



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

Корниенко А. А.

«20» февраля 2025 г.



Набор реагентов для выявления мутаций V600
гена *BRAF* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в режиме реального времени "**Real-time-PCR-BRAF-4M**"
по ТУ 20.59.52-016-57201404-2023

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2025/25145 от 04.04.2025

Содержание

Содержание	1
Введение	3
1 Назначение набора	4
2 Характеристика набора	4
2.1. Варианты исполнения	4
2.2. Комплектность	4
2.3. Состав набора реагентов	5
2.4. Число анализируемых проб	5
2.5. Принцип действия набора	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	8
3.4. Диагностическая специфичность	9
3.5. Диагностическая чувствительность	9
3.6. Ограничения при применении	9
3.7. Доступные референтные материалы и методы анализа	9
4 Риски, связанные с применением набора реагентов	9
5 Меры предосторожности	10
6 Оборудование и материалы	11
6.1 Оборудование, необходимое для работы с набором реагентов	11
6.2 Материалы, необходимые для работы с набором реагентов	12
7 Анализируемые пробы	13
8 Подготовка компонентов для анализа	13
8.1. Подготовка реагентов	13
8.2. Подготовка образцов – приготовление разведений	13
9 Проведение анализа	14
9.1 Постановка контрольной ПЦР	14
9.2 Программирование и запуск амплификатора	15
9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР	16
9.4 Постановка мультиплексной ПЦР на мутации гена <i>BRAF</i>	17
9.5 Программирование и запуск амплификатора	19

10	Анализ результатов	19
10.1	Критерии достоверности результатов ПЦР	19
10.2	Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена <i>BRAF</i>	21
11	Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	21
11.1	Условия хранения.....	21
11.2	Условия транспортирования.....	22
11.3	Условия эксплуатации	22
11.4	Условия утилизации.....	22
12	Гарантийные обязательства	23
12.1	Гарантии производителя	23
12.2	Рекламации	23
13	Маркировка	23
	Библиография.....	24
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков	25
	Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel».....	26

Введение

Ген *BRAF* кодирует внутриклеточный белок – компонент сигнальных каскадов RAS-МАРК и RAS-МЕК-ERK, контролирующих пролиферацию и дифференциацию клеток в ответ на внешние митогенные стимулы. Белок BRAF обладает киназной активностью, необходимой для передачи сигнала при его активации.

Активирующие соматические мутации гена *BRAF* приводят к постоянной гиперактивации внутриклеточных сигнальных путей и пролиферации клеток. Соматические мутации в гене *BRAF* распространены при различных злокачественных образованиях: при меланоме кожи, опухолях щитовидной железы, раке лёгкого, колоректальном раке. Наиболее частой активирующей мутацией гена *BRAF* является точечная нуклеотидная замена с.1799Т>А, которая соответствует замене валина на глутаминовую кислоту в позиции 600 (V600E) в белке BRAF. Второй по частоте является мутация с.1798_1799delinsAA, соответствующая замене валина на лизин в позиции 600 (V600K) [1].

Опухоли с мутациями кодона V600 в гене *BRAF* чувствительны к лекарственным препаратам на основе ингибиторов протеинкиназы BRAF и МЕК (вемурафениб, дабрафениб, траметиниб и др.) [2-3]. Наличие мутаций в гене *BRAF* при колоректальном раке ассоциировано с резистентностью к терапии анти-EGFR антителами (цетуксимаб, панитумумаб) [4].

В соответствии с утверждёнными клиническими рекомендациями «Меланома кожи и слизистых оболочек», «Дифференцированный рак щитовидной железы», «Злокачественное новообразование бронхов и легкого», «Злокачественное новообразование ободочной кишки», «Рак прямой кишки» рекомендуется выполнять молекулярно-генетическое исследование мутаций в гене *BRAF* методом ПЦР для выбора таргетной терапии при обследовании пациентов с разными опухолевыми заболеваниями [5-9].

Показания и противопоказания к применению

Показания: набор реагентов рекомендуется к применению у пациентов с различными опухолевыми заболеваниями: меланомой кожи с метастазами, меланомой слизистых оболочек с метастазами (при отсутствии мутаций в гене *KIT*), раком ободочной и прямой кишки с метастазами – для определения показаний к таргетной терапии.

Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутаций V600 гена *BRAF* методом ПЦР в режиме реального времени (обнаруживает, но не различает мутации V600E, V600K, V600R, V600D).

Функциональное назначение: сопутствующая диагностика; 1) определение показаний к таргетной терапии с использованием ингибиторов протеинкиназы BRAF и MEK (дабрафениб и траметиниб или вемурафениб и кобиметиниб) у пациентов с метастатической меланомой, колоректальным раком; 2) определение показаний к таргетной терапии анти-EGFR антителами (цетуксимаб или панитумумаб) у пациентов с метастатическим раком ободочной и прямой кишки.

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 V600 гена *BRAF* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-BRAF-4M" по ТУ 20.59.52-016-57201404-2023» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-BRAF-4M (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-BRAF-4M (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	Желтый	ПЦР-смесь BRAF-V600mut2	280 мкл	840 мкл
3	Синий	Тақ ДНК-полимераза	25 мкл	50 мкл
4	Красный	ПКО	65 мкл	190 мкл
5	Белый	ОКО	1.4 мл	4 мл

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

ПЦР-смесь BRAF-V600mut2 – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента гена *BRAF* с мутациями V600.

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

ПКО – положительный контрольный образец, содержащий ДНК рекомбинантной плазмиды с фрагментом гена *BRAF* с мутацией V600K и ДНК человека без мутаций гена *BRAF*.

ОКО – отрицательный контрольный образец, содержащий воду без нуклеаз.

Набор реагентов не содержит опасных химических веществ, не содержит биологических материалов 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-BRAF-4M (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-BRAF-4M (36)" содержит реактивы для проведения 36 реакций, что позволяет проанализировать 12 клинических образцов в трёх постановках по четыре клинических образца с положительным и отрицательным контролем (все образцы в дублях) или 16 клинических образцов с положительным и отрицательным контролем в одной

постановке (все образцы в дублях) или 34 клинических образца с положительным и отрицательным контролем в одной постановке (все образцы без дублей).

2.5. Принцип действия набора

Принцип действия набора реагентов основан на методе аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с детекцией сигнала с помощью TaqMan зондов.

Набор содержит две смеси для ПЦР (таблица 1): контрольную ПЦР-смесь и мультиплексную ПЦР-смесь для амплификации фрагментов гена *BRAF* с мутациями V600 (V600E, V600K, V600R, V600D), а также константного участка ДНК гена *BRAF*. Определяемые мутации гена *BRAF* согласно номенклатуре HGVS (Human genome variation society): V600E (NM_004333.6: c.1799T>A (p.Val600Glu)), V600K (NM_004333.6: c.1798_1799delinsAA (p.Val600Lys)), V600R ((NM_004333.6: c.1798_1799delinsAG ((p.Val600Arg)), V600D ((NM_004333.6: c.1799_1800delinsAT ((p.Val600Asp)). ПЦР-смеси содержат все необходимые реагенты за исключением Taq ДНК полимеразы, поставляемой в отдельной пробирке.

Для контроля в состав набора входят положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО). ПКО содержит ДНК рекомбинантной плазмиды, несущей фрагмент гена *BRAF* с мутацией V600K и ДНК человека без мутаций в 600-м кодоне гена *BRAF*. 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 *BRAF* состоит из двух этапов:

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

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 *BRAF*. 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 превышает фоновый. Значения Cq_{FAM} разведений клинических образцов ДНК сравнивают с Cq_{FAM} ПКО. Для последующей аллель-специфичной ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину Cq_{FAM} относительно Cq_{FAM} ПКО.

На втором этапе выбранные разведения образцов ДНК анализируют в мультиплексной ПЦР. В аллель-специфичной ПЦР происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *BRAF*, содержащего мутацию V600 (V600E, V600K, V600R, V600D), за счёт использования праймера, специфичного последовательности ДНК с мутацией. Продукты ПЦР гена *BRAF* с мутациями V600 детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM. Для контроля в мультиплексной ПЦР также происходит амплификация константного участка гена *BRAF*. Продукты ПЦР константного участка детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором ROX.

В аллель-специфичной реакции величина Cq_{FAM} для образцов ДНК, содержащих ген *BRAF* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина Cq_{FAM} для образцов ДНК, содержащих ген *BRAF* с мутацией V600.

Наличие мутации в образце ДНК определяется по разнице между значением Cq_{FAM} и значением Cq по каналу ROX (Cq_{ROX}) в мультиплексной ПЦР (ΔCq).

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

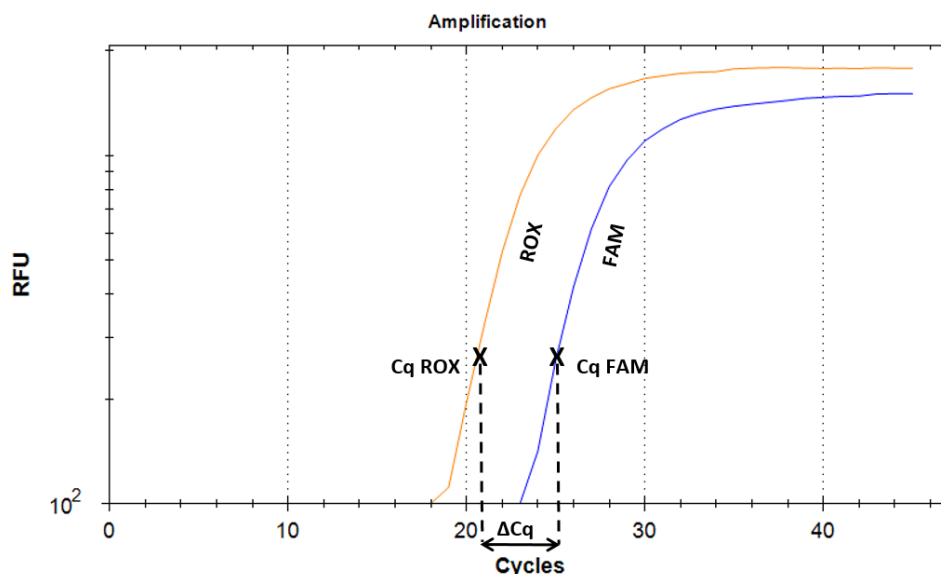


Рисунок 1. Графическое пояснение расчёта ΔCq

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией V600E на фоне ДНК гена *BRAF* без мутаций, 5% ДНК с мутацией V600K на фоне ДНК гена *BRAF* без мутаций, 5% ДНК с мутацией V600R на фоне ДНК гена *BRAF* без мутаций, 5% ДНК с мутацией V600D на фоне ДНК гена *BRAF* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, составляет 20 мкл с концентрацией 0,4 нг/мкл (120 копий гена *BRAF* в 1 мкл) при анализе в дублях, 10 мкл с концентрацией 0,4 нг/мкл при анализе без дублей.

3.2. Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутаций V600E, V600K, V600R, V600D в гене *BRAF* на фоне ДНК гена *BRAF* без мутаций. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации для образцов ДНК, несущих ген *BRAF* без мутаций V600.

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

Различное содержание парафина на срезе (от 33% до 86%) не влияет на результаты определения мутаций гена *BRAF*. Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутаций гена *BRAF*.

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. В испытаниях не выявлено расхождений в определении мутаций V600E, V600K, V600R, V600D гена *BRAF*, значение повторяемости результатов составило 100% (60/60, интервал 94,04-100% 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. В испытаниях не выявлено расхождений в определении мутаций V600E, V600K, V600R, V600D гена *BRAF*, значение воспроизводимости результатов составило 100% (60/60, интервал 94,04-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутаций V600E, V600K, V600R, V600D гена *BRAF* в клинических испытаниях на выборке из 54 образцов, из них 25 отрицательных образцов, составила 100% (интервал 86,28-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.5. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность набора реагентов при выявлении мутаций V600E, V600K, V600R, V600D гена *BRAF* в клинических испытаниях на выборке из 54 образцов, из них 29 положительных образцов, составила 100% (интервал 88,06-100% 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.

Пригодность ДНК для анализа на наличие мутаций V600 гена *BRAF* оценивается по значению C_{qFAM} в контрольной ПЦР. Если в этой реакции величина C_{qFAM} 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 *BRAF* – 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. 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).
4. Некорректная интерпретация результатов ПЦР в случае, когда персонал для определения величин C_q 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.

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 клинко-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 3.5.1.4025-24 «Дезинфектология. Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях. Руководство».
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 Лабораториз, 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°C до 8°C) и морозильной камерами (от минус 18°C до минус 25°C) (например, ATLANT ХМ-6023-031 «ATLANT», Белоруссия).

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 объемом от 0,1 мкл до 1000 мкл (РУ № ФСЗ 2012/12077, «Эксиджен, Инк.», США).

Перчатки медицинские, например, перчатки медицинские диагностические (смотровые) и хирургические одноразовые "Venou" 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: «Экстракт ДНК FFPE набор реагентов для выделения ДНК человека из срезов с FFPE-блоков для диагностики *in vitro*» по 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 реагентов

Контрольную ПЦР-смесь, ПЦР-смесь BRAF-V600mut2, ПКО и ОКО разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 1-2 сек при 1000 об/мин., чтобы собрать всю жидкость на дне пробирок.

ВНИМАНИЕ! После приготовления смесей для ПЦР немедленно поместить оставшиеся реагенты в морозильную камеру с температурой минус 20°C.

ВНИМАНИЕ! Помимо клинических образцов ДНК в каждой постановке необходимо использовать ПКО и ОКО, входящие в состав набора реагентов.

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 А) 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 2.

Таблица 2. 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°C или не более 6 месяцев при температуре минус 20°C.

9 Проведение анализа

9.1 Постановка контрольной ПЦР

9.3.1 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 3, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях это указанное количество необходимо умножить на $(4N + 5)$, без дублей – на $(2N + 3)$.

Таблица 3. Количество реагентов на одну реакцию

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

9.3.2 Контрольную ПЦР-смесь (пробирка №1, зелёная крышка), ПКО (пробирка №4, красная крышка) и ОКО (пробирка №5, белая крышка) разморозить при комнатной температуре (от 18°C до 25°C) или при 37°C, убедиться, что растворы полностью растаяли. Содержимое пробирок перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки.

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

9.3.4 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).

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

9.3.6 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.

9.3.7 Закрывать крышки и перемешать содержимое пробирок, постукивая по стенке (не использовать вортекс).

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

9.3.9 Установить стрипы в блок термоциклера.

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 4.

Таблица 4. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	5 мин	Нет
5	Денатурация	95°C	20 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	40 сек	
45	Денатурация	95°C	20 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	58°C	1 мин	

9.2.3 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации ДНК ВК;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации константного участка гена *BRAF*.

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 C_q : при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот «С1000 Touch» с модулем CFX96 выбрать режим регрессия (regression), при применении амплификатора «ДТпрайм» – геометрический метод.

9.3.2 Проверить значение C_q по каналам FAM и ROX для ПКО и ОКО (таблица 5).

 Таблица 5. Допустимые значения C_q для ПКО и ОКО в контрольной ПЦР

ПЦР	Допустимое значение C_q для образца	
	ПКО	ОКО
Контрольная ПЦР	$C_{qFAM} \leq QC_{FAM}$ (контрольная ПЦР) ¹ $C_{qROX} \leq QC_{ROX}$ (контрольная ПЦР) ¹	C_{qFAM} не определено или $C_{qFAM} > C_{qПКО}^2 + 6$ $C_{qROX} \leq QC_{ROX}$ (контрольная ПЦР) ¹

¹⁾ Значения QC_{ROX} и QC_{FAM} для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов в паспорте качества.

²⁾ $C_{qПКО}$ – значение C_q ПКО в этой же постановке ПЦР.

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

- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и определяется значение C_{qFAM} 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).

Если величины Cq контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ.

9.3.4 Сравнить значения Cq по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов (Cq_{FAM}) и Cq по каналу FAM для ПКО ($Cq_{ПКО}$). Для проведения мультиплексной ПЦР на мутации гена *BRAF* выбрать разведение образца, имеющее значение Cq_{FAM} , наиболее близкое к $Cq_{ПКО}$. Если значение Cq_{FAM} больше $Cq_{ПКО}+4$, то нужно сравнить значение Cq по каналу ROX (Cq_{ROX}) со значением QC_{ROX} (контрольная ПЦР). Рекомендации по анализу значений Cq приведены в таблице 6.

Таблица 6. Анализ значений Cq , полученных в контрольной ПЦР

Cq_{FAM}	Cq_{ROX}	Интерпретация результатов
$Cq_{FAM} < Cq_{ПКО}-4$	Не задано	Необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает Cq на 1 цикл, и повторить анализ.
$Cq_{ПКО}-4 \leq Cq_{FAM} \leq Cq_{ПКО}+4$	Не задано	Концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутаций гена <i>BRAF</i> .
$Cq_{FAM} > Cq_{ПКО}+4$	$Cq_{ROX} > QC_{ROX}$ (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 $Cq_{FAM} > Cq_{ПКО}+4$, то повторить анализ, начиная с этапа выделения ДНК.
	$Cq_{ROX} \leq QC_{ROX}$ (контрольная ПЦР)	Концентрация ДНК недостаточна для анализа. Необходимо повторить анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

9.4 Постановка мультиплексной ПЦР на мутации гена *BRAF*

9.4.1 Рассчитать необходимое количество ПЦР-смеси и Taq ДНК-полимеразы для тестирования клинических образцов ДНК, ОКО и ПКО. Состав реакционной смеси на 1 реакцию приведен в таблице 3, 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°C до 25°C) или при 37°C ПЦР-смесь BRAF-V600mut2 (пробирка №2, 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 одну чистую пробирку объёмом на 1,5 мл для реакционной смеси. Внести в пробирку ПЦР-смесь BRAF-V600mut2. Добавить в пробирку для реакционной смеси Таq ДНК-полимеразу. Перемешать на вортексе 1 раз в течении 3 секунд (или пипетированием 8-10 раз) и центрифугировать 5 секунд в мини-центрифуге, чтобы собрать всю жидкость на дне пробирки. Реакционная смесь готова.

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

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.

ПЦР-смесь	Клинические образцы ДНК						Образцы из набора	
	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
BRAF-	ДНК1	ДНК2	ДНК3	ДНК4	ДНК5	ДНК6	ОКО	ПКО
V600mut2	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 номера образцов ДНК, ПКО, ОКО.

9.4.5 Добавить в стрипы по 20 мкл реакционной смеси с Таq ДНК-полимеразой в соответствии со схемой.

9.4.6 Добавить в пробирки с готовой реакционной смесью:

- по 5 мкл ДНК клинических образцов, 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 Закрывать 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 4.

9.5.2 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации константного участка гена *BRAF*;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации участка гена *BRAF* с мутацией V600 (V600E, V600K, V600R, V600D).

9.5.3 Запрограммировать положение пробирок с клиническими и контрольными образцами.

9.5.4 Запустить протокол ПЦР.

10 Анализ результатов

10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР

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

10.1.2 Проверить значения C_q по каналам FAM и ROX последовательно для ПКО, ОКО (таблица 7) и клинических образцов ДНК.

Таблица 7. Допустимые значения C_q для контрольных образцов

ПЦР	Допустимое значение C_q для образца	
	ПКО	ОКО
BRAF-V600mut2	$C_{qFAM} \leq Q_{CFAM} (BRAF-V600mut2)^1$ $C_{qROX} \leq Q_{CROX} (BRAF-V600mut2)^1$	C_{qFAM} не определено или $C_{qFAM} > C_{qПКО}^2 + 6$ C_{qROX} не определено или $C_{qROX} > C_{qПКО}^2 + 6$

1) Значения Q_{CFAM} и Q_{CROX} для мультиплексной ПЦР для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

2) $C_{qПКО}$ – значение C_q ПКО в этой же постановке ПЦР.

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

- для ПКО в мультиплексной ПЦР на мутации гена *BRAF* наблюдается нарастание флуоресценции по каналам FAM и ROX и определяются значения C_{qFAM} меньше или

равное значению $QC_{FAM (BRAF-V600mut2)}$ и Cq_{ROX} меньше или равное значению $QC_{ROX (BRAF-V600mut2)}$;

– для ОКО в мультиплексной ПЦР на мутации гена *BRAF* не наблюдается нарастание флуоресценции по каналам FAM и ROX и не определяются значения Cq_{FAM} и Cq_{ROX} либо Cq больше $Cq_{ПКО+6}$ ($Cq_{ПКО}$ – 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 Cq не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны.

Возможные проблемы представлены в таблице 8.

Таблица 8. Другие значения Cq контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	Значение Cq	Возможные проблемы
ОКО	$Cq_{FAM} \leq Cq_{ПКО+6}$ $Cq_{ROX} \leq Cq_{ПКО+6}$	Возможна контаминация.
ПКО	$Cq_{FAM} > QC_{FAM (BRAF-V600mut2)}$ $Cq_{ROX} > QC_{ROX (BRAF-V600mut2)}$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

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

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 *BRAF*.

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 *BRAF*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

10.1.9 Для ПКО для 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. Рекомендации по расчёту ΔCq в программе «MS Office Excel» приведены в приложении Б.

10.1.10 Сравнить полученное значение ΔCq ПКО со значением точки отсечения (ТО). Значения ТО для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.1.11 Если рассчитанное значение ΔCq ПКО меньше или равно значению T_0 , то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутаций гена *BRAF* в клинических образцах ДНК.

10.1.12 Если рассчитанное значение ΔCq ПКО больше значения T_0 , необходимо повторить анализ.

10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутаций гена *BRAF*

9.3.1 Для каждого клинического образца рассчитать разницу $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$, где Cq_{FAM} – Cq образца по каналу FAM, Cq_{ROX} – Cq образца по каналу ROX для данной лунки.

9.3.2 Сравнить полученные значения ΔCq каждого клинического образца ДНК со значением T_0 для соответствующего амплификатора.

9.3.3 Образец учитывается как положительный (содержащий мутацию V600E или V600K, V600R, V600D в гене *BRAF*), если значение ΔCq меньше или равно значению T_0 (при анализе в дублях – для обоих повторов).

9.3.4 Образец учитывается как отрицательный, не содержащий мутаций V600E, V600K, V600R, V600D в гене *BRAF* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения, если значение ΔCq больше T_0 , или в мультиплексной ПЦР значение Cq_{FAM} образца не определено; при анализе в дублях – любой из вариантов для обоих повторов или для одного из повторов значение ΔCq больше T_0 , а для другого – значение Cq_{FAM} не определено.

9.3.5 Если при анализе в дублях для одного из повторов значение ΔCq меньше или равно T_0 , а для другого ΔCq больше T_0 или значение Cq_{FAM} образца не определено, 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°C до минус 18°C в течение всего срока годности в холодильниках, обеспечивающих 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°C – не более 30 минут.

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°C до минус 18°C.

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°C до 25°C).

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.

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

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 <i>in vitro</i>		Изготовитель

Библиография

1. 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/braf/> – Загл. с экрана.
2. Mutations of the BRAF gene in human cancer. / H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox et al. // Nature. – 2002. – Vol. 417. – P. 949-954. – DOI: 10.1038/nature00766
3. Tissue-agnostic activity of BRAF plus MEK inhibitor in BRAF V600-mutant tumors / J. J. Adashek, A. K. Menta, N. K. Reddy, et al. // Mol Cancer Ther. – 2022. – Vol. 21 (6). – P. 871-878. – DOI: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0950>
4. F. Pietrantonio, F. Petrelli, A. Coinu, et al. / Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. // Eur J Cancer. – 2015. – Vol. 51 (5). – P. 587–594.
5. Клинические рекомендации «Меланома кожи и слизистых оболочек» / Ассоциация специалистов по проблемам меланомы. Ассоциация онкологов России. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» // Год утверждения (частота пересмотра): 2023. – 140 с.
6. Клинические рекомендации. «Злокачественное новообразование бронхов и легкого» / Ассоциация онкологов России. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии». // Год утверждения (частота пересмотра): 2022. – 114 с.
7. Клинические рекомендации «Дифференцированный рак щитовидной железы» / Ассоциация онкологов России. Общероссийская общественная организация «Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи». Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии». Некоммерческая организация «Ассоциация онкологических организаций Сибири и Дальнего Востока». Ассоциация эндокринных хирургов. Российская ассоциация эндокринологов. Общероссийская общественная организация «Российское общество специалистов по опухолям головы и шеи». // Год утверждения (частота пересмотра): 2024. – 71 с.
8. 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.
9. 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.

Приложение А (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 мм². 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 объемом 1,5 мл и выделить ДНК с помощью набора реагентов для выделения ДНК из FFPE ткани, зарегистрированного на территории РФ.

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

Особенности применения критериев достоверности к ОКО для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96»

Перед экспортом данных в «MS Office Excel» обратить внимание на вид графика амплификации. Если для ОКО график амплификации имеет линейную форму, но при этом определяется значение C_q от 0 до 5, то это указывает на дрейф фонового уровня. В таком случае критерии достоверности для ОКО учитывать не нужно, т.к. этот эффект не связан с наличием контаминации.

На рисунке Б1 показан линейный график с дрейфом фонового уровня и два других графика ПЦР для сравнения. В данном примере график амплификации красного цвета имеет S-образную форму, график зеленого цвета имеет линейную форму, но не превышает фоновый уровень, а график синего цвета (для ОКО) имеет линейную форму и $C_q = 2,5$.

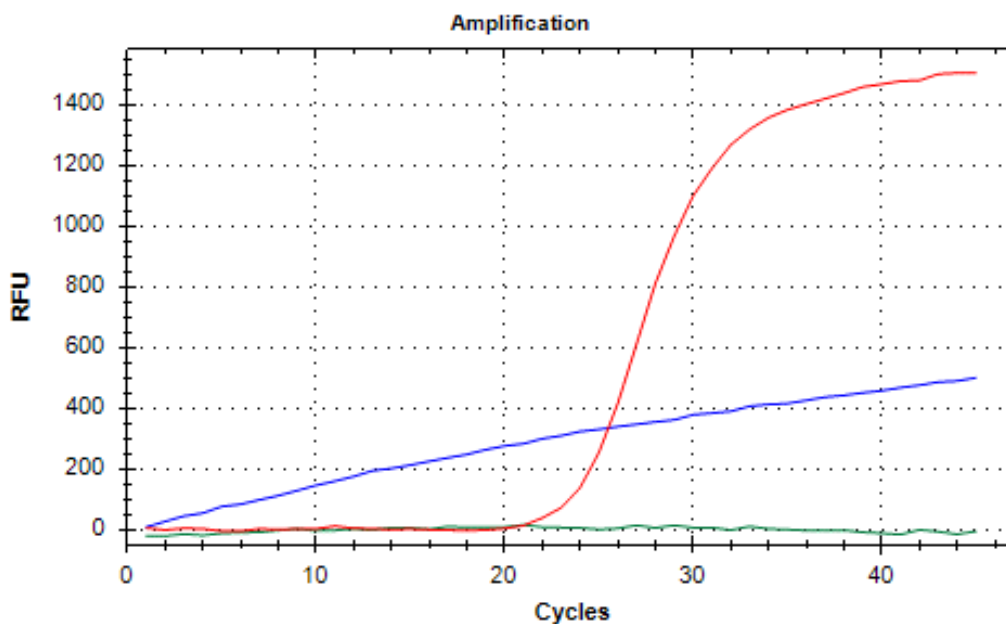


Рисунок Б1. Графики амплификации S-образной и линейной формы

Обработка результатов для термоциклера «С1000 Touch» с модулем «CFX96»

Выбрать режим определения C_q регрессия (regression). Для удобства анализа экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel».

На рисунке Б2 приведён пример расчёта ΔC_q . В столбце «Target» ввести «V600mut2» в ячейки, соответствующие ПЦР со смесью BRAF-V600mut2 (рисунок Б2, элемент 2). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец «Cq_{ROX}», где Cq_{ROX} – значение Cq образца в мультиплексной ПЦР, определяемое по каналу ROX (рисунок Б2, элементы 5). Значения Cq, определяемое по каналу ROX в мультиплексной ПЦР скопировать в столбце «Cq» (рисунок Б2, элемент 4) и вставить в столбец «Cq_{ROX}» (рисунок Б2, элемент 5), таким образом, чтобы значения Cq 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 рассчитать разницу $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$ (рисунок Б2, элемент 6).

Добавить столбец «ТО», внести значение ТО для термоциклера «C1000 Touch» с модулем «CFX96», указанное на упаковке набора реагентов и в паспорте качества (рисунок Б2, элемент 7).

Сравнить полученное значение ΔCq ПКО со значением ТО. Если рассчитанное значение ΔCq ПКО меньше или равно значению ТО, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутаций гена *BRAF* в клинических образцах ДНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔCq клинических образцов ДНК со значением ТО и записать результат (рисунок Б2, элемент 8).

В приведённом на рисунке Б2 примере $ТО = 7,0$.

Для ПКО значения ΔCq составляют 5,5 и 5,6 (меньше значения $ТО = 7,0$), следовательно, можно переходить к анализу результатов ПЦР для клинических образцов ДНК.

Образец ДНК1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутаций V600E или V600K, V600R, V600D в гене *BRAF* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью BRAF-V600mut2 значения ΔCq составляют 14,0 и 13,7 (больше $ТО = 7,0$).

Образец ДНК2 учитывается как положительный, содержащий мутацию V600E или V600K, V600R, V600D в гене *BRAF*, так как в ПЦР со смесью BRAF-V600mut2 значения ΔCq составляют 6,0, что меньше значения $ТО = 7,0$.

1	2	3	4			5	6	7	8	
Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	CqROX	ΔCq	TO	Результат
ROX	V600 Mut 2	Unkn-1	ДНК1	16,9	17,0	0,0				
ROX	V600 Mut 2	Unkn-1	ДНК1	17,0	17,0	0,0				
ROX	V600 Mut 2	Unkn-2	ДНК2	20,8	20,8	0,1				
ROX	V600 Mut 2	Unkn-2	ДНК2	20,9	20,8	0,1				
ROX	V600 Mut 2	NTC-2	ОКО		0,0	0,0				
ROX	V600 Mut 2	NTC-2	ОКО		0,0	0,0				
ROX	V600 Mut 2	Pos Ctrl-2	ПКО	21,0	21,0	0,0				
ROX	V600 Mut 2	Pos Ctrl-2	ПКО	21,1	21,0	0,0				
								ΔCq	TO	
FAM	V600 Mut 2	Unkn-1	ДНК1	30,9	30,8	0,1	16,9	14,0	7,0	Отрицательный
FAM	V600 Mut 2	Unkn-1	ДНК1	30,7	30,8	0,1	17,0	13,7	7,0	Отрицательный
FAM	V600 Mut 2	Unkn-2	ДНК2	26,8	26,8	0,1	20,8	6,0	7,0	Положительный
FAM	V600 Mut 2	Unkn-2	ДНК2	26,8	26,8	0,1	20,9	6,0	7,0	Положительный
FAM	V600 Mut 2	NTC-2	ОКО		0,0	0,0				
FAM	V600 Mut 2	NTC-2	ОКО		0,0	0,0				
FAM	V600 Mut 2	Pos Ctrl-2	ПКО	26,5	26,6	0,2	21,0	5,5	7,0	Положительный
FAM	V600 Mut 2	Pos Ctrl-2	ПКО	26,7	26,6	0,2	21,1	5,6	7,0	Положительный

Рисунок Б2. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на термоциклере с модулем «CFX96»

- 1 – в столбце «Fluor» указан канал регистрации флуоресценции (FAM, ROX).
- 2 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с мультиплексной ПЦР-смесью BRAF-V600mut2.
- 3 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.
- 4 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Cq образцов, регистрируемые по каналу ROX (контроль).
- 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 TO для амплификатора «CFX96».
- 8 – результат анализа на наличие мутаций в гене *BRAF*.

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.

Обработка результатов для амплификатора «ДТпрайм»

Выбрать режим определения C_q – геометрический метод. Экспортировать таблицу данных в программу «MS Office Excel». При необходимости выполнить сортировку и удалить лишние столбцы.

Добавить столбец « ΔC_q ». Используя функцию вычитания, для образца ПКО и для каждого клинического образца рассчитать значение ΔC_q : $\Delta C_q = C_{qFAM} - C_{qROX}$ (рисунок Б3, элемент 5).

Добавить столбец «ТО», внести значение ТО для амплификатора «ДТпрайм» (рисунок Б3, элемент 6).

Сравнить полученное значение ΔC_q ПКО со значением ТО. Если рассчитанное значение ΔC_q ПКО меньше или равно значению ТО, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутаций гена *BRAF* в клинических образцах ДНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔC_q клинических образцов ДНК со значениями ТО и записать результат (рисунок Б3, элемент 7).

1	2	3	4	5	6
id	FAM	ROX	ΔC_q	ТО	Результат
Образец_1	30,4	17,8	12,6	5,2	Отрицательный
Образец_1	30,5	17,8	12,7	5,2	Отрицательный
Образец_2	25,5	21,8	3,7	5,2	Положительный
Образец_2	25,6	21,9	3,7	5,2	Положительный
К+	25,2	22,1	3,1	5,2	Положительный
К+	25,3	21,9	3,4	5,2	Положительный
К-	nd	nd			
К-	nd	nd			

Рисунок Б3. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на амплификаторе «ДТпрайм»

- 1 – в столбце «id» обозначены номера образцов ДНК, ПКО (К+) и ОКО (К-).
- 2 – столбец «FAM», значения C_q образцов по каналу FAM.
- 3 – столбец «ROX», значения C_q образцов по каналу ROX.
- 4 – вычисление значений ΔC_q по формуле $\Delta C_q = C_{qFAM} - C_{qROX}$.
- 5 – значение ТО для амплификатора «ДТпрайм».
- 6 – результат анализа на наличие мутации гена *BRAF*.

Для удобства расчёта значения «-1» заменены на nd (значение не определено).

В приведённом на рисунке Б3 примере $TO = 5,2$.

Для ПКО значения ΔCq составляют 3,1 и 3,4 (меньше значения $TO = 5,2$), следовательно, можно переходить к анализу результатов ПЦР для клинических образцов ДНК.

Образец 1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутаций V600E или V600K, V600R, V600D гена *BRAF* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью BRAF-V600mut2 значения ΔCq составляют 12,6 и 12,7 (больше $TO = 5,2$).

Образец 2 учитывается как положительный, содержащий мутацию V600E или V600K, V600R, V600D гена *BRAF*, так как в ПЦР со смесью BRAF-V600mut2 значения ΔCq составляют 3,7, что меньше значения $TO = 5,2$.

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