация подавляется незначительно или совсем не подавляется. Продукты ПЦР гена *KRAS* с мутациями детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM.

В мультиплексных ПЦР также происходит амплификация константного участка гена *KRAS*, данная реакция используется в качестве контроля. Продукты ПЦР константного участка гена *KRAS* детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX. Список ПЦР-смесей с указанием каналов регистрации флуоресценции и определяемых мутаций в кодонах гена *KRAS* приведён в таблице 2.

Таблица 2. Список ПЦР-смесей с указанием каналов регистрации флуоресценции и определяемых мутаций в кодонах гена *KRAS*

Название ПЦР-смеси	Мишень	Канал
KRAS G12/13 Mut	Мутации 12-го, 13-го кодонов	FAM
	Контроль	ROX
KRAS Q61 Mut	Мутации 61-го кодона	FAM
	Контроль	ROX
KRAS A146 Mut	Мутации 146-го кодона	FAM
	Контроль	ROX

В мультиплексной ПЦР величина Cq_{FAM} для образцов ДНК, содержащих ген *KRAS* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина Cq_{FAM} для образцов ДНК, содержащих ген *KRAS* с мутациями. Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значением Cq_{FAM} и значением Cq по каналу ROX (Cq_{ROX}) для соответствующей ПЦР-смеси (ΔCq). Значения ΔCq рассчитывают для

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

каждой ПЦР-смеси для каждой лунки с образцом ДНК следующим образом: $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$. Графическое пояснение расчёта ΔCq приведено на рисунке 1.

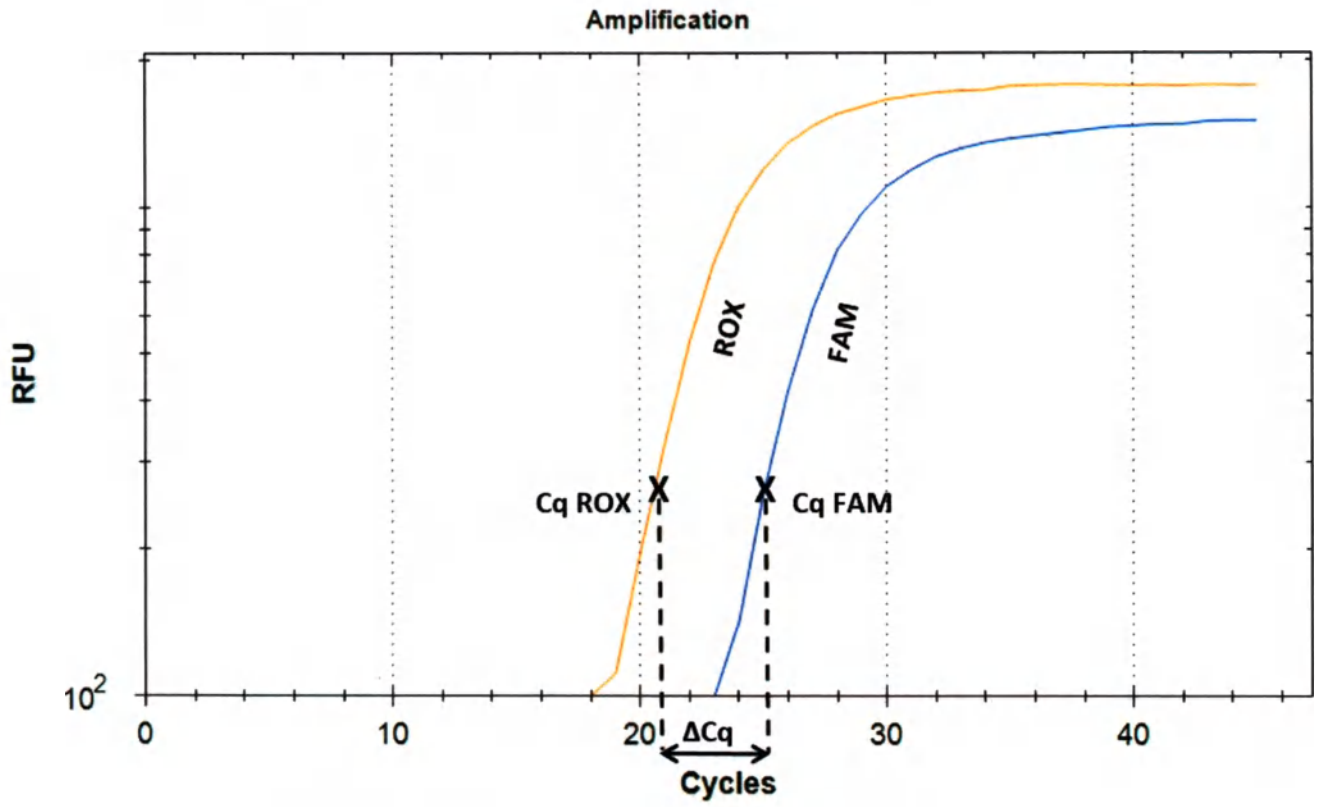

Рисунок 1. Графическое пояснение расчёта ΔCq

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией 12-го и 13-го кодона гена *KRAS* на фоне ДНК гена *KRAS* без мутаций, 5% ДНК с мутацией 61-го кодона гена *KRAS* на фоне ДНК гена *KRAS* без мутаций, 5% ДНК с мутацией 146-го кодона гена *KRAS* на фоне ДНК гена *KRAS* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 40 мкл с концентрацией 0,4 нг/мкл (120 копий гена *KRAS* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS* на фоне ДНК гена *KRAS* без мутаций. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *KRAS* без мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

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

Различное содержание парафина на срезе (от 48% до 82%) не влияет на результаты определения мутаций гена *KRAS*. Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций гена *KRAS*.

3.3 Характеристики аналитической эффективности

Повторяемость оценивали в условиях, при которых независимые результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, одним оператором, в пределах короткого промежутка времени. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS*. Значение повторяемости результатов при определении мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS* составило 100% (108/108, интервал 96,64-100% с доверительной вероятностью 95%).

Воспроизводимость оценивали в условиях, при которых результаты испытаний получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, двумя операторами, с использованием различного оборудования, в разные дни. По результатам испытаний не выявлено расхождений в определении мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS*. Значение воспроизводимости результатов при определении мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS* составило 100% (108/108, интервал 96,64-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS* в клинических испытаниях на выборке из 54 образцов, из них 27 отрицательных образцов, составила 100% (интервал 87,23-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS* в клинических испытаниях на выборке из 54 образцов, из них 27 положительных образцов, составила 100% (интервал 87,23-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 50% опухолевых клеток.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций гена *KRAS* оценивается по значению Cq_{FAM} в контрольной ПЦР. Если в этой реакции величина Cq_{FAM} образца превышает допустимые значения, то концентрация ДНК не достаточна, и результаты анализа не валидны. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

3.7 Доступные референтные материалы и методы анализа

Референтный метод анализа на наличие мутаций гена *KRAS* – секвенирование по Сэнгеру. Референтные материалы отсутствуют.

4 Риски, связанные с применением набора реагентов

Перечень опасных ситуаций, которые относятся к категории R2 «допустимый риск», зависят от человеческого фактора и не могут быть уменьшены производителем другим способом, кроме как добавлением соответствующей информации в инструкцию по применению.

1. Деградация компонентов ПЦР-смеси или ПКО, инактивация фермента Taq ДНК-полимеразы из-за нарушения условий хранения и транспортировки или при использовании набора реагентов после истечения срока годности (возможный вред: отсутствие результата).
2. Недостаточное количество клеток опухолевой ткани на срезе из-за несоблюдения рекомендаций по выделению ДНК из парафиновых блоков (возможный вред: ложноотрицательный результат).
3. Появление неспецифических продуктов амплификации из-за пропуска этапа обработки образцов ДНК урацил-ДНК-гликозилазой, снижение специфичности анализа (возможный вред: ложноположительный результат).
4. Некорректная интерпретация результатов ПЦР в случае, когда персонал не использует контрольные образцы при постановке ПЦР или не учитывает критерии достоверности (возможный вред: ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).
5. Некорректная интерпретация результатов ПЦР в случае, когда персонал для определения величин Cq использует значение порогового уровня вместо режима регрессии для термоциклера с модулем CFX96 или геометрического метода для амплификатора ДТпрайм (возможный вред: ложноотрицательный результат или ложноположительный результат).

Совокупный остаточный риск является допустимым.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5 Меры предосторожности

1. Класс потенциального риска применения набора реагентов – 2б согласно Приказу МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н.
2. Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
3. Применять набор реагентов строго по назначению, согласно настоящей инструкции.
4. Работу следует проводить в ПЦР-боксе биобезопасности II класса защиты.
5. Во избежание риска контаминации проводить выделение образцов ДНК и постановку ПЦР в отдельных помещениях (зонах). Не возвращать образцы, реагенты и оборудование в зону, в которой была проведена предыдущая стадия.
6. При работе с набором реагентов использовать лабораторную одежду и одноразовые медицинские перчатки. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
7. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.
8. При постановке ПЦР использовать и менять после каждой операции одноразовые наконечники с фильтром для автоматических дозаторов. Использованные наконечники и пробирки сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство для обеззараживания медицинских отходов.
9. Использовать только ПЦР-смесь с Taq ДНК-полимеразой, входящую в состав набора реагентов.
10. Не использовать компоненты наборов реагентов из разных серий.
11. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности, при нарушении условий транспортировки или хранения.
12. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
13. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно следует подвергать влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.
14. Все рабочие зоны следует подвергать ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением в соответствии с Р 3.5.1904-04 «Использование

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях».

15. Паспорта безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

6 Оборудование и материалы

6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов

Амплификатор планшетного типа с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени:

Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4М1, 4М3, 4М6, 5М1, 5М3, 5М6, 6М1, 6М3, 6М6, 4Х1, 5Х1, 6Х1 (РУ № ФСР 2011/10229, ООО «НПО ДНК-Технология») или термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнения: «С1000 Touch» с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96) (РУ №ФСЗ 2008/01792, «Био-Рад Лабораториез, Инк.», США).

Бокс для ПЦР, например, бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» по ТУ 9443-004-51495026-2004 (РУ № ФСР 2010/07114, ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

Вортекс, например, вортекс персональный V-1 plus (РУ № ФСЗ 2011/09797, ООО «Биосан», Латвия).

Дозаторы переменного объема, например, дозаторы пипеточные, одно- и многоканальные, «Блэк» по ТУ 9443-008-33189998-2009 (РУ № ФСР 2009/05681, АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия).

Компьютер с операционной системой Windows XP Professional SP3 или Windows 7 и выше, жёстким диском не менее 10 ГБ, тактовой частотой процессора не менее 2.0 ГГц, оперативной памятью не менее 1 ГБ, разрешением экрана не менее 1024*768, программным обеспечением Microsoft Office Excel версии 2003 или выше.

Термостат твердотельный, например, термостат типа «Драй-блок» TDB-120, вариант исполнения: I. Термостат TDB-120 с крышкой и термоблоком А-53 (РУ № РЗН 2018/7729, ООО «Биосан», Латвия).

Холодильник бытовой с холодильной (от 2°С до 8°С) и морозильной камерами (от минус 18°С до минус 25°С) (например, ATLANT ХМ-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Центрифуга, например, центрифуга медицинская лабораторная LMC-3000 с принадлежностями: ротор R-2, ротор R-6, ротор R-12/10, ротор R-12/15 (РУ № ФСЗ 2008/01792, ООО «Биосан», Латвия).

6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов

Контейнер для сброса отходов («КМ-ПРОЕКТ», Россия).

Набор реагентов для выделения ДНК из срезов тканей, заключенных в парафиновые блоки, зарегистрированный в РФ, например, «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по ТУ 9398-001-11248074-2017 (РУ № РЗН 2019/9172, ООО «Номотек», Россия).

Наконечники универсальные, например, наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем. 3. Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром объёмом от 0,1 мкл до 1000 мкл (РУ № ФСЗ 2012/12077, «Эксиджен, Инк.», США).

Перчатки медицинские, например, перчатки медицинские диагностические (смотровые) и хирургические одноразовые "Benovy" стерильные и нестерильные. Перчатки нитриловые неопудренные нестерильные смотровые, цвета: бирюзовый, синий, белый, голубой, сиреневый, зеленый, размеры: XS, S, M, L, XL (вид 185830) (РУ № ФСЗ 2012/12488, «ТГ Медикал Сдн. Бхд.», Малайзия).

Пробирки, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. 13. Микроцентрифужные пробирки градуированные объемом от 0,6 мл до 2,0 мл или 17. плашки для ПЦР на 96 лунок (РУ № ФСЗ 2012/11892, «Эксиджен, Инк.», США).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro. Вариант исполнения 23. Штатив для пробирок, 80 ячеек (РУ № ФСЗ 2009/05024, «Эксиджен, Инк.», США).

7 Анализируемые пробы

В качестве материала для проведения ПЦР используют клинические образцы ДНК, выделенные из фиксированной формалином и заключенной в парафин (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) опухолевой ткани.

Для выделения ДНК из срезов FFPE тканей используют зарегистрированные в РФ наборы реагентов, рекомендуемый набор: «ЭкстрактДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ТУ 9398-001-11248074-2017, РЗН 2019/9172 от 14.04.2020. Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков приведены в приложении Б.

ВНИМАНИЕ! Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 50% опухолевых клеток.

Выделенные образцы ДНК хранить с соблюдением условий согласно требованиям инструкции используемого набора для выделения ДНК и с соблюдением мер, предотвращающих контаминацию образцов чужеродной ДНК.

8 Подготовка компонентов для анализа

8.1 Подготовка образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой

Обработка образцов ДНК, выделенных из FFPE опухолевой ткани, урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) улучшает специфичность анализа на наличие соматических мутаций.

8.1.1 Разморозить 10x UDG буфер и образцы ДНК, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.1.2 Приготовить UDG-смесь: добавить в пробирку объёмом 1,5 мл реагенты (ОКО, 10x UDG буфер и UDG) и перемешать на вортексе 1 раз 3 секунды (или пипетированием 8-10 раз). Количество реагентов в расчёте на один образец приведено в таблице 3, для обработки N образцов указанное количество необходимо умножить на (N+1).

Таблица 3. Состав UDG-смеси

Реагент	Количество на 1 образец ДНК
ОКО	4 мкл
10x UDG буфер	5 мкл
UDG	1 мкл

8.1.3 Добавить в пробирки объёмом 1,5 мл по 10 мкл UDG-смеси, по 40 мкл образцов ДНК и перемешать на вортексе 1 раз 3 секунды (или пипетированием 8-10 раз). Центрифугировать в течение 3 секунд на микроцентрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

8.1.4 Поместить пробирки в термостат и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°С. После этого прогреть в течение 5 минут при температуре 95°С, чтобы инактивировать UDG и центрифугировать в течение 3 секунд. ДНК, обработанную UDG, хранить не более суток при температуре 4°С или в течение 6 месяцев при температуре минус 20°С.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений

Необходимая степень разведения образцов ДНК зависит от количества ткани, взятой для выделения ДНК и от концентрации ингибирующих примесей. При использовании рекомендаций по выделению ДНК (Приложение Б) для большинства образцов достаточно разведение в 5-20 раз, поэтому сначала рекомендуется тестировать все образцы в разведениях 1/5 и 1/20.

8.2.1 Приготовить две микропробирки объёмом 1,5 мл для каждого образца ДНК. Промаркировать пробирки «1/5» и «1/20» соответственно.

8.2.2 В каждую пробирку добавить ОКО и образец ДНК согласно таблице 4.

Таблица 4. Разведение образцов ДНК

Разведение	Количество ДНК	Количество ОКО
1/5	30 мкл	120 мкл
1/20	10 мкл	190 мкл

8.2.3 Перемешать на вортексе в течение 2-3 сек, центрифугировать в течение 5-10 секунд, чтобы собрать жидкость на дне пробирок. Разведенную ДНК хранить не более суток при температуре 4°С или не более 6 месяцев при температуре минус 20°С.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка контрольной ПЦР

9.1.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ПКО и ОКО с учётом погрешности при пипетировании. Состав реакционной смеси на одну реакцию приведен в таблице 5, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях указанное количество необходимо умножить на (4N + 5), без дублей – на (2N + 3).

Таблица 5. Количество реагентов на одну реакцию

Реагент	Количество
ПЦР-смесь (без полимеразы)	19,8 мкл
Taq ДНК-полимераза	0,2 мкл

9.1.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №6, красная крышка) и ОКО (пробирка №7, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) или при 37°С, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое каждой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки.

9.1.3 Приготовить реакционную смесь в пробирке объёмом 1,5 мл согласно расчёту (пункт 9.1.1): внести в пробирку расчётное количество контрольной ПЦР-смеси,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

добавить Taq ДНК-полимеразу и тщательно перемешать на вортексе 1 раз в течение 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз). Реакционная смесь готова.

ВНИМАНИЕ! Использовать ПЦР-смесь немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходной ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы сразу поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

9.1.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать крышки пробирок!

Пример расположения шести клинических образцов ДНК и контрольных образцов в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведён на рисунке 2.

Разведение	**Клинические образцы ДНК**						**Образцы из набора**	
	ДНК1	**ДНК2**	**ДНК3**	**ДНК4**	**ДНК5**	**ДНК6**	**ОКО**	**ПКО**
1:5	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
	ДНК1 1:5	ДНК2 1:5	ДНК3 1:5	ДНК4 1:5	ДНК5 1:5	ДНК6 1:5	ОКО	ПКО
1:20	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		
	ДНК1 1:20	ДНК2 1:20	ДНК3 1:20	ДНК4 1:20	ДНК5 1:20	ДНК6 1:20		

Рисунок 2. Схема расположения шести образцов ДНК в двух разведениях в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны номера образцов ДНК, ПКО, ОКО и разведение (1:5; 1:20).

9.1.5 Добавить в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой.

9.1.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

– по 5 мкл клинических образцов ДНК в соответствующие пробирки;

– по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;

– по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

9.1.7 Закрыть крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.1.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.1.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9.2 Программирование и запуск амплификатора

9.2.1 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и регистрации флуоресценции в соответствии с руководством по эксплуатации и п. 9.2.2-9.2.4.

9.2.2 Задать объём реакционной смеси 25 мкл. Запрограммировать протокол проведения ПЦР в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	3 мин	Нет
5	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	55°C	40 сек	
45	Денатурация	95°C	15 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	55°C	40 сек	Да

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

– ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;

– FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *KRAS*.

9.2.4 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.2.5 Запустить протокол ПЦР.

9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР

9.3.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Выбрать режим определения величин Cq: при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот «С1000 Touch» с модулем CFX96 выбрать режим регрессия (regression), при применении амплификатора «ДТпрайм» – геометрический метод.

Проверить значения Cq по каналам FAM для ПКО и ОКО (таблица 7).

Таблица 7. Допустимые значения Cq для ПКО и ОКО в контрольной ПЦР

ПЦР	Допустимое значение Cq для образца	
	ПКО	ОКО
Контрольная ПЦР	$\mathbf{Cq_{FAM}} \leq QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР) $\mathbf{Cq_{ROX}} \leq QC_{ROX}$ (контрольная ПЦР)	$\mathbf{Cq_{FAM}}$ не определено или $\mathbf{Cq_{FAM}} > Cq_{ПКО}+6$ $\mathbf{Cq_{ROX}} \leq QC_{ROX}$ (контрольная ПЦР)

9.3.2 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *KRAS* только в том случае, если величины Cq для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

– для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение Cq_{FAM} меньше или равно $QC_{FAM\ (контрольная\ ПЦР)}$;

– для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Cq_{ROX} меньше или равно $QC_{ROX\ (контрольная\ ПЦР)}$;

– для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение Cq_{FAM} либо Cq_{FAM} больше $Cq_{ПКО}+6$ ($Cq_{ПКО}$ – это Cq ПКО в контрольной ПЦР);

– для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение Cq_{ROX} меньше или равно $QC_{ROX\ (контрольная\ ПЦР)}$.

Значения QC_{ROX} и QC_{FAM} для каждого амплификатора («CFX96» и «ДТпрайм») указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества. Если величины Cq контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

9.3.3 Сравнить значения Cq по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов ДНК (Cq_C) и Cq ПКО ($Cq_{ПКО}$). Для проведения ПЦР на мутации гена *KRAS* выбрать разведение образца, имеющее значение Cq_C, наиболее близкое к $Cq_{ПКО}$. Если значение Cq_C по каналу FAM больше $Cq_{ПКО}+4$, то нужно сравнить значение Cq по каналу ROX (Cq_{ROX}) со значением $QC_{ROX\ (контрольная\ ПЦР)}$. Рекомендации по анализу полученных значений Cq приведены в таблице 8.

Таблица 8. Анализ значений Cq, полученных в контрольной ПЦР

Cq_{FAM}	**Cq_{ROX}**	**Интерпретация результатов**
$Cq_C < Cq_{ПКО}-4$	Не задано	Необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Cq на 1 цикл, и повторить анализ.
$Cq_{ПКО}-4 \leq Cq_C \leq Cq_{ПКО}+4$	Не задано	Концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена *KRAS*.
$Cq_C > Cq_{ПКО}+4$	$Cq_{ROX} > QC_{ROX}$ (контрольная ПЦР) или Cq_{ROX} не определяется	В образце ДНК много ингибиторов ПЦР. Нужно развести образец ДНК и повторить постановку контрольной ПЦР. Если по-прежнему $Cq_C > Cq_{ПКО}+4$, то повторить анализ, начиная с этапа выделения ДНК.
	$Cq_{ROX} \leq QC_{ROX}$ (контрольная ПЦР)	Концентрация ДНК не достаточна для анализа. Необходимо повторить анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9.4 Постановка мультиплексных ПЦР на мутации гена *KRAS*

9.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ОКО и ПКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 5, для тестирования N клинических образцов в дублях это количество необходимо умножить на (2N + 5), без дублей – на (N + 3).

9.4.2 Разморозить при комнатной температуре (от 18°С до 25°С) или при 37°С ПЦР-смесь KRAS G12/13 Mut (пробирка №2, жёлтая крышка), ПЦР-смесь KRAS Q61 Mut (пробирка №3, жёлтая крышка), ПЦР-смесь KRAS A146 Mut (пробирка №4, жёлтая крышка), ПКО и ОКО. Убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и кратко центрифугировать, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

9.4.3 Промаркировать три чистые пробирки объёмом 1,5 мл для реакционных смесей. Внести в пробирку №1 ПЦР-смесь KRAS G12/13 Mut, в пробирку №2 – ПЦР-смесь KRAS Q61 Mut, в пробирку №3 – ПЦР-смесь для KRAS A146 Mut. Добавить в каждую пробирку для реакционных смесей Taq ДНК-полимеразу. Перемешать на вортексе 1 раз в течение 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз) и центрифугировать 5 секунд в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок. Реакционные смеси готовы.

ВНИМАНИЕ! Использовать немедленно, время нахождения ПЦР-смеси при комнатной температуре – не более 10 минут. Неиспользованные остатки исходных ПЦР-смесей и Taq ДНК-полимеразы немедленно поместить в морозильную камеру с температурой минус 20°С.

9.4.4 Подготовить и промаркировать стрипы или плашки для ПЦР на 96 лунок.

ВНИМАНИЕ! Во избежание загрязнения оптики термоциклера не маркировать стрипы на крышках!

Пример расположения клинических и контрольных образцов при анализе шести образцов ДНК в дублях с использованием стрипов по восемь пробирок приведен на рисунке 3.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПЦР-смесь	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
KRAS G12/13 Mut	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
KRAS Q61 Mut	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
KRAS A146 Mut	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО

Рисунок 3. Схема расположения шести образцов ДНК и контрольных образцов в дублях при использовании стрипов по восемь пробирок. Указаны ПЦР-смеси, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

9.4.5 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Taq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой и закрыть крышки.

9.4.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

– по 5 мкл разведённых клинических образцов ДНК, используя оптимальные разведения, определённые на этапе контрольной ПЦР;

– по 5 мкл ОКО в пробирки для отрицательного контроля;

– по 5 мкл ПКО в пробирки для положительного контроля.

9.4.7 Закрыть крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

9.4.8 Центрифугировать 3 мин при 2000 об/мин, чтобы собрать всю жидкость на дне.

9.4.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

9.5 Программирование и запуск амплификатора

9.5.1 Программирование и запуск прибора проводить в соответствии с руководством по эксплуатации, п. 9.2.2 и таблицей 6.

9.5.2 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

– ROX – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *KRAS* без мутаций;

– FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагментов гена *KRAS* с мутациями.

9.5.3 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.5.4 Запустить протокол ПЦР.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

10.1.1 Открыть окно анализа данных ПЦР. Для получения величин Cq использовать соответствующий режим, как описано в разделе 9.3.1.

10.1.2 Проверить значения Cq по каналам ROX и FAM последовательно для ПКО, ОКО и клинических образцов ДНК.

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутаций гена *KRAS* только в том случае, если величины Cq для ПКО и ОКО имеют допустимые значения (таблица 9):

– для ПКО во всех мультиплексных ПЦР на мутации гена *KRAS* наблюдается нарастание флуоресценции по каналам FAM и ROX и определяются значения $Cq_{ПКО}$ меньше или равные значениям QC_{FAM} и QC_{ROX} для этих ПЦР-смесей;

– для ОКО во всех ПЦР на мутации гена *KRAS* не наблюдается нарастание флуоресценции по каналам FAM и ROX и не определяется значение Cq_{FAM} и Cq_{ROX} либо Cq больше $Cq_{ПКО}+6$ ($Cq_{ПКО}$ – значение Cq ПКО в ПЦР с этой же смесью).

Таблица 9. Допустимые значения Cq для контрольных образцов

ПЦР-смесь	Допустимое значение Cq для образца	
	ПКО	ОКО
KRAS G12/13Mut	$\mathbf{Cq_{FAM}} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ G12/13)}$[1] $\mathbf{Cq_{ROX}} \le QC_{ROX\ (ПЦР\ G12/13)}$[1]	$\mathbf{Cq_{FAM}}$ не определено или $\mathbf{Cq_{FAM}} > Cq_{ПКО}$[2]$+6$ $\mathbf{Cq_{ROX}}$ не определено или $\mathbf{Cq_{ROX}} > Cq_{ПКО}$[2]$+6$
KRAS Q61 Mut	$\mathbf{Cq_{FAM}} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ Q61)}$[1] $\mathbf{Cq_{ROX}} \le QC_{ROX\ (ПЦР\ Q61)}$[1]	$\mathbf{Cq_{FAM}}$ не определено или $\mathbf{Cq_{FAM}} > Cq_{ПКО}$[2]$+6$ $\mathbf{Cq_{ROX}}$ не определено или $\mathbf{Cq_{ROX}} > Cq_{ПКО}$[2]$+6$
KRAS A146 Mut	$\mathbf{Cq_{FAM}} \le QC_{FAM\ (ПЦР\ A146)}$[1] $\mathbf{Cq_{ROX}} \le QC_{ROX\ (ПЦР\ A146)}$[1]	$\mathbf{Cq_{FAM}}$ не определено или $\mathbf{Cq_{FAM}} > Cq_{ПКО}$[2]$+6$ $\mathbf{Cq_{ROX}}$ не определено или $\mathbf{Cq_{ROX}} > Cq_{ПКО}$[2]$+6$

[1] Значение QC_{ROX} и QC_{FAM} для мультиплексных ПЦР на мутации гена *KRAS* для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

[2] $Cq_{ПКО}$ – значение Cq ПКО в этой же постановке ПЦР.

10.1.4 Если величины Cq контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Cq не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 10.

Таблица 10. Другие значения Cq контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	ПЦР-смесь	Значение Cq	Возможные проблемы
ПЦР на мутации в 12, 13, 61 и 146-м кодонах гена *KRAS*			
ОКО	KRAS G12/13Mut	**Cq_{FAM}** $\leq Cq_{ПКО}+6$, **Cq_{ROX}** $\leq Cq_{ПКО}+6$	Возможна контаминация.
	KRAS Q61 Mut		
	KRAS A146 Mut		
ПКО	KRAS G12/13Mut	**Cq_{FAM}** $> QC_{FAM\ (ПЦР\ G12/13)}$; **$Cq_{ROX}$** $> QC_{ROX\ (ПЦР\ G12/13)}$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.
	KRAS Q61 Mut	**Cq_{FAM}** $> QC_{FAM\ (ПЦР\ Q61)}$; **Cq_{ROX}** $> QC_{ROX\ (ПЦР\ Q61)}$	
	KRAS A146 Mut	**Cq_{FAM}** $> QC_{FAM\ (ПЦР\ A146)}$; **Cq_{ROX}** $> QC_{ROX\ (ПЦР\ A146)}$	

10.1.5 Для каждого клинического образца в ПЦР на мутации гена *KRAS* должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяться значение Cq (Cq_{ROX}). По каналу ROX происходит регистрация флуоресценции продуктов амплификации константного участка гена *KRAS*.

10.1.6 Если значение Cq_{ROX} определяется в диапазоне $Cq_{ПКО}-4 \leq Cq_{ROX} \leq Cq_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК достаточна для анализа на наличие мутаций гена *KRAS*.

10.1.7 Если значение Cq_{ROX} меньше $Cq_{ПКО}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Cq на 1 цикл, и повторить анализ.

10.1.8 Если значение Cq_{ROX} больше $Cq_{ПКО}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутаций гена *KRAS*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

10.1.9 Для ПКО для каждой мультиплексной ПЦР-смеси рассчитать значение ΔCq: $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$, где Cq_{FAM} – Cq ПКО по каналу FAM, Cq_{ROX} – Cq ПКО по каналу ROX для данной лунки и данной ПЦР-смеси. Рекомендации по расчёту ΔCq в программе «MS Office Excel» приведены в приложении В.

10.1.10 Сравнить полученные значения ΔCq ПКО для каждой ПЦР-смеси со значениями соответствующих точек отсечения (ТО). Значения ТО для каждой ПЦР-смеси для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.1.11 Если рассчитанные значения ΔCq ПКО для каждой ПЦР-смеси меньше или равны соответствующим значениям ТО, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутаций гена *KRAS* в клинических образцах ДНК.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10.1.12 Если какое-либо из значений ΔCq ПКО больше соответствующего значения ТО, необходимо повторить анализ.

10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *KRAS*

10.2.1 Для каждого клинического образца для каждой мультиплексной ПЦР-смеси на мутации гена *KRAS* рассчитать значения ΔCq по формуле: $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$, где Cq_{FAM} – Cq образца по каналу FAM, Cq_{ROX} – Cq образца по каналу ROX для данной лунки и данной ПЦР-смеси.

Рекомендации по расчёту ΔCq в программе «MS Office Excel» приведены в приложении В. В таблице 2 приведен список ПЦР-смесей на мутации гена *KRAS* и кодонов гена *KRAS* с соответствующими каналами регистрации флуоресценции.

10.2.2 Сравнить полученные значения ΔCq каждого клинического образца ДНК для каждой ПЦР-смеси со значениями соответствующих точек отсечения (ТО).

10.2.3 Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию в кодоне гена *KRAS*, если значение ΔCq меньше или равно значению ТО для соответствующей ПЦР-смеси (при анализе в дублях – для обоих повторов).

10.2.4 Образец учитывается как отрицательный, не содержащий мутацию в кодоне гена *KRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения, если значение ΔCq больше ТО или значение Cq_{FAM} образца не определено, при анализе в дублях – любой из вариантов для обоих повторов или для одного из повторов значение ΔCq больше ТО, а для другого – значение Cq_{FAM} не определено.

10.2.5 Если при анализе в дублях для одного из повторов значение ΔCq меньше или равно ТО, а для другого ΔCq больше ТО, то результат считают сомнительным и анализ повторяют. Если в повторном анализе получают сомнительный результат, то проводят макродиссекцию участков опухоли из срезов FFPE опухолевой ткани так, чтобы содержание опухолевых клеток было не менее 50%, выделяют ДНК и повторяют анализ.

11 Условия хранения, транспортирования и эксплуатации

11.1 Условия хранения

11.1.1 Хранить набор реагентов при температуре от минус 25°С до минус 18°С в течение всего срока годности в холодильниках, которые обеспечивают регламентированный температурный режим, не допуская проникновения света.

11.1.2 Не подвергать набор реагентов замораживанию и размораживанию более трёх раз, общее время нахождения после оттаивания при температуре 22°С – не более 30 минут.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

11.1.3 Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска или 3 месяца после первого вскрытия упаковки набора в зависимости от того, какая дата наступит раньше.

11.2 Условия транспортирования

11.2.1 Транспортировать набор реагентов следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от минус 25°С до минус 18°С.

11.2.2 Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы (ХТЛ-4, ООО «Термологика» или аналогичные).

11.2.3 Срок транспортирования – не более 5 суток.

11.2.4 При транспортировании необходимо соблюдать условия, обеспечивающие сохранность набора реагентов от механического повреждения, неблагоприятного воздействия температуры окружающей среды, воздействия солнечного света.

ВНИМАНИЕ! Если реагенты прибыли незамороженными или упаковка повреждена, пожалуйста, свяжитесь с производителем ООО «БиоЛинк» (см. раздел 12).

11.3 Условия эксплуатации

11.3.1 Использовать набор реагентов при комнатной температуре (от 18°С до 25°С).

11.3.2 Строго соблюдать требования данной инструкции по применению набора реагентов.

11.3.3 Не использовать набор реагентов после истечения срока годности.

11.4 Условия утилизации

11.4.1 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал и упаковку подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией согласно СанПиН 2.1.3684-21.

11.4.2 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, реагентов и оборудования.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

12 Гарантийные обязательства

12.1 Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие качества набора реагентов требованиям нормативной и технической документации при соблюдении условий хранения, транспортирования и применения. Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

12.2 Рекламации

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

Рекламации следует направлять в письменном виде производителю ООО «БиоЛинк».

Адрес:	630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13
Телефон:	+7 (383) 209-32-40
Электронная почта:	info@biolinklab.ru
Веб-сайт:	biolinklab.ru

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

13 Маркировка

Маркировка потребительской упаковки содержит следующие графические символы.

	Содержимого достаточно для проведения указанного количества реакций		Номер по каталогу
	Температурный диапазон (условия хранения и транспортирования)		Номер серии
	Не допускать воздействия солнечного света		Дата изготовления (месяц, год)
	Обратитесь к инструкции по применению		Использовать до (месяц, год)
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Изготовитель

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Библиография

1. Comparative Analysis of Individual RAS Mutations in Cancer Biology / C. Muñoz-Maldonado, Y. Zimmer, M. Medová // Frontiers in Oncology. – 2019. – Vol 9:1088. – P. 1-22. – DOI: 10.3389/fonc.2019.01088
2. My Cancer Genome | Genetically Informed Cancer Medicine [Электронный ресурс]: клиническое значение молекулярных маркёров – Электрон. дан. – [S. 1.] – Режим доступа: https://www.mycancergenome.org/content/gene/kras/ – Загл. с экрана.
3. KRAS Mutation Status is PrediCqive of Response to Cetuximab Therapy in ColoreCqal Cancer. /A. Lievre, J.-B. Bachet, D. Le Corre, et al. // Cancer Research – 2006. – Vol. 66 (8). – P. 3992-3995. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0191
4. KRAS mutation testing for prediCqing response to anti-EGFR therapy for coloreCqal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. / J. H. J. M. van Krieken, A. Jung, T. Kirchner, et al. // Virchows Archiv. – 2009. – Vol. 454(2). – P. 233-235. – DOI: 10.1007/s00428-008-0665-y
5. Клинические рекомендации. Злокачественное новообразование ободочной кишки / Ассоциация онкологов России. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии». Российское общество специалистов по колоректальному раку. Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России» // Год утверждения (частота пересмотра): 2022. – 95 с.
6. Клинические рекомендации. Рак прямой кишки / Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии». Российское общество специалистов по колоректальному раку. Общероссийская общественная организация «Ассоциация колопроктологов России». Ассоциация онкологов России. // Год утверждения (частота пересмотра): 2022. – 105 с.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение А (справочное) Список определяемых мутаций гена *KRAS*

Кодон	Описание в соответствии с рекомендациями HGVS
12	NM_004985.5: c.34G>A (p. Gly12Ser)
	NM_004985.5: c.34G>C (p. Gly12Arg)
	NM_004985.5: c.34G>T (p. Gly12Cys)
	NM_004985.5: c.35G>A (p. Gly12Asp)
	NM_004985.5: c.35G>C (p. Gly12Ala)
	NM_004985.5: c.35G>T (p. Gly12Val)
13	NM_004985.5: c.37_38delinsTT (p. Gly13Phe)
	NM_004985.5: c.37G>A (p. Gly13Ser)
	NM_004985.5: c.37G>C (p. Gly13Arg)
	NM_004985.5: c.37G>T (p. Gly13Cys)
	NM_004985.5: c.38G>A (p. Gly13Asp)
	NM_004985.5: c.38G>C (p. Gly13Ala)
	NM_004985.5: c.38G>T (p. Gly13Val)
61	NM_004985.5: c.181C>A (p. Gln61Lys)
	NM_004985.5: c.181C>G (p. Gln61Glu)
	NM_004985.5: c.182A>C (p. Gln61Pro)
	NM_004985.5: c.182A>G (p. Gln61Arg)
	NM_004985.5: c.182A>T (p. Gln61Leu)
	NM_004985.5: c.183A>C (p. Gln61His)
	NM_004985.5: c.183A>T (p. Gln61His)
146	NM_004985.5: c.436G>A (p. Ala146Thr)
	NM_004985.5: c.436G>C (p. Ala146Pro)
	NM_004985.5: c.437C>T (p. Ala146Val)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков

Для выделения ДНК из FFPE блоков излишки парафина обрезать скальпелем и приготовить серийные срезы толщиной 5 микрон с площадью ткани на срезе 25-80 мм^2. Если поверхность блока была длительное время экспонирована на воздухе, то первые 2-3 среза отбросить, а последующие пять использовать для выделения ДНК.

Первый или последний рабочие срезы серии окрасить гематоксилин-эозином, после чего патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток. Если на срезе менее 50% опухолевых клеток, то провести макродиссекцию. Рабочие срезы поместить в пробирку объёмом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного на территории РФ.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Приложение В (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»

Обработка результатов для термоциклера «C1000 Touch» с модулем «CFX96»

Выбрать режим определения Cq регрессия (regression). Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». На рисунке В1 приведён пример расчёта ΔCq для мутаций в 12-м и 13-м кодонах гена *KRAS*. Далее подробно будут описаны расчеты для ПЦР-смеси KRAS G12/13 Mut, для других ПЦР-смесей обработка результатов проводится аналогично.

В столбце «Target» ввести «G12/13 Mut» в ячейки, соответствующие ПЦР-смеси KRAS G12/13 Mut (рисунок В1, элемент 2). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец «Cq_{ROX}», где Cq_{ROX} – значение Cq образца, регистрируемое по каналу ROX (рисунок В1, элемент 5). Значения Cq, регистрируемое по каналу ROX в соответствующей ПЦР на мутации гена *KRAS* скопировать в столбце «Cq» (рисунок В1, элемент 4) и вставить в столбец «Cq_{ROX}» (рисунок В1, элемент 5), таким образом, чтобы значения Cq_{FAM} и Cq_{ROX} для каждой лунки находились в одной строке, соответствующей этой лунке.

Добавить столбец «ΔCq». Используя функцию вычитания, для образца ПКО и для каждого клинического образца для каждого кодона рассчитать значение ΔCq: $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$ (рисунок В1, элемент 6).

Добавить столбец «ТО», внести значения ТО для каждого кодона для амплификатора «CFX96», указанные в паспорте качества (рисунок В1, элемент 7).

Сравнить полученные значения ΔCq ПКО для каждого кодона со значениями точек отсечения (ТО) для соответствующего кодона. Если рассчитанные значения ΔCq ПКО для каждого кодона меньше или равны значению ТО для этого кодона, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутаций гена *KRAS* в клинических образцах ДНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCq клинических образцов ДНК со значениями ТО для каждого кодона и записать результат (рисунок В1, элемент 8).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1 Fluor	2 Target	Content	3 Sample	4 Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	5 CqROX	6 ΔCq	7 TO	8 Результат
ROX	G12/13 Mut	NTC-01	ОКО	nd	0,0	0,0				
ROX	G12/13 Mut	NTC-01	ОКО	2,5	2,5	0,0				
ROX	G12/13 Mut	Pos Ctrl-1	ПКО	21,9	21,6	0,3				
ROX	G12/13 Mut	Pos Ctrl-1	ПКО	21,4	21,6	0,3				
ROX	G12/13 Mut	Unkn-01	ДНК1	18,0	18,0	0,0				
ROX	G12/13 Mut	Unkn-01	ДНК1	18,0	18,0	0,0				
ROX	G12/13 Mut	Unkn-02	ДНК2	25,2	25,2	0,0				
ROX	G12/13 Mut	Unkn-02	ДНК2	25,2	25,2	0,0				
FAM	G12/13 Mut	NTC-01	ОКО	nd	0,0	0,0				
FAM	G12/13 Mut	NTC-01	ОКО	nd	0,0	0,0		$\Delta Cq_{G12/13}$	$TO_{G12/13}$	
FAM	G12/13 Mut	Pos Ctrl-1	ПКО	27,0	27,0	0,0	21,9	5,1	6,9	положительный
FAM	G12/13 Mut	Pos Ctrl-1	ПКО	27,0	27,0	0,0	21,4	5,5	6,9	положительный
FAM	G12/13 Mut	Unkn-01	ДНК1	30,8	30,8	0,0	18,0	12,8	6,9	отрицательный
FAM	G12/13 Mut	Unkn-01	ДНК1	30,8	30,8	0,0	18,0	12,8	6,9	отрицательный
FAM	G12/13 Mut	Unkn-02	ДНК2	30,0	30,1	0,0	25,2	4,8	6,9	положительный
FAM	G12/13 Mut	Unkn-02	ДНК2	30,1	30,1	0,0	25,2	4,9	6,9	положительный

Рисунок В1. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на термоциклере с модулем «CFX96», на примере ПЦР-смеси KRAS G12/13 Mut

1 – в столбце «Fluor» указан канал регистрации флуоресценции (FAM, ROX).

2 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР-смеси KRAS G12/13 Mut.

3 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

4 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Cq, регистрируемые по каналу ROX.

5 – столбец Cq_{ROX}, в который вставлены значения Cq из столбца «Cq».

6 – вычисление значений ΔCq по формуле $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$.

7 – значения ТО для мутаций 12-го и 13-го кодонов для амплификатора «CFX96».

8 – результат анализа на наличие мутаций в гене *KRAS*.

Cq Mean – среднее значение Cq для образца, Cq Std. Dev – среднеквадратическое отклонение значения Cq для образца. Значения Cq Mean и Cq Std. Dev не используются при расчётах. nd – значение не определено.

В приведённом на рисунке В1 примере $TO_{G12/13} = 6,9$.

Для ПКО значения ΔCq составляют 5,1 и 5,5 (меньше значения $TO_{G12/13} = 6,9$), следовательно, можно переходить к анализу результатов ПЦР для клинических образцов ДНК.

Образец ДНК1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутаций в 12-м и 13-м кодоне гена *KRAS* (или концентрация мутантного аллеля менее

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью KRAS G12/13 Mut значения ΔCq составляют 12,8 (больше $TO_{G12/13}$ = 6,9).

Образец ДНК2 учитывается как положительный, содержащий мутацию 12-м или 13-м кодоне гена *KRAS*, так как в ПЦР со смесью KRAS G12/13 Mut значения ΔCq составляют 4,8 и 4,9, что меньше значения $TO_{G12/13}$ = 6,9.

Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм»

Выбрать режим определения Cq геометрический метод. Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». При необходимости выполнить сортировку. Столбец «result» экспортируется автоматически из программного обеспечения амплификатора «ДТпрайм», его следует игнорировать при анализе результатов или удалить (на рисунке В2 этот столбец удалён).

Добавить столбец «ΔCq». Используя функцию вычитания, для образца ПКО и для каждого клинического образца для каждого кодона рассчитать значение ΔCq: $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$ (рисунок В2, элемент 4).

Добавить столбец «ТО», внести значения ТО для каждого кодона для амплификатора «ДТпрайм», указанные в паспорте качества (рисунок В2, элемент 5).

Сравнить полученные значения ΔCq ПКО для каждого кодона со значениями точек отсечения (ТО) для соответствующего кодона. Если рассчитанные значения ΔCq ПКО для каждого кодона меньше или равны значению ТО для этого кодона, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутаций гена *KRAS* в клинических образцах ДНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCq клинических образцов ДНК со значениями ТО для каждого кодона и записать результат (рисунок В2, элемент 6).

В приведённом на рисунке В2 примере $TO_{G12/13}$ = 4,2.

Для ПКО значения ΔCq составляют 2,6 (меньше значения $TO_{G12/13}$ = 4,2), следовательно, можно переходить к анализу результатов ПЦР для клинических образцов ДНК.

Образец 1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутаций в 12-м и 13-м кодоне гена *KRAS* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью KRAS G12/13 Mut значения ΔCq составляют 10,8 и 12,8 (больше $TO_{G12/13}$ = 4,2).

Образец 2 учитывается как положительный, содержащий мутацию 12-м или 13-м кодоне гена *KRAS*, так как в ПЦР со смесью KRAS G12/13 Mut значения ΔCq составляют 2,0 и 1,8, что меньше значения $TO_{G12/13}$ = 4,2.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1	2	3	4	5	6
id	FAM	ROX	ΔCq	ТО	Результат
Образец_1	30,4	19,6	10,8	4,2	отрицательный
Образец_1	32,2	19,4	12,8	4,2	отрицательный
Образец_2	29,7	27,7	2,0	4,2	положительный
Образец_2	29,1	27,3	1,8	4,2	положительный
К+	26,3	23,7	2,6	4,2	положительный
К+	26,3	23,7	2,6	4,2	положительный
К-	-1	-1			
К-	-1	-1			

Рисунок В2. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на амплификаторе «ДТпрайм», на примере ПЦР-смеси KRAS G12/13 Mut

1 – в столбце «id» обозначены номера образцов ДНК, ПКО (К+) и ОКО (К-).

2 – столбец «FAM», значения Cq образцов по каналу FAM.

3 – столбец «ROX», значения Cq образцов по каналу ROX.

4 – вычисление значений ΔCq по формуле $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$.

5 – значение ТО для мутаций 12-го и 13-го кодонов для амплификатора «ДТпрайм».

6 – результат анализа на наличие мутации в гене *KRAS*.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Производитель: ООО «БиоЛинк»

Адрес: 630090, г. Новосибирск, ул. Николаева, д. 13

Телефон: (383) 209-32-40

E-mail: info@biolinklab.ru

Веб-сайт: biolinklab.ru

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Прошито, пронумеровано
и скреплено печатью
_____35_____листов
Директор ООО «БИОЛИНК»
_____/ Корниенко А. А. /
«__»_____ 2024 г.