ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

1166 2026-04-08

IVD

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения соматических мутаций
в гене BRAF (V600, V600E и V600K) методом ПЦР в режиме реального времени

BRAF 3

Регистрационный номер
ЕРУЛ Г004-00110-00/04717587 от 03.04.2026

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ 5
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 7
2.1 Состав набора реагентов 7
2.2 Количество анализируемых образцов 7
2.3 Принцип метода 8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 10
3.1 Аналитическая специфичность 10
3.2 Интерферирующие вещества 12
3.3 Предел обнаружения 13
3.4 Диагностические характеристики 14
3.5 Воспроизводимость 14
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 15
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 17
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ 19
6.1 Материал для исследования 19
6.2 Общие требования 19
6.3 Взятие материала на исследование 20
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала 20
6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК 20
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 21
7.1 Выделение ДНК 21
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S 21
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование 24
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим 26
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ 28
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 28
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ 29
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ 30
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ 30
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ 30
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ 31
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ И НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ 32
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ 33
Приложение А 34
Приложение Б 35
Приложение В 38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

BRAF	- протоонкоген семейства серин/треониновых протеинкиназ
МАРК	- от англ. mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа
ERK	- от англ. extracellular signal-regulated kinase, киназа, регулируемая внеклеточным сигналом
МЕК	- от англ. MAPK/ERK kinase, киназа MAPK/ERK – каскада
RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВК	- внутренний контроль
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
К–	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
КВМ	- контроль взятия материала
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
МА	- мутантный аллель
НИОКР	- научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РНКазы	- рибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Протоонкоген BRAF принадлежит семейству серин/треониновых протеинкиназ RAF, участвует в регуляции MAPK/MEK-ERK сигнальных каскадов, контролирующих рост, пролиферацию и дифференцировку клеток. Мутации в этом гене, чаще всего мутация V600E, приводят к неконтролируемому делению клеток и характерны для меланом, колоректального рака, рака легкого, рака щитовидной железы, волосатоклеточного лейкоза и неходжинской лимфомы [1]. Мутации в гене BRAF также встречаются при глиобластоме, холангиокарциноме, раке почки, раке мочевого пузыря, плоскоклеточном раке головы и шеи, раке простаты, раке эндометрия, раке яичников, раке молочной железы, раке шейки матки, раке желудка и других типах опухолей [2]. Полагают, что возникновение соматической мутации в гене BRAF может, как инициировать неопластическую трансформацию, так и способствовать адаптации и инвазии опухолевых клеток [3].

Тестирование на наличие активирующей мутации в гене BRAF показано для отбора пациентов на терапию низкомолекулярными ингибиторами мутированного белка BRAF (вемурафениб, дабрафениб, энкорафениб) при меланоме, немелкоклеточном раке легких, анапластическом раке щитовидной железы и колоректальном раке. Опухоли с мутациями BRAF V600 также чувствительны к ингибиторам MEK. Двойное ингибирование MAPK/MEK-ERK сигнальных каскадов, которое достигается при одновременном использовании ингибиторов BRAF и MEK (кобиметиниб, траметиниб, биниметиниб), обладает более высокой эффективностью по сравнению с BRAF-ингибированием в монорежиме [4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Poulikakos P.I, Sullivan R.J, Yaeger R. Molecular Pathways and Mechanisms of BRAF in Cancer Therapy. Clin Cancer Res. 2022 Nov 1; 28(21):4618–4628. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-2138.
2. Zehir A. et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. Nat Med. 2017 Jun; 23(6):703–713. doi: 10.1038/nm.4333. Epub 2017 May 8.
3. Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M, Rutkowski P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. Int J Mol Sci. 2020; 21(13): 4576.
4. Robert C, et al. Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma. New England Journal of Medicine. 2019; Vol.381, №7, P.626–636.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для определения соматических мутаций в гене BRAF (V600, V600E и V600K) методом ПЦР в режиме реального времени (BRAF 3), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для определения соматических мутаций V600 в гене BRAF с дифференциацией мутаций V600E и V600K в препаратах ДНК, полученных из фиксированных в формалине парафинизированных образцов солидных опухолей, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с целью подбора таргетной терапии низкомолекулярными BRAF и MEK-ингибиторами.

1.3 Функциональное назначение: сопутствующая диагностика.

1.4 Показания к проведению исследования: подбор препаратов для таргетной терапии низкомолекулярными ингибиторами мутированного белка BRAF (вемурафениб, дабрафениб, энкорафениб) и MEK-ингибиторами (кобиметиниб, траметиниб, биниметиниб). Диагностика мутаций в гене BRAF должна осуществляться строго в соответствии с рекомендациями Минздрава РФ. Тестирование мутаций в гене BRAF направлено на определение показаний для назначения таргетной терапии BRAF- и MEK-ингибиторами и предусмотрено при метастатической меланоме кожи III/IV стадии (КР 546_3), колоректальном раке (КР 396_3 и КР 554_3), немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) IV стадии (КР 30_4), анапластическом раке щитовидной железы (КР 329_2), метастатических гастроинтестинальных стромальных опухолях (ГИСО) дикого типа по KIT/PDGFRA/SDH для назначения дополнительной терапии (дабрафениб) или при планировании неоадъювантной терапии иматинибом пациентов с местно-распространенными ГИСО (опухоли в пищеводе, кардии, 12-перстной или прямой кишке с BRAF мутацией резистентны к иматинибу) (КР 551_3), при аденокарциномах невыявленной первичной локализации (КР 893_1). При рецидивных неоперабельных или метастатических опухолях слюнных желез, рефрактерных к стандартным режимам химиотерапии, при наличии подтверждённой мутации в гене BRAF рекомендована таргетная терапия ингибиторами BRAF до прогрессирования или непереносимой токсичности (КР 116_2). При плеоморфной ксантоастроцитоме при наличии мутации V600 BRAF вопрос о проведении таргетной терапии решается индивидуально консилиумом (КР 578_1). При метастатическом поражении головного мозга при ЗНО первичных локализаций с BRAF-мутацией (меланома, рак легкого и пр.) системная противоопухолевая лекарственная терапия проводится на основании гистологической и молекулярной характеристик первичной опухоли и с учетом предшествующего лечения (КР 534_3). При карциноме поджелудочной железы при отсутствии мутации в гене KRAS и выявлении мутации BRAF возможно применение анти-BRAF терапии во второй и более линии лечения (КР 355_5). При холангиокарциноме применение молекулярно-направленной терапии в настоящее время не носит обязательного характера, но может быть рекомендовано по исчерпании стандартных терапевтических опций по решению консилиума, в случае HER2-позитивной

внутрипеченочной холангиокарциноме и раке желчного пузыря при ко-мутации BRAF/RAS отмечено значимое снижение эффективности анти-HER2 терапии (КР 495_2).
Противопоказаний к применению нет.

1.5 Популяционные и демографические аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6 Область применения: набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории: врач клинико-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник).

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-H486-S3/4, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная, розовая или голубая жидкость под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	50 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-H486-UA/4, фасовка U			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации BRAF 3.1	Прозрачная голубая жидкость	1 пробирка	300 мкл
Смесь для амплификации BRAF 3.2	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	300 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
Положительный контрольный образец[1]	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

Комплектность:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.
- Инструкция по применению – 1 экз.
- Вкладыш – 1 экз.
- Паспорт – 1 экз.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 48 определений (не более 12 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

[1] – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

Набор реагентов в фасовке U рассчитан на проведение 48 определений (не более 10 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

2.3 Принцип метода

Метод: полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени. Качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании технологии аллель-специфичной амплификации ДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. «Горячий» старт обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами. Активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С. Это исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при более низких температурах.

В реакционную смесь для проведения ПЦР введены отдельные или ковалентно связанные с праймером ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических продуктов амплификации. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

Условия реакции и используемые олигонуклеотиды подобраны таким образом, чтобы наиболее эффективно обеспечить амплификацию на матрице мутантного аллеля. Значение порогового цикла Ср на матрице мутантного аллеля значительно опережает фоновую амплификацию на матрице нормального аллеля дикого типа – от 8,5 циклов в зависимости от аналита.

Помимо аллель-специфичных к мутантным аллелям гена BRAF олигонуклеотидов в реакционную смесь добавлены праймеры и ДНК-зонды для определения консервативного фрагмента ДНК гена BRAF (КВМ), который используется для контроля прохождения полимеразной цепной реакции. Для определения мутации используется показатель разницы индикаторных циклов мутантного аллеля (МА) и КВМ (dCp = Ср МА – Ср КВМ): значение dCp менее порогового значения фоновой амплификации свидетельствует о наличии мутации.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации мутантных аллелей гена BRAF, включены флуоресцентные метки Fam и Hex.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации фрагмента ДНК гена BRAF (КВМ), входит флуоресцентный краситель Cy5.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок и биоматериала, необходимого для проведения исследования, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Для контроля расположения стрипов в термоблоке детектирующего амплификатора в определенную пробирку набора реагентов добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер».

Он используется детектирующим амплификатором для определения положения стрипа в термоблоке. После прохождения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение (при неправильном расположении стрипа), то предупреждает оператора о несоответствии.

Для оценки валидности полученных результатов учитывают показатель контроля взятия материала (КВМ).

В таблице 1 представлены перечень выявляемых мутаций в гене BRAF, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая маркировка.

Таблица 1 – Перечень выявляемых мутаций в гене BRAF, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая маркировка

Фасовка S	**Фасовка U**	**Канал детекции**				**Цветовая маркировка смеси для амплификации**
№ пробирки в стрипе	Смесь для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1, 3, 5, 7	BRAF 3.1	V600*	–	Маркер	КВМ	Голубая
2, 4, 6, 8	BRAF 3.2	V600E**	V600K	–	КВМ	Бесцветная или розовая
* – определение мутаций в 600 кодоне (V600E, V600Ec, V600K, V600D, V600Dc, V600R, V600G, V600M без дифференциации) ** – определение мутаций V600E и V600Ec без дифференциации						

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов BRAF 3.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В таблице 2 приведен перечень мутаций в гене BRAF, выявляемых с помощью набора реагентов BRAF 3.

Таблица 2 – Перечень мутаций в гене BRAF, выявляемых с помощью набора реагентов BRAF 3

Тривиальное название мутации	Экзон	Наименование мутации (номенклатура HGVS)*	Cosmic ID	NIH ID
V600 (без дифференциации)				
V600E	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1799T>A (p.Val600Glu)	COSM476	rs113488022
	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1799_1800delinsAA (p.Val600Glu)**	COSM475	rs121913377
V600K	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1798_1799delinsAA (p.Val600Lys)	COSM473	rs121913227
V600D	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1799_1800delinsAT (p.Val600Asp)	COSM477	rs121913377
	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1799_1800delinsAC (p.Val600Asp)***	COSM308550	rs121913377
V600G	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1799T>G (p.Val600Gly)	COSM6137	rs113488022
V600R	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1798_1799delinsAG (p.Val600Arg)	COSM474	rs121913227
V600M	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1798G>A (p.Val600Met)	COSM1130	rs121913378
V600E				
V600E	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1799T>A (p.Val600Glu)	COSM476	rs113488022
	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1799_1800delinsAA (p.Val600Glu)**	COSM475	rs121913377
V600K				
V600K	15	NM_004333.6 (BRAF): c.1798_1799delinsAA (p.Val600Lys)	COSM473	rs121913227

Примечание к таблице:
* – https://hgvs-nomenclature.org/
** – Данную мутацию также обозначают как V600E(complex) или V600Ec
*** – Данную мутацию также обозначают как V600D(complex) или V600Dc

3.1.1 Перекрестная реактивность (неспецифическая или фоновая амплификация)

Ввиду высокой гомологии нуклеотидных последовательностей аналитов, выявляемых набором реагентом, возможна фоновая амплификация неспецифических аналитов, т.е. получение экспоненциального роста флуоресценции для неспецифической матрицы.

Фоновая амплификация возможна на матрице как нормальных (3.1.1.1), так и мутантных (3.1.1.2) аллелей.

Фоновая амплификация учитывается при анализе результатов исследования.

3.1.1.1 Перекрёстная реактивность на матрицу нормальных аллелей

Выявлена слабая перекрестная реактивность (фоновая амплификация) на матрицу нормальных аллелей. Для контроля фоновой амплификации на матрице нормальных аллелей используется показатель Ср КВМ.

После завершения реакции амплификации программное обеспечение для детектирующих амплификаторов определяет индикаторные циклы (Ср) по заявленным каналам детекции для мутантных аллелей (Fam, Hex) и КВМ (Cy5). При определении мутации учитывают наличие амплификации (Ср) и разницу индикаторных циклов мутантного аллеля (МА) и КВМ (dCp = Ср МА – Ср КВМ).

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК мутантного аллеля гена BRAF, значение dCp должно быть менее порогового значения (таблица 3), что позволяет сделать заключение о наличии мутации.

В связи с погрешностью метода ПЦР для показателя dCp предусмотрено наличие «серой зоны» в пределах 0,5 цикла, для которой статус мутации не определен (таблица 3).

В образцах биологического материала человека, не содержащих ДНК мутантного аллеля гена BRAF значение dCp должно быть более порогового значения dCp «серой зоны» (таблица 3), что позволяет сделать заключение об отсутствии мутации.

Алгоритмы определения статуса аллелей на основании значений индикаторных циклов (Ср) приведены в Приложении Б.

Таблица 3 – Пороговые значения dCp для определения мутации

Аналит	**Диапазон Ср КВМ (фасовка S/U)**	**dCp = Ср МА – Ср КВМ**		
		Мутация	«Серая зона»	Нет мутации
V600	S: Ср КВМ ≤ 31 U: Ср КВМ ≤ 30	< 9,5	9,5 – 10,0	> 10,0
	S: 31 < Ср КВМ ≤ 34 U: 30 < Ср КВМ ≤ 33	< 8,5	8,5 – 9,0	> 9,0
V600E	S: Ср КВМ ≤ 31 U: Ср КВМ ≤ 30	< 11,5	11,5 – 12,0	> 12,0
	S: 31 < Ср КВМ ≤ 34 U: 30 < Ср КВМ ≤ 33	< 10,5	10,5 – 11,0	> 11,0
V600K	S: Ср КВМ ≤ 31 U: Ср КВМ ≤ 30	< 11,5	11,5 – 12,0	> 12,0
	S: 31 < Ср КВМ ≤ 34 U: 30 < Ср КВМ ≤ 33	< 10,5	10,5 – 11,0	> 11,0

3.1.1.2 Перекрестная реактивность на матрицу других мутантных аллелей

Возможна перекрестная реактивность (фоновая амплификация) на матрицу других (неспецифических) мутантных аллелей, т.е. при выявлении специфического аналита также может наблюдаться экспоненциальный рост флуоресценции для неспецифического (другого) мутантного аллеля. Однако для фоновой амплификации всегда характерны бóльшие значения индикаторных

циклов, чем для специфического аналита V600 (таблица 4). Для контроля фоновой амплификации на матрице других мутантных аллелей используют показатель Ср V600 и рассчитывают dCp для двух аналитов (таблица 4).

Таблица 4 – Фоновая перекрестная реактивность на другие мутантные аллели

Совместная амплификации	dCp	Пороговое значение dCp (возможная мутация V600)	Заключение
V600 и V600E	Ср(V600E) – Ср(V600)	> 3,5 (V600G или V600R)	Обнаружена мутация V600, отличная от V600E и V600K
		≤ 3,5	Обнаружена V600E
V600 и V600K	Ср(V600K) – Ср(V600)	> 3,5 (V600R)	Обнаружена мутация V600, отличная от V600E и V600K
		≤ 3,5	Обнаружена V600K

Таким образом, положительное заключение о наличии мутации выдается для аналита с наименьшим значением индикаторного цикла. Заключение о наличии второй мутации выдается только в случае, если dCp для двух аналитов не превышает 3,5 цикла.

Пример:

В неизвестном образце значение dCp для аналитов V600 и V600E составляет 7 циклов (Ср V600E – Ср V600 = 7), следует выдать заключение о наличии только мутации V600.

3.1.2 Влияние близкородственных генов

В качестве контроля фоновой амплификации на матрице нормальных аллелей гена BRAF использовались образцы геномной ДНК, полученной из периферической крови условно-здоровых доноров (отрицательные контрольные образцы). Указанная ДНК человека содержит ДНК близкородственных генов, в частности BRAFP1 (псевдоген), ARAF, RAF1. Мутации в гене BRAF в исследованных образцах не выявлены. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии ложноположительных результатов вследствие фоновой амплификации на матрице нормальных аллелей не только гена BRAF, но и других близкородственных генов.

3.1.3 Влияние микроорганизмов

Добавление на стадии выделения ДНК культур микроорганизмов *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Klebsiella* spp. и *Serratia marcescens* в концентрации $1{,}0 \times 10^6$ КОЕ/мл к образцам, содержащим аллели мутантного и дикого типа, не повлияло на результаты исследования с использованием набора реагентов.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (недостоверных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является отсутствие амплификации КВМ по каналу детекции Cy5 (Ср для КВМ не указан).

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, по результатам анализа рисков и проведения НИОКР отнесены следующие вещества: гемоглобин и меланин, присутствующий в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из образца биоматериала, содержащего примесь крови и пигмент кожи соответственно, а также изопропиловый спирт и метилацетат, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца и КВМ составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца ДНК, меланин – 0,20 мкг/мл образца ДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца ДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца ДНК.

Интерферирующие вещества, содержащиеся в образце биоматериала, практически полностью удаляются в ходе выделения ДНК. Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения ДНК, позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца, не рекомендуется использовать экспресс-методы выделения ДНК.

На результат исследования может оказать влияние наличие в образце большого количества здоровой и некротизированной ткани. Оптимальное содержание ядер опухолевых клеток должно составлять не менее 35%, допустимое – не менее 20%. При меньшем содержании рекомендуется макро- или минидиссекция.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения доли мутантного аллеля определяется, как минимальное количество мутантного аллеля в пуле аллелей (дикий тип и мутация), определение которого возможно с воспроизводимостью 95% с трактовкой результата «мутация».

Предел обнаружения доли мутантного аллеля лимитирован количеством ДНК и составляет 1,0% в образце при значении Ср ≤ 31 (фасовка S) или Ср ≤ 30 (фасовка U) по каналу детекции КВМ (Cy5), 5,0% – при значении 31 < Ср ≤ 34 (фасовка S) или 30 < Ср ≤ 33 (фасовка U) (таблица 5).

Таблица 5 – Предел обнаружения доли мутантного аллеля в образце

Чувствительность	**Значение Ср КВМ**	
	Ср ≤ 31 (фасовка S) Ср ≤ 30 (фасовка U)	31 < Ср ≤ 34 (фасовка S) 30 < Ср ≤ 33 (фасовка U)
Предел обнаружения доли мутантного аллеля в образце	1,0%	5,0%

При значении Ср КВМ > 33 (фасовка U) или Ср КВМ > 34 (фасовка S) количество материала расценивается как недостаточное для корректного заключения, результат регистрируется как не валидный. При использовании меньшего количества ДНК (Ср КВМ > 33 (фасовка U) или Ср КВМ > 34 (фасовка S)) производитель не гарантирует корректную работу набора реагентов.

Набор реагентов обеспечивает выявление мутаций при доле мутантного аллеля не менее 1,0% в смеси с нормальным аллелем при общей концентрации ДНК не менее 2,0 нг/мкл (10 нг на реакцию, Ср КВМ ≤ 31 (фасовка S), Ср КВМ ≤ 30 (фасовка U)) и не менее 5,0% в смеси с нормальным аллелем при общей концентрации ДНК не менее 0,25 нг/мкл (1,5 нг на реакцию, 31 < Ср КВМ ≤ 34 (фасовка S), 30 < Ср КВМ ≤ 33 (фасовка U)).

3.4 Диагностические характеристики

При проведении клинико-лабораторных испытаний набора реагентов получены следующие диагностические характеристики:

Мутация/ норма	**Диагностическая чувствительность**		**Диагностическая специфичность**	
	Исследовано образцов	Значение	Исследовано образцов	Значение
V600E	42	100% (95% ДИ: 91,59% – 100%)	72	100% (95% ДИ: 95,01% – 100%)
V600K	11	100% (95% ДИ: 71,51% – 100%)	72	100% (95% ДИ: 95,01% – 100%)
V600	54	100% (95% ДИ: 93,40% – 100%)	72	100 % (95% ДИ: 95,01% – 100%)

3.5 Воспроизводимость

Воспроизводимость исследования определялась путем двукратных повторов внутри одной постановки, а также для фасовок S и U набора реагентов, в экспериментах, выполненных в одной лаборатории разными операторами на разных приборах в различные дни путем тестирования положительных и отрицательных биологических образцов ДНК. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Воспроизводимость исследования

Тип образца	**Повторяемость внутри постановки**		**Внутрилабораторная повторяемость между вариантами фасовки S и U**	
	Количество	Совпадение результатов	Количество	Совпадение результатов
V600	12	12 из 12	12	12 из 12
V600E	8	8 из 8	8	8 из 8
V600K	4	4 из 4	4	4 из 4
Нет мутаций	8	8 из 8	8	8 из 8
Итого:	32	32 из 32 (100%)	32	32 из 32 (100%)

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 15190-2023, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в специальный контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится выделение НК и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	**Наличие/отсутствие опасного компонента**		**Указание на риски**
	Фасовка S	Фасовка U	
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Нет опасных веществ	–	–
Смесь для амплификации BRAF 3.1	–	Нет опасных веществ	–
Смесь для амплификации BRAF 3.2	–	Нет опасных веществ	–
Полимераза ТехноТаq MAX	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
ПЦР-буфер	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
Минеральное масло	Нет опасных веществ	–	–
Положительный контрольный образец	**Азид натрия менее 0,1%**	**Азид натрия менее 0,1%**	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности, контакт с организмом человека исключён.

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	**Фасовка S, стрипы**	**Фасовка U, дозирование**	
		ручное	автоматизи-рованное
ПЦР-бокс	●	●	●
амплификатор с детекцией в режиме реального времени[1]	●	●	●[2]
микроцентрифуга-вортекс[3]	●	●	●
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	●	–	–
холодильник с морозильной камерой	●	●	●
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	–	●[4]	–
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	●	–	–
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	●	●	●
дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	●	●	●
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	●	●	●
штатив для дозаторов	●	●	●
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	●	●	●
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или микропланшет ПЦР 96 лунок[5]	–	●	●[6]
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	●	●	●
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	●	●	●
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12М1 или 15М1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстрим	–	-	●
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *М1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	–	–	●
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	–	●[6]	●
центрифуга, обеспечивающая RCF (g) 100, с адаптером для микропланшетов ПЦР	–	●[6]	●
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов ПЦР	–	●[6]	●
микропланшет ПЦР 384 лунки	–	–	●
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)			

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S, стрипы	Фасовка U, дозирование	
		ручное	автоматизированное
набор/комплект реагентов для выделения ДНК из образцов, фиксированных в формалине парафинизированных тканей, рекомендуются: – Набор реагентов для предобработки биоматериала при выделении нуклеиновых кислот (ПРОБА-ПК) по ТУ 21.20.23-107-46482962-2020, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ №РЗН 2021/14384 и – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08867			
Примечания к таблице: [1] – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже [2] – для работы с микропланшетами ПЦР 384 лунки валидированы детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *X*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229; «ДТпрайм II» (модификация «ДТпрайм II *X*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179 [3] – рекомендуется Встряхиватель лабораторный медицинский «ДТспин» по ТУ 32.50.50-003-96301278-2024, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24070; ротор для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл входит в комплектацию [4] – только при использовании пробирок [5] – не используется для детектирующих амплификаторов «ДТлайт» [6] – только при использовании микропланшетов ПЦР **Расшифровка обозначений:** «●» – требуется «–» – не требуется			

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объёмом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex, Rox, Cy5;
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °С.

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *M*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм II» по ТУ 26.51.53-001-96301278-2022 (модификация «ДТпрайм II *M*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179, далее по тексту – «ДТпрайм II»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *X*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования при

использовании микропланшетов ПЦР 384 лунки), далее по тексту – «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *X*»;

– Амплификатор детектирующий «ДТпрайм II» по ТУ 26.51.53-001-96301278-2022 (модификация «ДТпрайм II *X*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2024/24179 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования при использовании микропланшетов ПЦР 384 лунки), далее по тексту – «ДТпрайм II» в модификации «ДТпрайм II *X*»;

– Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228 (только для набора реагентов в фасовке S; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок), далее по тексту – «ДТлайт».

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют фиксированные в формалине парафинизированные образцы солидных опухолей.

6.2 Общие требования

6.2.1 Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка. Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

6.2.2 На этапах подготовки биоматериала и выделении из него нуклеиновых кислот используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

6.2.3 Для предотвращения контаминации всегда открывайте крышку только той пробирки, с которой идёт работа (внесение образца/реактива, удаление надосадочной жидкости), и закрывайте её после этого. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-21.

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК требуется подготовка образцов биологического материала (6.5).

Взятие материала осуществляется только врачом патоморфологом из очага опухоли. Оптимальное содержание ядер опухолевых клеток должно составлять не менее 35%, допустимое от 20%. При меньшем содержании рекомендуется макро- или минидиссекция.

При выполнении макро- или минидиссекции объём материала для исследования может оказаться недостаточным для получения валидного результата. Для повышения концентрации ДНК рекомендуется увеличить количество срезов; сократить объём буфера для протеиназы К до 100 мкл, а далее весь лизат использовать для выделения ДНК; уменьшить объём буфера для элюирования ДНК до 100 мкл и менее.

Фиксация в формалине должна осуществляться в течение 2 часов после получения материала. Время фиксации в формалине зависит от объема препарата и не должно превышать 48–72 часов. Более длительная фиксация приводит к деградации нуклеиновых кислот. При расчете времени фиксации биоматериала необходимо учитывать, что пропитка формалином 1,0 мм ткани осуществляется в течение 1 часа.

Для приготовления срезов используют одноразовое, острое лезвие микротома, отрезают 1–3 участка толщиной 5,0 мкн из предварительно обрезанного блока ткани, заключенной в парафин (приблизительная площадь среза до 0,5–1,5 см^2, общая площадь всех срезов должна быть около 2,0–4,0 см^2). Парафиновые срезы помещают в сухие одноразовые пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл. Не следует превышать рекомендуемое количество ткани, т.к. избыток ткани, заключенной в парафин, может снизить выход тотальной ДНК.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала определяются инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК (7.1).

Допускается транспортирование и хранение образцов биологического материала при температуре от 18 °С до 25 °С не более 1 месяца (если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектам реагентов для выделения ДНК).

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

ВНИМАНИЕ! Для образцов фиксированных в формалине парафинизированных тканей опухолей перед выделением ДНК обязательна депарафинизация образцов и обработка протеиназой К.

Для предварительной обработки биоматериала рекомендуется набор реагентов ПРОБА-ПК.

Предварительную обработку материала проводят в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов ПРОБА-ПК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения на медицинское изделие и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, ПРОБА-НК-ПЛЮС.

Выделение ДНК из биологического материала проводят в соответствии с инструкцией по применению используемого набора/комплекта реагентов.

Рекомендуемый объём элюции ДНК – 100 мкл. Увеличение объёма элюции может снизить концентрацию ДНК и чувствительность исследования. Для постановки реакции требуется не менее ≥ 1,5 нг ДНК на реакцию (5 мкл х ≥ 0,25 нг/мкл или 6 мкл х ≥ 0,25 нг/мкл).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот, в объёме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации.
2. Следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по 2 стрипованные пробирки со смесями для амплификации, запечатанными парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К–) и для положительного контрольного образца (К+) (таблица 7).

Примечание – Один стрип рассчитан на исследование 4 образцов.

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Таблица 7 – Пример маркировки пробирок для исследования 2 неизвестных образцов

Анализируемые образцы	Маркировка пробирок в стрипе
Неизвестный образец №1	Пробирки 1, 2
Неизвестный образец №2	Пробирки 3, 4
«К–»	Пробирки 5, 6
«К+»	Пробирки 7, 8

7.2.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 10 х (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,5 х (N+1) мкл полимеразы ТехноТаq МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К–» и «К+».

7.2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

7.2.5 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ в пробирки со смесью для амплификации необходимо сразу же выполнить 7.2.6 – 7.2.13.

7.2.6 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте стрипы крышками.

7.2.7 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будут вноситься образцы, и закрывать его перед внесением следующих. Необходимо закрывать стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.8 Внесите в соответствующие промаркированные стрипованные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К–», «К+», ДНК не вносится.

7.2.9 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К–», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

7.2.10 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.11 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.2.12 Установите все стрипы в детектирующий амплификатор.

7.2.13 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.12) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 8.

Таблица 8 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» и «ДТлайт»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	10		Цикл
	68,1 инкремент по температуре Δt – 0,3	0	20		√	
3	94	0	10	40		Цикл
	65	0	20		√	
4	80	0	01	1		Цикл
5	25[2]	…	…	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

[1] – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

[2] – допускается хранение при температуре 10 °С

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объёмом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок[1], герметизируемые термоплёнкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постамплификационной контаминации.
2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.3.1 Промаркируйте по 2 пробирки (одну для смеси BRAF 3.1, одну для смеси BRAF 3.2) или зарезервируйте по 2 лунки микропланшета ПЦР 96 лунок для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К–) и для положительного контрольного образца (К+).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 10 постановок при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 8 пробирок/зарезервировать 8 лунок микропланшета для неизвестных образцов, две пробирки/лунки для «К–» и две пробирки/лунки для «К+». Общее количество пробирок/лунок – 12.

7.3.2 Встряхните пробирки со смесями для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.3.3 Внесите во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета (включая «К–» и «К+») по 6,0 мкл соответствующей смеси для амплификации (отдельным наконечником для каждой смеси).

7.3.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq MAX. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:

- 6,0 х (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,3 х (N+1) мкл полимеразы ТехноТаq MAX,

где N – количество промаркированных пробирок/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К–», «К+».

[1] – для детектирующего амплификатора «ДТлайт» микропланшеты ПЦР 96 лунок не используются

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца, «К–», «К+». Промаркированных пробирок/необходимых лунок микропланшета – 12. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ для 13 (12+1) пробирок/лунок, т.е. 78 мкл ПЦР-буфера + 3,9 мкл полимеразы ТехноТаq МАХ.

7.3.6 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

7.3.7 Добавьте во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ. Неплотно закройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ в пробирки/лунки со смесями для амплификации необходимо сразу же выполнить 7.3.8 – 7.3.15.

7.3.8 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки/лунки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Необходимо закрывать пробирки плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.3.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К–», «К+», ДНК не вносится.

7.3.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К–», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

7.3.11 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К+» 6,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.12 В случае использования микропланшетов ПЦР 96 лунок:

7.3.12.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.3.12.2 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.3.12.3 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.3.13 В случае использования пробирок:

Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.14 Установите все пробирки/микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.

7.3.15 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.3.14) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 8.

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II»)

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать микропланшеты ПЦР 96 лунок или 384 лунки[2], герметизируемые термоплёнкой.

2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.4.1 Встряхните пробирки со смесями для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, приготовьте в отдельной одноразовой пробирке смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ.

[1] – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

[2] – только для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» в модификациях «ДТпрайм *X*», «ДТпрайм II *X*»

7.4.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением дозирования для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.4.6 Установите пробирки со смесями для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX, с препаратами ДНК, отрицательным контрольным образцом и положительным контрольным образцом, а также микропланшет ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации дозирующего устройства.

7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.4.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.4.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.

7.4.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест[1]. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.4.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 8.

[1] – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учёт результатов амплификации осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение образцов с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. В этом случае необходимо проверить расположение пробирок/микропланшета ПЦР в термоблоке (стрипованные пробирки №№1, 3, 5, 7 или смесь BRAF 3.1 отмечены голубым буфером) и скорректировать идентификаторы пробирок/лунок в протоколе.

9.3 Анализ и интерпретацию результатов проводят в соответствии с Приложением Б: определяют наличие или отсутствие мутации в анализируемых образцах.

Примечание – Рекомендуется пройти обучение по проведению анализа и интерпретации результатов. Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 16 данной инструкции.

9.4 Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов (таблица 9).

Таблица 9 – Интерпретация результатов ПЦР для контрольных образцов

Отрицательный контрольный образец	
Мутации не должны быть обнаружены (для мутантных аллелей значения Cp не указаны или Cp > 45 (фасовка S), Cp > 44 (фасовка U); для КВМ значения Cp не указаны или Cp > 38 (фасовка S), Cp > 37 (фасовка U)	**Отрицательный результат** Результаты постановки валидны
Для мутантных аллелей значения Cp ≤ 45 (фасовка S), Cp ≤ 44 (фасовка U); для КВМ значения Cp ≤ 38(фасовка S), Cp ≤ 37 (фасовка U)	Результаты всей постановочной серии считают недостоверными. Необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.
Положительный контрольный образец	
Все мутации должны быть обнаружены (значения Cp для мутантных аллелей и КВМ указаны); доля мутантных аллелей должна составлять 10–100%	**Положительный результат** Результаты постановки валидны
Значения Cp для мутантных аллелей и КВМ не указаны; доли мутантных аллелей не соответствуют заданному диапазону	Результаты постановки считают недостоверными. Требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТаq MAX в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации BRAF 3.1, смесь для амплификации BRAF 3.2 и смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2 Полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- смесь для амплификации BRAF 3.1, смесь для амплификации BRAF 3.2 и смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;

- полимеразу ТехноTaq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

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

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных настоящими техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействия солнечного света
	Нестерильно

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ И НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ТУ 20.59.52-032-89545560-2025 Набор реагентов для определения соматических мутаций в гене BRAF (V600, V600E и V600K) методом ПЦР в режиме реального времени (BRAF 3)

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований, Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов

ГОСТ Р ИСО 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Ч.1. Основные требования

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального использования

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» (ООО «ДНК-Технология ТС»), Россия.

Адрес производителя: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г.о. Серпухов, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru

Приложение А

Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТпрайм II» и «ДТлайт» при использовании набора реагентов BRAF 3 в фасовках S, U

1) Количество пробирок в тесте – 2;
2) Объём реакционной смеси – 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	10		Цикл
	68,1 инкремент по температуре Δt – 0,3	0	20		√	
3	94	0	10	40		Цикл
	65	0	20		√	
4	80	0	01	1		Цикл
5	25[1]	…	…	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Фасовка S	Фасовка U	Канал детекции			
№ пробирки в стрипе	Смесь для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5
1, 3, 5, 7	BRAF 3.1	V600	–	Маркер	КВМ
2, 4, 6, 8	BRAF 3.2	V600E	V600K	–	КВМ

[1] – допускается хранение при температуре 10 °С

Приложение Б

Алгоритм анализа и интерпретации результатов полученных с использованием набора реагентов BRAF 3

ВНИМАНИЕ! Перед проведением анализа результатов необходимо оценить результаты ПЦР, полученные для отрицательного и положительного контрольных образцов (см. таблицу 9).

ШАГ 1. Оценка КВМ

1. Оценка значений Ср КВМ.
2. Оценка разницы значений Ср КВМ в разных пробирках для одного образца (dCp КВМ).
3. Дополнительно для положительного контрольного образца:
   Расчёт значения lg для КВМ по формуле: X = (48,5–Cp)/3,34 (фасовка S) или X = (47,5–Cp)/3,34 (фасовка U), где X – значение lg концентрации КВМ в образце, Ср – среднее значение Ср КВМ.
4. Интерпретация результата согласно таблице Б.1.

Таблица Б.1 – Интерпретация результата ПЦР для КВМ

Результат исследования	Интерпретация	
Ср КВМ ≤ 33 (фас. U) Ср КВМ ≤ 34 (фас. S), dCp КВМ ≤ 2,0	Результат валиден	
Ср КВМ > 33 (фас. U) Ср КВМ > 34 (фас. S)	Недостоверный результат	Вероятна низкая концентрация ДНК. Требуется повторная подготовка образцов: • меньшее разведение образца (в случае если исходный образец ДНК был высокой концентрации и разведён перед постановкой); • повторное выделение ДНК с целью повышения концентрации. Для этого количество используемых срезов может быть увеличено, и/или объём буфера для протеиназы К может быть сокращён до 100 мкл, а далее весь лизат использован для выделения ДНК, и/или объём буфера для элюирования ДНК на этапе выделения может быть уменьшен до 100 мкл и менее.
dCp КВМ > 2,0	Недостоверный результат	Значение КВМ не определено. Требуется повторная постановка ПЦР или повторное выделение ДНК (выполняется последовательно).

ШАГ 2. Определение статуса аллелей гена BRAF (НОРМА или МУТАЦИЯ)

Для каждого аналита учитывают наличие амплификации.

- В случае отсутствия амплификации (отсутствие Ср), статус аллеля определяют как «норма».
- При наличии амплификации для аналитов (Ср указаны) рассчитывают dCp = Ср аналита – Ср КВМ.

Полученный результат сравнивают с пороговым значением.

Таблица Б.2 – Алгоритм определения статуса мутантных аллелей с пороговым значением

Показатель	Расчёт dCp	Анализ dCp	Интерпретация d Ср
Ср КВМ ≤ 31 (фасовка S), Ср КВМ ≤ 30 (фасовка U)			
V600	dCp = Ср V600 – Ср КВМ	dCp < 9,5	**МУТАЦИЯ**
		9,5 ≤ dCp ≤ 10	? (серая зона)
		dCp > 10	Норма
V600E	dCp = Ср V600E – Ср КВМ	dCp < 11,5	**МУТАЦИЯ**
		11,5 ≤ dCp ≤ 12	? (серая зона)
		dCp > 12	Норма
V600K	dCp = Ср V600K – Ср КВМ	dCp < 11,5	**МУТАЦИЯ**
		11,5 ≤ dCp ≤ 12	? (серая зона)
		dCp > 12	Норма
31 < Ср КВМ ≤ 34 (фасовка S), 30 < Ср КВМ ≤ 33 (фасовка U)			
V600	dCp = Ср V600 – Ср КВМ	dCp < 8,5	**МУТАЦИЯ**
		8,5 ≤ dCp ≤ 9,0	? (серая зона)
		dCp > 9,0	Норма
V600E	dCp = Ср V600E – Ср КВМ	dCp < 10,5	**МУТАЦИЯ**
		10,5 ≤ dCp ≤ 11	? (серая зона)
		dCp > 11	Норма
V600K	dCp = Ср V600K – Ср КВМ	dCp < 10,5	**МУТАЦИЯ**
		10,5 ≤ dCp ≤ 11	? (серая зона)
		dCp > 11	Норма

Расшифровка обозначений:

МУТАЦИЯ – определена мутация, можно вычислить долю мутантного аллеля (шаг 3).

? (серая зона) – статус мутации не определен.

НОРМА – мутация не выявлена, статус аллеля «Норма».

При определении двух мутаций:

- статус аллеля определяют как «МУТАЦИЯ» для аналита с меньшим значением индикаторного цикла;
- заключение о наличии второй мутации выдается только в случае, если значение dCp для аналитов не превышает 3,5 цикла.

Для положительного контрольного образца дополнительно выполнить:

ШАГ 3. Расчёт доли мутантного аллеля

Расчёт доли мутантного аллеля проводят по формуле:

$$\frac{[\text{МА}]}{[\text{КВМ}]}\% = \frac{E_{\text{КВМ}}{}^{Cp\ \text{КВМ}}}{E_{\text{МА}}{}^{Cp\ \text{МА}}} \text{ x } 100\%, \text{ где}$$

$\frac{[\text{МА}]}{[\text{КВМ}]}$ – доля мутантного аллеля,

Еквм, Ема – эффективность амплификации (прирост матрицы в цикле амплификации) КВМ и мутантного аллеля соответственно;

Ср квм, Ср ма – значения пороговых циклов КВМ и мутантного аллеля соответственно.

Таблица Б.3 – Формулы расчёта доли мутантного аллеля

Показатель	Расчёт доли мутантного аллеля
V600	$= \frac{1{,}99^{Cp\ \text{КВМ}}}{1{,}95^{Cp\ V600}}$ x 100%
V600E	$= \frac{1{,}99^{Cp\ \text{КВМ}}}{1{,}95^{Cp\ V600E}}$ * 100%
V600K	$= \frac{1{,}99^{Cp\ \text{КВМ}}}{1{,}95^{Cp\ V600k}}$ * 100%

ШАГ 4. Оценка доли мутантного аллеля (проводят для каждого показателя)

Результат, полученный на шаге 4 **Расчетная доля мутантного аллеля**	Интерпретация результата: **Диапазон полуколичественной оценки**
< 0,7%	< 1,0%
≥ 0,7% и < 6,0%	1,0–10%
≥ 6,0% и < 16%	5,0–20%
≥ 16%	10–100%

Приложение В

ПРИМЕР АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования выполнены при использовании набора реагентов в фасовке S

ОБРАЗЕЦ №1 – Определена мутация V600 и V600E

Данные ПЦР для ОБРАЗЦА №1		**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ**			
Показатель	Ср	Показатель	Анализ Ср КВМ	Расчёт dCp	Анализ dCp Интерпретация
V600	31,9	V600X	–	dCp КВМ 31,9–29,9=2,0	dCp КВМ 2,0 < 9,5 **МУТАЦИЯ**
КВМ	29,9	КВМ	Менее 34, ОК	–	–
V600E	31,9	V600E	–	dCp КВМ 31,9–30,0=1,9 dCp V600 31,9–31,9=0	dCp КВМ 1,9 < 11,5 dCp V600 0≤ 3,5 **МУТАЦИЯ**
V600K	–	V600K	–	–	Норма
КВМ	30,0	КВМ	Менее 34, ОК	–	–
			dCp КВМ=0,1 менее 2,0; ОК		

РЕЗУЛЬТАТ ДЛЯ ОБРАЗЦА №1

Контрольный параметр для биоматериала	**Результат**
Контроль взятия биоматериала	Валиден
Мутация BRAF	**Результат**
V600 Мутация в 600 кодоне гена BRAF, любая из V600E, V600Ec, V600K, V600D, V600Dc, V600R, V600G, V600M	**ОБНАРУЖЕНО**
V600E NM_004333.6 (BRAF): c.1799T>A (p. Val600Glu) или c.1799_1800delinsAA (p. Val600Glu)*	**ОБНАРУЖЕНО**
V600K NM_004333.6 (BRAF): c.1798_1799delinsAA (p. Val600Lys)*	Не обнаружено
Примечание к таблице: * – наименование мутации по номенклатуре HGVS	

Пример заключения:

ОБНАРУЖЕНА мутация V600E (NM_004333.6 (BRAF): c.1799T>A или c.1799_1800delinsAA (p. Val600Glu)) в гене BRAF.

ОБРАЗЕЦ №2 – Определена мутация V600, отличная от V600E и V600K

Данные ПЦР для ОБРАЗЦА №2		**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ**			
Показатель	Ср	Показатель	Анализ Ср КВМ	Расчёт dCp	Анализ dCp Интерпретация
V600	28,8	V600X	–	28,8–26,1=2,7	2,7 < 9,5 **МУТАЦИЯ**
КВМ	26,1	КВМ	Менее 34, ОК	–	–
V600E	34,9	V600E	–	dCp КВМ 34,9–26,0=8,9 dCp V600 34,9–28,8=6,1	dCp КВМ 8,9 < 11,5 dCp V600 6,1> 3,5 норма
V600K	33,0	V600K	–	dCp КВМ 33–26,0=7 dCp V600 33–28,8=4,2	dCp КВМ 7 < 11,5 dCp V600 4,2 >3,5 норма
КВМ	26,0	КВМ	Менее 34, ОК	–	–
			dCp КВМ=0,1 менее 2,0; ОК		

РЕЗУЛЬТАТ ДЛЯ ОБРАЗЦА №2

Контрольный параметр для биоматериала	**Результат**
Контроль взятия биоматериала	Валиден
Мутация BRAF	**Результат**
V600 Мутация в 600 кодоне гена BRAF, любая из V600E, V600Ec, V600K, V600D, V600Dc, V600R, V600G, V600M	**ОБНАРУЖЕНО**
V600E NM_004333.6 (BRAF): c.1799T>A или c.1799_1800delinsAA (p. Val600Glu)*	Не обнаружено
V600K NM_004333.6 (BRAF): c.1798_1799delinsAA (p. Val600Lys)*	Не обнаружено
Примечание к таблице: * – наименование мутации по номенклатуре HGVS	

Пример заключения:

ОБНАРУЖЕНА мутация V600 в гене BRAF, отличная от V600E и V600K.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ (К+)

Данные ПЦР для К+		**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ**			
Показатель	Ср	Показатель	Анализ Ср КВМ	Расчёт dCp	Анализ dCp Интерпретация
V600	29,5	V600X	–	dCp КВМ 29,5–30=–0,5	–0,3 < 9,5 **МУТАЦИЯ**
КВМ	30	КВМ	Менее 34, ОК	–	–
V600E	29,6	V600E	–	dCp КВМ 29,6–29,9=–0,3	–0,3 < 11,5 **МУТАЦИЯ**
V600K	29,4	V600K	–	dCp КВМ 29,4–29,9=–0,5	–0,5 < 11,5 **МУТАЦИЯ**
КВМ	29,9	КВМ	Менее 34, ОК	–	–
			dCp КВМ=0,1 менее 2,0; ОК		

Расчёты (для положительного контрольного образца):

Среднее значение Ср КВМ = 30.

Значение lg для КВМ = $\frac{48,5-30}{3,34}$ = 5,5.

Доля мутантного аллеля $\mathrm{V600} = \frac{1,99^{30}}{1,95^{29,5}} * 100\% = 257$ (диапазон 10–100%).

Доля мутантного аллеля $\mathrm{V600}E = \frac{1,99^{29,9}}{1,95^{29,6}} * 100\% = 224$ (диапазон 10–100%).

Доля мутантного аллеля $\mathrm{V600K} = \frac{1,99^{29,9}}{1,95^{29,4}} * 100\% = 256$ (диапазон 10–100%).

РЕЗУЛЬТАТ ДЛЯ К+

Контрольный параметр для биоматериала	**Результат**
Контроль взятия биоматериала	Валиден
Мутация BRAF	**Результат**
V600 Мутация в 600 кодоне гена BRAF, любая из V600E, V600Ec, V600K, V600D, V600Dc, V600R, V600G, V600M	ОБНАРУЖЕНО (10–100%)
V600E NM_004333.6 (BRAF): c.1799T>A или c.1799_1800delinsAA (p. Val600Glu)*	ОБНАРУЖЕНО (10–100%)
V600K NM_004333.6 (BRAF): c.1798_1799delinsAA (p. Val600Lys)*	ОБНАРУЖЕНО (10–100%)
Примечание к таблице: * – наименование мутации по номенклатуре HGVS	

Пример заключения:

Положительный контрольный образец валиден.