



УТВЕРЖДАЮ

Директор

ООО «БИОЛИНК»

 Корниенко А.А.

«17» марта 2025 г.



Набор реагентов для выявления мутации G12C в гене *KRAS*

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

в режиме реального времени

"Real-time-PCR-KRAS-G12C"

по ТУ 20.59.52-017-57201404-2023

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Содержание

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	4
2.5 Принцип действия набора	5
3 Аналитические и диагностические характеристики набора	7
3.1 Предел обнаружения	7
3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ	7
3.3 Характеристики аналитической эффективности	8
3.4 Диагностическая специфичность	8
3.5 Диагностическая чувствительность	8
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 образцов – обработка урацил-ДНК-гликозилазой	13
8.2 Подготовка образцов – приготовление разведений	14
9 Проведение анализа	14
9.1 Постановка контрольной ПЦР	14
9.2 Программирование и запуск амплификатора	16
9.3 Анализ результатов контрольной ПЦР	16
9.4 Постановка мультиплексной ПЦР на мутацию G12C в гене <i>KRAS</i>	18
9.5 Программирование и запуск амплификатора	19
10 Анализ результатов	20
10.1 Критерии достоверности результатов ПЦР	20
10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации G12C в гене <i>KRAS</i>	22

11	Условия хранения, транспортирования и эксплуатации	22
11.1	Условия хранения.....	22
11.2	Условия транспортирования.....	23
11.3	Условия эксплуатации	23
11.4	Условия утилизации.....	23
12	Гарантийные обязательства	24
12.1	Гарантии производителя	24
12.2	Рекламации	24
13	Маркировка	24
	Библиография	25
	Приложение А (рекомендуемое) Рекомендации по выделению ДНК из парафиновых блоков	25
	Приложение Б (рекомендуемое) Рекомендации по анализу данных в программе «MS Office Excel»	27

Введение

Ген *KRAS* кодирует внутриклеточный белок – компонент сигнальных каскадов, контролирующих пролиферацию, выживание и миграцию клеток.

Мутация *KRAS* G12C (NM_004985.5: с.34G>T) приводит к активации пролиферации клеток и встречается в 10-14% случаев немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [1].

Препараты соторасиб и адаграсиб являются селективными ингибиторами мутантного белка *KRAS* G12C и применяются для таргетной терапии НМРЛ у пациентов с мутацией *KRAS* G12C [2-5].

В соответствии с практическими рекомендациями российского общества клинической онкологии RUSSCO «Немелкоклеточный рак лёгкого» и клиническими рекомендациями «Злокачественное новообразование бронхов и легкого» при выявлении неплоскоклеточного (в том числе, диморфного) НМРЛ рекомендовано проведение молекулярно-генетических исследований на наличие активирующих мутаций в зависимости от стадии, в том числе при неоперабельной III стадии и IV стадии – определение мутации *KRAS* («возможный объём тестирования»). При выявлении мутации *KRAS* рекомендуется назначение таргетной терапии. Соторасиб может быть рекомендован в качестве монотерапии взрослых пациентов с распространенным НМРЛ с мутацией *KRAS* G12C при прогрессировании по крайней мере после одной предшествующей линии системной терапии (в т. ч. иммунотерапии) [6-7].

Показания и противопоказания к применению

Показания: набор реагентов рекомендуется к применению у пациентов с немелкоклеточным раком легкого для сопутствующей диагностики: определения показаний к таргетной терапии препаратами соторасиб или адаграсиб. Противопоказания: при применении по назначению специально обученным персоналом противопоказания отсутствуют.

1 Назначение набора

Набор реагентов предназначен для качественного определения мутации G12C в гене *KRAS* методом ПЦР в режиме реального времени. Функциональное назначение: сопутствующая диагностика, определение показаний к таргетной терапии ингибиторами мутантного белка *KRAS* G12C (соторасибом или адаграсибом) у пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

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 мутации G12C в гене *KRAS* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени "Real-time-PCR-KRAS-G12C" по ТУ 20.59.52-017-57201404-2023» (далее по тексту – набор реагентов) представлен в двух вариантах исполнения:

- 1) Набор реагентов на 12 реакций "Real-time-PCR-KRAS-G12C (12)";
- 2) Набор реагентов на 36 реакций "Real-time-PCR-KRAS-G12C (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 <i>KRAS</i> -G12C	280 мкл	840 мкл
3	Синий	Taq ДНК-полимераза	25 мкл	50 мкл
4	Красный	ПКО	65 мкл	190 мкл
5	Белый	ОКО	1.4 мл	4 мл
6	Бесцветный	10x UDG буфер	36 мкл	110 мкл
7	Бесцветный	UDG (урацил-ДНК-гликозилаза)	12 мкл	36 мкл

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

ПЦР-смесь KRAS-G12C – готовая к применению ПЦР-смесь без ДНК-полимеразы для амплификации фрагмента гена *KRAS* с мутацией G12C.

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

ПКО – положительный контрольный образец, содержащий ДНК с фрагментом гена *KRAS* с мутацией G12C 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 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-G12C (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-G12C (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 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

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 фрагмента гена *KRAS* с мутацией G12C. Название мутации G12C в гене *KRAS* согласно номенклатуре HGVS (Human genome variation society): NM_004985.5: c.34G>T (p. Gly12Cys). 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 фрагмент ДНК гена *KRAS* с мутацией G12C и ДНК человека без мутаций в 12-м кодоне 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 мутации в гене *KRAS*.

На первом этапе проводят реакцию с контрольной ПЦР-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 C_q по каналу FAM (C_{qFAM}), соответствующей количеству циклов ПЦР, при котором уровень флуоресценции превышает фоновый. Значения C_{qFAM} разведений клинических образцов ДНК сравнивают с C_{qFAM} ПКО. Для последующей аллель-специфичной ПЦР выбирают разведение образца ДНК, которое имеет наиболее близкую величину C_{qFAM} относительно C_{qFAM} ПКО.

На втором этапе выбранные разведения образцов ДНК анализируют в мультиплексной ПЦР. В аллель-специфичной ПЦР происходит избирательная амплификация фрагмента ДНК гена *KRAS*, содержащего мутацию G12C, за счёт использования праймера, специфичного последовательности ДНК с мутацией. Продукты ПЦР гена *KRAS* с мутацией G12C детектируют в 5'-экзонуклеазной реакции с помощью TaqMan зонда, меченного флуорофором FAM. Для контроля в мультиплексной ПЦР также происходит амплификация константного участка гена *KRAS*. 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 *KRAS* без мутации, на несколько циклов выше, чем величина Cq_{FAM} для образцов ДНК, содержащих ген *KRAS* с мутацией G12C.

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

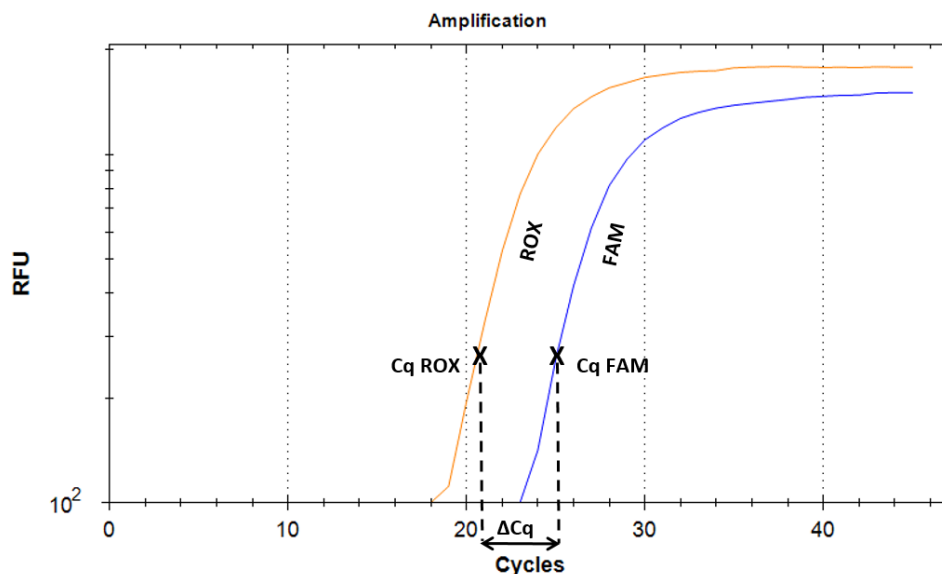


Рисунок 1. Графическое пояснение расчёта ΔCq

3 Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет 5% ДНК с мутацией G12C гена *KRAS* на фоне ДНК гена *KRAS* без мутаций.

Минимальное количество ДНК, необходимое для проведения анализа, при постановке в дублях составляет 20 мкл, при постановке без дублей – 10 мкл с концентрацией 0,2 нг/мкл (60 копий гена *KRAS* в 1 мкл).

3.2 Аналитическая специфичность, влияние интерферирующих веществ

Под аналитической специфичностью понимается способность набора реагентов специфически определять наличие мутации G12C в гене *KRAS* на фоне ДНК гена *KRAS* без мутаций и на фоне ДНК гена *KRAS* с мутациями G12S, G12R, G12V, G12D и G12A. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов

амплификации для образцов ДНК, несущих ген *KRAS* без мутации G12C и для образцов ДНК, несущих ген *KRAS* с мутациями G12S, G12R, G12V, G12D и G12A.

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 мутации G12C гена *KRAS*. Потенциально интерферирующие вещества: гемоглобин (2 мг/мл), ксилол (5%), этанол (5%) – не влияют на результаты определения мутации G12C 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 мутации G12C в гене *KRAS*. Значение повторяемости результатов при определении мутации G12C в гене *KRAS* составило 100% (40/40, интервал 91,19-100% 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 мутации G12C в гене *KRAS*. Значение воспроизводимости результатов при определении мутации G12C в гене *KRAS* составило 100% (40/40, интервал 91,19-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.4 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность набора реагентов при выявлении мутации G12C в гене *KRAS* в клинических испытаниях на выборке из 55 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 мутации G12C в гене *KRAS* в клинических испытаниях на выборке из 55 образцов, из них 28 положительных образцов, составила 100% (интервал 87,66-100% с доверительной вероятностью 95%).

3.6 Ограничения при применении

Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% опухолевых клеток.

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, инаktivация 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 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 клиничко-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 объема, 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 партий.
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 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 (ПУ № 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 (ПУ № 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 (ПУ № 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 (ПУ № 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) (ПУ № 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 (ПУ № ФСЗ 2012/11892, «Эксиджен, Инк.», США).

Штатив, например, изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*. Вариант исполнения 23. Штатив для пробирок, 80 ячеек (ПУ № 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 А.

ВНИМАНИЕ! Для уменьшения риска ложноотрицательных результатов необходимо использовать срезы FFPE ткани, содержащие не менее 30% 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 2, для обработки N образцов указанное количество необходимо умножить на (N+1).

Таблица 2. 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°C. После этого прогреть в течение 5 минут при температуре 95°C, чтобы инактивировать UDG и центрифугировать в течение 3 секунд. ДНК, обработанную UDG, хранить не более суток при температуре 4°C или в течение 6 месяцев при температуре минус 20°C.

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 3.

Таблица 3. 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

9.1.1 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 4, для тестирования N клинических образцов ДНК в двух разведениях в дублях указанное количество необходимо умножить на (4N + 5), без дублей – на (2N + 3).

Таблица 4. 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 №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 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, 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.

9.1.4 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.

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 5.

Таблица 5. Протокол ПЦР в реальном времени

Количество циклов	Этап	Температура	Время	Измерение флуоресценции
1	Первичная активация	95°C	5 мин	Нет
10	Денатурация	95°C	20 сек	
	Отжиг праймеров, элонгация	59°C	40 сек	
40	Денатурация	95°C	20 сек	Да
	Отжиг праймеров, элонгация	59°C	1 мин	

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 C_q : при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот «C1000 Touch» с модулем CFX96 выбрать режим регрессия (regression), при применении амплификатора «ДТпрайм» – геометрический метод.

Проверить значения C_q по каналам FAM для ПКО и ОКО (таблица 6).

Таблица 6. Допустимые значения C_q для ПКО и ОКО в контрольной ПЦР

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

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

²⁾ $C_{q_{ПКО}}$ – значение C_q ПКО в контрольной ПЦР.

9.3.2 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутации в гене *KRAS* 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 $Q_{C_{FAM}}$ (контрольная ПЦР);
- для ПКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение C_{qROX} меньше или равно $Q_{C_{ROX}}$ (контрольная ПЦР);
- для ОКО не наблюдается нарастание флуоресценции по каналу FAM и не определяется значение C_{qFAM} либо C_{qFAM} больше $C_{q_{ПКО}} + 6$ ($C_{q_{ПКО}}$ – значение C_q ПКО в контрольной ПЦР);
- для ОКО наблюдается нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяется значение C_{qROX} меньше или равно $Q_{C_{ROX}}$ (контрольная ПЦР).

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

9.3.3 Сравнить значения C_q по каналу FAM для каждого разведения клинических образцов ДНК (C_{qC}) и C_q ПКО ($C_{q_{ПКО}}$). Для проведения ПЦР на мутацию гена *KRAS* выбрать разведение образца, имеющее значение C_{qC} , наиболее близкое к $C_{q_{ПКО}}$. Если значение C_{qC} по каналу FAM больше $C_{q_{ПКО}} + 4$, то нужно сравнить значение C_q по каналу ROX (C_{qROX}) со значением $Q_{C_{ROX}}$ (контрольная ПЦР). Рекомендации по анализу полученных значений C_q приведены в таблице 7.

Таблица 7. Анализ значений C_q , полученных в контрольной ПЦР

C_{qFAM}	C_{qROX}	Интерпретация результатов
$C_{qC} < C_{q_{ПКО}} - 4$	Не задано	Необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает C_q на 1 цикл, и повторить анализ.

Cq_{FAM}	Cq_{ROX}	Интерпретация результатов
$Cq_{ПКО-4} \leq Cq_C \leq Cq_{ПКО+4}$	Не задано	Концентрация ДНК оптимальна для анализа на наличие мутации G12C в гене KRAS.
$Cq_C > Cq_{ПКО+4}$	$Cq_{ROX} > Q_{C_{ROX}}$ (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.
	$Cq_{ROX} \leq Q_{C_{ROX}}$ (контрольная ПЦР)	Концентрация ДНК не достаточна для анализа. Необходимо повторить анализ, начиная с этапа выделения ДНК.

9.4 Постановка мультиплексной ПЦР на мутацию G12C в гене KRAS

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 4, 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 KRAS-G12C (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 1,5 мл для реакционной смеси. Внести в пробирку ПЦР-смесь KRAS-G12C, добавить 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 пробирки. 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 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
KRAS-G12C	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-смесь, номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.

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 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 5.

9.5.2 Выбрать каналы для регистрации флуоресценции:

- ROX – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *KRAS* без мутации;
- FAM – регистрация сигнала при амплификации фрагмента гена *KRAS* с мутацией G12C.

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 ROX и FAM последовательно для ПКО, ОКО (таблица 8) и клинических образцов ДНК.

Таблица 8. Допустимые значения C_q для контрольных образцов

ПЦР	Допустимое значение C_q для образца	
	ПКО	ОКО
KRAS-G12C	$C_{qFAM} \leq Q_{C_{FAM}} \text{ (ПЦР G12C)}^1$ $C_{qROX} \leq Q_{C_{ROX}} \text{ (ПЦР G12C)}^1$	C_{qFAM} не определено или $C_{qFAM} > C_{q_{ПКО}}^2 + 6$ C_{qROX} не определено или $C_{qROX} > C_{q_{ПКО}}^2 + 6$

¹⁾ Значение $Q_{C_{FAM}}$ и $Q_{C_{ROX}}$ для мультиплексной ПЦР для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

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

10.1.3 Результаты ПЦР считаются достоверными и могут быть использованы для анализа на наличие мутации G12C в гене *KRAS* только в том случае, если величины C_q для ПКО и ОКО имеют допустимые значения:

- для ПКО в мультиплексной ПЦР наблюдается нарастание флуоресценции по каналам FAM и ROX и определяются значения C_{qFAM} меньше или равное значению $Q_{C_{FAM}} \text{ (ПЦР G12C)}$ и C_{qROX} меньше или равное значению $Q_{C_{ROX}} \text{ (ПЦР G12C)}$;
- для ОКО в мультиплексной ПЦР не наблюдается нарастание флуоресценции по каналам FAM и ROX и не определяются значения C_{qFAM} и C_{qROX} либо C_q больше $C_{q_{ПКО}} + 6$ ($C_{q_{ПКО}}$ – значение C_q ПКО в этой же постановке ПЦР).

10.1.4 Если величины C_q контрольных образцов выходят за пределы допустимых значений, то необходимо повторить анализ. Если после повторного анализа значения C_q не соответствуют допустимым пределам, то результаты анализа не валидны. Возможные проблемы представлены в таблице 9.

Таблица 9. Другие значения C_q контрольных образцов и возможные проблемы

Образец	Значение C_q	Возможные проблемы
ОКО	$C_{qFAM} \leq C_{qPKO}+6$ $C_{qROX} \leq C_{qPKO}+6$	Возможна контаминация.
ПКО	$C_{qFAM} > Q_{C_{FAM}} (ПЦР\ G12C)$ $C_{qROX} > Q_{C_{ROX}} (ПЦР\ G12C)$	Возможны ошибки постановки ПЦР, наличие ингибиторов, деградация ПЦР-смеси и/или деградация ПКО.

10.1.5 Для каждого клинического образца в ПЦР на мутацию G12C в гене *KRAS* должно наблюдаться нарастание флуоресценции по каналу ROX и определяться значение C_q (C_{qROX}). По каналу ROX происходит регистрация флуоресценции продуктов амплификации константного участка гена *KRAS*.

10.1.6 Если значение C_{qROX} определяется в диапазоне $C_{qPKO}-4 \leq C_{qROX} \leq C_{qPKO}+4$, то концентрация ДНК достаточна для анализа на наличие мутации G12C в гене *KRAS*.

10.1.7 Если значение C_{qROX} меньше $C_{qPKO}-4$, то необходимо развести ДНК, принимая, что двукратное разведение увеличивает C_q на 1 цикл, и повторить анализ.

10.1.8 Если значение C_{qROX} больше $C_{qPKO}+4$, то концентрация ДНК не достаточна для анализа на наличие мутации G12C в гене *KRAS*. Необходимо провести повторный анализ, начиная с этапа выделения ДНК из срезов FFPE опухолевой ткани.

10.1.9 Для ПКО для мультиплексной ПЦР-смеси *KRAS*-G12C рассчитать значение ΔC_q : $\Delta C_q = C_{qFAM} - C_{qROX}$, где C_{qFAM} – C_q ПКО по каналу FAM, C_{qROX} – C_q ПКО по каналу ROX для данной лунки и данной ПЦР-смеси. Рекомендации по расчёту ΔC_q в программе «MS Office Excel» приведены в приложении Б.

10.1.10 Сравнить полученные значения ΔC_q ПКО со значением точки отсечения (ТО) для соответствующего амплификатора. Значения ТО для каждого амплификатора указаны на упаковке набора реагентов и в паспорте качества.

10.1.11 Если рассчитанное значение ΔC_q ПКО меньше или равно значению ТО, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутации в гене *KRAS* в клинических образцах ДНК.

10.1.12 Если рассчитанное значение ΔC_q ПКО больше значения ТО, необходимо повторить анализ.

10.2 Анализ результатов ПЦР на наличие мутации G12C в гене *KRAS*

10.2.1 Для каждого клинического образца для ПЦР-смеси *KRAS*-G12C 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.

10.2.2 Сравнить полученные значения ΔCq каждого клинического образца ДНК со значением TO для соответствующего амплификатора.

10.2.3 Образец учитывается как положительный, содержащий мутацию G12C в гене *KRAS*, если значение ΔCq меньше или равно значению TO (при анализе в дублях – для обоих повторов).

10.2.4 Образец учитывается как отрицательный, не содержащий мутацию G12C в гене *KRAS* или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения, если значение ΔCq больше TO 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 TO , 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 TO , а для другого ΔCq больше TO 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, 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°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

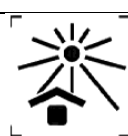
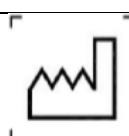
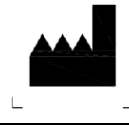
Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действий третьих лиц, либо обстоятельств непреодолимой силы.

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 партии
	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. Characterization of KRAS Mutation Subtypes in Non-small Cell Lung Cancer / J. Judd, N. Abdel Karim, H. Khan, et al. // Mol Cancer Ther. – 2021. – Vol. 20 (12) – P. 2577-2584. – DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0201
2. FDA Approval Summary: Sotorasib for KRAS G12C-Mutated Metastatic NSCLC / E. C. Nakajima, N. Drezner, X. Li, et al. // Clin Cancer Res. – 2022. – Vol. 28 (8) – P. 1482-1486. – DOI: 1078-0432.CCR-21-3074
3. KRAS-мутированный немелкоклеточный рак легкого: новые стратегии терапии / Лактионов К.К., Саранцева К.А., Нелюбина Л.А., и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2024. – Т. 23 № 2 – С. 72-81. – DOI: 1814-4861-2024-23-2-72-81
4. Sotorasib for Lung Cancers with *KRAS* p.G12C Mutation / F. Skoulidis, B. T. Li, G. K. Dy, et al. // N Engl J Med. – 2021. – Vol. 384 (25) – P. 2371-2381. – DOI: NEJMoa2103695
5. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a *KRAS*^{G12C} Mutation / P. A. Jänne, G. J. Riely, S. M. Gadgeel, et al. // N Engl J Med – 2022. – Vol. 387 (2) – P. 120-131. – DOI: NEJMoa2204619
6. Немелкоклеточный рак легкого. Практические рекомендации RUSSCO, часть 1.1. Злокачественные опухоли 2024/ Лактионов К. К., Артамонова Е. В., Бредер В. В. и соавт. // Злокачественные опухоли. – 2024. – Т. 14. №4. – С. 65-104. – DOI: 2224-5057-2024-14-3s2-1.1-04
7. Клинические рекомендации. «Злокачественное новообразование бронхов и лёгкого». / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России», Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии» // Год утверждения (частота пересмотра): 2025 – 114 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 30% 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.

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

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

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

На рисунке Б1 приведён пример расчёта ΔC_q . В столбце «Target» ввести «KRAS G12C» в ячейки, соответствующие ПЦР-смеси KRAS-G12C (рисунок Б1, элемент 2). При необходимости выполнить сортировку.

Добавить новый столбец « $C_{q_{ROX}}$ », где $C_{q_{ROX}}$ – значение C_q образца в мультиплексной ПЦР, определяемое по каналу ROX (рисунок Б1, элемент 5). Значения C_q , регистрируемое по каналу ROX в мультиплексной ПЦР скопировать в столбце « C_q » (рисунок Б1, элемент 4) и вставить в столбец « $C_{q_{ROX}}$ » (рисунок Б1, элемент 5), таким образом, чтобы значения C_q и $C_{q_{ROX}}$ для каждой лунки находились в одной строке, соответствующей этой лунке.

Добавить столбец « ΔC_q ». Используя функцию вычитания, для образца ПКО и для каждого клинического образца рассчитать разницу $\Delta C_q = C_{q_{FAM}} - C_{q_{ROX}}$ (рисунок Б1, 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 Б1, элемент 7).

Сравнить полученные значения ΔC_q ПКО со значением ТО. Если рассчитанные значения ΔC_q ПКО меньше или равны значению ТО, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутации в гене *KRAS* в клинических образцах ДНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔC_q клинических образцов ДНК со значением ТО и записать результат (рисунок Б1, элемент 8).

В приведённом на рисунке Б1 примере $ТО = 7,7$.

Для ПКО значения ΔC_q составляют 6,4 и 6,0 (меньше значения $ТО = 7,7$), следовательно, можно переходить к анализу результатов ПЦР для клинических образцов ДНК.

Образец ДНК1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутацию G12C в гене *KRAS* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью KRAS-G12C значения ΔC_q составляют 13,5 и 14,5 (больше $ТО = 7,7$).

Образец ДНК2 учитывается как положительный, содержащий мутацию G12C в гене *KRAS*, так как в ПЦР со смесью KRAS-G12C значения ΔCq составляют 5,6 и 5,7, что меньше значения $TO = 7,7$.

1	2	3	4	5	6	7	8
Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Результат
ROX	KRAS G12C	NTC-1	ОКО		0,0	0,0	
ROX	KRAS G12C	NTC-1	ОКО		0,0	0,0	
ROX	KRAS G12C	Unkn-1	ДНК1	13,6	13,6	0,0	
ROX	KRAS G12C	Unkn-1	ДНК1	13,6	13,6	0,0	
ROX	KRAS G12C	Unkn-2	ДНК2	19,7	19,7	0,0	
ROX	KRAS G12C	Unkn-2	ДНК2	19,7	19,7	0,0	
ROX	KRAS G12C	Pos Ctrl-1	ПКО	16,4	16,3	0,1	
ROX	KRAS G12C	Pos Ctrl-1	ПКО	16,3	16,3	0,1	
FAM	KRAS G12C	NTC-1	ОКО		0,0	0,0	
FAM	KRAS G12C	NTC-1	ОКО		0,0	0,0	
FAM	KRAS G12C	Unkn-1	ДНК1	27,1	27,6	0,7	Отрицательный
FAM	KRAS G12C	Unkn-1	ДНК1	28,1	27,6	0,7	Отрицательный
FAM	KRAS G12C	Unkn-2	ДНК2	25,3	25,4	0,1	Положительный
FAM	KRAS G12C	Unkn-2	ДНК2	25,4	25,4	0,1	Положительный
FAM	KRAS G12C	Pos Ctrl-1	ПКО	22,8	22,5	0,3	Положительный
FAM	KRAS G12C	Pos Ctrl-1	ПКО	22,3	22,5	0,3	Положительный

Рисунок Б1. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на термоциклере с модулем «CFX96»

- 1 – в столбце «Fluor» указан канал регистрации флуоресценции (ROX, FAM).
- 2 – в столбце «Target» обозначены ячейки, соответствующие ПЦР с мультиплексной ПЦР-смесью KRAS-G12C.
- 3 – в столбце «Sample» обозначены номера образцов ДНК, ОКО и ПКО.
- 4 – столбец «Cq», откуда скопированы значения Cq, регистрируемые по каналу ROX (контроль).
- 5 – столбец Cq_{ROX} , в который вставлены значения Cq из столбца «Cq».
- 6 – значение ΔCq вычисленное по формуле $\Delta Cq = Cq_{FAM} - Cq_{ROX}$.
- 7 – значения TO для мутации G12C для амплификатора «CFX96».
- 8 – результат анализа на наличие мутации G12C 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.

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 Б2, элемент 4).

Добавить столбец «ТО», внести значение ТО для амплификатора «ДТпрайм», указанное на упаковке набора реагентов и в паспорте качества (рисунок Б2, элемент 5).

Сравнить полученные значения ΔC_q ПКО со значением ТО. Если рассчитанные значения ΔC_q ПКО меньше или равно значению ТО, то можно переходить к анализу результатов ПЦР на наличие мутации в гене *KRAS* в клинических образцах ДНК.

Добавить столбец «результат». Сравнить значения ΔC_q клинических образцов ДНК со значением ТО и записать результат (рисунок Б2, элемент 6).

1	2	3	4	5	6
ID	FAM	ROX	ΔC_q	ТО	Результат
Образец_1	27,6	13,7	13,9	7,9	Отрицательный
Образец_1	29,8	13,6	16,2	7,9	Отрицательный
Образец_2	26,2	20,4	5,8	7,9	Положительный
Образец_2	25,8	20,3	5,5	7,9	Положительный
К+	22,8	16,8	6,0	7,9	Положительный
К+	22,5	16,8	5,7	7,9	Положительный
К-	nd	nd			
К-	nd	nd			

Рисунок Б2. Обработка в программе «MS Office Excel» данных, полученных на амплификаторе «ДТпрайм», на примере ПЦР-смеси KRAS-G12C

- 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 G12C в гене *KRAS*.

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

В приведённом на рисунке Б2 примере $TO = 7,9$.

Для ПКО значения ΔCq составляют 6,0 и 5,7 (меньше значения $TO = 7,9$), следовательно, можно переходить к анализу результатов ПЦР для клинических образцов ДНК.

Образец 1 учитывается как отрицательный, то есть, не содержащий мутацию G12C в гене *KRAS* (или концентрация мутантного аллеля менее предела обнаружения), поскольку в ПЦР со смесью KRAS-G12C значения ΔCq составляют 13,9 и 16,2 (больше $TO = 7,9$).

Образец 2 учитывается как положительный, содержащий мутацию G12C в гене *KRAS*, так как в ПЦР со смесью KRAS-G12C значения ΔCq составляют 5,8 и 5,5, что меньше значения $TO = 7,9$.

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