

МИЕЛОСКРИН

набор реагентов для одновременного выявления драйверных мутаций хронических миелопролиферативных неоплазий методом ПЦР в реальном времени

мутация	ген
V617F	JAK2
c.1092_1143del (p.L367fs*46)	CALR
c.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)	CALR
W515K	MPL
W515L	MPL

Инструкция по применению

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Хронические миелоидные неоплазии (ХМН) представляют собой группу Ph-негативных хронических лейкозов, к которым относятся: истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), первичный миелофиброз (ПМФ). Соматическая мутация в гене янус-киназы 2 (Jak2 V617F) является обнаруживается в 93–97% случаев истинной полицитемии, 50–70% случаев эссенциальной тромбоцитемии и 40–50% случаев первичного миелофиброза. Мутации с.1154_1155insTTGTC (р.К385fs*47) и с.1092_1143del (р.L367fs*46) в гене кальретикулина (CALR) и мутации в гене рецептора тромбопоэтина (myeloproliferative leukemia virus – MPL) не выявляется у пациентов при ИП, но характерны для 30-40 % случаев ЭТ и ПМФ при отсутствии V617F Jak2. Поскольку лишь менее 15% всех вариантов клинически и морфологически верифицированных ХМН не ассоциированы с описанными «драйверными» мутациями заболевания, их идентификация признана специфическим диагностическим тестом и одним из основных критериев постановки диагноза (ВОЗ 2016).

Набор реагентов «Миелоскрин» предназначен для одновременного количественного определения мутации V617F в гене янус-киназы 2 (JAK2), мутаций 1 и 2 типа в гене CALR и мутаций W515L, W515K в гене MPL методом ПЦР в режиме реального времени. Анализируемым материалом является ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови или из сухих пятен крови. Также данный набор позволяет определять мутацию V617F в гене JAK2 в пулированных образцах цельной крови, каждый пул при этом может включать до 10 образцов крови пациентов. Результатом анализа является установление наличия или отсутствия соматической мутации JAK2 V617F, мутаций 1-го и 2-го типа в гене

CALR и мутаций W515L, W515K в гене MPL в образце ДНК человека. Набор предназначен для профессионального использования и рекомендуется для выполнения лабораторного тестирования крови или костного мозга у пациентов с подозрением на хронические миелоидные лейкозы.

Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений с научно-исследовательскими целями.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод выявления мутации V617F в гене JAK2, мутаций 1-го и 2-го типов в гене CALR, мутаций W515L, W515K в гене MPL основан на амплификации нуклеиновых кислот с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» благодаря использованию специфических TaqMan зондов. Результат амплификации регистрируется по каналам флуоресценции FAM, HEX/JOY и ROX. В качестве внутреннего контроля (определяющего прохождение реакции) используется дикий аллель гена JAK2.

Для выполнения анализа требуется проведение ПЦР в двух пробирках на одного пациента:

Смесь 1: Дикий аллель гена JAK2 (канал FAM), мутантный аллель гена CALR с мутацией c.1092_1143del (канал HEX/JOY), мутантный аллель гена MPL с мутацией W515K (канал ROX).

Смесь 2: Мутантный аллель гена JAK2 (канал FAM), мутантный аллель гена CALR с мутацией c.1154_1155insTTGTC (канал HEX/JOY), мутантный аллель гена MPL с мутацией W515L

(канал ROX).

- Для всех пробирок определяется порог обнаружения флуоресцентного сигнала (Ct) (рекомендуется использовать автоматический расчет Ct).
- Наличие или отсутствие мутации определяется по значению Ct (см. **Анализ и учет результатов**).
- *ПКО* представляет собой вектор с участками ДНК, несущими мутантные аллели всех исследуемых генов.
- *ОКО* представляет собой ДНК, не имеющая мутаций в исследуемых генах.

2.2 Состав набора и форма выпуска

Набор рассчитан на проведение 50 тестов, включая позитивный и негативный контроли.

Набор реагентов «Миелоскрин» выпускается в одном варианте исполнения.

Набор реагентов «Миелоскрин» выпускается в одной комплектации.

Набор поставляется в пластиковом контейнере. Все реагенты разлиты в пластиковые герметичные флаконы с цветовой кодировкой этикеток и крышек.

Все компоненты набора готовы к использованию, в составе набора отсутствуют лиофилизированные компоненты.

В состав набора входит:

Название	Описание	Объем, мкл	Кол-во (шт)
Смесь 1	Прозрачная жидкость	900	1
Смесь 2	Прозрачная жидкость	900	1
Тақ-полимераза	Прозрачная жидкость	60	1
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная жидкость	200	1
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость	200	1
Инструкция по применению	–	–	1
Паспорт	–	–	1

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Контроль работы набора. Каждый набор снабжен внутренним контролем, который представляет собой смесь, содержащую праймеры, специфичные к аллелю дикого типа гена JAK2.

Чувствительность. Аналитическая чувствительность метода составляет 0,5% относительной концентрации мутации V617F гена JAK2, 3% относительной концентрации мутации 1 и 2 типа в гене

CALR, 3% относительной концентрации мутации W515L и W515K в гене MPL в клиническом образце.

Специфичность. Анализ надежно выявляет только мутации V617F в гене JAK2, W515K и W515L в гене MPL, мутации 1 и 2 типа в гене CALR. Частота выявления мутаций по результатам тестирования более 4 тысяч пациентов с подозрением на ХМН полностью соответствует литературным данным. Низкие уровни (менее 2%) аллельной нагрузки мутации могут выявляться у доноров крови (с частотой до 0,8%), а также у пожилых пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и ишемическими инсультами (с частотой до 5%) при синдроме «клонального гемопоэза неопределенного потенциала» или «синдроме CHIP»).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.
2. Хотя все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях при их попадании на кожу или слизистые оболочки место контакта необходимо промыть большим количеством воды, поскольку в редких случаях может наблюдаться индивидуальная гиперчувствительность.
3. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н).
4. При использовании набора необходимо пользоваться одноразовыми перчатками, использовать и менять при каждой

операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.

5. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
6. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.
7. Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах).
8. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.
9. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после начала работ облучаться ультрафиолетовым светом.
10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.
11. При работе с набором является обязательное соблюдение требований, изложенных в ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», утвержденном Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007г.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Амплификатор детектирующий.
2. Микроцентрифуга типа «Вортекс».
3. Стерильный ламинарный шкаф.
4. Холодильник с морозильной камерой от -24 до -16°С.
5. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Стерильные микропробирки для ПЦР объемом 0,1 - 0,2 мкл.
9. Автоматические пипетки переменного объема.

6. МАТЕРИАЛ ДЛЯ АНАЛИЗА

В качестве образца необходимо использовать геномную ДНК, выделенную из периферической крови или косного мозга. Возможно использование ДНК, выделенной из сухих пятен крови (DBS), собранных на FTA картах.

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Транспортирование набора необходимо производить в термоконтейнерах с хладоэлементами не допуская длительного (более 12 час размораживания). Необходимо избегать многократного (более 20 циклов) замораживания-размораживания. Перевозка набора реагентов может

производиться всеми видами крытого транспорта при соблюдении необходимых температурных режимов в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта. Хранение наборов должно осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом, защищенном от света месте с соблюдением необходимых температурных режимов.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

8. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора составляет 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортировки и хранения. Нельзя использовать набор после установленной даты окончания срока годности. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетке для невскрытых реагентов.

9. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

Набор предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом, имеющим опыт выполнения ПЦР тестов.

10. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

10.1 Подготовка реагентов

Все компоненты набора готовы к использованию.

10.2 Процедура тестирования

1. Довести все компоненты набора до комнатной температуры,

кроме Taq-полимеразы, тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок.

2. Подготовить необходимые объемы реакционной смеси для N проб согласно таблице 3. В расчет включены постановки ОКО и ПКО. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок.

Таблица 3. Расчет необходимого количества ПЦР-смесей для анализа N-проб

Название смеси	Кол-во смеси, мкл	Кол-во Taq-полимеразы, мкл
Смесь 1	$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$
Смесь 2	$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$

Taq-полимеразу необходимо использовать непосредственно из морозильной камеры. После добавления в реакционные смеси немедленно убирать в морозильную камеру. **Не размораживать!!!**

3. Отобрать необходимое количество микропробирок для ПЦР. Расчет количества микропробирок осуществляется исходя из того, что каждый образец исследуется в двух ПЦР-смесях («Смесь 1», «Смесь 2»), кроме того, осуществляется постановка ПКО и ОКО (таблица 3) для каждой смеси.
4. Внести в каждую микропробирку для ПЦР по 15 мкл соответствующей реакционной смеси.
5. Разморозить исследуемые образцы, ПКО и ОКО.
6. Внести в пробирки с реакционными смесями по 10 мкл исследуемых образцов ДНК¹, ПКО и ОКО, используя

¹ Рекомендуемое количество вносимой в смесь ДНК находится в диапазоне 20-100 нг.

наконечники с аэрозольным барьером. Пробирки кратковременно перемешать на вортексе.

- Поместить пробирки в амплификатор. Установить программу амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 4).

Таблица 4. Протокол ПЦР

Цикл	Шаг	Повторов	Время	Температура	Камера
1	1	1	5 мин	95°C	
2	1	50	15 с	95°C	Включена (каналы FAM, HEX/JOY, ROX)
	2		60 с	60°C	

Установить следующие каналы считывания флюоресценции:

Смесь «1»:

- FAM – ген JAK2 «дикий тип»;
- HEX/JOY – мутация с.1092_1143del в гене CALR;
- ROX – мутация W515K в гене MPL.

Смесь «2»:

- FAM – мутация V617F в гене JAK2;
- HEX/JOY – мутация с.1154_1155insTTGTC в гене CALR;
- ROX – мутация W515L в гене MPL.

10.3 Анализ и учет результатов

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного

сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией к прибору.

1. Определить пороговый цикл (Ct) для каждой пробирки. Рекомендуется автоматический расчет порогового цикла. При наличии нелинейной области флюоресценции на первых циклах ПЦР рекомендуется воспользоваться функцией программного обеспечения для удаления первых нескольких циклов амплификации. Например, в программном комплексе *CFX Manager* (для приборов *Bio-Rad CFX*) выбрать в меню «*Settings->Cycles to Analyze*» и установить начальный цикл, начинающийся в линейной области.
2. Пороговые циклы ОКО должны быть более 35*, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
3. Пороговый цикл всех пробирок ПКО должен быть менее 30*, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
4. Для всех исследуемых проб пороговый цикл **смеси 1** по каналу **FAM** должен быть менее 30*. Несоблюдение этого условия указывает на малое количество ДНК, добавленное в пробу. Необходимо повторить исследование клинического образца с этапа экстракции. Возможные причины: ошибка в процедуре обработки клинического материала, приведшая к потере ДНК, или ингибирование ПЦР.

* - величина этого параметра зависит от используемой модели амплификатора. В настоящей инструкции приведены значения для прибора CFX96 (BioRad).

5. Пороговые циклы всех пробирок не должны быть менее 15*. Несоблюдение этого условия указывает на избыточное количество ДНК, добавленное в пробу. Необходимо повторить анализ с предварительным разведением ДНК.
6. Для расчета аллельной нагрузки мутации V617F необходимо воспользоваться формулой:

$$V617F, \% = \frac{100}{1 + 2^{Ct_{FAM(смесь\ 2)} - Ct_{FAM(смесь\ 1)}}$$

При значении аллельной нагрузки > 0,5% проба считается положительной по мутации V617F JAK2.

7. Для определения наличия мутаций в гене CALR необходимо воспользоваться формулами:

$$CALR\ с.\ 1092_1143del = \frac{100}{1 + 2^{Ct_{HEX(смесь\ 1)} - Ct_{FAM(смесь\ 1)}}$$

При значении CALR с.1092_1143del > 3 проба считается положительной по мутации с.1092_1143del гена CALR.

$$CALR\ с.\ 1154_1155insTTGTC = \frac{100}{1 + 2^{Ct_{HEX(смесь\ 2)} - Ct_{FAM(смесь\ 1)}}$$

При значении с.1154_1155insTTGTC > 3 проба считается положительной по мутации с.1154_1155insTTGTC гена CALR.

8. Наличие мутации W515K в гене MPL определяется при Ct < 35

* - величина этого параметра зависит от используемой модели амплификатора. В настоящей инструкции приведены значения для прибора CFX96 (BioRad).

смеси 1 по каналу ROX. Наличие мутации W515L в гене MPL определяется при Ct < 35 смеси 2 по каналу ROX.

9. Образцы пациентов в редких случаях могут содержать одновременно несколько мутаций.

Настоящий высокочувствительный аналитический метод позволяет выявлять клон V617F-положительных клеток в крови у людей без онкогематологического заболевания, что расценивается как «клональный гемопоэз неопределенного (пролиферативного) потенциала» (clonal hematopoiesis of indeterminate potential – CHIP), или CHIP-синдром. В 2008 году было показано, что развитие ХМН и дальнейшая прогрессия отдельных клинических форм заболевания зависит от уровня аллельной нагрузки JAK2V617F. При этом высокий риск трансформации клеток с переходом от бессимптомного носительства мутации к проявлению клинических признаков заболевания отмечен при нагрузке, превышающей уровень 0,8-1,0% мутантной ДНК в образце крови.

В периферической крови пациентов с JAK2V617F-позитивным CHIP, не имеющих симптомов гематологического заболевания, могут выявляться от 0,01% до 1% мутированных ДНК-содержащих клеток.

При этом важно отметить, что клинически значимым уровнем аллельной нагрузки JAK2 V617F является уровень более 1% в периферической крови. Только при таком результате и соответствующих клинических данных может быть определен диагноз и назначено лечение.

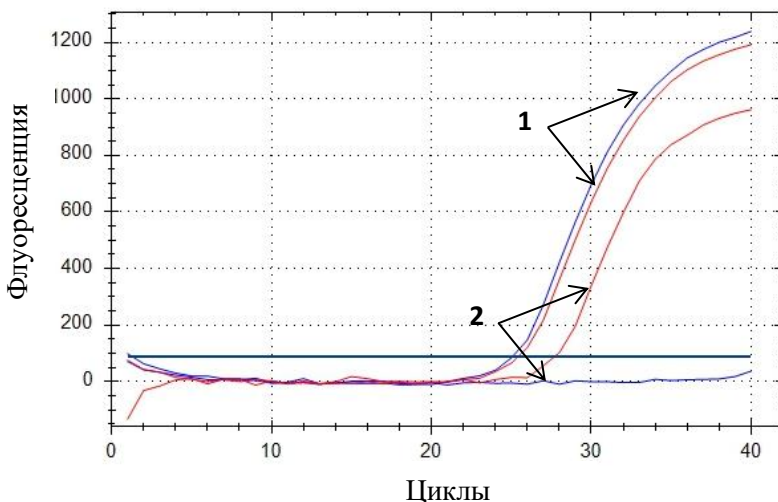


Рисунок 1. Пример кривых накопления флуоресцентного сигнала в пробах с мутацией JAK2 V617F и без мутации JAK2 V617F: красным цветом обозначен пациент с мутацией JAK2 V617F, синим цветом пациент без мутации JAK2 V617F; 1 – смесь 1, канал FAM; 2 – смесь 2, канал FAM.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ

Данный тест дает количественные результаты и показывает присутствие мутаций в образце, что, однако не должно рассматриваться как единственный критерий для диагностики ХМН. Так же, как и при любом другом диагностическом тестировании, все результаты должны быть интерпретированы вместе с другими лабораторными и клиническими данными.

12. УТИЛИЗАЦИЯ (УНИЧТОЖЕНИЕ) И ДЕЗИНФЕКЦИЯ

При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам

профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утвержденных департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г.). Нормы контроля, дезинфекции и утилизации изложены в Постановлении Главного государственного санитарного врача РФ от 9 декабря 2010 г. №163 «Об утверждении СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Дезинфекцию, а также утилизацию или уничтожение наборов реагентов и отходов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Возможные типы отходов:

- все компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, и упаковочная тара (класс А);
- использованные в ходе работы набора реагентов компоненты (класс Б);
- выделенная ДНК в элюирующем растворе, не используемая для дальнейших исследований или архивного хранения (класс Б);
- амплификат, образовавшийся после проведения ПЦР-РВ (класс Б).

Компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по

истечении срока годности, имеют класс опасности А на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Сбор отходов класса А осуществляется в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного. Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров. Емкости для сбора отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А". Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты доставляются с использованием средств малой механизации и перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора отходов данного класса, установленные на специальной площадке (помещении).

Компоненты, использованные в ходе работы набора реагентов, и выделенная ДНК в элюирующем растворе, не используемая для дальнейших исследований и архивного хранения, имеют класс опасности Б на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов.

Для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости с крышкой (контейнеры), обеспечивающей их герметизацию и исключающей возможность самопроизвольного вскрытия.

13. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Не применимо.

14. ТЕКУЩИЙ РЕМОНТ

Не применимо.

15. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

По вопросам качества набора следует обращаться в ООО «Формула гена» по фактическому адресу: 660036, Россия, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, строение 45, офис 102, тел. +7(391)290-55-13, e-mail: mail@formulagena.ru.

ООО «Формула гена»

г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, стр. 45, оф. 101

тел. +7(391)290-55-13

mail@formulagena.ru

formulagena.ru