

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Кроткова Е.Н.  
«16» \_\_\_\_\_ 2024 г.  
Регистрационный № 132-1223

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ  
У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ, НА  
ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ мРНК СУРВИВИНА (BIRC5) В  
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ**  
(инструкция по применению)

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы  
народов медицинский университет»

учреждение здравоохранения «Витебский областной клинический  
онкологический диспансер»

**АВТОРЫ:**

Орехва А.В., д.м.н., доцент Шляхтунов Е.А., д.м.н., профессор  
Семенов В.М., д.м.н., профессор Жильцов И.В., к.м.н., доцент  
Шаппо Г.М., Карчмит Е.В., Лях Я.Н., Орехва А.В.

Минск, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения минимальной остаточной болезни на основе оценки экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в циркулирующих опухолевых клетках (далее – ЦОК), применяемый у пациентов, страдающих колоректальным раком (далее – КРР), который может быть использован как дополнительный.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов, врачей-онкологов-хирургов, врачей-радиационных онкологов, врачей-хирургов, врачей-проктологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим опухолевыми новообразованиями толстой кишки.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Злокачественные опухоли толстой кишки (C18-C20).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ**

1. Пробирки стерильные вакуумные с К2ЭДТА объемом 5 мл для хранения периферической венозной крови.
2. Термоциклер для Real-Time PCR.
3. Пластиковые расходные материалы для термоциклера.
4. Микроцентрифуга скоростная (15000 g), пригодная для пробирок объёмом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.

5. Твердотельный термостат, пригодный для пробирок объёмом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для 96-луночных микропланшетов.
6. Вихревой смеситель.
7. Пробирки типа эппендорф 1,5 мл.
8. Дозаторы механические или электронные переменного объема.
9. Одноразовые наконечники (обязательно наконечники с фильтром для предотвращения кросс-контаминации).
10. Наборы для обогащения, выделения и изоляции CD326/ErSAM положительных клеток из периферической крови.
11. Наборы для выделения общей фракции РНК (сорбционный принцип).
12. Набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции.
13. Набор реагентов для проведения ПЦР в режиме реального времени.
14. Средства индивидуальной защиты (лабораторный халат, перчатки, очки)

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ**

1. Первичный этап мониторинга минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих КРР, проводится в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 июля 2018г. № 60 «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований».

2. Определение экспрессии гена *BIRC5* в ЦОК

2.1. Получение и хранение биологического материала

Получение периферической венозной крови осуществляют утром натощак из локтевой вены в стерильную вакуумную пробирку объемом 5 мл с К2ЭДТА. Полученный образец периферической венозной крови транспортируется в контейнере для транспортировки биологических образцов в лабораторию и выполняются последующие этапы исследования. Допускается при необходимости хранение образца в холодильнике не более 4 часов при температуре +4 °С.

## 2.2. Обогащение, выделение и изоляция ЦОК

Обогащение, выделение и изоляцию ЦОК из периферической крови производят с применением метода экспресс-выделения опухолевых клеток из цельной крови на основе ковалентно-связанных антител для CD326 (ЕрСАМ) на немагнитную полимерную матрицу крупных микросфер с последующей изоляцией ЦОК по размеру (согласно инструкции производителя набора для выделения).

## 2.3. Определение нормализованной экспрессии гена *BIRC5* в ЦОК

Из ЦОК выделяют РНК, проводят реакцию обратной транскрипции для получения кДНК, которую используют для проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени с использованием необходимых пар праймеров и зондов для гена *BIRC5* и для контрольного референсного гена *c-ABL*, затем проводят амплификацию по программе: 1 цикл: 95°С – 4 мин.; 45 циклов: 95°С – 30 с, 59°С – 1 мин., проводят детекцию флуоресценции по каналам FAM для гена *BIRC5* и FAM для гена *c-ABL*.

Наличие экспрессии гена *BIRC5* определяется по каналу FAM при этом значения порогового цикла находится в пределах от 18 до 35, и по каналу FAM для гена *c-ABL* значение порогового цикла находится в пределах от 18 до 35. Отсутствие экспрессии гена *BIRC5* определяется по каналу FAM – значение порогового цикла не определяется или больше 35, а по каналу FAM для гена *c-ABL* значение порогового цикла находится в

пределах от 18 до 35.

#### 2.4. Интерпретация результатов

Таблица 1. – Критерии оценки уровня экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК через 9 месяцев после оперативного лечения КРР.

мРНК	Уровень экспрессии, отн. ед.		
	отсутствие прогрессирования колоректального рака	пороговое значение	прогрессирование колоректального рака
Сурвивин ( <i>BIRC5</i> )	<0,2	0,2	≥0,2

В случае если через 9 месяцев после оперативного лечения у пациента в ЦОК определяется уровень нормализованной экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) выше 0,2 относительных единиц, данный результат свидетельствует о наличии у пациента прогрессирования колоректального рака.

В случае если через 9 месяцев после оперативного лечения у пациента в ЦОК определяется уровень нормализованной экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) ниже 0,2 относительных единиц, данный результат свидетельствует об отсутствии прогрессирования колоректального рака.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Возможные ошибки могут быть связаны с неправильным взятием, транспортировкой и хранением биологического материала, применением реагентов с истекшим сроком годности, неточным дозированием реагентов, нарушением технологии лабораторного тестирования (время

инкубации, температурный режим и т. д.), нарушением протокола выделения РНК, синтеза кДНК, и проведения TaqMan ПЦР в режиме реального времени.

Устранение: для того чтобы избежать ошибок нужно точно следовать этапам данной инструкции по применению и инструкциям производителя материалов и реагентов.