

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Н.Кроткова

«16»

06

2022 г.

Регистрационный № 070-06dd

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ НА ОСНОВЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: Пунько А.В., Михалевская Т.М., д.м.н, профессор,
Конопля Н.Е.

Минск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод диагностики злокачественных новообразований головного мозга у детей на основе определения соматических мутаций. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг по диагностике злокачественных новообразований головного мозга у детей.

Настоящая инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов, врачей-патологоанатомов и иных специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам с онкологическими заболеваниями.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Злокачественные новообразования головного мозга у лиц в возрасте до 18 лет (С71.0-71.9).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВПС – высокопроизводительное секвенирование;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

п.о. – пар оснований;

Таq-ДНК полимеразы – термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза;

ФСБ – фосфатно-солевой буфер;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Нестерильные одноразовые перчатки;
дозаторы (от 0,5 до 10 мкл, от 20 до 200 мкл);
наконечники для дозаторов (емкостью от 0,1 до 200 мкл);
пробирки типа «эппендорф» емкостью от 0,2 мкл до 1,5 мл;
пробирки емкостью 15 мл;
лабораторная посуда;
96-луночные планшеты;
оптические пленки для планшетов;
магнитный штатив для пробирок;
морозильная камера -70°C ;
холодильник $+4^{\circ}\text{C}$;
вихревой смеситель;
микроцентрифуга;
термошейкер;
спектрофотометр;
флуориметр;
ПЦР-амплификатор;
аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле;
лабораторные весы;
документирующая система для визуализации результатов
электрофореза;
прибор для проведения капиллярного электрофореза;
прибор для проведения прямого секвенирования по Сенгеру;
прибор для проведения высокопроизводительного секвенирования.

РЕАКТИВЫ

- Раствор ЭДТА (EDTA), 0,1-0,2 мМ;
- раствор трис гидрохлорида (Tris –HCl), 10 Мм;
- раствор NaCl, 5М;
- раствор натрия додецилсульфата (SDS), 10%;
- изопропанол;
- раствор ацетата аммония, 8М;
- фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1);
- смесь фосфатно-солевой буфер (рН 7,2-7,4);
- этанол, 70%;
- этанол, 96%;
- вода деионизированная;
- магнитные шарики для очистки ДНК-библиотек и их селекции по размерам продукта;
- водный раствор гидроксида натрия, 10нМ;
- набор реагентов для выделения ДНК из формалин-фиксированных участков ткани в парафиновых блоках;
- набор реагентов для пробоподготовки библиотек для высокопроизводительного секвенирования по заданному генетическому профилю;
- набор реагентов для мультиплексации библиотек образцов для панельного секвенирования;
- набор реагентов для измерения концентрации ДНК методом флуоресцентного анализа;
- набор реагентов для капиллярного электрофореза с диапазоном детекции от 50 до 7000 пар оснований;

внутренний контроль для оценки качества запуска
высокопроизводительного секвенирования;

Taq ДНК-полимераза;

праймеры для амплификации включенных в панель генов;

5-кратный буфер для проведения ПЦР;

нуклеозидтрифосфаты (дНТФ), 25 мМ;

хлорид магния, 25 мМ;

агарозный гель;

бромистый этидий;

маркеры молекулярного веса.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Выделение ДНК из образцов опухолей;
2. Высокопроизводительное секвенирование по заданному генетическому профилю;
3. Биоинформационный анализ результатов высокопроизводительного секвенирования;
4. Верификация мутаций методом прямого секвенирования по Сенгеру;
5. Интерпретация результатов секвенирования.

1. Выделение ДНК из образцов опухолей

1.1 Выделение ДНК из образцов нефиксированной ткани и крови пациентов

Нативную опухолевую ткань растирают в фарфоровой ступке с жидким азотом до гомогенного состояния. Распределяют обработанный материал на две пробирки: две пробирки с денатурирующим буфером (5M NaCl, 1M Tris-HCl (pH 8,0), 0,5M EDTA (pH 8,0), 10% SDS). Клетки помещают в морозильную камеру и хранят при -70°C .

Осадок, содержащий $5-10 \times 10^6$ клеток, лизируют в денатурирующем буфере (5M NaCl, 1M Tris-HCl (pH 8,0), 0,5M EDTA (pH 8,0), 10% раствора SDS). Перемешивают с использованием вихревого смесителя и инкубируют при 37°C в течение 1-24 часов до образования гомогенного лизата. К лизату добавляют равный объем фенол-хлороформа и перемешивают. Центрифугируют 1 минуту при 5000 об/мин. К нижней фазе добавляют равный объем 8M ацетата аммония, перемешивают и центрифугируют 10-20 минут при 15000 об/мин. В

водную фазу добавляют равный объем изопропанола, перемешивают и центрифугируют при 14000 об/мин 20 минут с охлаждением. Отбирают дозатором водную фазу, к осадку добавляют 500 мкл 70% этанола и центрифугируют на 14000 об/мин 20 минут с охлаждением. Отбирают дозатором надосадочную жидкость, осадок высушивают и растворяют в 100 мкл буфера для элюции ДНК (содержащего 0,1-0,2 мМ EDTA, 10 мМ Tris –HCl, pH=7,5-0,8).

1.2 Выделение ДНК из формалинфиксированных парафиновых блоков

Выделение ДНК из формалинфиксированных парафиновых блоков проводят набором, предназначенным для экстракции ДНК из парафиновых блоков согласно инструкции производителя.

Оценку количества и качества выделенной ДНК проводят с использованием спектрофотометра. Чистоту выделенной ДНК оценивают по интенсивности поглощения света определенной длины волны (260 нм – нуклеиновые кислоты, 280 нм – белок, 230 нм – фенол и другие низкомолекулярные соединения). Соотношение интенсивности поглощения света 260:280 и 260:230 для чистых образцов ДНК должно превышать 1,80-2,00.

Концентрацию ДНК в образце оценивают с использованием флуориметра. Стандартное растворение осуществляют в 30 - 200 мкл - буфера (100 мМ NaCl, 10 мМ TrisHCl, 25 мМ EDTA pH = 7,4 – 8,0). ДНК растворяют в термомиксере при 25 - 40 °С в течение 1 ч. После инкубации раствор ДНК тщательно перемешивают с помощью вихревого смесителя, осаждают капли центрифугированием 5-10 секунд. Измерение выполняют на спектрофотометре, на трех независимых порциях ДНК, по 2 мкл, которые отбирают из пробирки с

ДНК новым типсом после 4 - 5 пипетирований для каждого забора. Для каждого измерения выписывают значение концентрации, соотношение A260/A280 и A260/A230. Чистая ДНК имеет значение A260/A280 в диапазоне 1,7 - 2,0 и A260/A230 в диапазоне 2,0 - 2,3. Раствор ДНК должен иметь концентрацию 250 - 300 нг/мкл.

2. Высокопроизводительное секвенирование по заданному генетическому профилю

Пробоподготовку образцов геномной ДНК для высокопроизводительного секвенирования (ВПС) по заданному генетическому профилю проводят согласно инструкции производителя. Подготовка библиотеки для таргетного секвенирования включает 4 основных этапа, обеспечивающих фланкирование целевых регионов, лигирование технических последовательностей и амплификацию фрагментов библиотеки.

2.1 Приготовление ДНК-библиотеки для таргетного высокопроизводительного секвенирования

Для приготовления ДНК-библиотеки используют набор реагентов для пробоподготовки библиотек по заданному генетическому профилю, включающий реагенты для секвенирования 275 генов, мутации в которых ассоциированы с злокачественными новообразованиями головного мозга (приложение А).

На первом этапе готовят реакционную смесь для фрагментации согласно таблице 2.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для фрагментации

Компонент	Количество
ДНК	10-40 нг
Fragmentation Buffer, 10x	2,5 мкл
FERA Solution	0,75 мкл
Вода	До 20 мкл
Всего	20 мкл

Далее добавляют 5 мкл ферментативной смеси для фрагментации ДНК в каждую пробирку и амплифицируют образцы согласно программе, представленной в таблице 3.

Таблица 3 – Условия амплификации для фрагментации

Шаг	Температура отжига	Время
1	4°C	1 мин
2	32°C	24 мин
3	72°C	30 мин
4	4°C	∞

Далее пробирки переносят в ледяную баню и готовят смесь для лигирования адаптеров согласно таблице 4.

Лигирование проводят в термоциклере при температуре 20°C 15 мин. Далее проводят очистку образцов. В образцы добавляют 50 мкл воды и 100 мкл магнитных шариков. Перемешивают пипетированием, инкубируют 5 мин при комнатной температуре.

По истечении времени инкубации планшет с образцами переносят на магнитный штатив на 10 мин, после чего удаляют супернатант и добавляют 200 мкл свежеприготовленного 80% этанола. Промывку этанолом осуществляют дважды. Планшет оставляют на 10 мин на магнитном штативе при комнатной температуре.

Таблица 4 – Реакционная смесь для лигирования адаптеров

Компонент	Количество
Фрагментированная ДНК	25 мкл
Буфер для лигирования, 5x	10 мкл
IL-N7## адаптер	2,8 мкл
ДНК-лигаза	5 мкл
Раствор для лигирования	7,2 мкл
Вода	До 50 мкл
Всего	50 мкл

Далее добавляют 52 мкл воды и перемешивают пипетированием. Планшет инкубируют на магнитном штативе до полной прозрачности раствора. Далее 50 мкл супернатанта переносят в чистый планшет и добавляют 50 мкл магнитных шариков, инкубируют 5 минут при комнатной температуре.

Далее планшет устанавливают на магнитный штатив на 5 мин, после чего удаляют супернатант и дважды отмывают магнитные шарики 200 мкл 80% этанолом, после чего образцы оставляют на 10-15 минут при комнатной температуре.

Далее добавляют 12 мкл воды к образцам и перемешивают пипетированием. Планшет инкубируют на магнитной подставке до полной прозрачности раствора, после чего супернатант в объеме 9,4 мкл переносят в чистый планшет.

Состав реакционной смеси для обогащения и условия амплификации указаны в таблицах 5 и 6, соответственно.

Таблица 5 – Состав реакционной смеси для обогащения

Компонент	Количество
ДНК-фрагменты, лигированные с адаптерами	9,4 мкл
TEPCR buffer, 5x	4 мкл

QIAseq Targeted DNA Panel	5 мкл
IL-Forward primer	0,8 мкл
HotStarTaq DNA Polymerase	0,8 мкл
Всего	20 мкл

Таблица 6 – Условия амплификации для обогащения

Шаг	Время	Температура	Количество циклов
Общая денатурация	13 мин	95°C	1
	2 мин	98°C	
Денатурация Элонгация	15 сек	98°C	8
	10 мин	68°C	
Досинтез	5 мин	72°C	1
Охлаждение	5 мин	4°C	
Охлаждение	∞	4°C	

После завершения реакции обогащения к образцу добавляют воду до конечного объема 100 мкл. Далее добавляют 100 мкл магнитных шариков. Смесь пипетируют и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Планшет устанавливают на магнитный штатив на 5 мин.

После удаления супернатанта необходимо дважды отмыть осадок в 200 мкл 80% этанола, после чего инкубировать 10 мин при комнатной температуре. Далее планшет убирают с магнитного штатива и элюируют ДНК в 16 мкл воды.

Смесь пипетируют и возвращают планшет на магнитный штатив до полной прозрачности раствора, после чего супернатант в объеме 13,4 мкл в чистый планшет.

Далее проводят амплификацию библиотеки и добавление панель-специфичных адаптеров. Состав реакционной смеси указан в таблице 7.

Таблица 7 – Состав реакционной смеси Universal PCR

Компонент	Количество
Обогащенная ДНК	13,4 мкл
UPCR Buffer, 5x	4 мкл
IL-Universal Primer	0,8 мкл
IL-S502 Index Primer	0,8 мкл
HotStarTaq DNA Polymerase	1 мкл
Всего	20 мкл

Условия реакции амплификации указаны в таблице 8.

Таблица 8 – Условия амплификации Universal PCR

Шаг	Время	Температура	Количество циклов
Общая денатурация	13 мин	95°C	1
	2 мин	98°C	
Денатурация	15 сек	98°C	22
Элонгация	2 мин	60°C	
Досинтез	5 мин	72°C	1
Охлаждение	5 мин	4°C	
Охлаждение	∞	4°C	

После завершения реакции амплификации к образцу добавляют воду до конечного объема 100 мкл. Затем к образцу добавляют 100 мкл магнитных шариков и инкубируют 5 мин при комнатной температуре.

Планшет устанавливают на магнитный штатив, дважды отмывают в 200 мкл 80% этанола и оставляют сушиться 10 мин при комнатной температуре.

Далее планшет снимают с магнитного штатива и элюируют ДНК в 30 мкл воды. Затем планшет возвращают на магнитный штатив до полной прозрачности раствора, после чего отбирают 28 мкл

супернатанта и переносят в чистый планшет. Библиотеку разводят до концентраций от 2 нМ до 4 нМ.

Далее образцы пулируют в эквимольных количествах для получения одинакового количества прочтений участков генов.

Библиотеку разводят до концентрации 1,25 нМ. Далее денатурируют ДНК путем смешивания 10 мкл библиотеки ($C=1,25\text{нМ}$) с 10 мкл NaOH (80%, свежий) и инкубирования в течение 5 мин при комнатной температуре. С помощью гибридизационного буфера, входящего в набор реагентов для мультиплексации библиотек для панельного секвенирования, образец разбавляют до концентрации 12,5 пМ (конечный объем – 600 мкл). Контрольную ДНК-библиотеку PhiX разводят до концентрации 4 нМ, для чего смешивают 3 мкл TRIS-HCl ($\text{pH}=8,5$) с 2 мкл PhiX ($C=10\text{нМ}$). PhiX денатурируют путем добавления 5 мкл NaOH (0,2 н), после чего смесь осаждают и инкубируют при комнатной температуре 5 мин. Далее PhiX необходимо развести до концентрации 12,5 пМ. Для получения конечной библиотеки объемом 600 мкл, содержащей 3% PhiX, смешивают 582 мкл ДНК-библиотеки и 18 мкл PhiX. Готовую ДНК-библиотеку загружают в картридж и проводят секвенирование на секвенаторе следующего поколения, обеспечивающим секвенирование 15 Gb нуклеотидов.

3. Биоинформационный анализ результатов высокопроизводительного секвенирования

Первичный биоинформационный анализ данных ВПС включает оценку основных параметров запуска и демультиплексирование полученных прочтений с последующим формированием файлов

формата fastq для каждого образца библиотеки. Данный этап предполагает использование программ MiSeq Reporter и Sequencing Analysis Viewer или их аналогов.

3.1 Анализ и обработка «сырых» данных

Качественная и количественная характеристика прочтений для каждого образца проводится с использованием универсальной программы FastQC (исходные данные – файлы с расширением FASTQ). В процессе анализа учитываются следующие показатели: качество по шкале Phred ($Q \geq 30$) для каждого цикла, качество определения нуклеотидов в каждой клетке проточной ячейки, процентное соотношение нуклеотидов в процессе секвенирования, длина последовательности, количество дубликатов (часто повторяющихся последовательностей), отсутствие адаптеров.

Удаление технических последовательностей (адаптеров), фильтрация по качеству ($Q \geq 25$) и длине прочтений (не менее 80 п.о.) осуществляется с использованием программы Trimmomatic или аналогов с последующей оценкой качества отсортированных FASTQ файлов.

3.2 Выравнивание прочтений и вызов вариантов

Выравнивание последовательностей осуществляется в соответствии с геномом версии hg19 (UCSC) с использованием программного пакета для сопоставления последовательностей от 70 п.н. до 1 Мбп. с геном человека для парноконцевых прочтений. Работа с выравниваниями (SAM/BAM форматами), включающая сортировку, индексацию, фильтрацию по качеству и маркирование дубликатов, поиск вариантов, отличающихся от референсной последовательности

(генерирование файла с расширением vcf), выполняется с использованием программы SAMtools v.1.4-18 и GATK или аналогов.

Оценка количества прочтений участков осуществляется также с использованием вышеуказанных программ или их аналогов. Удовлетворительным для соматических мутаций считается не менее 500 прочтений на нуклеотид. Вызов вариантов осуществляется при частоте альтернативного варианта не менее 5%.

3.3 Аннотация вариантов

Анализ выявленных вариантов выполняется с использованием программ для функционального аннотирования генетических вариантов. Фильтрация аннотированных данных проводится с учетом следующих показателей:

- Частота встречаемости в мировой и европейской популяциях (открытые базы данных «1000 геномов», «Exome Aggregation Consortium»). При значении частоты встречаемости более 1% идентифицируемое изменение считалось не патогенным;

- Локализация замены в гене: экзон и сплайс-варианты;

- Тип мутации: исключают синонимичные замены. При отсутствии информации о патогенетической значимости варианта (отсутствие клинического значения), варианты типа «инделлы со сдвигом рамки считывания» и «замены, приводящие к образованию преждевременного стоп-кодона» считаются патогенетически значимыми. В отношении несинонимичных замен при условии отсутствия информации о клинической значимости учитываются данные предикторов патогенности, таких как PolyPhen-2, SIFT и др.

4. Верификация клон-специфичных мутаций методом прямого секвенирования по Сенгеру

Подбор праймеров осуществляется с использованием программного обеспечения Primer3Plus или его аналогов, а также онлайн базы данных Ensembl. В качестве референсных последовательностей используется сборка генома человека версии GRCh37. Праймеры должны быть применимы для амплификации фрагмента гена, содержащего выявленную с помощью высокопроизводительного секвенирования мутацию.

В состав реакционной смеси для ПЦР входят: 5x ПЦР буфер (5,5 мкл), 25 мМ MgCl₂ – 1,25, 25 мМ дНТФ – 0,2 мкл, Taq ДНК-полимераза (5 ед/мкл) – 0,2 мкл, праймеры – по 1 мкл, ДНК матрица – 100 нг, вода – до 25 мкл. После амплификации проводят визуализацию результатов ПЦР с использованием электрофореза в агарозном геле. Измерение концентрации ПЦР-продукта проводят методом флуориметрии.

Секвенирование таргетных последовательностей проводится на анализаторе, предназначенном для капиллярного секвенирования. Секвенирование фрагментов осуществляется с использованием реагентов, предназначенных для секвенирования, согласно инструкции производителя. Очистка реакции секвенирования проводится методом спиртовой преципитации. Биоинформационный анализ проводят с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2.0, BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3, NCBI BLAST или их аналогов.

5. Интерпретирование результатов

5.1 Оценка диагностического значения патогенных мутаций

Анализ выявленных патогенных мутаций в комплексе с оценкой гистологических, рентгенологических и клинических данных используют для выставления диагноза злокачественного новообразования. Наиболее часто встречающиеся примеры отражены в таблице 9.

Таблица 9 – Перечень диагностически значимых мутаций

Гены	Нозологические формы, для которых мутации в данных генах специфичны
H3F3A	Диффузная полушарная глиома, ассоциированная с H3G34
HIST1H3B/C	Диффузная срединная глиома
TP53	Диффузная срединная глиома Диффузная полушарная глиома, ассоциированная с H3G34 Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt Медуллобластома SHH подтипа
ATRX	Диффузная срединная глиома Диффузная полушарная глиома, ассоциированная с H3G34
PDGFRa	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
ACVR1	Диффузная срединная глиома
PI3CA	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
NF1	Пилоцитарная астроцитома
PIK3R1	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
PPM1D	Диффузная срединная глиома
EGFR	Таламические глиомы Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
PTEN	Диффузная срединная глиома Медуллобластома SHH подтипа
BCOR	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt

ATM	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
BRAF	Пилоцитарная астроцитома Плеоморфная ксантоастроцитома Эпителиоидная глиобластома
FGFR1	Розеткоформирующая глионейрональная опухоль Дисэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль
SETD2	Диффузная срединная глиома
TERT	Плеоморфная ксантоастроцитома Глиобластома IDHwt
CIC	Олигодендроглиома
IDH1	Астроцитома, ассоциированная с мутацией IDH Олигодендроглиома
IDH2	Астроцитома, ассоциированная с мутацией IDH
ASXL1	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
PTPN11	Пилоцитарная астроцитома Розеткоформирующая глионейрональная опухоль
SMO	Медуллобластома SHH подтипа
PTCH1	Медуллобластома SHH подтипа
SUFU	Медуллобластома SHH подтипа
KMT2D	Медуллобластома
KMT2C	Медуллобластома
SMARCA4	Медуллобластома
BRCA2	Медуллобластома
PALB	Медуллобластома
CREBBP	Медуллобластома nonWNT/nonSHH подтипа
CTNNB1	Медуллобластома WNT подтипа

5.2 Оценка прогностического значения патогенных мутаций

В случае медуллобластомы наличие амплификации CMYC или обнаружение при секвенировании ткани мутаций гена TP53 или генов

ATM	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
BRAF	Пилоцитарная астроцитома Плеоморфная ксантоастроцитома Эпителиоидная глиобластома
FGFR1	Розеткоформирующая глионейрональная опухоль Дисэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль
SETD2	Диффузная срединная глиома
TERT	Плеоморфная ксантоастроцитома Глиобластома IDHwt
CIC	Олигодендроглиома
IDH1	Астроцитома, ассоциированная с мутацией IDH Олигодендроглиома
IDH2	Астроцитома, ассоциированная с мутацией IDH
ASXL1	Диффузная высокозлокачественная глиома педиатрического типа IDHwt, H3F3Awt
PTPN11	Пилоцитарная астроцитома Розеткоформирующая глионейрональная опухоль
SMO	Медуллобластома SHHподтипа
PTCH1	Медуллобластома SHHподтипа
SUFU	Медуллобластома SHHподтипа
KMT2D	Медуллобластома
KMT2C	Медуллобластома
SMARCA4	Медуллобластома
BRCA2	Медуллобластома
PALB	Медуллобластома
CREBBP	Медуллобластома non WNT/nonSHH подтипа
CTNNB1	Медуллобластома WNTподтипа

Диагноз подтверждается гистологическими, рентгенологическими и клиническими данными.

Возможные ошибки и осложнения.

1. Использование реагентов, условия хранения которых не соблюдались.

Устранение: соблюдать условия хранения.

2. Неточное дозирование реагентов.

Устранение: ежегодно поверять автоматические дозаторы переменного объема.

Панель генов для определения соматических мутаций при опухолях
головного мозга у детей (275 генов)

ABL, ACVR1B, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AMER, CCNE1, CD274, CD79a, CD79B, CDC73, CDH1, CDK12, GNA11, GNAQ, GNAS, GREM1, GRIN2A, H3F3a, HGF, APC, AR, ARAF, ARID1a, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATM, ATR, ATRX, AURKA, AURKB, AURKC, AXIN1,AXIN2,B2M, BAP1, BCL2, BCL2L1, CDK4, CDK6, CDLN2a, CDKN2B, CDKN2C, CHEK1,CHEK2, CIC, CREBBP, CRLF2, CSF1R,CSF3R, CTCF, CTNNA1, CTNNB1, CUX1, CXCR4, CYLD, HISTH3B, HNF1A, HOXB1, HRAS, HSP90AA1, ID3, IDH1, IDH2, IGFR1, IKZF1, IKZF3, IL7R, INHBA, IRF4, JAK1, JAK2, JAK3, KAT6A, KDM5C, BCL6, BCOR, BCORL1, BCR, BIRC3, BLM, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BTK, CALR, CARD11, CBL, CBLB, CBLC, CCND1, CCND3, DAXX, DDR2, DICER1, DNM2, DNMT3A, DOTIL, EED, EGFR, EGLN1, EP300, EPAS1, EPHA3, EPHA5,ERBB2, ERBB3, ERB4, ERG, ESR1, ETV6, KDM6, KDR, KEAP1, KIT, KMT2A, KMT2C, KMT2B, KMT2D, KRAS, LRP1B, MAP2K1,MAP2K2, MAP3K1, MAP3K14, MAPK1, MCL1, MDM2, MDM4, EXO1, EZH2, FAM175A, FAM46C, FANCA, FANCC,FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FAS, FBXW7, FGF4, FGF6, FGFR1, FGFR2, FGFR3,FGFR4, FH, MED12, MEF2B, MEN1, MET, MITF, MLH1, MPL, MRE11A, MSH2, MSH6, MTOR, MUTYH, MYC, MYCL,MYCN, MYD88, NF1,NF2,NFE2L2, FLCN,FLT3,FLT4, FOXL2, FUBP1, GALNT12, GATA1, GATA2, GATA3, GEN1, NFKBIA, NKX2-1, NOTCH1, NOTCH2,NOTCH3, NPM1,NRAS,NSD1,NTRK1, NTRK2, NTRK3, PAK3, PALB2, PAX5, PBRM1, PDGFRA, U2AF2, VHL, WHSC1, WT1, XPO1, XRCC2, PDGFRB, PHF6, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R2, PIM1, PLGG1, PMS1, PMS2, POLD1, POLE, PPM1D, PPP2R1A, PRDM1, PRKAR1A, PRKDC, PRSS1, PTCH1, PTEN, XRCC3, ZNF217, ZRSR2, PTPN11, RAC1, RAD21, RAD50, RAD51, RAF1, RB1, RET, RJEB, RJOA, RIT1, RNF43, ROS1, RUNX1, SDJB, SETBP1, SETD2, SF3B1, SMAD2, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMC1A, SMC3, SMO, SOCS1, SOX2, SOX9, SPOP, SEC, SRSF2, STAG2, STAT3, STK11, SUFU, SUZ12, TAL1, TCF3,TERT, TET2, TGFBR2, TNFAIP3, TNFRSF14, TP53, TRAF3, TSC1, TSC2, TSHR, U2AF1