

2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Н.Кроткова

« 23 » 2022 г.

Регистрационный № 180-1221



**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ
РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова»

АВТОРЫ: Медведь А.В., Смирнов С.Ю., Чекун О.В., Гремза К.С., Ходасевич В.М., Тур А.Г., Рукша К.Г., Ефремов Н.А., к.м.н. Субоч Е.И., д.м.н., доцент Портянко А.С., д.м.н., профессор, академик НАН Беларуси Красный С.А.

Минский р-н, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования течения рака толстой кишки у пациентов со II-III стадиями заболевания с использованием клинических, морфологических и молекулярно-генетических критериев. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение рака толстой кишки.

Метод предназначен для врачей-онкологов, врачей клинической лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с раком толстой кишки в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

1. Показания к применению: рак толстой кишки (С 18-С 20).

2. Противопоказания к применению: соответствующие таковым к применению медицинских изделий, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов, расходных материалов и т.п.

Перечень необходимых медицинских изделий:

3.1. Изделия медицинской техники для проведения морфологических и молекулярно-генетических исследований.

Перечень необходимых реактивов и расходных материалов:

3.2. Набор реагентов для выделения ДНК из парафинизированной опухолевой ткани.

3.3. Реагенты для постановки аллель-специфической ПЦР (ДНК-полимеразы, олигонуклеотиды синтетические (праймеры и зонды), смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (ДНТФ)).

3.4. Одноразовые наконечники для автоматических дозаторов объемом от 0,5 до 1000 мкл.

3.5. Микропробирки для ПЦР.

4. Технология использования предлагаемого метода

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется в несколько этапов.

4.1. Гистологическое заключение

Гистологическое заключение формулируется при исследовании гистологических препаратов операционного материала, окрашенных гематоксилином и эозином, с отражением следующих параметров: локализации опухолевого процесса (правосторонняя/левосторонняя) категории Т (первичная опухоль), категории N (регионарные лимфатические узлы), степени злокачественности, наличия венозной и периневральной инвазии, а также инвазии лимфатических сосудов, слизееобразования.

4.2. Молекулярно-генетические исследования

4.2.1. Выделение ДНК из опухолевой ткани, фиксированной формалином и заключенной в парафин.

Для проведения процедуры исследования используется набор реагентов для выделения ДНК из парафинизированной опухолевой ткани, согласно инструкции производителя. При необходимости допускается хранение ДНК при температуре -20°C в течение 1 месяца, при температуре -70°C – длительное время.

4.2.2. Оценка мутационного статуса генов *KRAS*, *BRAF*

Аллель-специфическая ПЦР (АС-ПЦР) для определения мутаций в гене *KRAS* включает 7 отдельных реакций: одну контрольную с праймерами на константный участок гена *KRAS* и шесть аллель-специфических реакций для мутаций в 12 и 13 кодонах гена *KRAS*. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры и зонды для амплификации

№ п-п	Название праймера	Последовательность праймера 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
Зонды				
1	KRAS_WT	GTTGGAGCTGGTGGCGTAG	FAM	BHQ1
2	KRAS_AC_G12C	GTTGGAGCTTGTGGCGTA	FAM	BHQ1

Продолжение таблицы 1

3	KRAS_AC_G12S	GTTGGAGCTAGTGGCGTA	FAM	BHQ1
4	KRAS_AC_G12V	AGTTGGAGCTGTTGGCGTAG	FAM	BHQ1
5	KRAS_AC_G12D	AGTTGGAGCTGATGGCGTAG	FAM	BHQ1
6	KRAS_AC_G12A	GTTGGAGCTGCTGGCGTA	FAM	BHQ1
7	KRAS_AC_G13D	AGTTGGAGCTGGTGACGTAG	FAM	BHQ1
Праймеры				
8	KRAS_AS_F	CCTGCTGAAAATGACTGAA	-	-
9	KRAS_AS_R	TATCGTCAAGGCACTCTTGC	-	-
10	KRAS_LNA*	GCGAAGCATACGCCACCAGCTAA	-	-

* позиции LNA указаны жирными буквами

Компоненты реакционной смеси представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Компоненты реакционной смеси для проведения ПЦР

№ п-п	Реактив	Количество на 1 реакцию (контрольный сток), мкл	Количество на 1 реакцию (мутантный сток с LNA), мкл
1.	Буфер для ПЦР, 10×	2,5	2,5
2.	MgCl ₂ , 50 мМ	1,0	1,0
3.	ДНТП, 10 мМ	0,5	0,5
4.	Полимераза, 5 ед/мкл	0,2	0,2
5.	Смесь праймеров	1,25	2,25
6.	H ₂ O	17,55	16,55
7.	ДНК	2,0	2,0
Общий объем		25,0	25,0

Адаптированный протокол амплификации представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Программа амплификации

Этап	Характеристика		
	температура, °С	время	количество циклов, абс.
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 с	9
Отжиг (без детекции сигнала)	60	1 мин	
Денатурация	95	10 с	30
Отжиг*	60	1 мин	

* детекция сигнала проводится по каналу FAM или аналогичному ему по длине волны во время этапа отжига

Результат анализа оценить путем сравнения dCt образца с dCt положительного 10% ДНК-стандарта. Образец считать положительным (содержащим мутацию), если dCt образца равно или меньше dCt положительного ДНК-стандарта. Образец считать отрицательным (отсутствие мутации или содержание мутации меньше, чем в положительном ДНК-стандарте), если dCt образца больше dCt положительного ДНК-стандарта.

АС-ПЦР для определения мутаций в гене *BRAF* проводится с помощью двух вариантов методик, одна из которых основана на использовании аллель-специфических праймеров для детекции мутации по прямой цепи ДНК (АС-ПЦР 1), другая – по обратной комплементарной цепи ДНК (АС-ПЦР 2). Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Праймеры и зонды для амплификации

№ п-п	Название праймера	Последовательность праймера, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
<i>АС-ПЦР 1</i>				
1.	BS2-1	TGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA	-	-
2.	BA1-2	GGACCCACTCCATCGAGATT	-	-
3.	BA2-2	CCCCTCCATCGAGATTCCT	-	-
4.	BTM5-2	ATGAAGACCTTCACAGAAAAATAGGTGATTTTGG	FAM	BHQ1
<i>АС-ПЦР 2</i>				
1.	BS5	TCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGG	-	-
2.	BS4-2	GTGATTTTGGTCTAGCTACGGA	-	-
3.	BA4-2	TCCACAAAATGGATCCAGAC	-	-
4.	BTM6	ACTGATGGGACCCACTCCATCGA	FAM	BHQ1

Компоненты реакционной смеси представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Компоненты реакционной смеси для проведения ПЦР

№ п-п	Реактив	Количество на 1 реакцию, мкл
1.	Буфер для ПЦР, 10×	2,5
2.	MgCl ₂ , 50 мМ	1,0
3.	ДНТП, 10 мМ	0,5
4.	Полимераза, 5 ед./мкл	0,25
5.	Смесь праймеров	1,0
6.	H ₂ O	16,75
7.	ДНК	3,0
Общий объем		25,0

Адаптированный протокол амплификации представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Программа амплификации

Этап	Характеристика		
	температура, °С	время	количество циклов, абс.
Предварительная денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	10 с	45
Отжиг*	58	1 мин	

*детекция сигнала проводится по каналу FAM или аналогичному ему по длине волны во время этапа отжига

Результат анализа оценить путем сравнения dCt образца с dCt положительного 1% ДНК-стандарта. Образец считать положительным (содержащим мутацию), если dCt образца равно или меньше dCt положительного ДНК-стандарта. Образец считать отрицательным (отсутствие мутации или содержание мутации меньше, чем в положительном ДНК-стандарте) если dCt образца больше dCt положительного ДНК-стандарта.

4.3. Использование математической модели.

Доступ к математической модели осуществляется по ссылке: <https://github.com/Senpumar/CRCProgression>. Для запуска системы необходимым является установка Python 3.9 и ее библиотек: numpy 1.21.4, scikit-learn 1.0.1. Запуск системы осуществляется с помощью файла ProgCRCTest.py через командную строку. Для проведения анализа требуется внесение клинико-морфологических и молекулярно-генетических характеристик пациента.

4.4. Критерии оценки результата

- 1) менее 50% – низкая вероятность одногодичного прогрессирования заболевания;
- 2) от 50 до 65% – неопределенная вероятность одногодичного прогрессирования заболевания;
- 3) более 65% – высокая вероятность одногодичного прогрессирования заболевания.

5. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении метода и пути их устранения.

5.1. Несоблюдения условий взятия, транспортировки и хранения биологического материала.

Устранение: соблюдать правила взятия, транспортировки и хранения биологического материала.

5.2. Нарушения в технологии лабораторного тестирования (несоблюдение времени инкубации, температурного режима и т.д.).

Устранение: не использовать реагенты с истекшим сроком годности, точно следовать инструкции к используемому набору реагентов.