

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., доц. Портянко А.С., д.м.н., проф., академик НАН Беларуси Красный С.А.

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 (C18–C20).

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-полимераза, олигонуклеотиды синтетические (праймеры и зонды), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (ДНТП)).

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 перинеуральной 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
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 ре- акцию (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, °C	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	CCCACTCCATCGAGATTCTCT	-	-
4.	BTM5-2	ATGAAGACSTTCACAGAAAAATAGGTGAT	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 mM	1,0
3.	ДНТП, 10 mM	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, °C	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.