

Listopad 2019

# Návod k použití soupravy *therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR Kit (příručka)



Verze 1



Kvalitativní diagnostika in vitro

K použití s přístrojem Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO



1119793CZ

# Obsah

QIAGEN Sample and Assay Technologies .....	4
Účel použití.....	5
Shrnutí a vysvětlení .....	6
Princip testu.....	7
Dodávané materiály .....	11
<b>Obsah soupravy</b> .....	<b>11</b>
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy .....	12
Varování a bezpečnostní opatření .....	14
<b>Informace o bezpečnosti</b> .....	<b>14</b>
<b>Všeobecná bezpečnostní opatření</b> .....	<b>14</b>
Skladování činidel a manipulace s nimi .....	16
Odběr vzorků, příprava pro analýzu a skladování .....	17
Postup .....	19
<b>Extrakce DNA</b> .....	<b>19</b>
<b>Protokol: Vyhodnocení alikvotu DNA</b> .....	<b>21</b>
<b>Protokol: Detekce mutací KRAS</b> .....	<b>34</b>
Interpretace výsledků .....	46
Návod na řešení potíží .....	48
<b>Příznaky generované softwarem <i>therascreen</i> KRAS Assay Package</b> .....	<b>49</b>
Kontrola kvality .....	52
Omezení .....	52
Charakteristika funkčních vlastností .....	53

---

Analytická účinnost .....	53
Mezní hodnota .....	53
Hodnoty meze slepého alikvotu .....	54
Porovnání s analytickou referenční metodou: CRC .....	54
Porovnání s analytickou referenční metodou: NSCLC .....	57
Limit detekce (Limit of Detection, LOD).....	59
Vstupní úrovně DNA a linearita .....	61
Interferující látky.....	65
Křížová kontaminace.....	66
Exkluzivita / zkřížená reaktivita .....	67
Opakovatelnost a reprodukovatelnost.....	69
Variabilita manipulace s alikvoty .....	72
Rovnocennost metod získávání alikvotů (pouze NSCLC).....	73
Literatura .....	74
Symby.....	77
Kontaktní údaje .....	78
Příloha 1: Souprava <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit – manuální protokol.....	79
Interpretace výsledků (manuální) .....	97
Nastavení softwarové analýzy.....	97
Analýza dat hodnocení alikvoty.....	98
Analýza alikvotů .....	101
Příloha 2: Instalace softwaru <i>therascreen</i> KRAS Assay Package .....	106
Informace pro objednání.....	110
Historie revizí dokumentu .....	112

---

# QIAGEN Sample and Assay Technologies

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování alikvotů a analýz, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického alikvotu. Naše vyspělé, vysoce kvalitní produkty a služby vám zajistí úspěšný průběh od odběru alikvotu až po výsledek.

Společnost QIAGEN určuje standardy pro:

- purifikaci DNA, RNA a proteinů,
- analýzy nukleových kyselin a proteinů,
- výzkum microRNA a RNAi,
- automatizaci technologií pro přípravu alikvotů a analýz.

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Účel použití

Souprava *therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR Kit je analýza real-time PCR pro kvalitativní detekci 7 somatických mutací v kodonech 12 a 13 lidského onkogenu KRAS s využitím přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Souprava je určena k použití s DNA extrahovanou z nádorové kolorektální tkáně (Colorectal Cancer, CRC) fixované formalinem zalité v parafinu (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) nebo z primárních alikvotů tkáně nemalobuněčného karcinomu plic (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), které byly odebrány resekcí, biopsií dutou jehlou (Core Needle Biopsy, CNB) nebo aspirační biopsií tenkou jehlou (Fine Needle Aspiration, FNA).

Somatické mutace v genu KRAS jsou potenciální prediktivní biomarkery resistance vůči léčbě receptorem epidermálního růstového faktoru (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), jako jsou panitumumab nebo cetuximab v léčbě kolorektálního karcinomu. Somatické mutace v genu KRAS mohou být i potenciálním prediktivním biomarkerem pro rozhodnutí o určitých způsobech léčby NSCLC.

Typ mutace pacienta posoudí odborný lékař spolu s dalšími faktory onemocnění a stanoví odpovídající léčbu. Léčebný plán pro pacienty s karcinomem se nesmí opírat pouze o samotný výsledek analýzy mutací onkogenu KRAS.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit není určena k diagnóze CRC, NSCLC nebo jiných onemocnění.

# Shrnutí a vysvětlení

Mutace onkogenu KRAS se objevují v lidských karcinomech velmi často (1–4). Díky použití technologií Scorpions® a ARMS® (Allele Refractory Mutation System) (5, 6) umožňuje souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit detekci 7 mutací v kodonech 12 a 13 onkogenu KRAS vůči pozadí genomové DNA divokého typu (tabulka 1). Na základě dat v databázi COSMIC (2015 v72) vykazalo 7 mutací detekovaných soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit > 95 % všech hlášených mutací KRAS u pacientů s CRC a > 88 % všech hlášených mutací u pacientů s NSCLC (7).

**Tabulka 1. Přehled mutací a identit kódů COSMIC**

Mutace	Změna báze	COSMIC ID*
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

\* Kódy mutací (COSMIC ID) vycházejí z *Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (Catalog of Somatic Mutations in Cancer)* (7) ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

Tento test je vysoce specifický a citlivý, umožňuje tak detekci nízkého procenta mutované DNA oproti pozadí DNA genu divokého typu. Za předpokladu, že je k dispozici dostatečné množství kopií DNA, je možná detekce 0,8% mutace na pozadí genomové DNA divokého typu (viz „Charakteristika funkčních vlastností“, strana 53, kde naleznete informace o limitu detekce pro každou mutaci).

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se používá v postupu polymerázových řetězových reakcí (Polymerase Chain Reaction, PCR). Výhoda této testovací soupravy spočívá v tom, že je vysoce specifická vůči cíli a je rychlá a účinná bez nutnosti subjektivního stanovení výsledků.

---

# Princip testu

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit využívá k detekci mutací 2 technologie – ARMS a Scorpions – při real-time PCR.

## Reakční směsi mutací

Každá reakční směs využívá primer ARMS specifický pro danou mutaci k selektivní amplifikaci mutované DNA a poté primer Scorpions k detekci produktu amplifikace.

## ARMS

Alelicky specifické amplifikace je dosaženo pomocí ARMS, který využívá schopnost *Taq* DNA polymerázy rozlišovat mezi shodnou a neshodnou bází na 3'-konci PCR primeru. Pokud se primer zcela shoduje, amplifikace pokračuje s plnou účinností. Pokud se 3'-báze neshoduje, může probíhat pouze amplifikace na nízké úrovni v pozadí reakce. Proto lze mutované sekvence selektivně amplifikovat, dokonce i v případech, kdy většina DNA mutaci neobsahuje.

## Scorpions

Detekce amplifikace se provádí pomocí detekčních sond Scorpions. Sondy Scorpions jsou bifunkční molekuly obsahující PCR primer kovalentně vázaný na sondu. Tato sonda obsahuje fluorofor karboxyfluorescein (FAM™) a zhášec. Zhášec tlumí fluorescenci fluoroforu. Jakmile se sonda během PCR naváže na amplikon ARMS, fluorofor a zhášec se oddělí, což vede k detekovatelnému zvýšení fluorescence.

## Formát soupravy

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit obsahuje 8 analýz:

- 1 kontrolní analýza (kontrolní reakční směs; CTRL)
- 7 analýz mutací (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Reakční směsi jsou duplexní a obsahují činidla značená pomocí FAM určená k detekci cílů a interní kontrolu značenou pomocí HEX™. Činidla reakční směsi a pozitivní kontroly obsahují pufr Tris EDTA a pozitivní kontrola obsahuje nosič Poly A RNA.

## Analýzy

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit zahrnuje postup o 2 krocích. V prvním kroku se provádí kontrolní analýza ke stanovení celkového množství amplifikovatelného DNA KRAS v alikvotu. Druhým krokem je provedení analýzy mutace a kontrolní analýzy ke stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti mutované DNA.

## Kontrolní reakce

Kontrolní reakční směs (CTRL) používá primer Scorpions a neznačený primer k amplifikaci krátké sekvence exonu 4 genu KRAS. Kontrolní reakce se používá ke stanovení, zda alikvot obsahuje patřičnou hladinu amplifikovatelné DNA, a v analytických výpočtech je použit faktor, který se používá k určení stavu mutace.

## Kontrolní analýza

Kontrolní analýza, značená FAM, se používá ke stanovení celkového množství amplifikovatelného DNA KRAS v alikvotu. Při této kontrolní analýze se amplifikuje oblast exonu 4 genu KRAS. Amplifikace pomocí primerů a sondy Scorpions, jejíž amplifikace je nezávislá na všech známých polymorfismech KRAS.

## Analýzy mutací

Každá analýza mutace zahrnuje sondu Scorpions označenou FAM a primer ARMS pro rozlišení mezi přirozenou DNA divokého typu a specifickou mutovanou DNA.

## Kontroly

**Poznámka:** Všechny cykly experimentů musejí zahrnovat pozitivní a negativní kontroly.

### Interní kontrola

Každá reakční směs obsahuje vedle cílové reakce navíc i interní kontrolní reakci. Selhání indikuje, že buď jsou přítomny inhibitory, které mohou způsobit nepřesné výsledky, nebo u dané zkumavky došlo k chybě obsluhy při její přípravě. Pokud k selhání interní kontroly došlo kvůli inhibici PCR, zředění alikvotu může pomoci snížit účinek inhibitorů. Je ale třeba poznamenat, že to zředí i cílovou DNA. Souprava obsahuje zkumavku vody pro ředění alikvotů (Dil.). Alikvoty se mají ředit vodou na ředění alikvotů (Dil.).

### Pozitivní kontrola

Každý cyklus musí obsahovat pozitivní kontrolu ve zkumavkách 1–5. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit obsahuje pozitivní kontrolu KRAS (Positive Control, PC), která se používá jako templát v reakci pozitivní kontroly. Vyhodnocením výsledků pozitivní kontroly se ověří, že souprava splňuje uvedené parametry přijatelnosti.

### Negativní kontrola

Každý cyklus musí obsahovat negativní kontrolu („beztemplátová kontrola“) ve zkumavkách 9–13. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit obsahuje vodu pro NTC (No Template Control, NTC), která se používá jako „templát“ v reakci beztemplátové kontroly. Beztemplátová kontrola se používá k vyhodnocení potenciální kontaminace v průběhu nastavení cyklu a k vyhodnocení výkonu reakce interní kontroly.

---

## Stanovení alikvotu

Kontrolní reakční směs (CTRL) dodávaná spolu se soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se používá ke stanovení celkového množství amplifikovatelné KRAS DNA v alikvotu. Při této kontrolní analýze se amplifikuje oblast exonu 4 genu KRAS. Alikvoty doporučujeme stanovit pouze pomocí této kontrolní analýzy za použití pozitivní kontroly KRAS (Positive Control, PC) jako pozitivní kontroly a vody pro NTC jako beztemplátové kontroly.

## Platforma a software

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je speciálně navržena pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Software Rotor-Gene Q a balíček analýz *therascreen* KRAS Assay Package lze stáhnout z webových stránek nebo objednat na CD.

Přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM musejí být udržovány dle požadavků v uživatelské příručce přístroje. Informace týkající se přístroje jsou uvedeny v uživatelské příručce.

Návod k instalaci naleznete v Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package.

# Dodávané materiály

## Obsah soupravy

<b>therascreen KRAS RGQ PCR Kit</b>				<b>(24)</b>
<b>Katalogové č.</b>		<b>Identifikace zkumavky</b>		<b>874011</b>
<b>Počet prep.</b>				<b>24</b>
<b>Barva</b>	<b>Identita</b>			<b>Objem</b>
Červená	Control Reaction Mix (kontrolní reakční směs)	1	CTRL	2× 600 µl
Fialová	12ALA Reaction Mix (reakční směs 12ALA)	2	12ALA	600 µl
Oranžová	12ASP Reaction Mix (reakční směs 12ASP)	3	12ASP	600 µl
Růžová	12ARG Reaction Mix (reakční směs 12ARG)	4	12ARG	600 µl
Zelená	12CYS Reaction Mix (reakční směs 12CYS)	5	12CYS	600 µl
Žlutá	12SER Reaction Mix (reakční směs 12SER)	6	12SER	600 µl
Šedá	12VAL Reaction Mix (reakční směs 12VAL)	7	12VAL	600 µl
Modrá	13ASP Reaction Mix (reakční směs 13ASP)	8	13ASP	600 µl
Béžová	KRAS Positive Control (pozitivní kontrola KRAS)	9	PC	250 µl
Zelenomodrá	Taq DNA Polymerase (Taq DNA polymeráza)		<i>Taq</i>	80 µl
Bílá	Water for NTC (voda pro NTC)		NTC	1,9 ml
Bílá	Water for Sample Dilution (voda pro ředění alikvotů)		Dil.	1,9 ml
<i>příručka therascreen KRAS RGQ PCR Kit (anglicky)</i>				1

# Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL) které obdržíte od dodavatele výrobku.

## Činidla

- Souprava QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404; viz Extrakce DNA)
- Xylen
- Etanol (96–100%)\*

## Spotřební materiály

- Sterilní špičky pipet s filtry (aby se předešlo křížové kontaminaci, doporučujeme pipety s aerosolovými bariérami)
- Sterilní mikrocentrifugační zkumavky na přípravu master mixů
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, použití s rotorem 72-Well Rotor (kat. č. 981103 nebo 981106)

## Vybavení

- Přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM s fluorescenčními kanály pro „Cycling Green“ a „Cycling Yellow“ (detekce FAM a HEX v uvedeném pořadí)
- Software Rotor-Gene Q verze 2.3 s balíčkem analýz KRAS Assay Package (verze 3.1.1) nainstalované pro automatickou detekci mutací (viz Příloha 2: Instalace softwaru theascreen KRAS Assay Package).

**Poznámka:** Software Rotor-Gene Q lze použít pro manuální detekci mutací bez balíčku analýz KRAS Assay Package. Viz Příloha 1: *Souprava theascreen KRAS RGQ PCR Kit – manuální protokol.*

\* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.

- 
- Termomixer\*, vyhříváný orbitální inkubátor, topný blok nebo vodní lázeň s možností inkubace při teplotě 56 °C a 90 °C.
  - Stolní odstředivka† s rotorem pro 1,5ml zkumavky
  - Stolní třepačka†
  - Pipety (nastavitelné), vyhrazené k přípravě alikvotu†
  - Pipety (nastavitelné) určené výhradně pro přípravu PCR master mixu\*
  - Pipety (nastavitelné) určené výhradně na dávkování templátu DNA\*

\* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

† Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.

# Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro

## Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

## Všeobecná bezpečnostní opatření

Uživatel musí vždy věnovat pozornost následujícím okolnostem:

- Pozitivní materiály (vzorky a pozitivní kontroly) skladujte a extrahujte odděleně od všech ostatních činidel. Do reakční směsi je přidávejte v odděleném prostoru.
- Při provádění PCR dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke kontaminaci reakcí PCR syntetickým kontrolním materiálem. Pro přípravu reakčních směsí a přidávání templátu DNA se doporučuje používat zvláště vyhrazené pipety. Příprava a dávkování reakčních směsí musejí být prováděny v prostoru odděleném od místa, kde se provádí dávkování templátu. Zkumavky přístroje Rotor-Gene Q po dokončení PCR cyklu nikdy neotevírejte. Předejdete tak laboratorní kontaminaci produkty vzniklými po PCR.
- Činidla v soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit jsou již optimálně naředěna. Další ředění činidel se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu. Nedoporučujeme používat menší reakční objemy než 25 µl, protože to zvyšuje riziko falešně pozitivních výsledků.

- 
- Všechna činidla v soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit mají specifické složení pro optimální výkon. Všechna reakční činidla dodávaná v soupravě jsou určena k použití výhradně s ostatními činidly ve stejné soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Má-li být zachován optimální výkon testu, nelze se soupravou používat žádná náhradní činidla.
  - Používejte výhradně *Taq* DNA polymerázu (*Taq*), která se dodává v soupravě. Nenahrazujte ji *Taq* DNA polymerázou dodávanou jako součást jiné soupravy stejného nebo jiného typu ani ji nezaměňujte za *Taq* DNA polymerázu od jiného dodavatele.

---

## Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je dodávána na suchém ledu. Pokud není jakákoliv součást soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit při dodání zmrzlá, během přepravy došlo k otevření vnějšího obalu nebo zásilka neobsahuje balicí list, příručku nebo činidla, obraťte se na oddělení technických služeb společnosti QIAGEN nebo na místní prodejce (viz zadní obálka nebo navštivte stránky [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit uložte ihned po dodání do mrazničky a skladujte v temnu při konstantní teplotě  $-30$  až  $-15$  °C. Jako všechny fluorescentně značené molekuly je třeba i detekční sondy Scorpions chránit před světlem, aby nebyly poškozeny vysvícením (photobleaching) a neztratily výkon.

Při uchovávání v doporučených podmínkách v původním balení je souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit stabilní až do uvedeného data expirace. Soupravu opakovaně nerozmrazujte a nezmrazujte. Nepřekračujte maximální počet 6 cyklů zmrazení/rozmrazení.

# Odběr vzorků, příprava pro analýzu a skladování

**Poznámka:** Se všemi alikvoty se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.

Materiál alikvotů musí být lidská genomová DNA extrahovaná ze vzorků tkání FFPE. Vzorky musejí být dopravovány v souladu se standardní patologickou metodologií, aby byla zajištěna kvalita vzorku.

Alikvoty nádorů jsou heterogenní a naměřené výsledky z alikvotu nádoru se nemusí shodovat s výsledky z jiných částí téhož nádoru. Alikvoty nádoru mohou také obsahovat nenádorovou tkáň. U DNA z nenádorové tkáně se neočekává přítomnost mutací, které detekuje souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

## Příprava alikvotů tkání

**Poznámka:** Používejte pouze suché skalpely. Neprovádějte tento krok v boxu s laminárním prouděním nebo odsáváním par.

- Seškrábněte nádorovou tkáň z řezů do označených mikrocentrifugačních zkumavek, a to vždy novým skalpelem u každého alikvotu.

## Příprava alikvotů tkáně pro extrakci DNA (Colorectal Cancer, CRC)

- S použitím standardních materiálů a metod zafixujte vzorek tkáně do 10% neutrálního pufovaného formalinu (Neutral Buffered Formalin, NBF) a zalijte vzorek tkáně do parafinu. Pomocí mikrotomu nařežte z parafínového bloku sériové řezy o šířce 5 µm a umístěte je na skleněná podložní sklíčka.
- Školený odborník (např. patolog) musí posoudit řez obarvený hematoxylinem a eosinem a určit obsah nádoru a jeho rozsah. Označte barvené sklíčko k rozlišení nádoru od normální tkáně. Použijte sériové řezy k extrakci DNA.
- Řezy s > 20% obsahem nádoru podle oblasti ke zpracování bez makrodisekce (viz níže).

- Pro řezy s < 20% obsahem nádoru podle oblasti proveďte makrodisekci jednoho nebo více řezů. Tkáň bez nádoru zlikvidujte.
- U řezů o ploše menší než < 4 mm<sup>2</sup> zpracujte 2 nebo více řezů, aby se zvýšila celková plocha nádorové tkáně alespoň na 4 mm<sup>2</sup> (platí pro alikvoty s provedením makrodisekce i bez ní). Tkáň bez nádoru zlikvidujte.
- Nadbytečný parafín seškrábněte z tkáňového řezu nepoužitým sterilním skalpelem.

#### Příprava alikvotů tkáně pro extrakci DNA (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)

- S použitím standardních materiálů a metod zafixujte vzorek tkáně do 10% NBF a zalijte vzorek tkáně do parafínu. Pomocí mikrotomu nařežte z parafínového bloku sériové řezy o šířce 5 μm a umístěte je na skleněná podložní sklíčka.
- Školený odborník (např. patolog) musí posoudit řez obarvený hematoxylinem a eosinem z hlediska přítomnosti nádoru. Použijte sériové řezy k extrakci DNA.
- Nadbytečný parafín seškrábněte z tkáňového řezu nepoužitým sterilním skalpelem.

#### Skladování

Bloky FFPE a podložní sklíčka uchovávejte při pokojové teplotě. Sklíčka je možné před extrakcí DNA uchovávat při pokojové teplotě až po dobu 4 týdnů.

Genomová DNA může být uchována při teplotě 2–8 °C po dobu 1 týdne po extrakci, poté při teplotě –25 až –15 °C až 8 týdnů před použitím.

---

# Postup

## Extrakce DNA

Charakteristika funkčních vlastností soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit byla stanovena na základě DNA extrahované pomocí soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404). Používáte-li soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, proveďte extrakci DNA podle pokynů v příručce, přičemž berte na vědomí následující informace.

### Extrakce DNA (aliquoty CRC)

- Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit musí být použita pouze ručně.
- Nepoužívejte krok s RNázou popsaný v příručce k soupravě QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Nepoužívejte produkt QIAGEN Deparaffinization Solution. Používejte pouze xyleneovou/etanolovou metodu deparafinizace popsanou v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Rozklad pomocí proteinázy K (krok 11 v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) musí být prováděn po dobu 1 hodiny.
- Aliquoty se musejí eluovat pomocí 200 µl elučního pufru (Buffer ATE) ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

---

## Extrakce DNA (aliquoty NSCLC)

- Pro extrakci používejte 2 řezy o šířce 5 µm.
- Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit musí být použita pouze ručně.
- Nepoužívejte krok s RNázou popsaný v příručce k soupravě QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Nepoužívejte produkt QIAGEN Deparaffinization Solution dodávaný k soupravě QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Používejte pouze xylene/etanolovou metodu deparafinizace popsanou v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Rozklad pomocí proteinázy K (krok 11 v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) musí být prováděn po dobu 1 hodiny.
- Přidejte 60 µl elučního pufru (ATE) ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit a inkubujte při teplotě místnosti po dobu 2,5 minuty.
- Odstřed'ujte při plné rychlosti po dobu 1 minuty.
- Přidejte dalších 60 µl elučního pufru (ATE) ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit a inkubujte při teplotě místnosti po dobu 2,5 minuty.
- Odstřed'ujte při plné rychlosti po dobu 1 minuty.

## Protokol: Vyhodnocení alikvotu DNA

Tento protokol je určen ke zjištění celkového amplifikovatelného obsahu DNA v alikvotech pomocí analýzy KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) pro automatizované stanovení alikvotu.

**Poznámka:** Manuální stanovení alikvotu je popsáno v Příloha 1: Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit – manuální protokol.

### Důležité body před zahájením používání

- Pomocí dostupné kontrolní reakční směsi CTRL lze vyhodnotit až 24 alikvotů.
- K vyhodnocení DNA před testováním používejte kontrolní reakční směs CTRL.

**Poznámka:** Je důležité pro toto vyhodnocení použít kontrolní reakční směs CTRL dle níže uvedeného popisu, nikoliv spektrofotometrii nebo jinou alternativní metodu. Silně rozložená DNA nemusí být amplifikována, i když primery vytvoří krátké fragmenty DNA.

- Pro efektivní použití činidel v soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit použijte co možná nejvíce alikvotů DNA, abyste vytvořili kompletně naplněné testovací cykly. Při testování jednotlivých alikvotů nebo v menších množstvích se spotřebuje více činidel a sníží se tak celkový počet alikvotů, který je možné testovat pomocí jedné soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Před prvním použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM zajistěte, aby byla instalována správná verze softwaru *therascreen* KRAS Assay Package odpovídající aktuální verzi softwaru Rotor-Gene Q (viz Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package).

## Postup

1. Úplně rozmrazte kontrolní reakční směs (zkumavka CTRL), vodu bez obsahu nukleázy pro beztemplátovou kontrolu (No Template Control, NTC) a pozitivní kontrolu KRAS (Positive Control, PC) na pokojovou teplotu (15–30 °C) po dobu nejméně 1 hodiny.

**Poznámka:** Nechte Taq DNA polymerázu (Taq) ohřát na pokojovou teplotu (15–30 °C) ve stejnou chvíli jako ostatní činidla (viz Skladování činidel a manipulace s nimi). Zkumavku krátce odstředte, aby se veškerý enzym shromáždil na dně zkumavky.

Doby pro rozmrazení činidel, přípravu PCR a skladování před provedením cyklu jsou uvedeny v tabulce 2.

**Poznámka:** PCR provádějte při pokojové teplotě.

**Tabulka 2. Doby pro rozmrazení, přípravu PCR a teploty skladování**

Doba pro rozmrazení		Skladovací* teplota po přípravě PCR	Maximální doba přípravy PCR a doba skladování
Minimální	Maximální		
1 hodina	4,5 hodiny	Pokojová teplota (15–30 °C)	7 hodin
1 hodina	4,5 hodiny	2–8 °C	18 hodin

\* Termín „skladovací“ se týká doby od dokončení přípravy PCR a zahájení cyklu PCR na přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

2. Po rozmrazení činidla promíchejte převrácením každé zkumavky (opakovaným 10krát), aby nedošlo k lokální koncentraci solí, a poté je krátce odstředte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.

**Poznámka:** Taq DNA polymerázu (Taq) ani žádnou směs obsahující Taq neprotřepávejte, neboť by mohlo dojít k inaktivaci enzymu.

3. Připravte dostatek master mixů (kontrolní reakční směs [CTRL] plus Taq DNA polymeráza [Taq]) podle objemů uvedených v tabulce 3 pro:

- všechny alikvoty DNA,
- 1 reakci pozitivní kontroly (Positive Control, PC) KRAS,
- 1 vodu bez nukleázy pro reakci beztemplátové kontroly (No Template Control, NTC),
- 1 alikvot navíc představující dostatečný přebytek pro přípravu PCR.

Master mix obsahuje všechny složky nutné pro provedení PCR kromě alikvotu.

**Tabulka 3. Příprava kontrolního master mixu analýzy**

Složka	Objem
Kontrolní reakční směs (CTRL)	$19,76 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
<i>Taq</i> DNA polymeráza ( <i>Taq</i> )	$0,24 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
Celkový objem	20 $\mu\text{l}$ /reakci

\* n = počet reakcí (aliquoty plus kontroly).

Připravte dostatek master mixu pro 1 alikvot navíc (n + 1) představující dostatečný přebytek pro přípravu PCR.

Hodnota n nesmí překročit 24 (plus kontroly), protože 24 je maximální počet alikvotů, které je možné zpracovat v jednom cyklu.

**Poznámka:** Během přípravy master mixu je do příslušné zkumavky nejprve přidán požadovaný objem kontrolní reakční směsi (CTRL) a *Taq* DNA polymeráza (*Taq*) je přidána jako poslední.

**Poznámka:** *Taq* DNA polymerázu pipetujte tak, že špičku pipety opatrně ponoříte těsně pod hladinu kapaliny, aby na vnějším povrchu špičky neulpělo nadměrné množství enzymu.

- Umístěte příslušný počet stripů se 4 zkumavkami PCR (každý strip obsahuje 4 zkumavky) do plnicího bloku podle rozvržení v tabulce 4. Zkumavky neuzavírejte.

**Poznámka:** Ponechte víčka v plastové nádobě až do okamžiku, kdy budou třeba.

**Tabulka 4. Rozvržení cyklu pro vyhodnocení alikvotu DNA v plicím bloku**

Analýza									
Kontrola	1 (PC)	9	17	25	–	–	–	–	–
Kontrola	2 (NTC)	10	18	26	–	–	–	–	–
Kontrola	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Kontrola	4	12	20	–	–	–	–	–	–
Kontrola	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Kontrola	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Kontrola	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Kontrola	8	16	24	–	–	–	–	–	–

\* Čísla označují pozice v plicím bloku a indikují konečnou polohu rotoru.

5. Nastavte nižší objem pipety, než je celkový objem reakčního master mixu, a důkladně promíchejte tak, že ho 10krát napipetujete a zcela vypustíte.

6. Ihned přidejte 20 µl master mixu do každé stripové zkumavky PCR.

**Poznámka:** Rozložení zkumavek naleznete v tabulce 4. Pro vyhodnocení alikvotu DNA je třeba přidat kontrolní master mix do jedné ze zkumavek pozitivní kontroly, do jedné zkumavky beztemplátové kontroly a do jedné zkumavky pro každý alikvot DNA.

7. Ihned přidejte 5 µl vody bez obsahu nukleázy pro beztemplátovou kontrolu (No Template Control, NTC) do zkumavky NTC (pozice zkumavky 2) a tuto zkumavku uzavřete víčkem.

8. Do zkumavek s alikvoty (pozice zkumavek 3–26) přidejte 5 µl každého alikvotu DNA a zkumavky uzavřete víčky.

9. Přidejte 5 µl pozitivní kontroly KRAS (Positive Control, PC) do zkumavky na pozitivní kontrolu (pozice zkumavky 1) a zkumavku uzavřete víčkem.

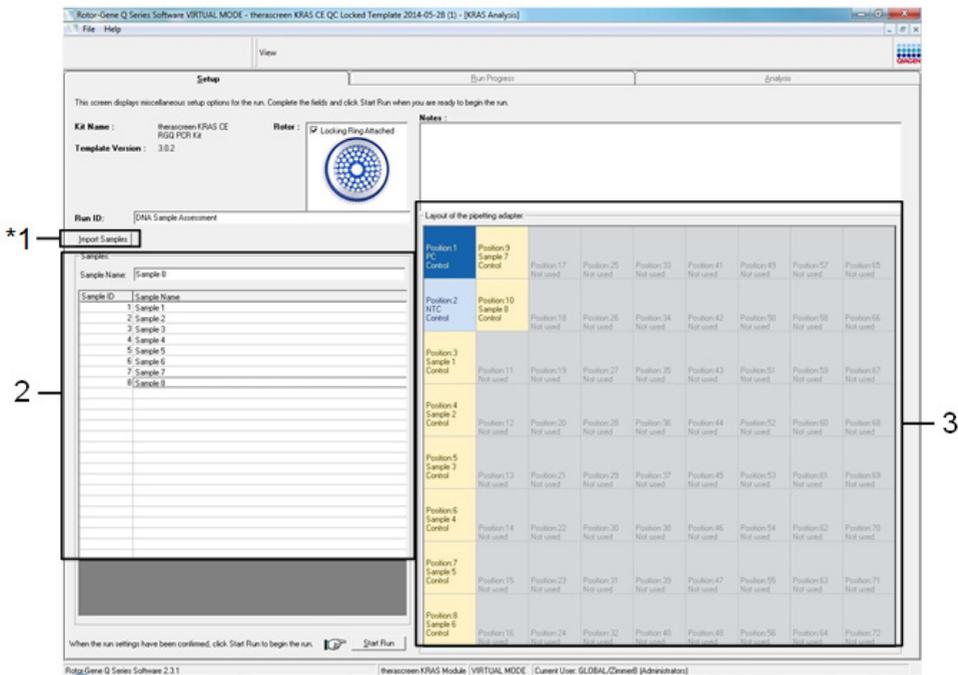
Každá zkumavka musí obsahovat celkový reakční objem 25 µl (20 µl master mixu připraveného dle tabulky 3 plus 5 µl NTC / alikvotu / pozitivní kontroly).

10. Pomocí permanentního popisovače označte víčka prvních zkumavek v nejnižší číselné pozici v každém stripu se 4 zkumavkami PCR (např. pozice 1, 5 a 9 atd.), aby byla naznačena orientace k naplnění zkumavek do rotoru se 72-jamkami přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Přístroj.
  11. Víčkem uzavřené zkumavky 4krát otočte, abyste promíchali alikvoty a reakční směsi.
  12. Umístěte všechny stripy se 4 zkumavkami PCR do příslušných pozic na rotoru se 72 jamkami podle rozvržení cyklu (tabulka 4) s využitím značek pro správný směr natočení.
- Poznámka:** Není-li rotor plně obsazen, zaplňte všechny nepoužité pozice rotoru prázdnými zkumavkami s víčky. Tím se zajistí, že bude zachována tepelná účinnost přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
13. Rotor se 72 jamkami umístěte do přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ujistěte se, že je pojistný kroužek (dodáván s přístrojem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) umístěn v horní části rotoru, aby zajistil zkumavky během zpracování.
  14. Spustíte software Rotor-Gene Q dvojitým kliknutím na ikonu „**therascreen KRAS QC Locked Template**“ (Uzavřená šablona therascreen KRAS QC) na pracovní ploše laptopu připojeného k zařízení Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (obrázek 1).



**Obrázek 1.** Ikona „therascreen KRAS QC Locked Template“ (Uzavřená šablona therascreen KRAS QC).

Objeví se záložka „Setup“ (Nastavení) jako výchozí nastavení (obrázek 2).



Obrázek 2. Záložka „Setup“ (Nastavení) a políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen).

1 = záložka „Setup“ (Nastavení); 2 = políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen).

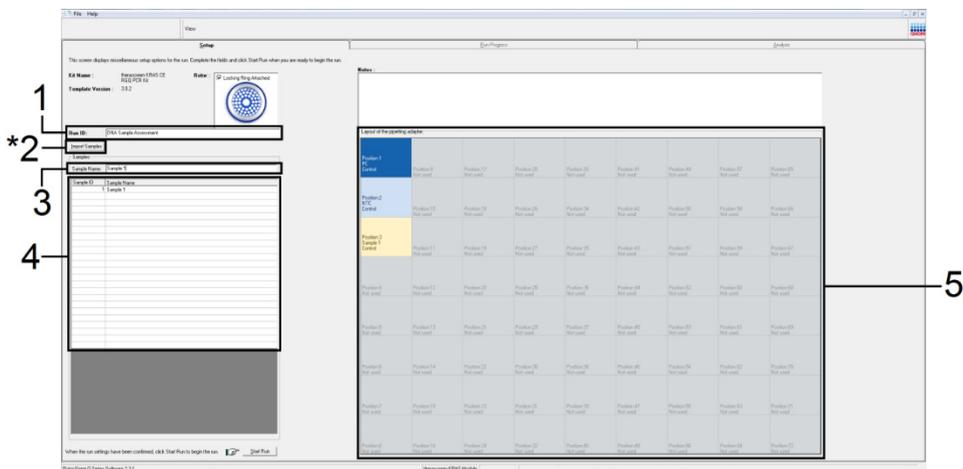
15. Zkontrolujte, zda je pojistný kroužek správně nasazen, a zaškrtněte políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen). Uzavřete víko přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
16. Zadejte ID cyklu do pole „Run ID“ (ID cyklu) dle místních zásad pro pojmenování. Zadejte název alikvotu do dialogového pole „Sample Name“ (Název alikvotu) podle místních zásad pro pojmenování a stiskněte klávesu Vrátit.

Tím přidáte název alikvotu do seznamu alikvotů níže a přiřadíte alikvotu „Sample ID“ (Identifikační číslo alikvotu) (1, 2, 3 atd.). Kromě toho dojde k aktualizaci panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) na pravé straně a bude obsahovat název alikvotu (obrázek 3).

Názvy alikvotů uložené ve formátu \*.smp (soubor s alikvoty zařízení Rotor-Gene Q) nebo \*.csv (hodnoty oddělené čárkou) je možné importovat pomocí tlačítka „**Import Samples**“ (Importovat alikvoty). Při použití tohoto způsobu jsou názvy alikvotů vyplněny automaticky.

**Poznámka:** V panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) zkontrolujte, zda bylo přidání názvu alikvotu zvýrazněno změnou barvy a zda je název alikvotu v dané pozici alikvotu (obrázek 3).

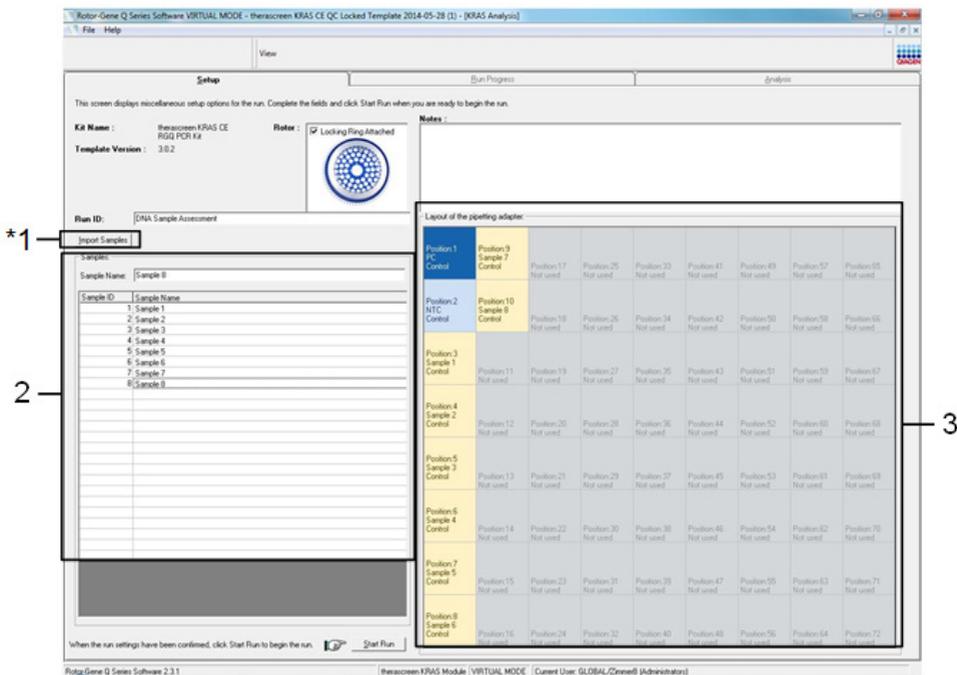
**Poznámka:** Názvy alikvotů s více než 8 znaky nemusejí být v panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) úplně zobrazeny.



**Obrázek 3. Zadání „Run ID“ (ID cyklu) a „Sample Name“ (Názvu alikvotu).** 1 = dialogové pole „Run ID“ (ID cyklu); 2 = tlačítko „Import Samples“ (Importovat alikvoty); 3 = dialogové pole „Sample Name“ (Název alikvotu); 4 = seznam alikvotů; 5 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru).

17. Zopakováním kroku 16 zadáte názvy všech dalších alikvotů (obrázek 4).

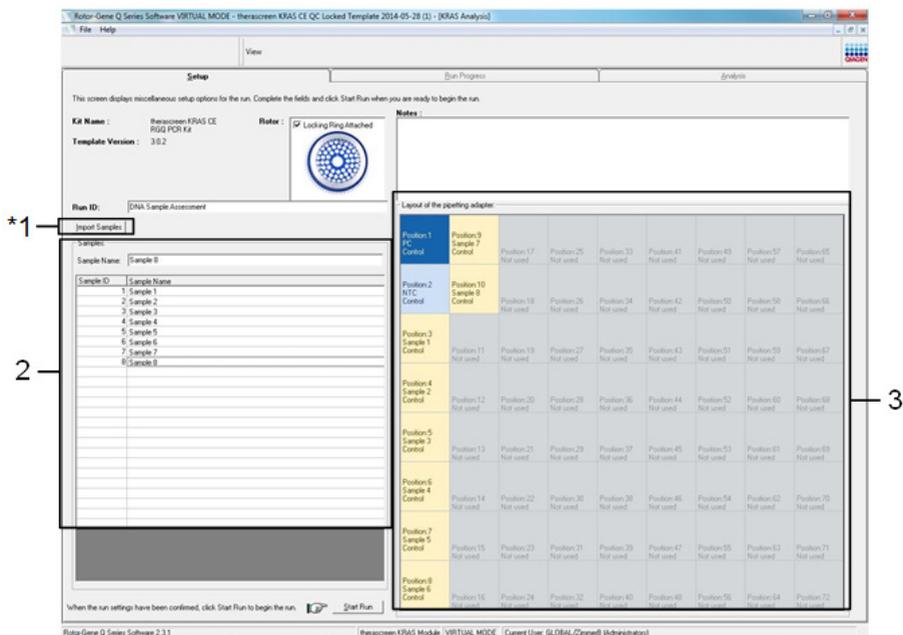
**Poznámka:** Chcete-li upravit název alikvotu, klikněte na „**Sample Name**“ (Název alikvotu) v seznamu alikvotů a zvolený alikvot se objeví v dialogovém poli „Sample Name“ (Název alikvotu) nahoře. Změňte název alikvotu dle místních zásad pro pojmenování a stisknutím klávesy Vrátit název aktualizujete.



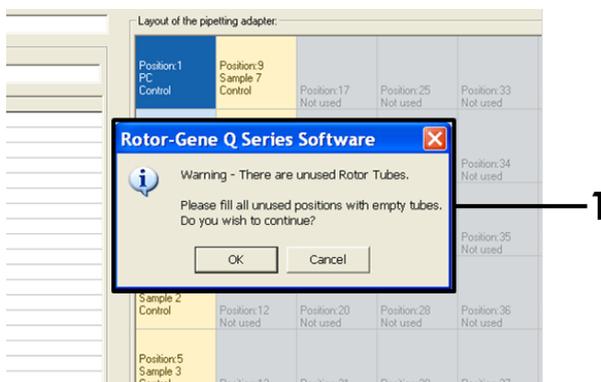
**Obrázek 4.** Zadání dalších názvů alikvotů v dialogovém poli „Sample Name“ (Název alikvotu). \*1 = tlačítko „Import Samples“ (Importovat alikvoty), 2 = dialogové pole „Sample Name“ (Název alikvotu) a seznam alikvotů, 3 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) s dodatečným názvem alikvotu.

18. Po zadání všech názvů alikvotů ověřte, zda jsou správné. V případě potřeby přidejte případné další informace do dialogového pole „Notes“ (Poznámky) a poté klikněte na tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) (obrázek 5).

**Poznámka:** Pokud je jakákoliv pozice rotoru nevyužita, objeví se „Warning“ (Varování) (obrázek 5 a obrázek 6), které uživatele upozorní, že všechny nevyužité pozice na rotoru musejí být vyplněny uzavřenou prázdnou zkumavkou. Zkontrolujte, že všechny nevyužité pozice rotoru jsou vyplněny uzavřenou prázdnou zkumavkou, a kliknutím na tlačítko „OK“ pokračujte.

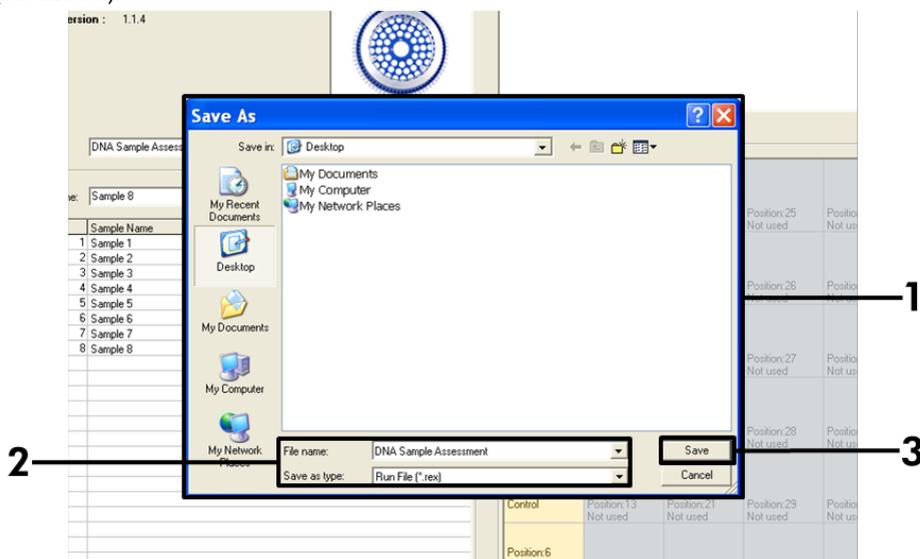


Obrázek 5. Dialogové pole „Notes“ (Poznámky), tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) a „Warning“ (Varování) o nevyužitých pozicích rotoru.



**Obrázek 6. 1 = Hlášení „Warning“ (Varování) o nevyužitých pozicích rotoru.**

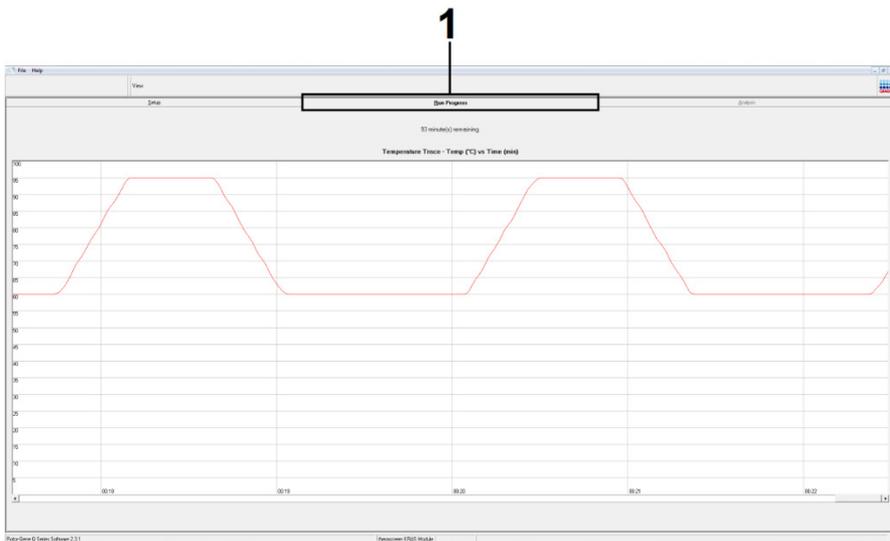
19. Objeví se okno „Save As“ (Uložit jako). Zvolte příslušný název souboru a uložte cyklus PCR jako soubor \*.rex na vybrané místo. Klikněte na tlačítko „Save“ (Uložit) (obrázek 7).



**Obrázek 7. Uložení souboru cyklu. 1 = okno „Save As“ (Uložit jako), 2 = název souboru a uložit jako soubor typu \*.rex, 3 = „Save“ (Uložit).**

Spustí se cyklus PCR.

**Poznámka:** Jakmile se cyklus spustí, automaticky se otevře záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu), v níž se zobrazí sledování teploty a zbývající doba zpracování cyklu (obrázek 8).



**Obrázek 8. Záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu).**

Po dokončení cyklu se automaticky otevře záložka „Analysis“ (Analýza).

**Poznámka:** Pokud se záložka „Analysis“ (Analýza) neotevře, klikněte na záložku „Analysis“ (Analýza) (obrázek 9).

**Poznámka:** Vysvětlení metody výpočtu je uvedeno v části „Interpretace výsledků“.

The screenshot shows a software window titled 'Analysis' with a 'Report' button. Below it is a 'Sample QC Result Table' with the following data:

Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	03771070B	29.39	-	Valid
4	03771071B	27.38	-	Valid
5	03771072B	30.07	-	Valid
6	03771073B	26.53	-	Valid
7	03771074B	29.55	-	Valid
8	03771075B	28.45	-	Valid
9	03771076B	29.95	-	Valid
10	03771077B	29.02	-	Valid
11	03771078B	31.42	-	Valid
12	03771079B	28.93	-	Valid
13	03771081B	29.68	-	Valid
14	03771082B	31.44	-	Valid
15	03771083B	31.02	-	Valid
16	03771084B	29.09	-	Valid
17	03771085B	29.91	-	Valid
18	03771087B	30.33	-	Valid
19	03771088B	30.22	-	Valid
20	03771089B	27.17	-	Valid
21	03771090B	29.67	-	Valid
22	03771091B	29.32	-	Valid
23	03771092B	29.22	-	Valid
24	03771093B	29.57	-	Valid
25	03771094B	29.80	-	Valid
26	03771095B	30.41	-	Valid

Obrázek 9. Záložka „Analysis“ (Analýza) a uvedení výsledků. 1 = záložka „Analysis“ (Analýza), 2 = „Sample QC Result Table“ (Tabulka s výsledky kontroly kvality alikvotů).

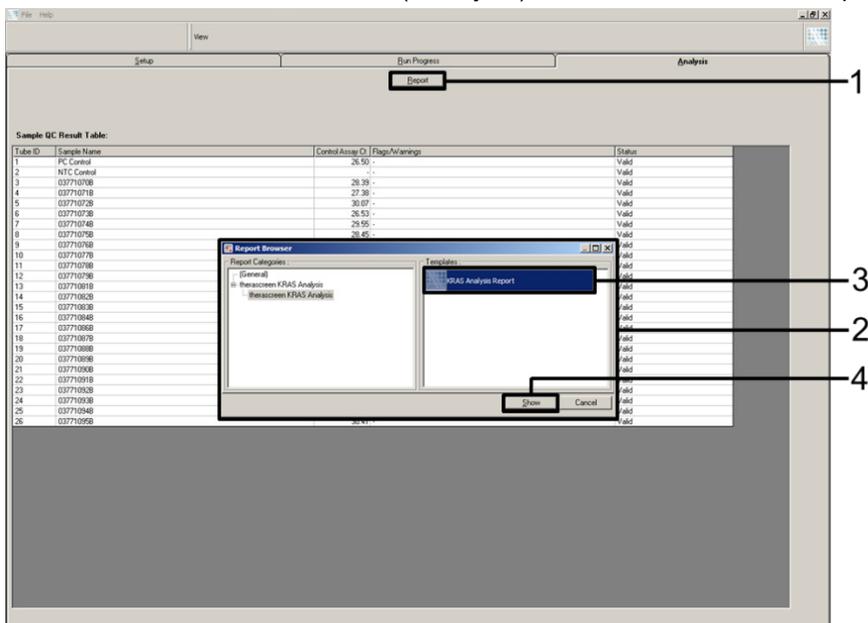
**Poznámka:** Výsledky kontroly budou uvedeny následovně v tabulce „Sample QC Result Table“ (Výsledky kontroly kvality alikvotů) (2 na obrázku 9).

- **Kontroly cyklu (PC a NTC, pozice zkumavky 1, respektive 2):** Pokud jsou výsledky v rámci přijatelného rozpětí, zobrazí se hodnota „Valid“ (Platný). V opačném případě se objeví hodnota „Invalid“ (Neplatný).
- **Hodnota  $C_T$  kontrolní reakce alikvotu je  $> 32,00$ :** Zobrazí se hodnota „Invalid“ (Neplatný). Množství DNA je nedostatečné pro analýzu mutace. Zopakujte testování alikvotu. Jestliže je množství DNA stále nedostatečné, extrahujte více nádorové tkáně, pokud je k dispozici (viz část „Návod na řešení potíží“).
- **Hodnota  $C_T$  kontrolní reakce alikvotu je  $< 21,92$ :** Zobrazí se hodnota „Invalid“ (Neplatný). Koncentrace DNA je příliš vysoká pro analýzu mutace. Zředte vodou bez obsahu nukleázy pro ředění (Dil.) a zopakujte test. Zředte na hodnotu  $C_T$  21,92–32,00. Ředění 1 : 1 zvyšuje hodnotu  $C_T$  přibližně o 1,0.
- **Hodnota  $C_T$  kontrolní reakce alikvotu je 21,92–32,00 ( $21,92 \leq C_T$  kontroly  $\leq 32,00$ ):** Zobrazí se hodnota „Valid“ (Platný). Koncentrace DNA je vhodná pro analýzu mutace.

**Poznámka:** V případě, že je vyžadována opakovaná extrakce nebo ředění, zopakujte kontrolní reakci k ověření, že koncentrace DNA je vhodná pro použití.

20. Chcete-li vygenerovat soubory se zprávami, klikněte na tlačítko „**Report**“ (Zpráva). Objeví se okno „Report Browser“ (Prohlížeč zpráv). Zvolte možnost „**KRAS Analysis Report**“ (Zpráva analýzy KRAS) v položce „Templates“ (Šablony) a poté klikněte na tlačítko „**Show**“ (Ukázat) (obrázek 10).

**Poznámka:** Zprávy je možné ukládat do alternativního umístění ve formátu webových archivů kliknutím na tlačítko „Save As“ (Uložit jako) v levém horním rohu každé zprávy.



**Obrázek 10.** Výběr zprávy „KRAS Analysis Report“ (Zpráva analýzy KRAS). 1 = „Report“ (Zpráva), 2 = okno „Report Browser“ (Prohlížeč zpráv), 3 = výběr „KRAS Analysis Report“ (Zpráva analýzy KRAS), 4 = tlačítko „Show“ (Zobrazit).

## Protokol: Detekce mutací KRAS

Tento protokol platí pro detekci mutací KRAS.

### Důležité body před zahájením používání

- Jakmile alikvot projde vyhodnocením vzorku, může být testován pomocí analýzy mutací KRAS.
- Pro efektivní použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je nutné alikvoty uspořádat do dávek po 7 (k naplnění jednoho rotoru se 72 jamkami). V případě menších dávek bude možné soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit otestovat méně alikvotů.
- Před prvním použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM zajistěte, aby byla instalována správná verze softwaru *therascreen* KRAS Assay Package odpovídající aktuální verzi softwaru Rotor-Gene Q (viz Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package).

### Postup

1. Označte 8 mikrocentrifugačních zkumavek (nejsou součástí dodávky) dle odpovídající reakční směsi, jak je znázorněno v níže uvedené tabulce. Připravte dostatek master mixů (kontrolní nebo mutační reakční směs [zkumavka CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL nebo 13ASP] plus *Taq* DNA polymeráza [*Taq*] pro alikvoty DNA, jednu pozitivní kontrolu KRAS (zkumavka PC) a jednu vodu bez nukleázy pro bezteplátovou kontrolu (zkumavka NTC) podle objemů uvedených v tabulce. Zahrňte činidla pro 1 alikvot navíc, což představuje dostatečný přebytek pro přípravu PCR. Master mix obsahuje všechny složky nutné k provedení PCR kromě alikvotu.

Analyza a zkumavka s reakční směsí	Objem reakční směsi	Objem Taq DNA polymerázy
Kontrola (zkumavka CTRL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ALA (zkumavka 12ALA)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ASP (zkumavka 12ASP)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12ARG (zkumavka 12ARG)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12CYS (zkumavka 12CYS)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12SER (zkumavka 12SER)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
12VAL (zkumavka 12VAL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
13ASP (zkumavka 13ASP)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)$

\* n = počet reakcí (aliquoty plus kontroly).

Připravte dostatek master mixu pro 1 alikvot navíc ( $n + 1$ ), představující dostatečný přebytek pro přípravu PCR. Hodnota n nesmí překročit 7 (plus kontroly), protože 7 je maximální počet alikvotů, které je možné zpracovat v jednom cyklu.

- Promíchejte rozmrazená činidla převrácením každé zkumavky 10krát, aby nedošlo k lokální koncentraci solí. Zkumavky krátce odstředte, aby se obsah shromáždil na dně zkumavky.
- Nastavte nižší objem pipety, než je celkový objem reakční směsi, a důkladně promíchejte master mixy tak, že je 10krát napipetujete a zcela vypustíte.
- Do každé příslušné stripové zkumavky PCR ihned přidejte 20  $\mu\text{l}$  master mixu.

**Poznámka:** Rozvržení zkumavek při přípravě reakčních směsí naleznete v tabulce 5. Pro detekci mutací KRAS musejí být master mixy přidány do 8 zkumavek PC, 8 zkumavek NTC a 8 zkumavek pro každý alikvot DNA.

**Tabulka 5. Rozvržení cyklu pro vyhodnocení mutací KRAS v plicním bloku**

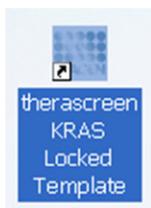
Analýza	Kontroly		Číslo alikvoty						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

\* Čísla označují pozice v plicním bloku a indikují konečnou polohu rotoru.

5. Ihned přidejte 5 µl vody bez obsahu nukleázy pro beztemplátovou kontrolu (No Template Control, NTC) do zkumavek NTC (pozice zkumavek 9–16) a tyto zkumavky uzavřete víčkem.
6. Do zkumavek s alikvoty (pozice zkumavek 17–72) přidejte 5 µl každého alikvoty DNA a zkumavky uzavřete víčky.
7. Přidejte 5 µl pozitivní kontroly KRAS (Positive Control, PC) do zkumavek PC (pozice zkumavek 1–8) a zkumavky uzavřete víčkem.
8. Pomocí permanentního popisovače označte víčka prvních zkumavek v nejnižší číselné pozici v každém stripu se 4 zkumavkami PCR (např. pozice 1, 5 a 9 atd.), aby byla naznačena orientace pro vkládání zkumavek do rotoru se 72 jamkami přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. 4krát převraťte zavíčkované zkumavky, abyste promíchali alikvoty a reakční směs.
10. Umístěte všechny stripy se 4 zkumavkami PCR do příslušných pozic na rotoru se 72 jamkami podle rozvržení cyklu (tabulka 5) s využitím značek pro správný směr natočení.

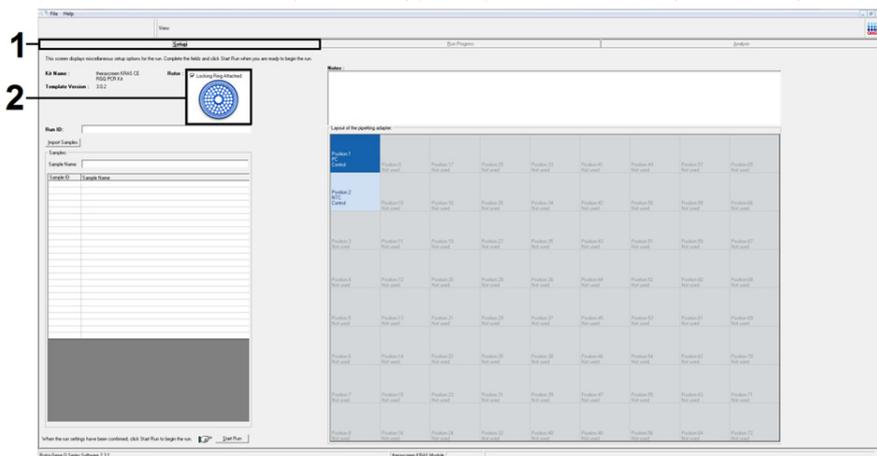
**Poznámka:** Při každém cyklu PCR lze zpracovat nejvýše 7 alikvotů. Není-li rotor plně obsazen, zaplňte všechny nepoužité pozice rotoru prázdnými zkumavkami s víčky. Tím se zajistí, že bude zachována tepelná účinnost přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

11. Rotor se 72 jamkami umístíte do přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ujistěte se, že pojistný kroužek (dodáván s přístrojem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) je umístěn v horní části rotoru, aby zajistil zkumavky během zpracování.
12. Spusťte software Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dvojitým kliknutím na ikonu „therascreen KRAS Locked Template“ (Uzavřená šablona therascreen KRAS) na pracovní ploše laptopu připojeného k zařízení Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (obrázek 11).



**Obrázek 11.** Ikona „therascreen KRAS Locked Template“ (Uzavřená šablona therascreen KRAS).

Objeví se záložka „Setup“ (Nastavení) jako výchozí nastavení (obrázek 12).



**Obrázek 12.** 1 = záložka „Setup“ (Nastavení) a 2 = políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen).

13. Zkontrolujte, zda je pojistný kroužek správně nasazen, a zaškrtněte políčko „**Locking Ring Attached**“ (Pojistný kroužek nasazen). Uzavřete víko přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
14. Zadejte ID cyklu do pole „**Run ID**“ (ID cyklu) dle místních zásad pro pojmenování.
15. Zadejte název alikvotu do dialogového pole „**Sample Name**“ (Název alikvotu) podle místních zásad pro pojmenování a stiskněte klávesu Vrátit.

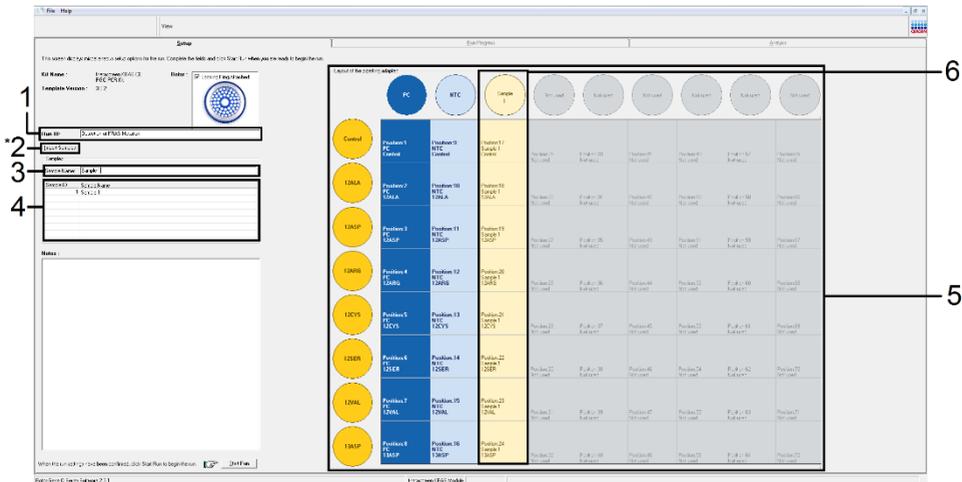
Tím přidáte název alikvotu do seznamu alikvotů níže a přiřadíte alikvotu „Sample ID“ (Identifikační číslo alikvotu) (1, 2, 3 atd.). Kromě toho dojde k aktualizaci panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) na pravé straně a bude obsahovat název alikvotu (obrázek 13).

**Poznámka:** V panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) zkontrolujte, zda bylo přidání názvu alikvotu zvýrazněno změnou barvy a zda je všech 8 analýz ve sloupci pod kroužkem alikvotu zvýrazněno (obrázek 13).

**Poznámka:** Je možné přidat maximálně 7 alikvotů. Identifikační čísla alikvotů (ID) (v kroužcích alikvotů) budou automaticky přiřazena od 1 do 7.

**Poznámka:** Názvy alikvotů s více než 8 znaky nemusejí být v panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) úplně zobrazeny.

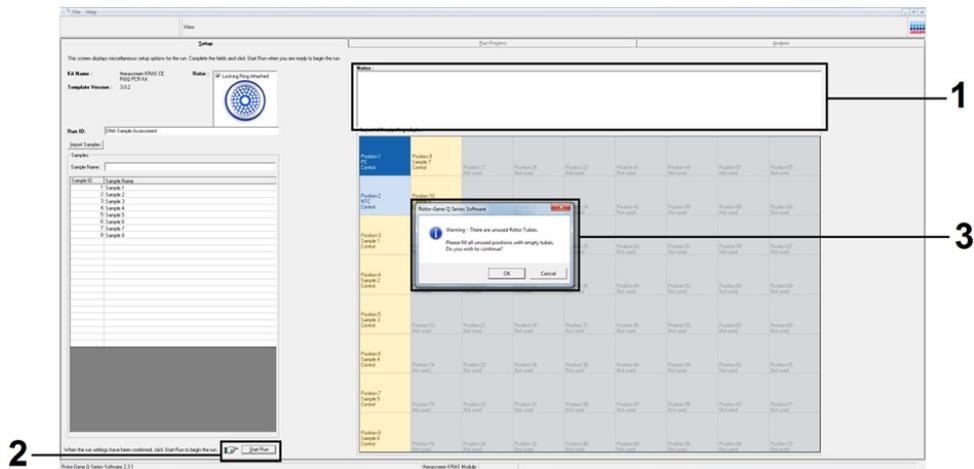
Názvy alikvotů uložené ve formátu \*.smp (soubor s alikvoty zařízení Rotor-Gene Q) nebo \*.csv (hodnoty oddělené čárkou) je možné importovat pomocí tlačítka „**Import Samples**“ (Importovat alikvoty). Při použití tohoto způsobu jsou názvy alikvotů vyplněny automaticky.



**Obrázek 13. Zadání „Run ID“ (ID cyklu) a „Sample Name“ (Názvu alikvotu).** 1 = dialogové pole „Run ID“ (ID cyklu), 2 = dialogové pole „Import Samples“ (Importovat alikvoty) (u verze softwaru 2.1 není k dispozici), 3 = dialogové pole „Sample Name“ (Název alikvotu), 4 = seznam alikvotů, 5 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru), 6 = zvýrazněný kroužek alikvotu a sloupec 8 analýz pod ním.

16. Zopakováním kroku 14 zadáte názvy všech dalších alikvotů (obrázek 14).

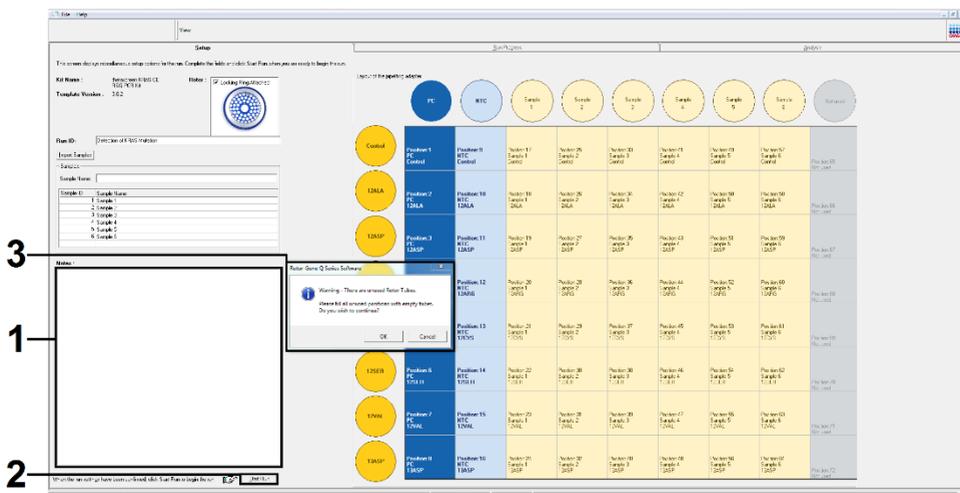
**Poznámka:** Chcete-li upravit název alikvotu, klikněte na „**Sample Name**“ (Název alikvotu) v seznamu alikvotů a zvolený alikvot se objeví v poli „**Sample Name**“ (Název alikvotu) nahoře. Změňte název alikvotu dle místních zásad pro pojmenování a stisknutím klávesy Vrátit název aktualizujete.



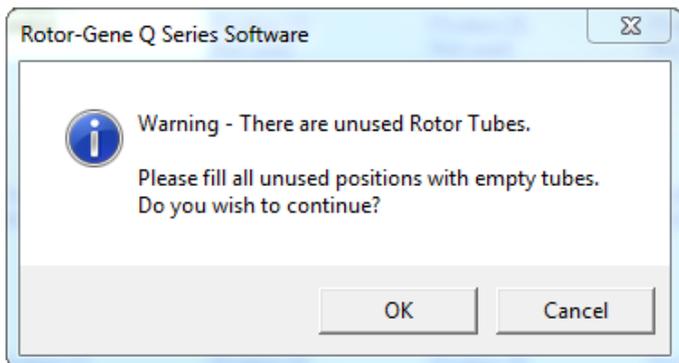
**Obrázek 14. Zadání dalších názvů alikvotů v dialogovém poli „Sample Name“ (Název alikvotu).** 1 = dialogové pole „Sample Name“ (Název alikvotu), 2 = seznam alikvotů, 3 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího adaptéru) s dodatečnými názvy alikvotů.

17. Po zadání všech názvů alikvotů ověřte, zda jsou správné. V případě potřeby přidejte případné další informace do dialogového pole „Notes“ (Poznámky) a poté klikněte na tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) (obrázek 15).

**Poznámka:** Pokud je jakákoliv pozice rotoru nevyužita, objeví se „Warning“ (Varování) (obrázek 15 a obrázek 16), které uživatele upozorní, že všechny nevyužité pozice na rotoru musejí být vyplněny uzavřenou prázdnou zkumavkou. Zkontrolujte, že všechny nevyužité pozice rotoru jsou

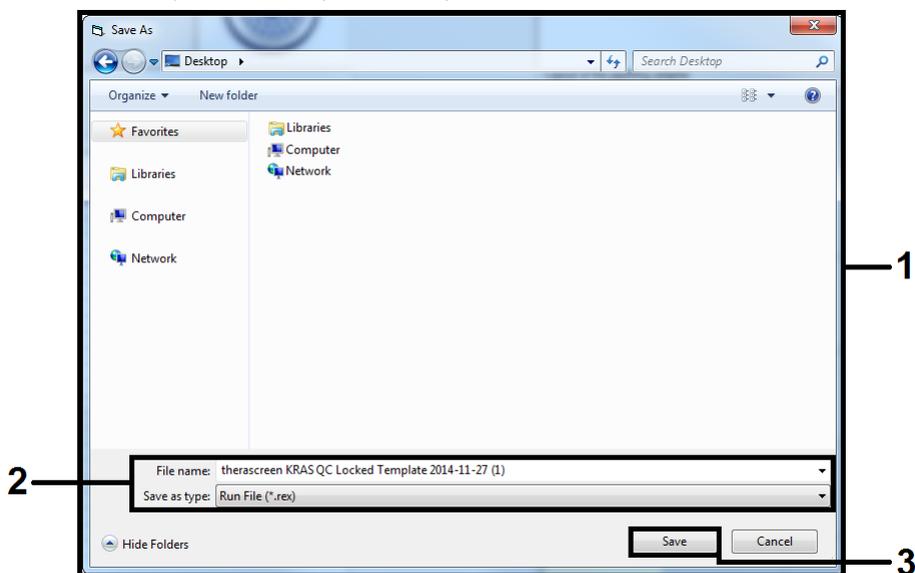


**Obrázek 15.** 1 = dialogové pole „Notes“ (Poznámky), 2 = tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) a 3 = „Warning“ (Varování) o nevyužitých pozicích rotoru.



Obrázek 16. Hlášení „Warning“ (Varování) o nevyužitých pozicích rotoru.

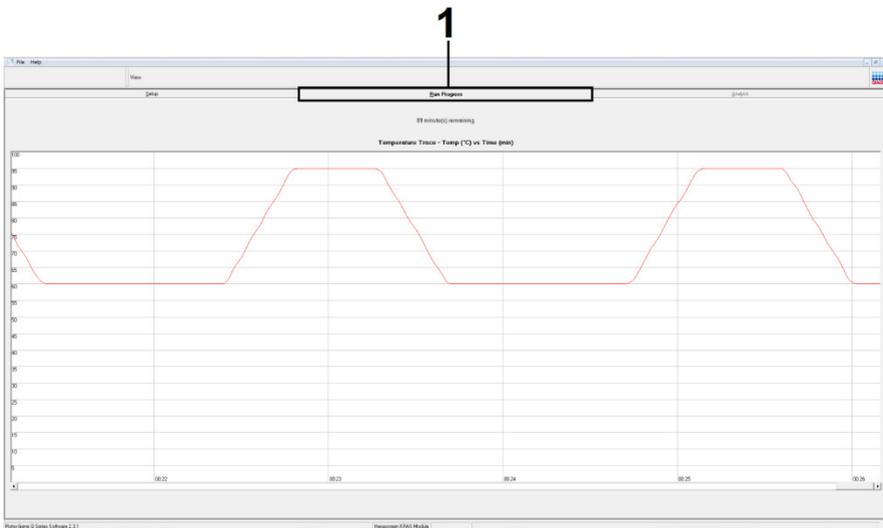
18. V okně Save as (Uložit jako) zvolte příslušný název souboru a uložte PCR cyklus jako soubor \*.rex na vybrané místo (obrázek 17).



Obrázek 17. Uložení souboru cyklu.

Spustí se cyklus PCR.

**Poznámka:** Jakmile se cyklus spustí, automaticky se otevře záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu), v níž se zobrazí sledování teploty a zbývající doba zpracování cyklu (obrázek 18).

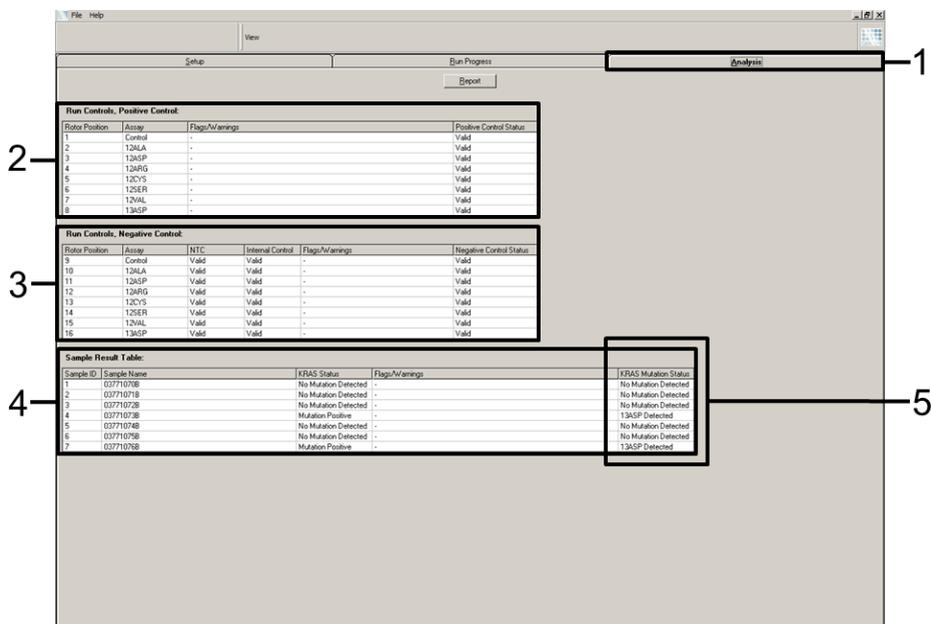


Obrázek 18. Záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu).

Po dokončení cyklu se automaticky otevře záložka „Analysis“ (Analýza).

**Poznámka:** Pokud se záložka „Analysis“ (Analýza) neotevře, klikněte na záložku „Analysis“ (Analýza) (obrázek 19).

**Poznámka:** Vysvětlení metody výpočtu je uvedeno v části „Interpretace výsledků“.



**Obrázek 19. Záložka „Analysis“ (Analýza) a uvedení výsledků.** 1 = záložka „Analysis“ (Analýza), 2 = panel „Run Controls, Positive Control“ (Kontroly cyklu, pozitivní kontrola), 3 = panel „Run Controls, Negative Control“ (Kontroly cyklu, negativní kontrola), 4 = „Sample Result Table“ (Tabulka s výsledky alikvotů), 5 = sloupec „KRAS Mutation Status“ (Stav mutace KRAS).

Výsledky analýzy budou uvedeny ve zprávě následujícím způsobem (obrázek 19):

- Panel **„Run Controls, Positive Control“** (Kontroly cyklu, pozitivní kontrola): Pokud jsou výsledky v přijatelném rozmezí, objeví se ve sloupci „Positive Control Status“ (Stav pozitivní kontroly) hodnota „Valid“ (Platný). V opačném případě se objeví výsledek „Invalid“ (Neplatný).
- Panel **„Run Controls, Negative Control“** (Kontroly cyklu, negativní kontrola): Pokud jsou výsledky „NTC“ (Beztemplátová kontrola) a „Internal Control“ (Vnitřní kontroly) v přijatelném rozmezí, objeví se ve sloupci „Negative Control Status“ (Stav negativní kontroly) hodnota „Valid“ (Platný). V opačném případě se objeví výsledek „Invalid“ (Neplatný).



## Interpretace výsledků

Analýza a detekce mutace jsou prováděny automaticky softwarem *therascreen* KRAS Assay Package po dokončení cyklu. Následující informace vysvětlují, jak software *therascreen* KRAS Assay Package provádí analýzu a detekci mutace.

**Poznámka:** Popis manuální analýzy je uveden v Příloha 1: *Souprava therascreen* KRAS RGQ PCR Kit – manuální protokol.

Cyklus PCR, při němž fluorescence z určité reakce překračuje prahovou hodnotu, která je definována jako hodnota  $C_T$ . Hodnoty  $C_T$  označují množství specifické vstupní DNA. Nízké hodnoty  $C_T$  ukazují na vyšší hladiny vstupní DNA a vysoké hodnoty  $C_T$  ukazují na nižší hladiny vstupní DNA. Reakce s hodnotou  $C_T$  jsou vyhodnoceny jako pozitivní amplifikace.

Software Rotor-Gene Q vloží fluorescenční signály mezi 2 zaznamenané hodnoty. Hodnotami  $C_T$  mohou proto být jakákoliv reálná čísla (nejen celá čísla) v rozmezí od 0 do 40.

Pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je prahová hodnota nastavena na 0,05 relativních jednotek fluorescence. Tato hodnota je konfigurována v softwaru *therascreen* KRAS Assay Package pro oba fluorescenční kanály, „Green“ i „Yellow“. Prahová hodnota byla definována během vývoje soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Byl proveden výpočet za účelem stanovení hodnoty  $\Delta C_T$  pomocí rovnice:

$$\Delta C_T = [\text{hodnota } C_T \text{ analýzy mutace}] - [\text{hodnota } C_T \text{ kontrolní analýzy}]$$

Kontroly cyklu (pozitivní kontrola, NTC a interní kontroly) jsou vyhodnoceny, aby bylo zajištěno, že jsou splněny přijatelné hodnoty  $C_T$  a že reakce jsou prováděny správně.

---

Hodnoty  $\Delta C_T$  alikvotu se počítají jako rozdíl mezi  $C_T$  analýzou mutací a  $C_T$  kontrolní analýzou u stejného alikvotu: Alikvoty jsou hodnoceny jako pozitivní z hlediska mutace, pokud vykazují hodnoty  $\Delta C_T$  nižší nebo rovny hraniční hodnotě  $\Delta C_T$  pro danou analýzu. Nad touto hodnotou může alikvot obsahovat méně než danou procentuální hodnotu mutace, kterou lze detekovat soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (mimo limit analýz), nebo je mutace u alikvotu negativní, což může být uváděno jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována).

Žádná amplifikace v mutačních reakcích nebude vyhodnocena jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována). Očekává se, že hodnoty  $\Delta C_T$  vypočítané z amplifikace na pozadí budou vyšší než hraniční hodnoty  $\Delta C_T$  a alikvot bude vyhodnocen jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována).

Výsledky analýzy budou zobrazeny jako „Mutation Positive“ (Mutace pozitivní), „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována), „Invalid“ (Neplatný) nebo, pokud dojde k selhání cyklu, „Run Control Failed“ (Kontrola cyklu selhala). U alikvotů pozitivních na mutaci bude uvedena specifická mutace.

Další možné výsledky, které mohou být zobrazeny, jsou probrány v části „Protokol: Vyhodnocení alikvotu DNA“ této příručky.

Ve vzácných případech může nádor obsahovat více než jednu mutaci. V takových případech bude identifikována mutace vykazující nejnižší hodnotu  $\Delta C_T$ .

# Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a/nebo protokolů v tomto manuálu i obecně k technologiím pro přípravu alikvotů a jejich analýz (kontaktní údaje naleznete na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentáře a návrhy

---

### Neplatné výsledky

- |   |   |
|---|---|
| a) Podmínky uchování jednoho nebo více komponentů neodpovídají pokynům uvedeným v části Skladování činidel a manipulace s nimi. | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek reakčních činidel a v případě potřeby použijte novou soupravu.              |
| b) Doba použitelnosti soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit již uplynula.  | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek na soupravě) reakčních činidel a v případě potřeby použijte novou soupravu. |

### Alikvoty NTC vykazují pozitivní výsledky v kanálu FAM.

- |  |  |
|--|--|
| Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci. | Zopakujte PCR v replikátech s novými činidly.<br>Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky, pokud možno, ihned po vložení zkoumaného alikvotu.<br>Zkontrolujte, zda jsou pracovní prostor i přístroje pravidelně dekontaminovány. |
|--|--|

## Příznaky generované softwarem *therascreen* KRAS Assay Package

V tabulce 6 jsou uvedeny možné příznaky, které mohou být generovány softwarem *therascreen* KRAS Assay Package, jejich význam a kroky, které je nutné provést.

**Tabulka6. Příznaky softwaru *therascreen* KRAS Assay Package**

Příznak	Význam	Kroky
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Cyklus PCR neplatný – FAM CT mimo rozsah pro pozitivní kontrolu v kontrolní reakci.	Zopakujte celý cyklus PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Cyklus PCR neplatný – FAM CT mimo rozsah pro jednu nebo více kontrolních reakcí mutace.	Zopakujte celý cyklus PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v pozitivní kontrole (kontrolní reakční směs) nelze interpretovat.	Zopakujte celý cyklus PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v pozitivní kontrole (mutační reakční směs) nelze interpretovat.	Zopakujte celý cyklus PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Cyklus PCR neplatný – interní kontrola vyšší než rozsah pro negativní kontrolu.	Zopakujte celý cyklus PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Cyklus PCR neplatný – interní kontrola nižší než rozsah pro negativní kontrolu.	Zopakujte celý cyklus PCR.
NTC_INVALID_CT	Cyklus PCR neplatný – FAM neplatný (nižší než limit) pro negativní kontrolu.	Zopakujte celý cyklus PCR.
NTC_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v negativní kontrole nelze interpretovat.	Zopakujte celý cyklus PCR.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v kontrolním alikvotu nelze interpretovat.	Připravte nový cyklus PCR pro zopakování příslušného/příslušných alikvotu/alikvotů.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Alikvot neplatný – hodnota FAM C <sub>T</sub> kontrolního alikvotu je příliš nízká.	Zředte alikvot, aby se zvýšila kontrolní hodnota C <sub>T</sub> . Toto ředění musí být vypočítáno s předpokladem, že ředění 1 : 1 vodou dodanou v soupravě zvýší hodnotu C <sub>T</sub> o 1,0; jakmile je alikvot zředěn, připravte nový cyklus PCR pro zopakování alikvotu.

SAMPLE_CTRL_FAIL	Alikvot neplatný – hodnota FAM C <sub>T</sub> kontrolní reakce alikvotu je příliš vysoká.	Připravte nový cyklus PCR pro zopakování reakce alikvotu. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte alikvot z nového/nových řezu/řezů FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného alikvotu. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže alikvot po tomto cyklu nedává platný výsledek, je alikvotu přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C <sub>T</sub> příliš vysoká (nebo žádná hodnota C <sub>T</sub> ) pro vnitřní kontrolu (HEX), mutace kanálu FAM negativní.	<p>Pokud je alikvotu přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Alikvoty CRC: Pokud je alikvotu přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování alikvotu. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte alikvot z nového/nových řezu/řezů FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného alikvotu. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže alikvot po tomto cyklu nedává platný výsledek, je alikvotu přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p> <p>Alikvoty NSCLC: Pokud je alikvotu přidělen neplatný stav, rozředte zbývající alikvot 1 ku 8 s vodou ze zkumavky označené DIL tak, aby byl konečný objem větší než 40 µl (např. 10 µl DNA a 70 µl vody ze zkumavky označené DIL) a připravte nový cyklus PCR pro zopakování alikvotu. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte alikvot z nového/nových řezu/řezů FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného alikvotu. Pokud je neplatný, rozředte zbývající alikvot 1 ku 8 s vodou ze zkumavky označené DIL tak, aby byl konečný objem větší než 40 µl, a testujte tento alikvot. Jestliže alikvot po tomto cyklu nedává platný výsledek, je alikvotu přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>

SAMPLE_INT_CTRL _EARLY_CT	Zkumavka mutace neplatná – hodnota C <sub>T</sub> HEX alikvotu příliš nízká (vnitřní kontrola).	<p>Pokud je alikvotu přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Pokud je alikvotu přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování alikvotu.</p> <p>Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte alikvot z nového/nových řezu/řezů FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného alikvotu. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže alikvot po tomto cyklu nedává platný výsledek, je alikvotu přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>
SAMPLE_INVALID_DATA	Zkumavka mutace neplatná – údaje fluorescence vnitřní kontroly nelze interpretovat.	<p>Pokud je alikvotu přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Pokud je alikvotu přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování alikvotu. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte alikvot z nového/nových řezu/řezů FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného alikvotu. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže alikvot po tomto cyklu nedává platný výsledek, je alikvotu přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>
MUTATION_EARLY_CT	Zkumavka mutace neplatná – hodnota C <sub>T</sub> FAM alikvotu příliš nízká.	<p>Pokud je alikvotu přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Pokud je alikvotu přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování alikvotu. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte alikvot z nového/nových řezu/řezů FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného alikvotu. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže alikvot po tomto cyklu nedává platný výsledek, je alikvotu přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	Jedna nebo více mutací alikvotu je platná a pozitivní, zároveň jedna nebo více mutací u stejného alikvotu je neplatná (varování, ne chyba).	Žádné.

# Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN, certifikovaným podle ISO, je každá výrobní šarže souprav *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

## Omezení

Tento test je určen k detekci 7 mutací v kodonech 12 a 13 genu KRAS. Alikvoty s výsledky uvedenými jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována) mohou ukrývat mutace KRAS nedetekované touto analýzou (např. 13CYS).

Detekce mutací závisí na celistvosti alikvotu a množství amplifikovatelné DNA přítomné v alikvotu. Postup by měl být zopakován v případě, že prvotní vyhodnocení DNA v alikvotu ukazuje, že množství buď není dostatečné, nebo je příliš vysoké pro analýzu mutace.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se používá v postupu polymerázových řetězových reakcí (Polymerase Chain Reaction, PCR). Stejně jako u všech postupů PCR mohou být alikvoty kontaminovány vnějšími zdroji DNA v prostředí, kde probíhá testování, a DNA přítomnou v pozitivní kontrole. Dbejte na to, abyste zabránili kontaminaci alikvotů a činidel reakční směsi.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je určena pouze k rozlišení mezi divokým typem genu a mutací. Tento test byl navržen tak, aby každá mutační reakce byla co nejvíce citlivá na konkrétní testovanou mutaci. Nicméně u alikvotů, kde je mutace detekována, mohlo dojít ke zkřížené reaktivitě s jinými mutačními reakcemi. Jestliže je pozitivní více než jedna mutační reakce, výsledkem je ta s nejnižší hodnotou  $\Delta C_T$ .

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je validována pouze pro tkáň kolorektálního karcinomu (Colorectal Cancer, CRC) a nemalobuněčného karcinomu plic (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) fixované metodou FFPE.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je validována pouze s použitím soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je validována pouze s použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

## Charakteristika funkčních vlastností

### Analytická účinnost

Specifické funkční vlastnosti soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit byly stanoveny na základě studií zahrnujících alikvoty fixovaných metodou FFPE odebrané od pacientů s kolorektálním karcinomem (Colorectal Cancer, CRC) a nemalobuněčným karcinomem plic (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). Metody odběru alikvotů NSCLC zahrnovaly biopsii dutou jehlou (Core Needle Biopsy, CNB), aspirační biopsii tenkou jehlou (Fine Needle Aspiration, FNA) a resekci. Pro každý typ alikvoty bylo použito 8 FFPE lidských buněčných linií, z nichž 7 obsahuje známé mutace KRAS detekované v analýze a jedna obsahuje divoký typ alely KRAS (tj. bez mutací v kodonech 12 a 13). Stav mutace alikvotů byl potvrzen obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou.

### Mezní hodnota

Pomocí metody, která se řídí směrnici v CLSI EP17-A (2004) (8), jsme analyzovali 225 alikvotů FFPE za účelem stanovení mezních hodnot pro tuto analýzu. Rozsah hodnot  $C_T$  kontrolní reakce byl stanoven na 21,92 až 32,00. Mezní hodnoty, které jsou založeny na hodnotě  $C_T$  kontrolní reakce odečtené od hodnoty  $C_T$  mutačních reakcí ( $\Delta C_T$ ), jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7. Stanovené mezní hodnoty pro každou analýzu mutací**

Mutační analýza							
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mezní hodnota ( $\leq \Delta C_T$ )	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

## Hodnoty meze slepého alikvotu

K vyhodnocení účinnosti soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bez přítomnosti templátu pozitivního na mutaci a aby se zajistilo, že slepý alikvot nevytváří analytický signál, který může ukazovat na nízkou koncentraci mutace, byly vyhodnoceny alikvoty bez templátu. Výsledky neukázaly žádné detekovatelné hodnoty  $C_T$  kontroly nebo mutace v žádné z mutačních ani kontrolních reakčních zkumavek (hodnoty  $C_T$  interní kontroly byly všechny platné).

## Porovnání s analytickou referenční metodou: CRC

Byly provedeny dvě studie k prokázání shody ve stavu mutace alikvotů CRC testovaných pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit v porovnání s obousměrnou sekvenační metodou. Celkem 137 alikvotů FFPE vykazalo platné výsledky pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit i obousměrnou sekvenační metodou.

Celkové výsledky, kromě 6 neplatných alikvotů zpracovaných Sangerovou obousměrnou sekvenační metodou, jsou uvedeny v tabulce 8. Tabulka 9 zobrazuje analýzu shody mezi výsledky analýz soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a obousměrnou sekvenační analýzou.

**Tabulka 8. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. Sangerova obousměrná sekvenační metoda**

		Zjištění mutace obousměrnou sekvenační metodou								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Celkem
Stanovení dle soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativní	80	–	–	1	–	–	–	1	<b>82</b>
	Pozitivní 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	<b>3</b>
	Pozitivní 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	<b>1</b>
	Pozitivní 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	<b>20</b>
	Pozitivní 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	<b>3</b>
	Pozitivní 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	<b>0</b>
	Pozitivní 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	<b>16</b>
	Pozitivní 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	<b>12</b>
	<b>Celkem</b>	<b>83</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>137</b>

**Tabulka 9. Analýza shody**

Měření shody	Frekvence (%)	Interval spolehlivosti 95 % (Confidence Interval, CI)
Celková míra shody	152/157 (96,82)	93,69–98,44
Míra pozitivní shody	72/74 (96,30)	92,63–98,63
Míra negativní shody	80/83 (96,39)	91,65–98,19

Druhý jedinečný soubor alikvotů byl vyhodnocen za účelem doplnění údajů z první studie. Byl vybrán soubor 271 alikvotů CRC FFPE; 250 s neznámým stavem mutace a 21 alikvotů se známým stavem mutace (pro obohacení vzácnými mutacemi) bylo porovnáno se Sangerovou obousměrnou sekvenační metodou, viz popis výše.

U 247 alikvotů byla provedena analýza shody s platnými výsledky obousměrné sekvenační metody i soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. 9 alikvotů bylo nesouhlasných. Celkově bylo dosaženo shody 96,82 %. Tyto údaje podporují výsledky přesnosti soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (tabulka 10 a tabulka 11).

**Tabulka 10. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. Sangerova obousměrná sekvenační metoda (druhá studie)**

		Zjištění mutace obousměrnou sekvenační metodou								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Celkem
Stanovení dle soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativní	132	–	–	–	–	1	–	–	133
	Pozitivní 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
	Pozitivní 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	–	10
	Pozitivní 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	–	31
	Pozitivní 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
	Pozitivní 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
	Pozitivní 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
	Pozitivní 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
	<b>Celkem</b>	<b>140</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>31</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>25</b>	<b>11</b>	<b>247</b>

**Tabulka 11. Analýza shody (druhá studie)**

Měření shody	Frekvence (%)	Interval spolehlivosti 95 % (Confidence Interval, CI)
Celková míra shody	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Míra pozitivní shody	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Míra negativní shody	132/140 (94,29)	89,93–97,13

---

## Porovnání s analytickou referenční metodou: NSCLC

Shoda mutačního stavu alikvotů NSCLC testovaných pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ve srovnání s obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou byla prokázána analýzou klinických alikvotů FFPE NSCLC odebraných pomocí resekce, CNB nebo FNA. Před analýzou soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit byla z každého alikvotu extrahována DNA. Výsledky z tohoto testu byly porovnány s hodnotami získanými obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou.

Celkem 360 alikvotů vykázalo platné výsledky pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit i obousměrnou sekvenační metodu, z čehož 340 alikvotů mělo shodné výsledky.

Shoda mezi soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou je uvedena v tabulce 12. Dva alikvoty vykázaly obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou dvojitou mutaci. Protože jedna z mutací byla stejná jako mutace ve výsledku obdrženém soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, byly tyto alikvoty klasifikovány jako souhlasné při analýze celkové shody, pozitivní shody a negativní shody (tabulka 13).

Tabulka 12. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. Sangerova obousměrná sekvenační metoda

		Zjištění mutace obousměrnou sekvenační metodou								
Stanovení dle soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Celkem	
	Negativní	132	–	–	–	–	1	–	–	133
	Pozitivní 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
	Pozitivní 12ALA_12CYS	5	–	5	–	–	–	–	–	10
	Pozitivní 12ARG	–	–	–	31	–	–	–	–	31
	Pozitivní 12ASP	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Pozitivní 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
	Pozitivní 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
	Pozitivní 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
	Pozitivní 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
<b>Celkem</b>	<b>140</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>31</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>25</b>	<b>11</b>	<b>247</b>	

Tabulka 13. Analýza shody

Měření shody	Frekvence (%)	Interval spolehlivosti 95 % (Confidence Interval, CI)
Celková míra shody	340/360 (94,44)	92,03–96,29
Míra pozitivní shody	79/80 (98,75)	94,21–99,94
Míra negativní shody	261/280 (93,21)	90,20–95,51

---

## Limit detekce (Limit of Detection, LOD)

Pracovní rozsah soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je založen na množství amplifikovatelné DNA ze vzorků, jak je stanoveno hodnotou  $C_T$  kontrolní reakce. Uvedený vstupní rozsah pro analýzu je definován předem stanoveným rozsahem hodnot  $C_T$  kontroly 21,92 až 32,00. LOD je minimální procento mutované DNA, které lze detekovat na pozadí divokého typu, pokud je celková hladina amplifikovatelné DNA v rámci uvedeného vstupního rozsahu, avšak nižší než hranice mezní hodnoty  $\Delta C_T$ .

## CRC

Byla zpracována studie na stanovení LOD všech 7 reakcí specifických pro jednotlivé mutace, jež jsou součástí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit byl limit detekce mutované DNA na pozadí DNA divokého typu definován jako nejnižší faktor ředění, při kterém bylo 95 % testovaných replikátů pro každý alikvot pozitivních na mutaci určeno jako pozitivní.

Modely logistické regrese byly použity individuálně na každou analýzu pro datové sady s nízkou a vysokou vstupní hladinou DNA. U těchto modelů byla proměnnou reakce binární výstup detekované mutace (detekce = 1) a nedetekované mutace (detekce = 0), průběžnou vysvětlující proměnnou byl  $\log_2$  % ředění mutace. Hodnoty LOD byly vypočítány jako procento ředění mutace, které poskytlo predikovanou pravděpodobnost detekce 0,95 (tabulka 14).

**Tabulka 14. Hodnoty LOD pro jednotlivé analýzy mutací s použitím buněčných linií FFPE**

<b>Analýza</b>	<b>LOD C<sub>95</sub> (procento mutované DNA v DNA divokého typu)</b>
12ALA	0,77
12ARG	2,56
12ASP	6,43
12CYS	1,47
12SER	5,65
12VAL	1,60
13ASP	6,42

## NSCLC

LOD soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit byl stanoven a ověřen pomocí tkáně CRC. Tyto výsledky LOD byly znovu ověřeny pro tkáně NSCLC.

Studie měla 2 části. V části 1 bylo naředěno 60 replikátů 7 mutačních buněčných linií NSCLC FFPE, představujících jednotlivé mutace zředěné na LOD příslušné analýzy, a testováno. Všech 60 platných replikátů buněčných linií FFPE každého vyhodnoceného alikvotu vykazalo 100% detekci příslušné mutace v rámci hodnoceného LOD.

V části 2 bylo 96 replikátů klinických alikvotů NSCLC FFPE, představujících jednotlivé mutace získané třemi metodami získávání (resekce, CNB a FNA), po naředění na LOD příslušné analýzy testováno.

96 platných replikátů pro mutace 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL a 13ASP bylo identifikováno se 100% správností. Analýzy mutací 12CYS a 12SER ukázaly 95,8% detekci při LOD.

To ukazuje, že dříve stanovená hodnota LOD je ověřena pro všechny analýzy mutace při posuzování alikvotů tkáně NSCLC a klinických alikvotů FFPE / NSCLC / buněčných linií FFPE / párových alikvotů pacienta.

## Vstupní úrovně DNA a linearita

### Vliv vstupní úrovně DNA na hodnoty $\Delta C_T$

Pokud alikvoty při různých celkových vstupních úrovních DNA obsahují stejný podíl mutační DNA, očekává se, že zjištěné hodnoty  $\Delta C_T$  zůstanou konzistentní. DNA extrahovaná z 8 buněčných linií FFPE byla použita k přípravě směsi DNA s nejnižší dosažitelnou hodnotou  $C_T$  kontrolní reakce.

Rozsah ředění pro každou mutační reakci a střední hodnota  $\Delta C_T$  získaná z výsledků jsou uvedeny v tabulce 15 a tabulce 16. Celkově jsou hodnoty  $\Delta C_T$  konzistentní u všech testů v celém pracovním rozsahu soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit; to dokazuje, že hladina vstupní DNA nebude mít dopad na přesnost stanovení mutace alikvotu.

**Tabulka 15. Vliv hladiny vstupní DNA na hodnoty  $\Delta C_T$  v rozsahu vstupních hodnot  $C_T$  kontrolní reakce – buněčné linie CRC FFPE**

Analýza	$\Delta C_T$				
	Ředění 1 ~20–21 $C_T$	Ředění 2 ~23–24 $C_T$	Ředění 3 ~26–27 $C_T$	Ředění 4 ~29–30 $C_T$	Ředění 5 ~32–33 $C_T$
12ALA	1,56	1,25	1,16	1,14	1,27
12ASP*	2,46	2,18	2,11	2,11	1,75
12ARG	1,18	0,63	1,08	0,94	1,06
12VAL	0,29	0,25	0,15	0,26	-0,1
12SER	2,91	2,21	2,15	2,15	2,08
12CYS	0,98	0,71	0,58	0,81	0,67
13ASP	3,57	2,84	2,54	2,46	2,62

\* Celkový počet replikátů pro 12ASP byl 27.

**Tabulka 16. Vliv hladiny vstupní DNA na hodnoty  $\Delta C_T$  v rozsahu vstupních hodnot  $C_T$  kontrolní reakce – alikvoty FPPE NSCLC**

Analýza	$\Delta C_T$				
	Ředění 1 ~20–21 $C_T$	Ředění 2 ~23–24 $C_T$	Ředění 3 ~26–27 $C_T$	Ředění 4 ~29–30 $C_T$	Ředění 5 ~32–33 $C_T$
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

\* Žádné  $C_T$  mutační reakce kvůli nízké koncentraci DNA – nebyla vypočítána žádná hodnota  $\Delta C_T$ .

### Linearita / účinnost amplifikace jako funkce vstupní DNA

Linearita a účinnost amplifikace PCR pro každou mutační reakci v porovnání s kontrolní reakcí v celém pracovním rozsahu soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit byla prokázána. Účinnost amplifikace byla vypočítána pro každou mutační reakci a kontrolní reakci jako  $[2(-1 / \text{sklon křivky})] - 1$ .

Účinnost amplifikace kontroly v porovnání s mutační reakcí ukazuje, že hodnota  $\Delta C_T$ , a tedy zjištění mutace, je konzistentní v celém pracovním rozsahu analýzy. Souhrn údajů je uveden v tabulce 17 a tabulce 18.

### Linearita / účinnost amplifikace jako funkce procenta mutace

Cílem této studie bylo vyhodnotit vliv sériově ředěného alikvotu pozitivního na mutaci na účinnost amplifikace v rámci pracovního rozsahu soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, počínaje od hodnot  $C_T$  vstupních hladin přibližně 22–23  $C_T$ .

---

Extrakty DNA z buněčných linií CRC FFPE a alikvotů NSCLC byly nejprve vyhodnoceny pomocí hodnot OD před provedením PCR pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Poté byly připraveny zásobní DNA tak, aby hodnota  $C_T$  kontrolní reakce odpovídala přibližně 23  $C_T$ . Zásobní DNA byly sériově zředěny, vždy pomocí DNA divokého typu, aby byla zachována konstantní celková DNA divokého typu a zároveň se měnil procentní podíl mutační DNA v templátu.

Byly připraveny směsi DNA dostatečné pro 6 replikátů na mutaci. Byly vypočítány hodnoty  $C_T$  a  $\Delta C_T$  pro každou mutaci a každé ředění. Model lineární regrese byl použit na hodnotu  $C_T$  mutační reakce oproti vstupnímu ředění DNA  $\log_2$ . Studie ukázala, že ředění mutací na pozadí konstantní koncentrace DNA divokého typu vykazovala účinnosti amplifikace, které se významně nelišily od hodnot stanovených ve výše uvedené studii.

Tabulka 17. Účinnost amplifikace u kontrolních a mutačních reakcí Buněčné linie CRC

Alikvot	Úsek	Standardní chyba úseku	Vypočítaný sklon křivky	Standardní chyba (sklon křivky)	Dolní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Horní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Účinnost amplifikace	Rozdíly v účinnosti amplifikace
12ALA	Kontrola C <sub>T</sub>	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	0,989	0,03
	12ALA C <sub>T</sub>	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	1,019	
12ARG	Kontrola C <sub>T</sub>	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	0,954	0,056
	12ARG C <sub>T</sub>	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	1,01	
12ASP	Kontrola C <sub>T</sub>	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	0,982	-0,003
	12ASP C <sub>T</sub>	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	0,979	
12CYS	Kontrola C <sub>T</sub>	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	1,026	0,032
	12CYS C <sub>T</sub>	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	1,058	
12SER	Kontrola C <sub>T</sub>	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	0,996	0,105
	12SER C <sub>T</sub>	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	1,101	
12VAL	Kontrola C <sub>T</sub>	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	1,007	0,033
	12VAL C <sub>T</sub>	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	1,04	
13ASP	Kontrola C <sub>T</sub>	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	0,999	0,145
	12ASP C <sub>T</sub>	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	1,144	

Tabulka 18. Účinnost amplifikace u kontrolních a mutačních reakcí Alikvoty NSCLC

Alikvot	Úsek	Standardní chyba úseku	Vypočítaný sklon křivky	Standardní chyba (sklon křivky)	Dolní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Horní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Účinnost amplifikace	Rozdíly v účinnosti amplifikace
12ALA	Kontrola C <sub>T</sub>	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	0,94	0,069
	12ALA C <sub>T</sub>	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	1,01	
12ARG	Kontrola C <sub>T</sub>	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	0,94	0,093
	12ARG C <sub>T</sub>	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	1,04	
12ASP	Kontrola C <sub>T</sub>	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	0,96	-0,001
	12ASP C <sub>T</sub>	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	0,96	
12CYS	Kontrola C <sub>T</sub>	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	0,98	0,019
	12CYS C <sub>T</sub>	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	1,00	
12SER	Kontrola C <sub>T</sub>	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	0,97	0,127
	12SER C <sub>T</sub>	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	1,09	
12VAL	Kontrola C <sub>T</sub>	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,92	0,011
	12VAL C <sub>T</sub>	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	0,91	
13ASP	Kontrola C <sub>T</sub>	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	0,94	0,066
	12ASP C <sub>T</sub>	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	1,01	

## Interferující látky

Cílem této studie bylo vyhodnotit vliv potenciálně interferujících látek na výsledky při použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. To bylo provedeno analýzou dopadu jednotlivých látek na hodnoty  $\Delta C_T$  a stav mutace testovaných alikvotů pomocí experimentů s obohacením na různé koncentrace. Potenciálními interferujícími látkami z testovaného procesu extrakce DNA byly pufr Buffer AL, pufr Buffer ATL, etanol, parafínový vosk, proteináza K, promývací Buffer AW1, promývací Buffer AW2 a xylen. Jako slepá kontrola byl testován i konečný eluční pufr ze soupravy, pufr Buffer ATE.

Žádné z potenciálně interferujících látek, které byly vyhodnoceny v koncentracích očekávaných při běžném použití, nemají vliv na schopnost soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit rozlišit mezi alikvoty s pozitivní a negativní reakcí na mutace.

---

Kromě studie interferujících látek byl posouzen potenciální vliv nekrózy u klinických alikvotů za účelem stanovení, zda vysoké úrovně nekrotické tkáně v alikvotech nádorů mají vliv na schopnost testu dosáhnout platných výsledků. Z celkem 421 vyhodnocených alikvotů jako součást studií porovnání s analytickou referenční metodou obsahovalo 29 alikvotů dle hodnocení patologa nekrózu v úrovni > 50 %. Z těchto 29 alikvotů 28 vykázalo platné výsledky, které se shodovaly s obousměrnou Sangerovou sekvenční metodou. Jeden výsledek byl neplatný v důsledku nedostatečného množství DNA.

## Křížová kontaminace

Cílem této studie bylo stanovit rozsah křížové kontaminace mezi alikvoty DNA při použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, která by mohla potenciálně vést k falešně pozitivním výsledkům. Mezi potenciální zdroje křížové kontaminace patří:

- Extrakce alikvoty (například seškrábnutí sklíček)
- Pipetování alikvotů
- Uzavření zkumavek s alikvoty (víčkem)
- Kontaminace činidel soupravy v průběhu používání
- Vkládání zkumavek analýzy do přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

U této studie byly použity standardy FFPE: standard genu divokého typu a standard 12ALA (protože reakce 12ALA je reakcí s nejnižší hodnotou LOD v soupravě).

Tato studie sestávala z 10 cyklů PCR, určených k prozkoumání možné kontaminace v rámci cyklů na přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM i mezi nimi. V těchto testovacích cyklech byly zkumavky obsahující DNA divokého typu použity k testování kontaminace z mutované DNA.

Výsledky uvedené studie neprokázaly žádnou zjištěnou kontaminaci v žádném z extraktů DNA divokého typu, které byly určeny k detekci křížové kontaminace.

## Exkluzivita / zkřížená reaktivita

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit obsahuje 8 samostatných reakcí; zahrnuje jednu samostatnou kontrolní reakci, která detekuje nepolymorfní oblast genu KRAS, a sedm reakcí specifických pro mutaci. Není k dispozici žádná reakce, která by specificky zjišťovala sekvenci KRAS divokého typu na kodonu 12 nebo 13. Výsledek KRAS „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována) (tj. divokého typu) je určen na základě nepřítomnosti jakékoliv ze 7 mutací dávající výsledek pozitivní na mutaci.

Proto je nezbytné demonstrovat množství nespecifické amplifikace nebo zkřížené reaktivity, ke kterým dochází v každé reakci s nadměrným množstvím DNA KRAS divokého typu, aby bylo zajištěno, že nedojde k žádným falešně pozitivním výsledkům. Podobně je nespecifická amplifikace vyhodnocována u mutací KRAS, které analýza nemá detekovat. To ukazuje, že množství zkřížené reaktivity mezi mutačními reakcemi nemá za následek chybně pozitivní výsledky mutací v přítomnosti nadměrných množství mutační DNA. Protože vstupní hladina DNA pro tuto analýzu je založena na rozsahu hodnoty  $C_T$  kontroly (21,92–32,00), nejvyšší vstupní koncentrace DNA je založena na hodnotě  $C_T$  kontroly přibližně 22.

### Nespecifická amplifikace / zkřížená reaktivita: DNA KRAS divokého typu

Bylo řešeno množství nespecifické amplifikace DNA divokého typu reakčními směsmi navrženými pro amplifikaci specifických mutací. Celkem bylo vyhodnoceno 60 replikátů DNA divokého typu buněčné linie FFPE a 60 alikvotů NSCLC při nejvyšší vstupní koncentraci amplifikovatelné DNA pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Hodnoty  $C_T$  kontrol byly v rozsahu 22–23. Výsledky ukázaly, že hodnoty  $\Delta C_T$  překročily dosažené mezní hodnoty analýzy a nejméně 95 % replikátů divokého typu bylo správně identifikováno.

## Nespecifická amplifikace / zkřížená reaktivita / exkluzivita: DNA KRAS pozitivní na mutaci

Mutační alikvoty s vysokou koncentrací vstupní DNA byly testovány oproti všem reakčním směsím. Alikvoty DNA byly připraveny z každé z buněčných linií CRC a NSCLC FFPE tak, aby hodnota  $C_T$  kontrolní reakce byla přibližně 23. Z těchto řadění bylo vyhodnoceno 6 replikátů každého alikvotu mutace. Procento mutace v alikvotu se řídilo procentem mutace v DNA buněčné linie.

Střední hodnoty  $\Delta C_T$  uvedené v tabulce 19 a tabulce 20 prokazují, že mezi mutačními reakcemi dochází ke zkřížené reaktivitě. Ve všech případech výsledky prokázaly, že byla zjištěna správná mutace v odpovídající mutační reakci (tj. nejmenší hodnota  $\Delta C_T$  byla správným pozitivním výsledkem mutace). Všechny ostatní případy buď nebyly detekovány, nebo byly mimo prahovou hodnotu  $\Delta C_T$ .

**Tabulka 19. Zkřížená reaktivita ( $\Delta C_T$ ) mezi mutačními reakcemi s použitím DNA buněčné linie CRC FFPE při vysokém vstupním rozmezí**

Mutační DNA	Mezní hodnota	$\Delta C_T$ analýzy						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	<b>1,42*</b>	12,66	–	<b>5,81†</b>	<b>2,78†</b>	<b>6,31†</b>	13,21
12ASP	6,6	12,56	<b>2,42*</b>	–	–	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	<b>1,12*</b>	11,42	–	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	<b>0,98*</b>	–	<b>7,96†</b>	12,88
12SER	8	–	13,39	13,31	–	<b>3,02*</b>	12,99	13,97
12VAL	7,5	<b>6,83†</b>	–	–	–	13,38	<b>0,28*</b>	13,74
13ASP	7,5	–	13,29	13,89	–	–	14,36	<b>4,5*</b>

–: Žádná zkřížená reakce.

\* Hodnoty  $\Delta C_T$  odpovídajících reakcí.

†  $\Delta C_T$  ze zkřížené reaktivních reakcí, které jsou nižší než mezní hodnota.

**Tabulka 20. Zkřížená reaktivita ( $\Delta C_T$ ) mezi mutačními reakcemi s použitím DNA buněčné linie NSCLC FFPE při vysokém vstupním rozmezí**

Mutační DNA	Mezní hodnota	$\Delta C_T$ analýzy						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	<b>1,31*</b>	12,8	–	<b>5,01<sup>†</sup></b>	<b>2,26<sup>†</sup></b>	<b>5,57<sup>†</sup></b>	12,65
12ASP	6,6	12,61	<b>1,66*</b>	–	–	–	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	<b>0,81*</b>	11,24	–	12,66	12,62
12CYS	8	–	12,22	<b>7,84<sup>†</sup></b>	<b>0,56*</b>	–	13,06	11,84
12SER	8	–	12,87	13,21	–	<b>1,93*</b>	13,25	12,93
12VAL	7,5	<b>5,93<sup>†</sup></b>	14,29	–	–	13,14	<b>0,45*</b>	12,39
13ASP	7,5	–	–	–	–	–	–	<b>2,02*</b>

–: Žádná zkřížená reakce.

\* Hodnoty  $\Delta C_T$  odpovídajících reakcí.

<sup>†</sup>  $\Delta C_T$  ze zkřížené reaktivních reakcí, které jsou nižší než mezní hodnota.

## Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Cílem této studie bylo prokázat přesnost soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit v rámci laboratoře (opakovatelnost) a mezi laboratořemi (reprodukovatelnost). Jsou uváděny jak správnost výsledků stanovení mutace, tak přesnost hodnot  $\Delta C_T$  (rozdíl v hodnotách  $C_T$  mezi mutační reakcí a kontrolní reakcí).

### CRC

Pro toto vyhodnocení byly použity klinické alikvoty CRC. Jeden alikvot divokého typu a po jednom alikvotu každé mutace byly testovány soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit; testy alikvot a kontrolní testy provedli 2 pracovníci na každém ze 3 pracovišť a ve 3 dávkách soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, každý den po dobu 5 dnů, se 2 cykly za den a dvěma replikáty pro každý alikvot každého cyklu. Hodnoty  $C_T$  a  $\Delta C_T$  získané pro každou reakci u každého alikvotu byly rovněž analyzovány analýzou variance složek.

Reprodukovatelnost testů soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit byla demonstrována pro alikvoty mutace nízké úrovně (3× LOD) a alikvoty divokého typu s nejméně 39/40 správnými identifikacemi mutace pro všechny analýzy napříč dávkami, platformami a pracovníky, v rámci jednotlivých laboratoří i mezi laboratořemi. Odhadovaný podíl 3× LOD alikvotů mutací a divokého typu byl hlášen celkově a v rámci každého pracoviště. U všech analýz a kombinací alikvotů alespoň 79 z 80 replikátů vykázalo správnou detekci mutace (tabulka 21).

**Tabulka 21. Celkový počet správných detekcí**

Alikvot	Správné detekce analýzy mutací						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mutace 3× LOD	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Divoký typ (nízká úroveň)	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

## NSCLC

Pro každou ze 7 mutací NSCLC KRAS byly použity 3 alikvoty reprezentující každou ze 3 metod získávání alikvotů (resekce, CNB a FNA). Pro vytvoření naředěných směsí DNA divokého typu bylo použito dalších 6 klinických alikvotů DNA divokého typu (vždy 2 alikvoty reprezentující každou ze 3 metod získávání alikvotů).

Smíšením více extrakcí každého mutačního alikvotu byla vytvořena vždy jedna směs alikvotů každé mutace. Každá směs mutačních alikvotů byla zředěna tak, aby vznikly testovací alikvoty s hladinami mutací 1× LOD a 3× LOD.

Laboratoře účastníci se této studie byly na 3 různých místech. Laboratorní podmínky byly na každém pracovišti různé: 2 zařízení Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 2 operátoři, 2 šarže soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a 2 cykly za den (na každého operátora) po dobu 16 dnů, které neproběhly v řadě za sebou.

U všech analýz a kombinací alikvotů alespoň 284 z 288 replikátů vykazalo správnou detekci mutace. Celkový podíl správných stanovení mutace, pro všechny analýzy dohromady, byl u skupiny 1× LOD 100 %. Celkový podíl správných stanovení mutace, pro všechny analýzy dohromady, byl u skupiny 3× LOD 99,6 %. Celkový podíl správných stanovení u alikvotů, kde mutace nebyla detekována (divokého typu) byl 100 % (tabulka 22).

**Tabulka 22. Správná stanovení mutace pro 1× LOD, 3× LOD a DNA divokého typu**

Úroveň mutace	Analýza	Správné detekce	Správné detekce, %	Dolní oboustranný 90% CI
1× LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
3× LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
Divoký typ		285/285	100	98,95

## Variabilita manipulace s alikvoty

Cílem této studie bylo vyhodnotit vliv variability manipulace s alikvoty, zvláště extrakce DNA, na výsledky při použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Tato studie doplňuje studii opakovatelnosti a reprodukovatelnosti analýzou variability manipulace s alikvoty. Stejně klinické řezy FFPE a buněčné linie FFPE byly zpracovány na 3 místech a poté testovány soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

### CRC

Z každého z 10 alikvotů CRC FFPE bylo nařezáno třicet po sobě jdoucích 5 $\mu$ m řezů (3 divokého typu a 1 pro každou mutaci). Řezy byly randomizovány k 1 ze 3 testovacích pracovišť tak, aby každé pracoviště získalo 10 řezů z každého alikvotu FFPE (celkem 100 řezů). Ze 300 testovaných extrakcí DNA bylo 298 alikvotů platných. Mezi těmito 3 pracovišti bylo dosaženo shody 99,33 % s ohledem na detekci mutace KRAS.

Porovnání průměrné hodnoty  $\Delta C_T$  pro alikvoty mutací a divokého typu podle jednotlivých pracovišť ukázalo velmi blízkou shodu výsledků. Výsledky prokázaly shodu v postupu extrakce DNA a zpracování alikvotů ve spojení se soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

### NSCLC

V této studii bylo použito 13 klinických alikvotů NSCLC (3 $\times$  12ASP, 3 $\times$  12CYS, 4 $\times$  12VAL a 3 divokého typu) a 4 alikvoty buněčných linií FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER a 13ASP). Alikvoty představovaly různé metody odběru: chirurgickou resekci, FNA a CNB. Kde klinická tkáň NSCLC nebyla k dispozici, buněčné linie představovaly vzácné mutace.

Tyto tři dávky 20 řezů FFPE byly poté náhodně distribuovány na 3 pracoviště. Na každém ze 3 pracovišť byla provedena extrakce DNA z 20 řezů FFPE v dávce (10 párů) podle mutace a divokého typu.

Při testování všech přípravků alikvotů na 3 jednotlivých pracovištích pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bylo všech 7 mutačních alikvotů a alikvotů divokého typu správně stanoveny. Celkový výsledek stanovení mutace pro každý ze 7 mutačních alikvotů a alikvotů divokého typu byl 100 %, což dokazuje shodu při extrakci DNA a detekci mutace pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit mezi pracovišti.

## Rovnocennost metod získávání alikvotů (pouze NSCLC)

Účelem této studie bylo posoudit, zda stanovení mutace u alikvotů NSCLC pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bylo ovlivněno způsobem získání alikvotu. 3 metody získání alikvotu posuzované v rámci této studie byly řez, FNA a CNB.

V této studii „párové“ alikvoty CNB a FNA pacienta byly získány z chirurgických řezů alikvotů nádoru, aby bylo možné stejný nádor odebrat 3 metodami získávání alikvotů. Pro tuto studii bylo k dispozici celkem 169 alikvotů odebraných resekcí, 169 pomocí CNB a 169 pomocí FNA.

Každý alikvot byl extrahován a testován pomocí kontrolní analýzy KRAS. Každý alikvot s platným výsledkem (169 řezů, 169 alikvotů CNB a 164 alikvotů FNA) byl testován pomocí všech 8 analýz KRAS.

Kromě toho ze všech klinických alikvotů NSCLC FFPE byla DNA extrahovaná pro test pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vyhodnocena i pomocí obousměrné Sangerovy sekvenační metody, aby mohla být stanovena úroveň shody mezi soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit a obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou. Ve všech typech alikvotů souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit přesně vyhodnocuje stav mutace a ve srovnání s obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou dosahuje celková míra shody 96,96 %.

Výsledky z této studie ukazují, že souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit poskytuje rovnocenné výsledky při všech 3 zkoumaných způsobech získávání, jak ukazují párové celkové míry shody:

- CNB vs. FNA 97,52 (meze spolehlivosti 94,41–99,15)
- CNB vs. řez 96,39 (meze spolehlivosti 92,99–98,41)
- FNA vs. řez 98,76 (meze spolehlivosti 96,14–99,78)

# Literatura

## Citovaná literatura

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**, 511.
2. Bachireddy, P., et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* **2**, 57.
5. Newton, C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2503.
6. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* **17**, 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer: [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

## Užitečná literatura

Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.

Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.

Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

---

Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.

De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.

Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.

Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.

Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.

Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.

Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.

---

Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.

Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.

Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.

Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* **120**, 1145.

Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).

Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.

Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

# Symbols

Na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:



<N>

Obsahuje dostatek činidel pro <N> reakcí



Použijte do



Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Obsahuje



Číslo

Rn

R označuje revizi příručky a n je číslo revize



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití



Upozornění

---

## Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na adrese **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, volejte 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN anebo naše místní distributory (viz poslední stránka obalu nebo navštivte stránky **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Příloha 1: Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit – manuální protokol

Tato část obsahuje pokyny k použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit se softwarem RGQ verze 2.3 v otevřeném režimu (tj. bez použití KRAS Assay Package).

## Všeobecné informace

- Požadované materiály jsou uvedeny v části Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy.
- Úplné pokyny k přípravě alikvotů a rozvržení alikvotů jsou v částech Protokol: Vyhodnocení alikvotu DNA a Protokol: Detekce mutací KRAS.

## Protokol: Vytvoření nového teplotního profilu

Předtím, než začnete, vytvořte tepelný profil pro analýzu KRAS. Parametry cyklování jsou stejné pro vyhodnocení alikvotu a vyhodnocení mutace.

## Postup

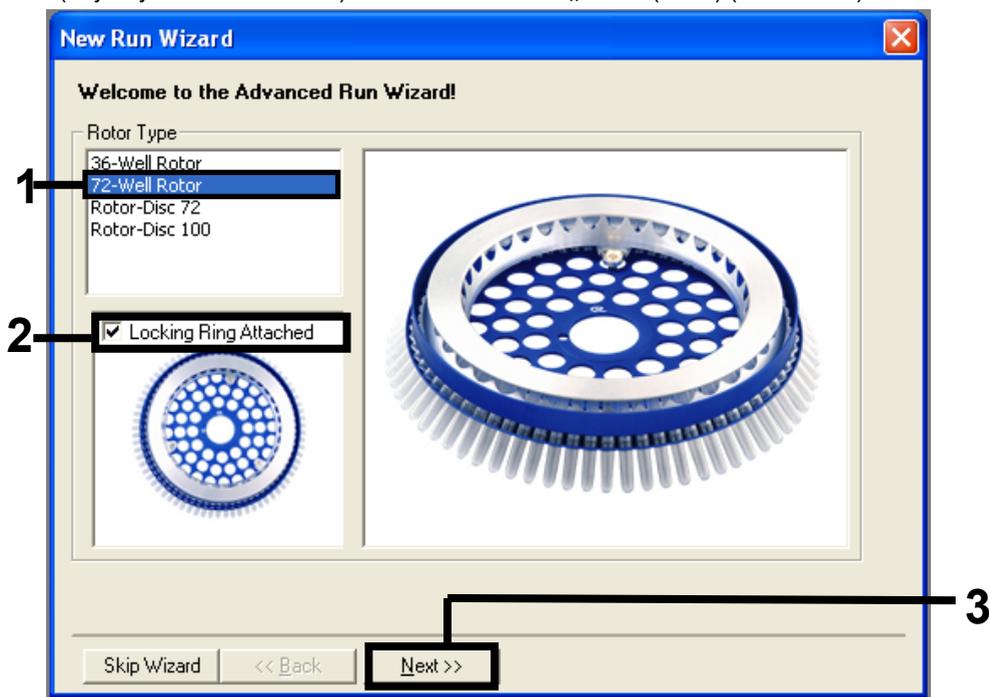
Parametry cyklování jsou uvedeny v tabulce 23.

**Tabulka 23. Parametry cyklování**

Cyklování	Teplota	Čas	Požítování dat
1	95 °C	15 minut	Žádné
40	95 °C	30 sekund	Žádné
	60 °C	60 sekund	„Green“ a „Yellow“

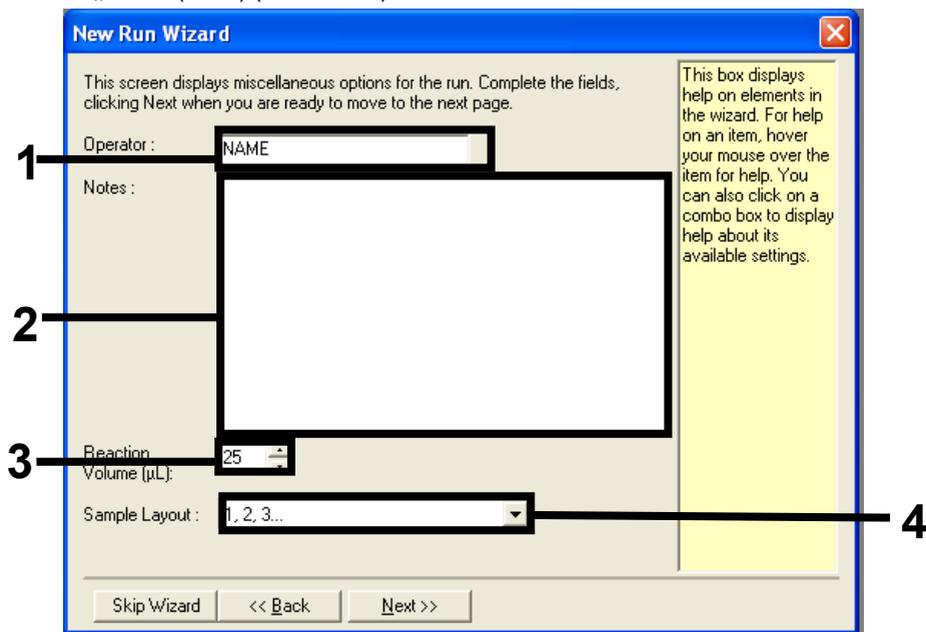
1. Poklepejte na ikonu aplikace Rotor-Gene Q Series Software 2.3 na pracovní ploše počítače připojeného k přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. V okně Nový cyklus, které se zobrazí, vyberte záložku „Advanced“ (Pokročilé).

2. Chcete-li vytvořit novou šablonu, vyberte „**Empty Run**“ (Prázdný cyklus) a poté klikněte na „**New**“ (Nový), tím vyvoláte průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem).
3. Jako typ rotoru vyberte „72-Well Rotor“ (rotor se 72 jamkami). Zkontrolujte, zda je správně nasazen pojistný kroužek, a zaškrtněte políčko „**Locking Ring Attached**“ (Pojistný kroužek nasazen). Klikněte na tlačítko „**Next**“ (Další) (obrázek 21).



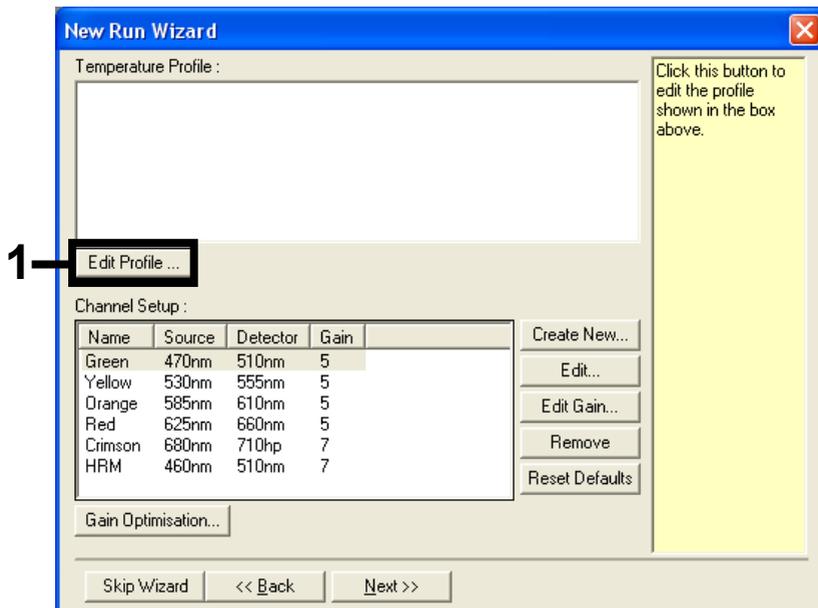
Obrázek 21. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem). 1 = „Rotor type“ (Typ rotoru), 2 = pole „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen), 3 = „Next“ (Další).

4. Zadejte jméno obsluhy. Zadejte poznámky a reakční objem jako 25. Zkontrolujte, zda pole „**Sample Layout**“ (Rozvržení alikvotů) obsahuje hodnoty **1, 2, 3...** Klikněte na tlačítko „**Next**“ (Další) (obrázek 22).



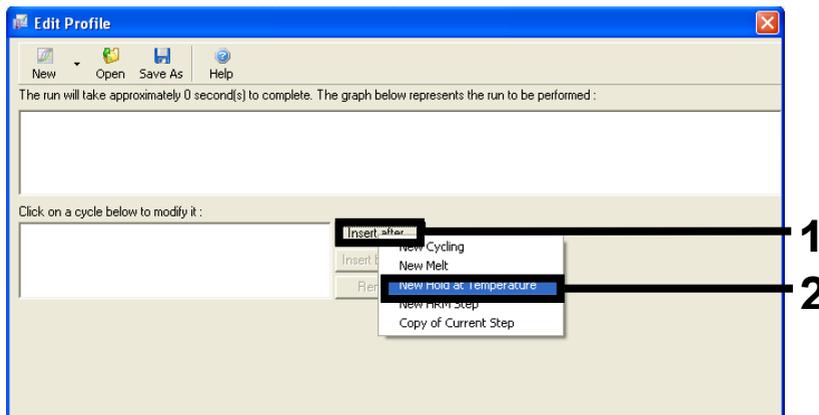
**Obrázek 22. Zadání jména obsluhy a objemů reakční směsi.** 1 = dialogové pole „Operator“ (Obsluha), 2 = dialogové pole „Notes“ (Poznámky), 3 = pole „Reaction Volume“ (Reakční objem), 4 = pole „Sample Layout“ (Rozvržení alikvotů), 5 = tlačítko „Next“ (Další).

5. Klikněte na „**Edit Profile**“ (Upravit profil) v dialogovém okně „New Run Wizard“ (Průvodce novým během) (obrázek 23) a naprogramujte teplotní profil podle informací v následujících krocích.



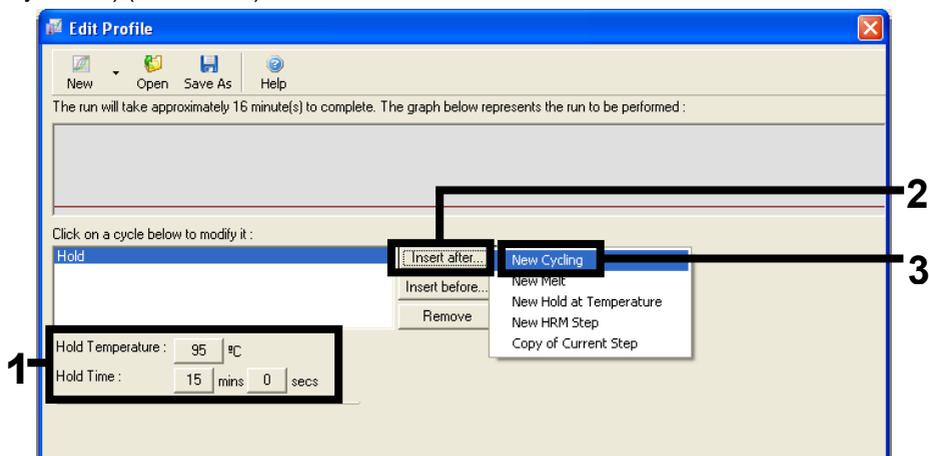
**Obrázek 23. Úprava profilu.**

6. Klikněte na tlačítko „**Insert after**“ (Vložit za) a vyberte „**New Hold at Temperature**“ (Nové pozastavení při teplotě) (obrázek 24).



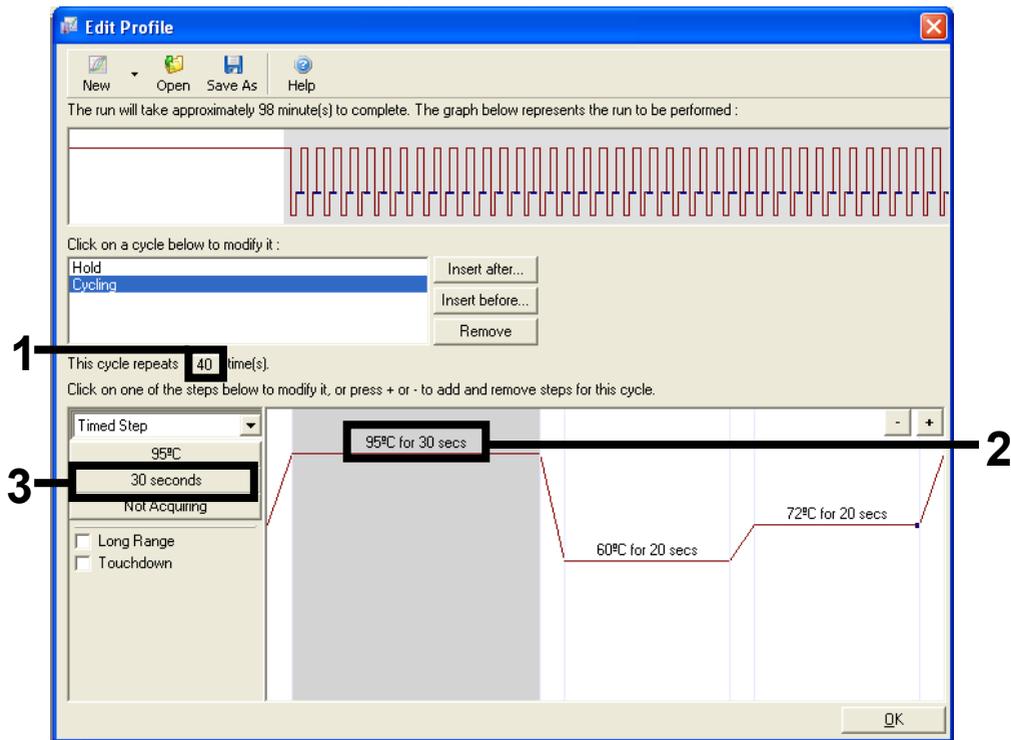
**Obrázek 24. Vložení kroku počáteční inkubace.** 1 = „Insert after“ (Vložit za), 2 = „New Hold at Temperature“ (Nové pozastavení při teplotě).

7. Hodnotu v poli **Hold Temperature** (Teplota pozastavení) na 95 °C a v poli **Hold Time** (Doba pozastavení) na hodnotu **15 mins 0 secs** (15 minut 0 sekund). Klikněte na tlačítko „**Insert after**“ (Vložit za) a poté vyberte možnost „**New Cycling**“ (Nové cyklování) (obrázek 25).



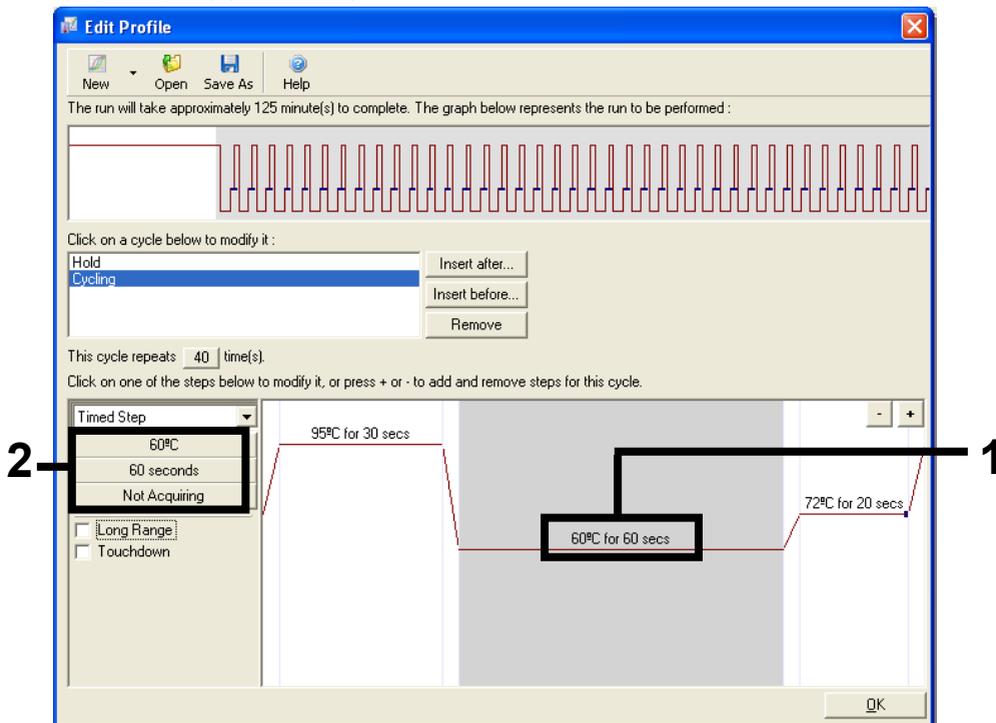
**Obrázek 25. Krok počáteční inkubace při teplotě 95 °C.** 1 = „Hold Temperature“ (Teplota pozastavení) a „Hold Time“ (Doba pozastavení), 2 = „Insert after“ (Vložit za), 3 = „New Cycling“ (Nové cyklování).

8. Nastavte počet opakování cyklování na **40**. Vyberte první krok a nastavte „**95°C for 30 secs**“ (95 °C na 30 sekund) (obrázek 26).



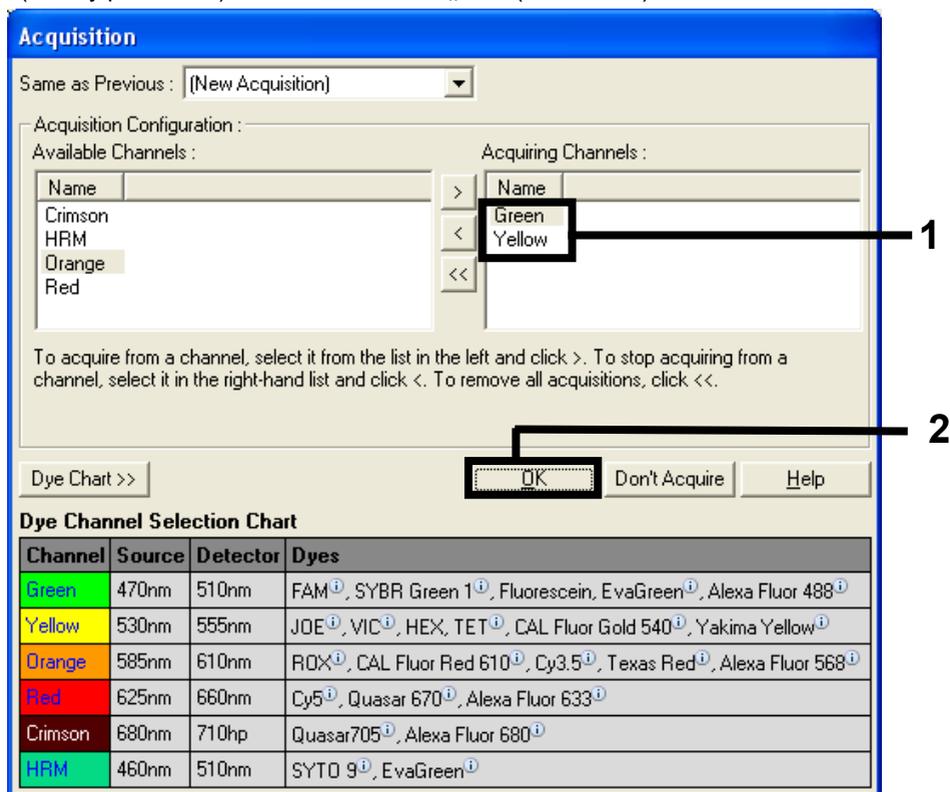
**Obrázek 26. Krok cyklování při teplotě 95 °C.** 1 = pole „Cycle repeats“ (Opakování cyklu), 2 = krok jedna: nastavení teploty, 3 = krok jedna: nastavení času.

9. Zvýrazněte druhý krok a nastavte na „60°C for 60 secs“ (60 °C na 60 sekund). Aktivujte pořizování dat v průběhu tohoto kroku stiskem tlačítka „Not Acquiring“ (Nepořizují se) (obrázek 27).



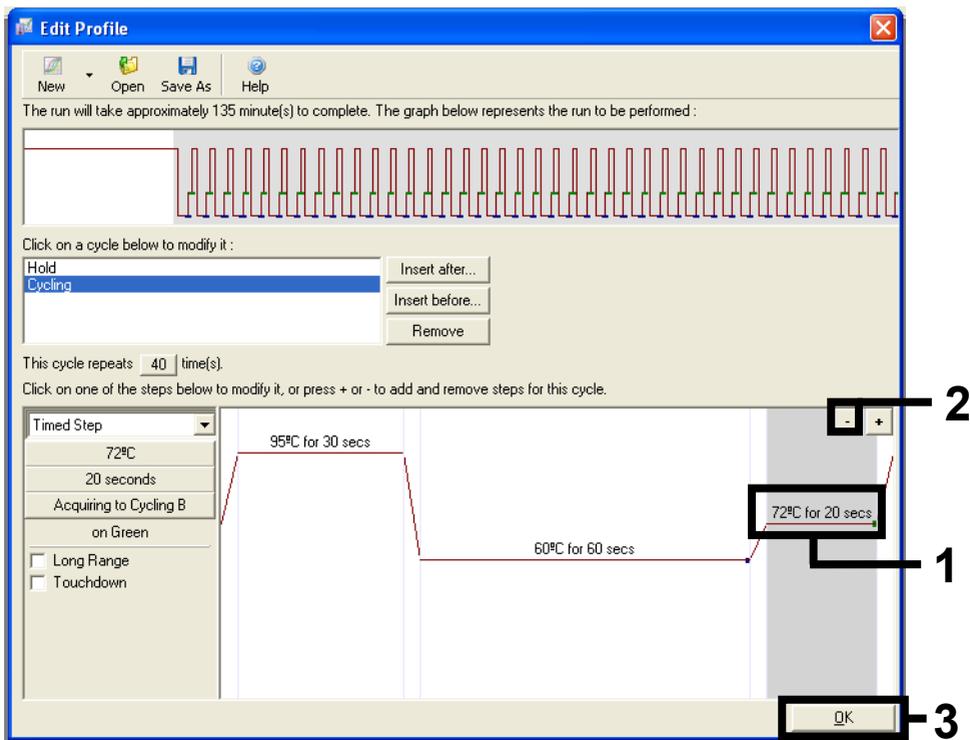
**Obrázek 27. Krok cyklování při teplotě 60 °C.** 1 = krok dvě: nastavení teploty a času, 2 = „Not Acquiring“ (Nepořizují se).

10. V seznamu „Available Channels“ (Dostupné kanály) vyberte kanály „Green“ a „Yellow“, poté kliknutím na „>“ je přeneste do seznamu „Acquiring Channels“ (Kanály pořizování). Klikněte na tlačítko „OK“ (obrázek 28).



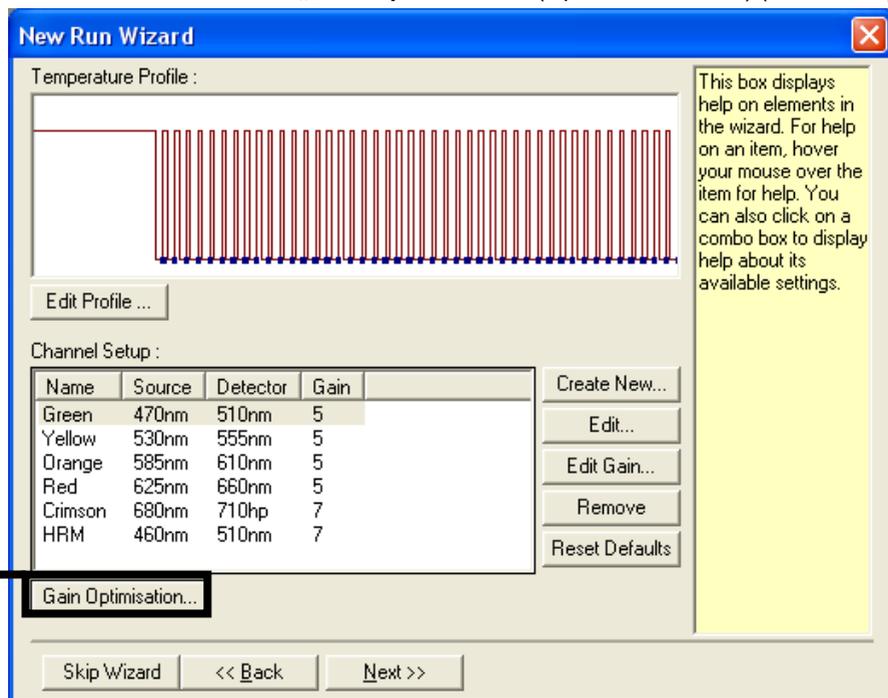
Obrázek 28. Pořizování při kroku cyklování 60 °C.

11. Zvýrazněte třetí krok a kliknutím na „-“ jej odstraňte. Klikněte na tlačítko „OK“ (obrázek 29).



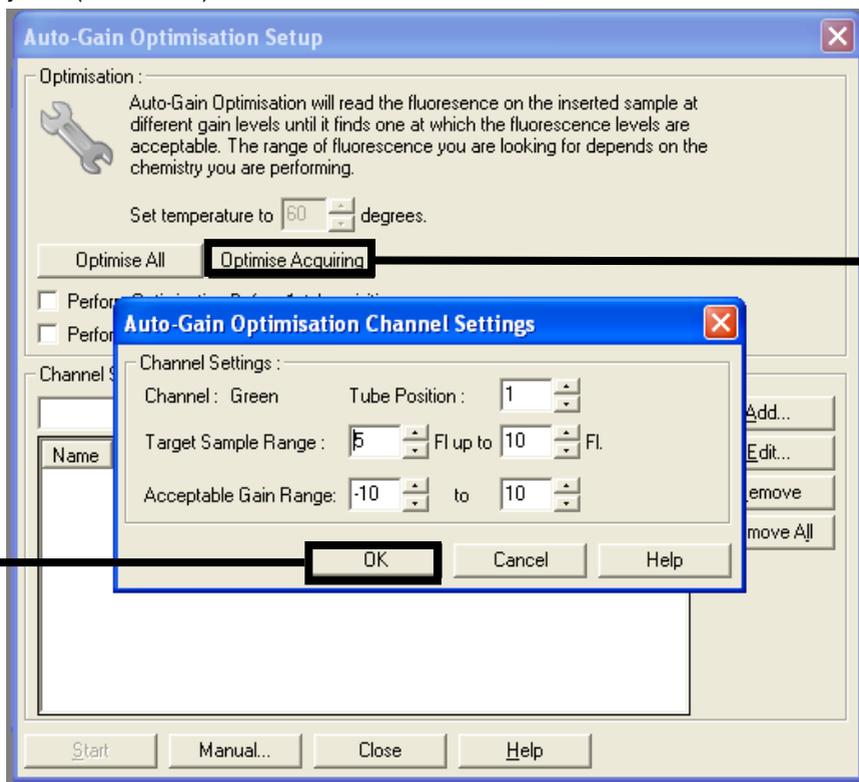
Obrázek 29. Odstranění rozšiřujícího kroku.

12. V dalším okně klikněte na „Gain Optimisation“ (Optimalizace zisku) (obrázek 30).



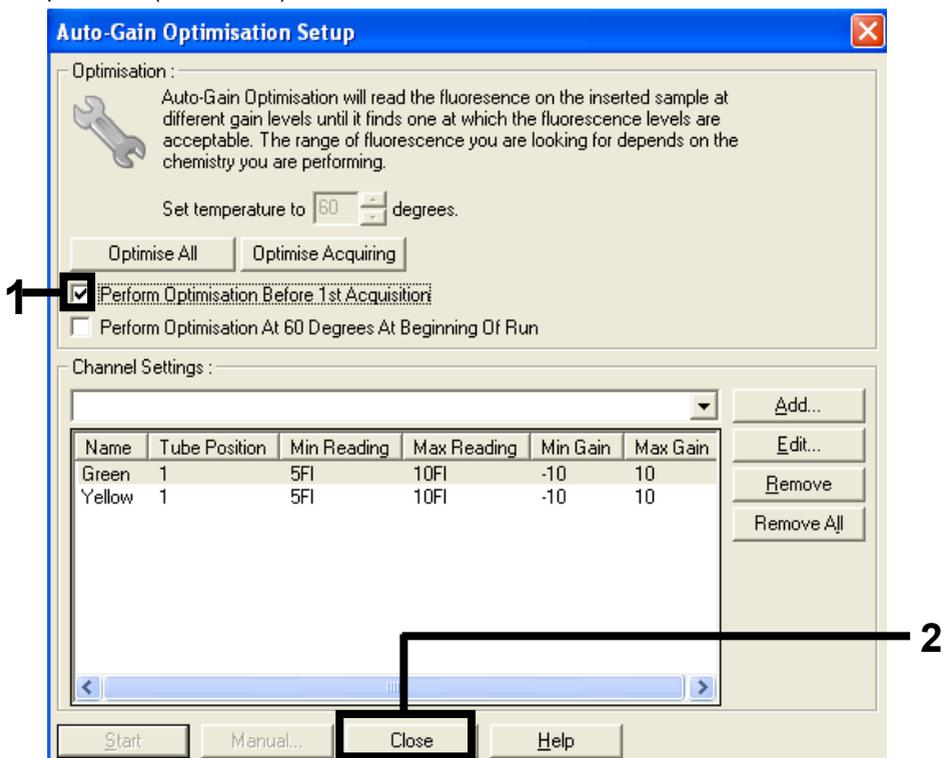
Obrázek 30. „Gain Optimisation“ (Optimalizace zisku).

13. Klikněte na tlačítko „**Optimise Acquiring**“ (Optimalizovat pořizování). Pro každý kanál se zobrazí jeho nastavení. Kliknutím na tlačítko „**OK**“ tyto výchozí hodnoty přijmete (obrázek 31).



Obrázek 31. „Auto-Gain Optimisation“ (Optimalizace automatického zvyšování citlivosti) pro kanál „zelený“.

14. Zaškrtněte políčko „**Perform Optimisation before 1st Acquisition**“ (Provést optimalizaci před 1. pořízením) a poté se kliknutím na tlačítko „**Close**“ (Zavřít) vraťte do průvodce (obrázek 32).



Obrázek 32. Výběr kanálu „zelený“ a „žlutý“.

15. Klikněte na tlačítko „**Next**“ (Další). Potom klikněte na tlačítko „**Save**“ (Uložit) a uložte templát do příslušného místa.

---

## **Protokol: Stanovení alikvotů (manuální)**

Tento protokol se používá pro stanovení celkové amplifikovatelné DNA v alikvotech a musí být proveden před analýzou mutace KRAS.

- Připravte alikvoty dle popisu v části Protokol: Vyhodnocení alikvotu DNA.
- Připravte cyklus PCR na zařízení Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dle popisu v části Protokol: *nastavení* soupravy theascreen KRAS RGQ PCR Kit.
- Po dokončení cyklu analyzujte data dle postupu v části Analýza dat hodnocení alikvotu.

## **Protokol: Detekce mutací KRAS (manuální)**

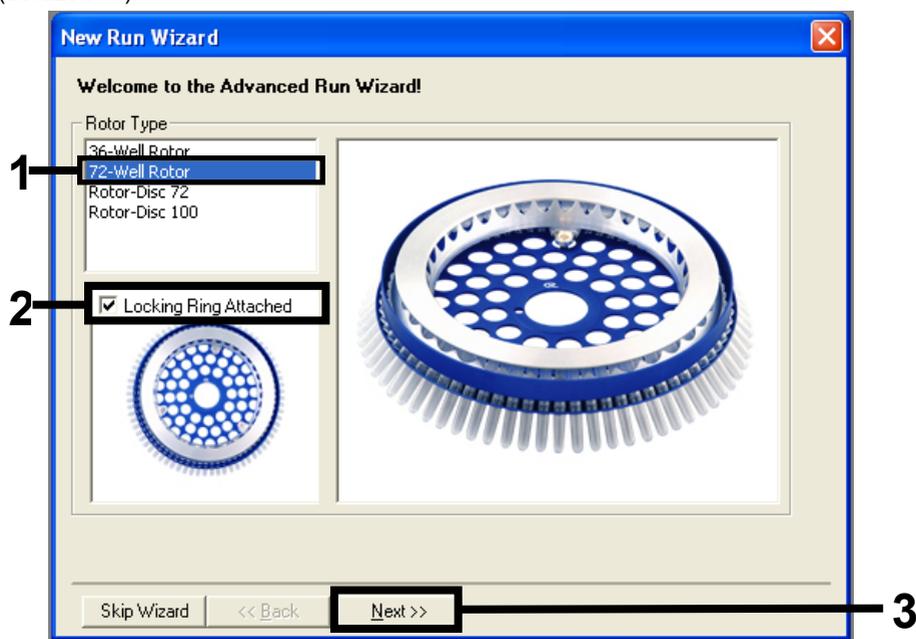
Jakmile alikvot projde stanovením, lze jej testovat k detekci mutací KRAS.

- Připravte alikvoty dle popisu v části Protokol: Detekce mutací KRAS.
- Připravte cyklus PCR na zařízení Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dle popisu v části Protokol: *nastavení* soupravy theascreen KRAS RGQ PCR Kit.
- Po dokončení cyklu analyzujte data dle postupu v části Analýza detekce mutace KRAS.

## Protokol: nastavení soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

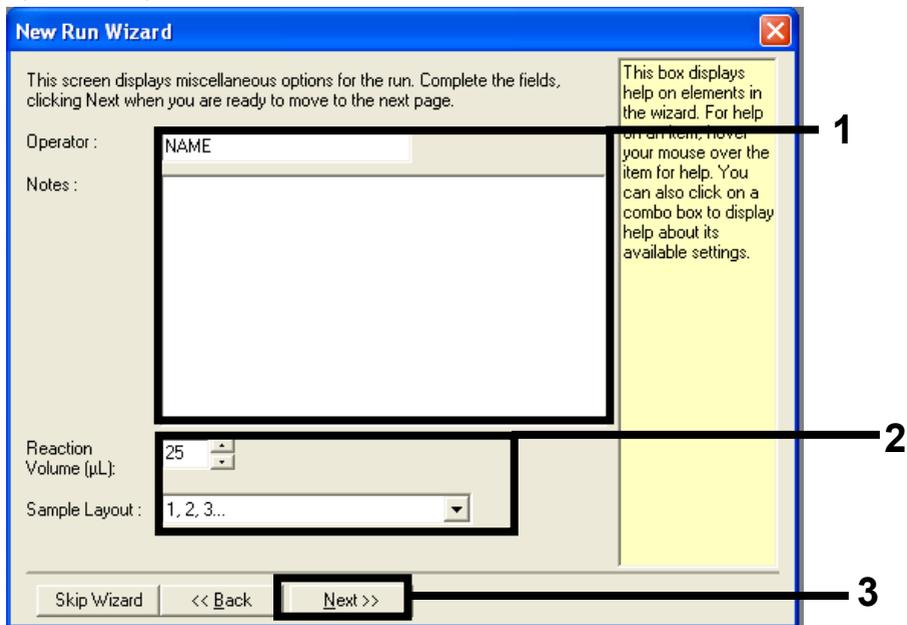
1. Otevřete software přístroje řady Rotor-Gene Q verze 2.3 a odpovídající vytvořený teplotní profil.
2. Teplotní profil vytvoříte podle protokolu: Vytvoření nového teplotního profilu.

Zkontrolujte, zda je vybrán správný rotor, a zaškrtněte políčko „**Locking Ring Attached**“ (Pojistný kroužek nasazen). Klikněte na tlačítko „**Next**“ (Další) (obrázek 33).



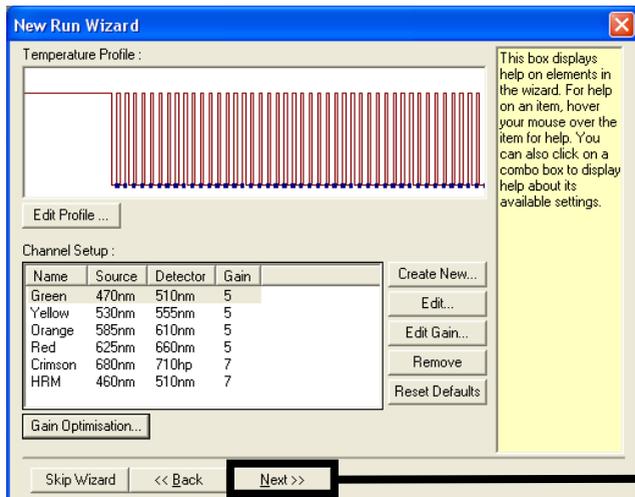
Obrázek 33. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem) a uvítací obrazovka. 1 = „Rotor type“ (Typ rotoru), 2 = pole „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen), 3 = „Next“ (Další).

3. Zadejte jméno obsluhy. Doplňte případné poznámky a zkontrolujte, zda je pole „**Reaction Volume**“ (Reakční objem) nastaven na 25 a pole „**Sample Layout**“ (Rozvržení alikvotů) obsahuje hodnoty „1, 2, 3...“. Klikněte na tlačítko „**Next**“ (Další) (obrázek 34).



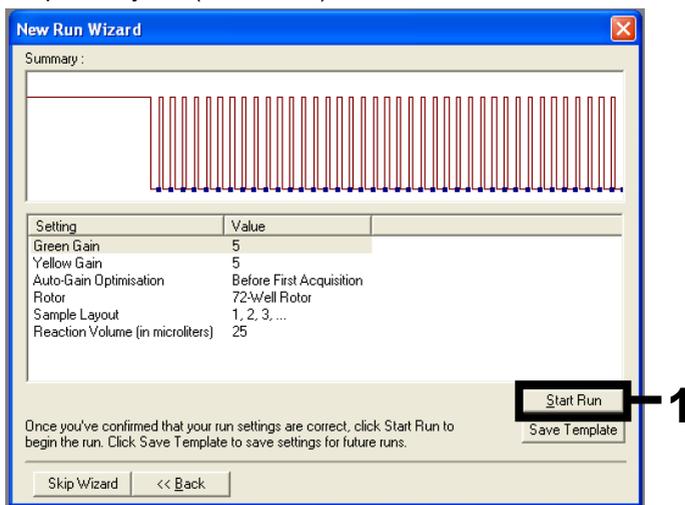
**Obrázek 34.** Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem). 1 = dialogové pole „Operator“ (Obsluha) a „Notes“ (Poznámky), 2 = pole „Reaction Volume“ (Reakční objem) a „Sample Layout“ (Rozvržení alikvotů), 3 = „Next“ (Další).

4. V dalším okně ponechte všechny hodnoty tak, jak jsou. Jestliže byl teplotní profil vytvořen podle návodu v protokolu: Vytvoření nového teplotního profilu, není třeba provádět žádné úpravy. Klikněte na tlačítko „Next“ (Další) (obrázek 35).



Obrázek 35. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem) a obrazovka na úpravu teplot. 1 = „Next“ (Další).

5. Zkontrolujte souhrn a poté kliknutím na tlačítko „**Start Run**“ (Spustit cyklus) uložte soubor cyklu a spusťte cyklus (obrázek 36).



**Obrázek 36.** Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem).  
1 = „Start Run“ (Spustit cyklus).

**Poznámka:** Po spuštění zpracování se zobrazí nové okno, ve kterém lze zadat názvy alikvotů nebo kliknout na tlačítko „**Finish**“ (Dokončit) a zadat je později výběrem tlačítka „**Sample**“ (Alikvot) v průběhu zpracování nebo po jeho skončení.

Kliknutím na tlačítko „**Finish and Lock Samples**“ (Dokončit a uzamknout alikvoty) již nebude možné názvy alikvotů upravovat. V zájmu zajištění správného testování a analyzování alikvotů byste měli věnovat zvláštní pozornost zadávání názvů alikvotů.

**Poznámka:** Při přidělování názvu alikvotů musí být pole pro prázdné jamky ve sloupci „**Name**“ (Název) ponechána prázdná.

6. Po dokončení cyklu analyzujte data dle postupu v částech Analýza dat hodnocení alikvotu nebo Analýza detekce mutace KRAS, podle toho, co se hodí.
7. Jestliže jsou zapotřebí kvantifikační zprávy, klikněte na ikonu „**Reports**“ (Zprávy) na nástrojové liště v souboru cyklu Rotor-Gene Q.

# Interpretace výsledků (manuální)

Po dokončení cyklu analýzy alikvotu nebo mutační analýzy analyzujte data následujícím postupem.

## Nastavení softwarové analýzy

1. Otevřete odpovídající soubor pomocí softwaru přístroje Rotor-Gene Q (verze 2.3).
2. Jestliže alikvoty dosud nebyly pojmenovány před provedením cyklu, klikněte na „**Edit Samples**“ (Upravit alikvoty).
3. Zadejte názvy alikvotů do sloupce „Name“ (Název).
4. Klikněte na tlačítko „Analysis“ (Analýza). Na straně analýzy klikněte na položku „**Cycling A. Yellow**“ a zkontrolujte kanál HEX.
5. Klikněte na položku „**Named On**“ (Pojmenované zapnuty).  
**Poznámka:** Tím se zajistí, že prázdné jamky nebudou v analýze figurovat.
6. Zvolte možnost „**Dynamic Tube**“ (Dynamická zkumavka).
7. Zvolte možnost „**Linear Scale**“ (Lineární stupnice).
8. Klikněte na položku „**Outlier Removal**“ (Odstranění zkreslení) a v poli „**NTC Threshold**“ (Prahová hodnota NTC) zadejte 10 %.
9. Nastavte prahovou hodnotu na **0.05** (0,05) a zkontrolujte hodnoty HEX CT.
10. Na straně analýzy klikněte na položku „**Cycling A. Green**“, aby se zobrazil kanál FAM.
11. Ověřte, zda je zvýrazněna položka „**Dynamic Tube**“ (Dynamická zkumavka). Klikněte na možnost „**Linear Scale**“ (Lineární stupnice).
12. Klikněte na položku „**Outlier Removal**“ (Odstranění zkreslení) a v poli „**NTC Threshold**“ (Prahová hodnota NTC) zadejte 10 %.
13. Nastavte prahovou hodnotu na **0.05** (0,05) a zkontrolujte hodnoty FAM CT.

## Analýza dat hodnocení alikvotu

### Analýza kontrol cyklu

Viz schematické znázornění „Analýza kontrol cyklu“ na obrázku 37.

- **Negativní kontrola:** Aby bylo jisté, že nedošlo ke kontaminaci reakční směsi, nesmí beztemplátová kontrola generovat hodnotu  $C_T$  v zeleném kanálu nižší než 40. Aby bylo zajištěno správné nastavení destičky, musí kontrola NTC zobrazovat ve žlutém kanálu amplifikaci v rozsahu 31,91–35,16. Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot.
- **Pozitivní kontrola:** Pozitivní kontrola KRAS (Positive Control, PC) musí vykazovat hodnotu  $C_T$  v rozsahu 23,5–29,5 v zeleném kanálu ve všech 8 analýzách. Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot. Hodnota mimo uvedený rozsah indikuje problém s nastavením analýzy a znamená tedy selhání cyklu.

**Poznámka:** Data alikvotu nelze použít, jestliže kterákoliv z těchto dvou kontrol cyklu selhala.

Za předpokladu, že oba výsledky kontrolních cyklů jsou platné, všechny hodnoty alikvotu  $C_T$  musejí být v rozsahu 21,92–32,00 v zeleném kanálu. Je-li alikvot mimo tento rozsah, platí následující pokyn.

### Analýza alikvotu – kontrolní analýza

- Kontrolní analýza alikvotu  $C_T$  je  $< 21,92$ : Alikvoty vykazující u kontroly hodnotu  $C_T < 21,92$  je nutno zředit. Představují dolní část validovaného rozsahu analýzy. Aby bylo možné zachytit každou mutaci při nízké úrovni, nadměrně koncentrované alikvoty musejí být ředěny tak, aby spadaly do výše uvedeného rozsahu za předpokladu, že rozředění alikvotu o polovinu zvýší hodnotu  $C_T$  o 1. Jestliže se alikvot blíží hodnotě 21,92, doporučuje se provést ředění tak, aby byl zajištěn výsledek získaný z testovacího cyklu alikvotu (detekce mutace KRAS). Alikvoty musejí být ředěny vodou dodanou v soupravě (vodou bez obsahu nukleázy k ředění [Dil.]).

- Kontrolní analýza alikvotu  $C_T$  je  $> 32$ : Doporučuje se opětovná extrakce alikvotu, protože k detekci všech mutací při stanovených mezních hodnotách pro danou analýzu nebude k dispozici dostatečné počáteční množství templátu DNA.

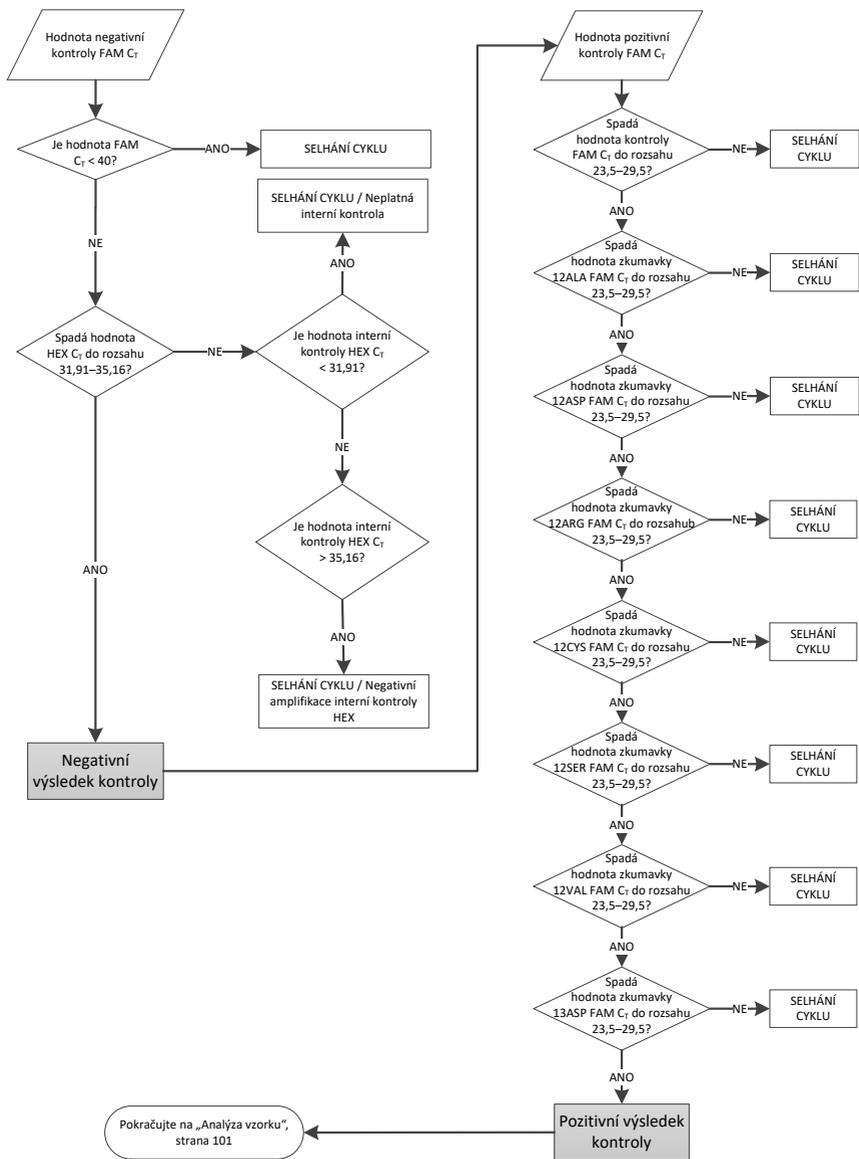
## Analýza detekce mutace KRAS

### Analýza kontrol cyklu

Viz schematické znázornění „Analýza kontrol cyklu“ (obrázek 37).

- **Negativní kontrola:** Aby bylo jisté, že nedošlo ke kontaminaci reakční směsi, nesmí beztemplátová kontrola generovat hodnotu  $C_T$  v zeleném kanálu nižší než 40. Aby bylo zajištěno správné nastavení destičky, musí kontrola NTC zobrazovat ve žlutém kanálu amplifikaci v rozsahu 31,91–35,16. Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot.
- **Pozitivní kontrola:** Pozitivní kontrola KRAS (Positive Control, PC) musí vykazovat hodnotu  $C_T$  v rozsahu 23,5–29,5 v zeleném kanálu ve všech 8 analýzách. Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot. Hodnota mimo uvedený rozsah indikuje problém s nastavením analýzy a znamená tedy selhání cyklu.

**Poznámka:** Data alikvotu nelze použít, jestliže kterákoliv z těchto 2 kontrol cyklu selhala.



Obrázek 37. Schématické znázornění kontrolní analýzy cyklu.

---

## Analýza alikvotů

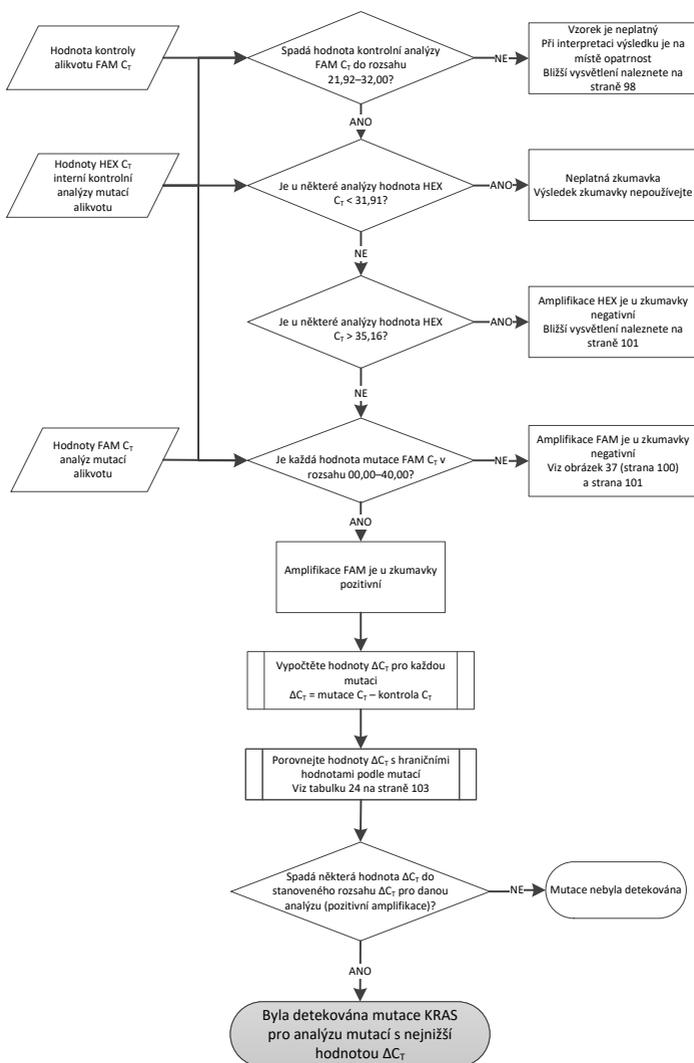
Viz schematické znázornění „Analýza alikvotů“ na obrázku 38.

### Hodnota kontroly alikvotu FAM CT

Za předpokladu, že oba výsledky kontrolních cyklů pro kontrolní analýzy jsou platné, všechny kontroly alikvotů  $C_T$  musejí být v rozsahu 21,92–32,00 v zeleném kanálu.

Je-li alikvot mimo tento rozsah, platí následující pokyn.

- **Kontrolní analýza alikvotu  $C_T$  je < 21,92:** Alikvoty vykazující u kontroly hodnotu  $C_T < 21,92$  nadměrně zatěžují analýzy mutace, a musejí se proto zředit. Aby bylo možné zachytit každou mutaci při nízké úrovni, nadměrně koncentrované alikvoty musejí být ředěny tak, aby spadaly do výše uvedeného rozsahu za předpokladu, že rozředění alikvotu o polovinu zvýší hodnotu  $C_T$  o 1. Alikvoty musejí být ředěny vodou dodanou v soupravě (vodou bez obsahu nukleázy k ředění [Dil.]).
- **Kontrolní analýza alikvotu  $C_T$  je > 32:** Výsledek interpretujte opatrně, protože mutace s nízkou hladinou nemusejí být detekovány.



Obrázek 38. Schématické znázornění analýzy alikvotů.

## Hodnota HEX CT interní kontrolní analýzy mutací alikvotu

Viz schematické znázornění „Analýza alikvotů“ na obrázku 38.

Musejí být analyzovány všechny jamky každého alikvotu. Zkontrolujte, zda každá jamka generuje signál HEX z interní kontroly. Mohou nastat 3 možné případy.

- Spadá-li hodnota  $C_T$  interní kontroly do specifikovaného rozsahu (31,91–35,16), je amplifikace HEX pozitivní.
- Je-li hodnota  $C_T$  interní kontroly vyšší než stanovený rozsah (> 35,16), je amplifikace HEX negativní.
- Je-li hodnota  $C_T$  interní kontroly nižší než stanovený rozsah (< 31,91), je neplatná.

Jestliže k selhání interní kontroly dojde v důsledku PCR inhibice, zředění alikvotu může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění cílové DNA. Souprava obsahuje zkumavku vody pro ředění alikvotů (Dil.).

## Hodnota FAM CT analýz mutací alikvotu

Hodnoty FAM všech 7 reakčních směsí je třeba zkontrolovat s využitím hodnot uvedených v tabulce 24.

**Tabulka 24. Přijatelné hodnoty reakce mutací alikvotů (FAM)\***

Analýza	Přijatelný rozsah $C_T$	Rozsah $\Delta C_T$
12ALA	0,00–40,00	≤ 8,00
12ASP	0,00–40,00	≤ 6,60
12ARG	0,00–40,00	≤ 8,00
12CYS	0,00–40,00	≤ 8,00
12SER	0,00–40,00	≤ 8,00
12VAL	0,00–40,00	≤ 7,50
13ASP	0,00–40,00	≤ 7,50

\* Přijatelné hodnoty jsou v mezích uvedených hodnot včetně mezních hodnot.

- Jestliže hodnota FAM  $C_T$  spadá do stanoveného rozsahu, je amplifikace FAM pozitivní.
- Jestliže hodnota FAM  $C_T$  uvedený rozsah přesahuje nebo nedošlo k žádné amplifikaci, je amplifikace FAM negativní.

Následujícím způsobem vypočítejte hodnotu  $\Delta C_T$  pro každou zkumavku s mutací, u níž je amplifikace FAM pozitivní. Zajistěte, aby hodnoty mutace a kontrolní hodnoty  $C_T$  pocházely ze stejného alikvotu.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutace} - C_T \text{ kontroly}$$

Porovnejte hodnotu  $\Delta C_T$  alikvotu s hraniční hodnotou pro zkoumanou analýzu (tabulka 24) a zkontrolujte, že se pro každou analýzu používá správná hraniční hodnota analýzy.

Hraniční hodnota je bod, nad kterým může docházet k pozitivnímu signálu v důsledku signálu pozadí primeru ARMS na DNA divokého typu. Je-li hodnota  $\Delta C_T$  alikvotu vyšší než hraniční hodnota, vyhodnotí se jako negativní nebo ležící pod detekčními limity soupravy.

Pro všechny alikvoty musí být na základě následujících kritérií každá reakce mutace vyhodnocena jako detekovaná mutace, nedetekovaná mutace nebo neplatná.

Detekovaná mutace:

- Pozitivní amplifikace FAM a hodnota  $\Delta C_T$  odpovídají mezní hodnotě nebo jsou nižší. V případě detekce více mutací by měla být vykázána mutace s nejnižší hodnotou  $\Delta C_T$ .

Mutace nebyla detekována:

- Pozitivní amplifikace FAM a hodnota  $\Delta C_T$  jsou nad mezní hodnotou.
- Amplifikace FAM je negativní a amplifikace HEX (interní kontrola) je pozitivní.

Neplatné:

- HEX (interní kontrola) je neplatná.
- Amplifikace FAM je negativní a amplifikace HEX je negativní.

Pokud má alikvot ve zkumavce negativní amplifikaci HEX, ale amplifikace FAM je v jiné zkumavce pozitivní, lze stále považovat výsledek „detekovaná mutace“ za platný, ale konkrétní identifikovaná mutace nemusí být spolehlivě přiřazena.

- Má-li alikvot negativní výsledek amplifikace HEX a amplifikace FAM je ve stejné zkumavce pozitivní, měl by být považován za platný výsledek „detekovaná mutace“.
- Pokud je (interní kontrola) HEX neplatná, nesmí se výsledek příslušné zkumavky použít.

## Přiřazování stavu mutace alikvotu

Po vyhodnocení všech reakčních zkumavek se následujícím způsobem určí stav mutace alikvotu.

- **Detekovaná mutace:** Jedna nebo více ze 7 reakcí mutace je pozitivní. V případě detekce více mutací by měla být vykázána mutace s nejnižší hodnotou  $\Delta C_T$ .
- **Mutace nebyla detekována:** Všechny 7 reakcí mutace je negativních.
- **Neplatné:** Žádná z reakcí mutací není pozitivní a jedna či více reakcí mutací je neplatných.

**Poznámka:** Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je určena k detekci mutací genu KRAS v alikvotu DNA. Když je u alikvotu detekována mutace KRAS, měla by se vykazovat pouze jedna specifická mutace. V případě detekce více mutací by měla být vykázána mutace s nejnižší hodnotou  $\Delta C_T$ .

Mezi reakcemi detekce mutací může docházet k určitým zkříženým reakcím. Pokud je například pozorována vysoká hladina mutace 12ALA, mohou vykazovat pozitivní výsledek i některé z jiných typů mutací. To je důsledkem skutečnosti, že primery ARMS detekují jiné mutace podobné sekvence. Pokud druhá analýza mutace dává pozitivní výsledek, jedná se patrně o zkříženou reaktivitu. Byly pozorovány i dvojité mutace, jedná se však o vzácný jev.

Jestliže je jedna nebo několik reakcí mutací neplatných, ale jedna nebo více je pozitivních, lze alikvot stále považovat za detekovanou mutaci KRAS, protože je přítomna mutace. Specifická ohlášená mutace však nemusí být přesná a může být výsledkem zkřížené reaktivity. Proto je třeba daný alikvot označovat pouze jako alikvot s detekovanou mutací KRAS.

## Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit je navržena pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM s rotorem se 72 jamkami. Software *therascreen* KRAS Assay Package je k dispozici samostatně na CD (kat. č. 9022641).

Software *therascreen* KRAS Assay Package lze stáhnout na příslušných webových stránkách výrobku *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Informace ke stažení lze najít v části „Product Resources“ (Zdroje týkající se výrobků) pod záložkou „Supplementary Protocols“ (Dodatečné protokoly). Software balíčků analýz lze také objednat na CD.

Softwarový balíček obsahuje „*therascreen* KRAS CE QC Locked Template“ a „*therascreen* KRAS CE Locked Template“.

**Poznámka:** Balíček *therascreen* KRAS Assay Package verze 3.1.1 (QIAGEN, kat. č. 9023675) bude fungovat pouze s odpovídající verzí 2.3 softwaru Rotor-Gene Q. Ujistěte se, že máte nainstalovanou správnou verzi softwaru Rotor-Gene Q, než začnete instalovat software *therascreen* KRAS Assay Package.

### Postup (stahování)

1. Software *therascreen* KRAS RGQ Assay Package stáhněte na příslušných webových stránkách výrobku *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Stažený zip soubor otevřete dvojitým kliknutím na soubor a vyjměte soubory z archívu.
3. Instalaci zahájíte dvojitým kliknutím na soubor „*therascreen*\_KRAS\_Assay\_Package\_3.1.1.exe“.

## Postup (CD)

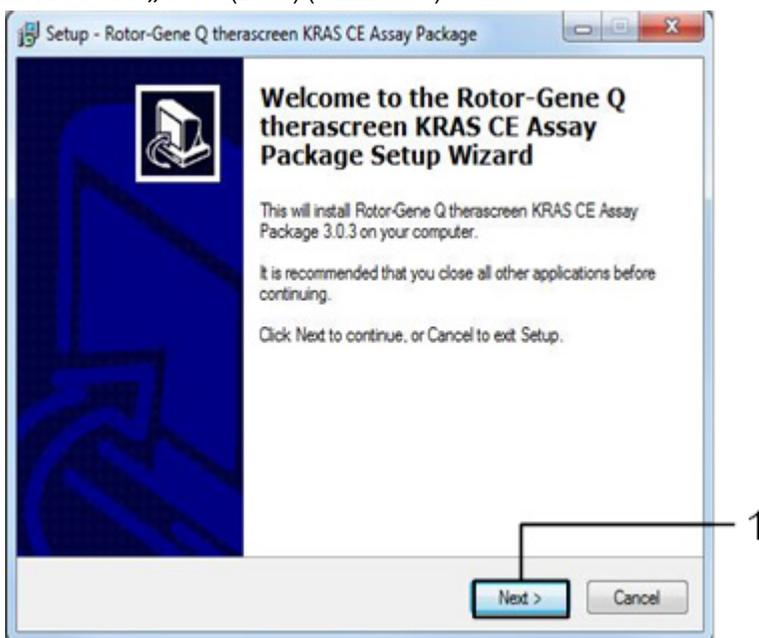
1. Objednejte si CD *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE kompatibilní s nainstalovaným softwarem Rotor-Gene Q (viz výše) je dostupné zvláště od společnosti QIAGEN.

Verze 3.1.1. Kat. č. 9023675.

2. Vložte CD do CD mechaniky notebooku připojeného k přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Dvojitým kliknutím na soubor „*therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.1.1.exe*“ nebo „*therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_1.0.12.exe*“ zahájíte instalaci.

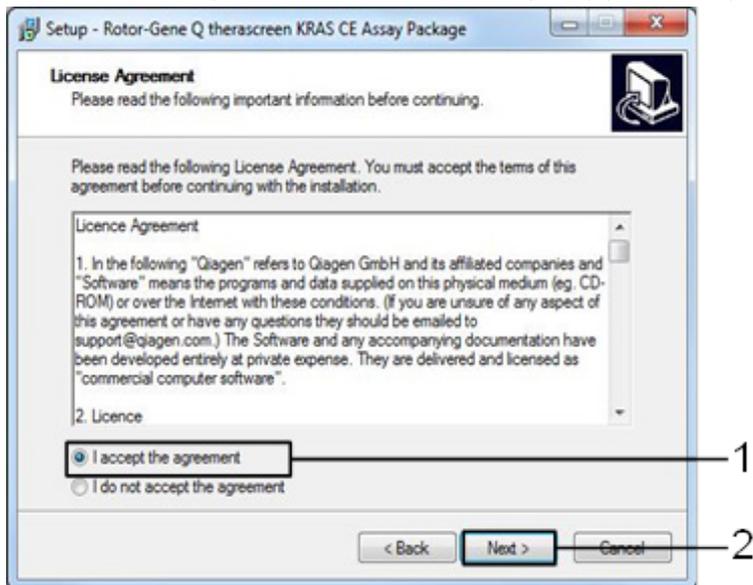
Zobrazí se průvodce instalací.

4. Klikněte na tlačítko „**Next**“ (Další) (obrázek 39).



Obrázek 39. Dialogové okno „Setup“ (Instalace). 1 = „Next“ (Další).

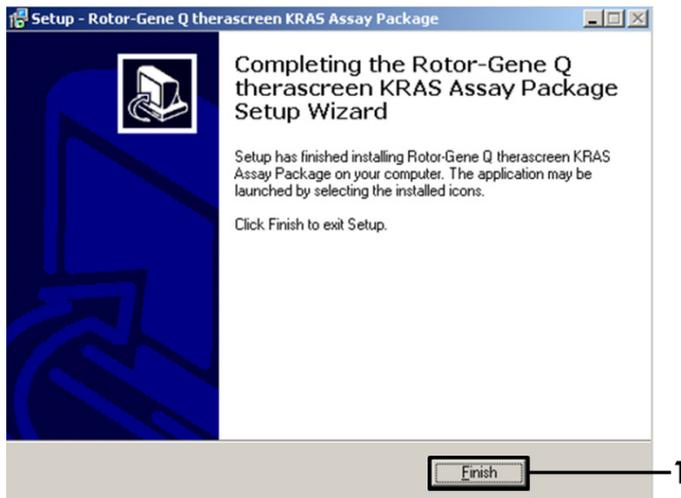
5. Přečtěte si licenční ujednání v dialogovém okně „License Agreement“ (Licenční ujednání) a zaškrtněte políčko u vyjádření „**I accept the agreement**“ (Přijímám podmínky tohoto ujednání). Klikněte na tlačítko „**Next**“ (Další) (obrázek 40).



**Obrázek 40.** Dialogové okno „License Agreement“ (Licenční ujednání). 1 = vyjádření „I accept the agreement“ (Přijímám podmínky tohoto ujednání); 2 = „Next“ (Další).

Instalace šablony se spustí automaticky.

6. V konečném okně Setup (Nastavení) klikněte na tlačítko „**Finish**“ (Dokončit) a průvodce ukončete (obrázek 41).



Obrázek 41. Dokončení průvodce.

7. Restartujte počítač. Zástupci k šabloně „thetascreen KRAS QC Locked Template“ (Uzavřená šablona thetascreen KRAS QC) i „thetascreen KRAS Locked Template“ (Uzavřená šablona thetascreen KRAS) budou vytvořeny automaticky a objeví se na pracovní ploše.

# Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: 1 kontrolní analýza, 7 analýz mutací, pozitivní kontrola, voda, <i>Taq</i> DNA polymeráza	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1)	Softwarový balíček protokolu pro použití se soupravou <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit a přístrojem QIAGEN Rotor-Gene Q Mdx 5plex HRM s rotorem se 72 jamkami	9023675
<b>Rotor-Gene Q a příslušenství</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Cykler pro real-time PCR a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Cykler pro real-time PCR a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení	9002033

Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok pro ruční nastavení reakce pomocí jednonanálové pipety s využitím zkumavek 72x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s uzávěry, pro 1 000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10× 250 stripů po 4 zkumavkách a víčka na 10 000 reakcí	981106
Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – pro čištění genomové DNA z tkání zalitých v parafínu		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pro přípravu 50 vzorků DNA: Kolonky QIAamp MinElute®, proteináza K, pufry a zkumavky Collection Tubes (2 ml)	56404

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo uživatelské příručce. Příručky k sadám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

# Historie revizí dokumentu

<b>Datum</b>	<b>Změny</b>
R4, leden 2019	Doplnění autorizovaného zástupce (titulní strana) Aktualizace části „Symboly“ Aktualizace templátu
R5, listopad 2019	Změna zákonného výrobce (titulní strana) Odstraněn symbol EC + REP z titulní strany a z části „Symboly“ Přizpůsobení názvu přístroje z Rotor-Gene Q MDx na Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tak, aby odpovídal názvu uvedenému na štítku přístroje. Aktualizován protokol Detekce mutací KRAS tak, aby zahrnoval další krok při přípravě master mixů Opravené hodnoty ve sloupcích Frequency (Frekvence) a 95% interval spolehlivosti v tabulce 9. Aktualizováno procento celkové míry shody CRC z 96,4 % na 96,82 % Opravené hodnoty ve sloupci LOD C <sub>95</sub> v tabulce 14

---

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

---

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Omezená licenční smlouva pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění komponent, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv komponenty, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsaných v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato souprava a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmějí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této soupravy souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakékoliv shora zakázané činnosti anebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou a/nebo jejími komponentami.

Aktualizované licenční podmínky viz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmějí být považovány za nechráněné zákonem.

*Není určeno k použití s alkalivými stolice.*

*Není určeno k použití s alkalivými moči.*

*Není určeno k použití s alkalivými extracelulární nukleové kyseliny z alkalivých krve.*

*Není určeno k použití s alkalivými kostní dřeně bez obsahu buněk.*

*Není určeno k použití s alkalivými slin.*

ZAKOUPENÍM TOHOTO PRODUKTU JE KUPUJÍCÍ OPRÁVNĚN NA ZÁKLADĚ KONKRÉTNÍCH PATENTŮ SPOLEČNOSTI ROCHE TENTO PRODUKT POUŽÍVAT VÝHRADNĚ K VÝKONU DIAGNOSTICKÝCH ÚKONŮ SPOJENÝCH S LIDSKOU DIAGNOSTIKOU IN VITRO. TÍMTO SE NEUDĚLUJE ŽÁDNÝ VŠEOBECNÝ PATENT ANI LICENCE JAKÉKOLI POKRYVÁ, KROMĚ PRAVA POUŽÍVAT TENTO VÝROBEK, KTERÉ JE DÁNO JEHO NÁKUPEM.

1119793 HB-1861-005 11-2019 © 2019 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

---

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)