



с-KIT D816V

набор реагентов для выявления мутации D816V в гене с-KIT методом ПЦР в реальном времени

Инструкция по применению

вер. январь 2022 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Ген KIT (с-KIT) является протоонкогеном и кодирует рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток. Мутация в 816 домене гена KIT (D816V) обнаруживается у большинства пациентов с системным мастоцитозом и является диагностическим критерием заболевания. Наличие мутации делает опухоль резистентной к ингибитору тирозинкиназы KIT – иматинибу.

Набор реагентов предназначен для качественного выявления мутации с-KIT D816V методом ПЦР в режиме реального времени. Анализируемым материалом является ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови или костного мозга. Результатом анализа является установление наличия или отсутствия мутации D816V в образце человека. Набор предназначен для профессионального использования и служит вспомогательным средством для диагностики пациентов с подозрением на волосатоклеточный лейкоз. Набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод выявления с-KIT D816V основан на:

- Амплификации с детекцией в режиме «реального времени» с использованием интеркалирующего красителя SYBR-Green. Результат амплификации регистрируется по каналу флуоресценции FAM. В качестве гена внутреннего контроля

используется не мутированный вариант («дикий» тип) гена с-KIT.

- Для анализа требуется проведение ПЦР в двух пробирках на одного пациента:
 1. Ген с-KIT «дикий» тип – смесь «KIT-W» (канал FAM);
 2. Ген с-KIT D816V – смесь «KIT-M» (канал FAM).
- Для всех пробирок определяется порог обнаружения флуоресцентного сигнала (Ct) (необходимо использовать расчет Ct согласно инструкции программного обеспечения используемого прибора).
- Наличие или отсутствие мутации определяется по значению Ct (см. **Анализ и учет результатов**).
- *ПКО* представляет собой раствор ДНК человека, несущую исследуемую мутацию.
- *ОКО* представляет собой вектор с участком ДНК, не несущий исследуемую мутацию.

2.2 Состав набора и форма выпуска

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

Набор реагентов «с-KIT D816V» выпускается в одном варианте исполнения.

Набор реагентов «с-KIT D816V» 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 лиофилизованные компоненты.

В состав набора входит:

Название	Описание	Объем, мкл	Кол-во (шт)
КІТ-W	Прозрачная жидкость	900	1
КІТ-М	Прозрачная жидкость	900	1
Таq-полимераза	Прозрачная жидкость	65	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 (с маркировкой «КІТ-W»), содержащую праймеры, специфичные к участку не мутированного гена с-КІТ.

Чувствительность. Аналитическая чувствительность метода составляет 10 копий мутантного гена с-КІТ в реакции ПЦР.

Специфичность. Анализ надежно выявляет только мутацию D816V в гене c-KIT.

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. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.
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. Ключевой мерой предосторожности при работе с набором является соблюдение требований, изложенных в ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», утвержденном Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Амплификатор детектирующий.
2. Микроцентрифуга типа «Вортекс».
3. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, 100 мкл.
4. Стерильный ламинарный шкаф.
5. Холодильник с морозильной камерой от -24 до -16°C.
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 ДНК выделенную из лейкоцитов периферической крови.

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Транспортирование набора необходимо производить с хладоэлементами не допуская длительного (более 12 час размораживания). Необходимо избегать многократного (более 20 циклов) замораживания-размораживания. Транспортировка набора реагентов может производиться в термоконтейнерах с соблюдением необходимых температурных режимов всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

Транспортировка и хранение должны осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности 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 невоскрытых реагентов.

9. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

Набор предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом.

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 Таq-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

Кол-во смеси, мкл	Кол-во Таq-полимеразы, мкл	Кол-во микропробирок для ПЦР
$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$	$(N+2)*2$

Таq-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 (KIT-W, KIT-M), кроме того, осуществляется постановка ПКО и ОКО (таблица 3).
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 ДНК, ПКО и ОКО, используя наконечники с аэрозольным барьером. Пробирки кратковременно перемешать на вортексе.
7. 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	
	2		60 с	60°C	Включена (FAM канал)

Установить следующие каналы считывания флуоресценции:

- Смесь «KIT-W» – FAM;
- Смесь «KIT-M» – FAM.

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. Необходимо использовать расчет Ct согласно инструкции программного обеспечения используемого прибора. При наличии нелинейной области флуоресценции на первых циклах ПЦР рекомендуется воспользоваться функцией программного обеспечения для удаления первых нескольких циклов амплификации¹.
2. Пороговый цикл смеси ОКО должен быть более 40*, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
3. Пороговый цикл пробирок ПКО должен быть менее 30*, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
4. 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.
5. Пороговый цикл смеси KIT-W исследуемых образцов должен быть менее 30*. Несоблюдение этого условия указывает на

¹ 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.

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

недостаточное количество ДНК, добавленное в пробу. Необходимо повторить анализ с этапа выделения ДНК.

6. Оптимальный пороговый цикл смеси КИТ-W от 22* до 28*.
7. Образец считается положительным по наличию мутации D816V, если пороговый цикл в пробирке со смесью КИТ-M менее 40.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ

Этот тест дает качественные результаты и показывает присутствие мутации в образце, что не должно рассматриваться как единственный критерий для диагностики острого лейкоза. Так же, как и при любом другом диагностическом тестировании, все результаты должны быть интерпретированы вместе с клиническими данными, которыми располагает врач.

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);
- ампликат, 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