

Νοέμβριος 2019

Οδηγίες χρήσης (Εγχειρίδιο) *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit



Έκδοση 1



Ποιοτική in vitro διαγνωστική εξέταση

Για χρήση με το Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ



1119793EL

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| QIAGEN Sample and Assay Technologies | 5 |
| Προβλεπόμενη χρήση | 6 |
| Σύνοψη και επεξήγηση | 7 |
| Αρχή της διαδικασίας..... | 9 |
| Υλικά που παρέχονται | 13 |
| Περιεχόμενα του κιτ..... | 13 |
| Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται | 14 |
| Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις..... | 16 |
| Πληροφορίες ασφάλειας..... | 16 |
| Γενικές προφυλάξεις..... | 16 |
| Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων | 18 |
| Συλλογή δοκιμίων, προετοιμασία για ανάλυση και αποθήκευση | 19 |
| Διαδικασία | 22 |
| Εκχύλιση DNA..... | 22 |
| Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων DNA..... | 24 |
| Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS | 37 |
| Ερμηνεία αποτελεσμάτων | 49 |
| Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων..... | 51 |
| Ενδείξεις που δημιουργούνται από το λογισμικό <i>therascreen</i> KRAS Assay Package | 52 |
| Ποιοτικός έλεγχος..... | 56 |
| Περιορισμοί | 56 |
| Χαρακτηριστικά απόδοσης..... | 58 |

| | |
|--|-----|
| Αναλυτικά στοιχεία απόδοσης..... | 58 |
| Οριακή τιμή αποκοπής..... | 58 |
| Όριο τυφλού..... | 59 |
| Σύγκριση προς την αναλυτική μέθοδο αναφοράς: CRC..... | 59 |
| Σύγκριση προς την αναλυτική μέθοδο αναφοράς: NSCLC..... | 62 |
| Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)..... | 64 |
| Εισαγόμενο DNA και γραμμικότητα..... | 66 |
| Παρεμβαλλόμενες ουσίες..... | 70 |
| Διασταυρούμενη επιμόλυνση..... | 71 |
| Αποκλειστικότητα/διασταυρούμενη αντιδραστικότητα..... | 72 |
| Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα..... | 75 |
| Διαφοροποίηση χειρισμού δειγμάτων..... | 77 |
| Ισοδυναμία μεθόδων δειγματοληψίας (NSCLC μόνο)..... | 79 |
| Βιβλιογραφία..... | 80 |
| Σύμβολα..... | 83 |
| Στοιχεία επικοινωνίας..... | 84 |
| Παράρτημα 1: Μη αυτόματο πρωτόκολλο <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit..... | 85 |
| Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Μη αυτόματη μέθοδος)..... | 104 |
| Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης..... | 104 |
| Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων..... | 105 |
| Ανάλυση δειγμάτων..... | 108 |
| Παράρτημα 2: Εγκατάσταση του λογισμικού <i>therascreen</i> KRAS Assay Package..... | 114 |
| Πληροφορίες παραγγελίας..... | 118 |
| Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου..... | 120 |

QIAGEN Sample and Assay Technologies

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμών για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων οποιουδήποτε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και της επίτευξης καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφτείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com.

Προβλεπόμενη χρήση

Το *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit είναι ένας ποιοτικός προσδιορισμός real-time PCR για την ανίχνευση 7 σωματικών μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 του ανθρώπινου ογκογονιδίου KRAS με χρήση του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Το kit προορίζεται για χρήση με DNA που έχει εκχυλιστεί από μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE) ιστό από δείγματα όγκου ορθοκολικού καρκίνου (Colorectal Cancer, CRC) ή δείγματα όγκου μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), ληφθέντα με εκτομή, βιοψία με κόππουσα βελόνη (Core Needle Biopsy, CNB) ή αναρρόφηση με λεπτή βελόνη (Fine Needle Aspiration, FNA).

Οι σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS είναι πιθανοί προβλεπτικοί βιολογικοί δείκτες της αντοχής σε θεραπείες που στρέφονται κατά του ανθρώπινου υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), όπως η πανιτουμουμάμπη και η κετουξιμάμπη, για τη θεραπεία του CRC. Οι σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS ενδεχομένως ενδείκνυνται και για χρήση ως πιθανοί προβλεπτικοί βιολογικοί δείκτες κατά τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων για ορισμένες θεραπευτικές αγωγές κατά του NSCLC.

Η κατάσταση μετάλλαξης του ασθενή θα πρέπει να αξιολογείται από έναν κλινικό ιατρό, σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες νόσου, για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία. Οι αποφάσεις για καρκινοπαθείς ασθενείς δεν θα πρέπει να βασίζονται αποκλειστικά στην κατάσταση μετάλλαξης του KRAS.

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit δεν προορίζεται για τη διάγνωση του CRC, του NSCLC ή οποιασδήποτε άλλης νόσου.

Σύνοψη και επεξήγηση

Οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS απαντώνται συχνά σε καρκίνους στον άνθρωπο (1–4). Με τον συνδυασμό των τεχνολογιών Scorpions® και ARMS® (Allele Refractory Mutation System – Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση) (5, 6), το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει 7 μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του ογκογονιδίου KRAS, έναντι ενός υποβάθρου γενωμικού DNA άγριου τύπου (wild-type) (Πίνακας 1). Βάσει των δεδομένων που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων COSMIC (2015 v72), οι 7 μεταλλάξεις που ανιχνεύονται με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit αποτελούν > 95% του συνόλου των μεταλλάξεων KRAS που έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με CRC και > 88% του συνόλου των μεταλλάξεων που έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με NSCLC (7).

Πίνακας 1. Κατάλογος μεταλλάξεων και αναγνωριστικά COSMIC

| Μετάλλαξη | Αλλαγή βάσης | 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 |

* Τα αναγνωριστικά COSMIC ID προέρχονται από τον κατάλογο σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο – *Catalog of Somatic Mutations in Cancer* (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Η δοκιμασία υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας επιτρέπει την ανίχνευση χαμηλού ποσοστού μεταλλαγμένου DNA έναντι υποβάθρου DNA άγριου τύπου. Υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχουν επαρκή αντίγραφα DNA, είναι δυνατή η ανίχνευση μετάλλαξης 0,8% σε υπόβαθρο γενωμικού DNA άγριου τύπου (για πληροφορίες σχετικά με το όριο ανίχνευσης για κάθε μετάλλαξη, βλ. «Χαρακτηριστικά απόδοσης», σελίδα 58).

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit χρησιμοποιείται σε μια διαδικασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Το πλεονέκτημα αυτού του kit είναι η υψηλή ειδικότητά του ως προς τον στόχο, καθώς και η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητά του χωρίς περιθώρια υποκειμενικότητας κατά τον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων.

Αρχή της διαδικασίας

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit χρησιμοποιεί 2 τεχνολογίες — ARMS και Scorpions — για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αντιδράσεις real-time PCR.

Μείγματα αντίδρασης μετάλλαξης

Σε κάθε μείγμα αντίδρασης χρησιμοποιείται ειδικός για τη μετάλλαξη εκκινητής ARMS για την επιλεκτική ενίσχυση του μεταλλαγμένου DNA και, στη συνέχεια, ένας εκκινητής Scorpions για την ανίχνευση του προϊόντος ενίσχυσης.

ARMS

Η ειδική για αλληλόμορφα ενίσχυση επιτυγχάνεται με την τεχνολογία ARMS, κατά την οποία αξιοποιείται η ικανότητα της *Taq* DNA πολυμεράσης να διαχωρίζει τη σωστή και την εσφαλμένη αντιστοίχιση βάσης στο 3' άκρο του εκκινητή PCR. Όταν υπάρχει πλήρης αντιστοίχιση του εκκινητή, η απόδοση της ενίσχυσης είναι πλήρης. Σε περίπτωση εσφαλμένης αντιστοίχισης της 3' βάσης, είναι δυνατή μόνο η ενίσχυση υποβάθρου χαμηλού επιπέδου. Επομένως, μια μεταλλαγμένη αλληλουχία υποβάλλεται σε επιλεκτική ενίσχυση ακόμη και σε δείγματα στα οποία το μεγαλύτερο μέρος του DNA δεν παρουσιάζει μετάλλαξη.

Scorpions

Η ανίχνευση ενίσχυσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Scorpions. Η τεχνολογία Scorpions συνίσταται σε διλειτουργικά μόρια που περιέχουν έναν εκκινητή PCR ομοιοπολικά συνδεδεμένο με έναν ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής περιλαμβάνει τη φθορισμοφόρο καρβοξυφλουορεσκεΐνη (FAM™) και έναν παρεμποδιστή. Ο τελευταίος παρεμποδίζει τον φθορισμό του φθορισμοφόρου. Όταν ο ανιχνευτής δεσμεύεται στο αμπλικόνιο ARMS κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, το φθορισμοφόρο και ο παρεμποδιστής διαχωρίζονται, προκαλώντας ανιχνεύσιμη αύξηση του φθορισμού.

Μορφή κιτ

Στο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit περιέχονται 8 προσδιορισμοί:

- 1 προσδιορισμός μάρτυρα [Control Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης μάρτυρα, CTRL)]
- 7 προσδιορισμοί μετάλλαξης (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Τα μείγματα αντίδρασης παρέχονται εις διπλούν και διαθέτουν αντιδραστήρια επισημασμένα με FAM για την ανίχνευση στόχων, καθώς και έναν εσωτερικό μάρτυρα επισημασμένο με HEX™. Τα μείγματα αντίδρασης και τα αντιδραστήρια θετικού μάρτυρα περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα Tris EDTA και ο θετικός μάρτυρας περιέχει τον φορέα Poly A RNA.

Προσδιορισμοί

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit περιλαμβάνει μια διαδικασία δύο βημάτων. Στο πρώτο βήμα, εκτελείται ο προσδιορισμός μάρτυρα για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου KRAS DNA ενός δείγματος. Στο δεύτερο βήμα, εκτελούνται τόσο ο προσδιορισμός μετάλλαξης όσο και ο προσδιορισμός μάρτυρα για ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας μεταλλαγμένου DNA.

Αντίδραση μάρτυρα

Στο CTRL χρησιμοποιείται ένας εκκινητής Scorpions και ένας μη επισημασμένος εκκινητής για την ενίσχυση μιας μικρής αλληλουχίας του εξονίου 4 του γονιδίου KRAS. Η αντίδραση μάρτυρα χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί εάν υπάρχει κατάλληλο επίπεδο ενισχύσιμου DNA στο δείγμα και αποτελεί παράγοντα που χρησιμοποιείται στους αναλυτικούς υπολογισμούς που συμβάλλουν στον προσδιορισμό της κατάστασης της μετάλλαξης.

Προσδιορισμός μάρτυρα

Ο προσδιορισμός μάρτυρα, που είναι επισημασμένος με FAM, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου KRAS DNA σε ένα δείγμα. Ο προσδιορισμός μάρτυρα ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 4 του γονιδίου KRAS. Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής Scorpions είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η ενίσχυση ανεξάρτητα από την ύπαρξη τυχόν γνωστών πολυμορφισμών του KRAS.

Προσδιορισμοί μετάλλαξης

Κάθε προσδιορισμός μετάλλαξης περιέχει έναν ανιχνευτή Scorpions επισημασμένο με FAM και έναν εκκινητή ARMS, για τη διάκριση μεταξύ του DNA άγριου τύπου (wild type) και ενός συγκεκριμένου μεταλλαγμένου DNA.

Μάρτυρες

Σημείωση: Όλες οι εκτελέσεις πειραμάτων πρέπει να περιέχουν θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες.

Εσωτερικός μάρτυρας

Κάθε μείγμα αντίδρασης περιέχει έναν εσωτερικό μάρτυρα επιπλέον της αντίδρασης-στόχου. Η μη επιτυχής έκβαση υποδεικνύει είτε την ύπαρξη αναστολέων, που ενδέχεται να οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα, είτε την ύπαρξη σφάλματος ρύθμισης από τον χειριστή για το συγκεκριμένο σωληνάριο. Σε περίπτωση που η μη επιτυχής εξέταση του εσωτερικού μάρτυρα οφείλεται σε αναστολή της PCR, η αραίωση του δείγματος μπορεί να μειώσει τη δράση των αναστολέων. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτή αραιώνεται και το DNA-στόχος. Μαζί με το kit παρέχεται και ένα σωληνάριο νερού για αραίωση δειγμάτων (Dil.). Η αραίωση δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται με χρήση του νερού για αραίωση δειγμάτων (Dil.).

Θετικός μάρτυρας

Κάθε εκτέλεση πρέπει να περιέχει θετικό μάρτυρα στα σωληνάρια 1–5. Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit περιέχει έναν θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC) KRAS για χρήση ως μήτρα στην αντίδραση θετικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα θετικού μάρτυρα θα αξιολογηθούν, για να διασφαλιστεί ότι η απόδοση του kit βρίσκεται εντός των καθορισμένων κριτηρίων αποδοχής.

Αρνητικός μάρτυρας

Κάθε εκτέλεση πρέπει να περιέχει αρνητικό μάρτυρα (χωρίς μήτρα) στα σωληνάρια 9–13. Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit περιέχει νερό για NTC (No Template Control, NTC) για χρήση ως «μήτρα» στην αντίδραση μάρτυρα χωρίς μήτρα. Ο μάρτυρας χωρίς μήτρα χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση πιθανής επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία της εκτέλεσης και για την αξιολόγηση της απόδοσης της αντίδρασης εσωτερικού μάρτυρα.

Αξιολόγηση δειγμάτων

Το μείγμα αντίδρασης μάρτυρα (CTRL) που παρέχεται με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου KRAS DNA σε ένα δείγμα. Ο προσδιορισμός μάρτυρα ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 4 του γονιδίου KRAS. Συνιστάται να προετοιμάζετε τα δείγματα μόνο με τον προσδιορισμό μάρτυρα, χρησιμοποιώντας τον θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC) KRAS ως θετικό μάρτυρα και το νερό για NTC ως μάρτυρα χωρίς μήτρα.

Πλατφόρμα και λογισμικό

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έχει σχεδιαστεί ειδικά για χρήση με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Το λογισμικό Rotor-Gene Q και το *therascreen* KRAS Assay Package διατίθενται για λήψη από το web ή ξεχωριστά σε CD.

Τα όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM πρέπει να συντηρούνται σύμφωνα με τις απαιτήσεις που περιγράφονται στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου. Για πληροφορίες σχετικά με το όργανο, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου.

Βλ. Παράρτημα 2: Εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* KRAS Assay Package για πληροφορίες εγκατάστασης.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του kit

| therascreen KRAS RGQ PCR Kit | | | | |
|--|---|-------------------------------|-------|---------------|
| Αρ. καταλόγου | | Ταυτοποίηση σωληναρίου | | (24) |
| Αριθμός παρασκευών | | | | 874011 |
| Χρώμα | Αναγνωριστικό | | | 24 |
| | | | | Όγκος |
| Κόκκινο | Control Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης μάρτυρα) | 1 | CTRL | 2 x 600 μl |
| Πορφυρό | 12ALA Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης 12ALA) | 2 | 12ALA | 600 μl |
| Πορτοκαλί | 12ASP Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης 12ASP) | 3 | 12ASP | 600 μl |
| Ροζ | 12ARG Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης 12ARG) | 4 | 12ARG | 600 μl |
| Πράσινο | 12CYS Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης 12CYS) | 5 | 12CYS | 600 μl |
| Κίτρινο | 12SER Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης 12SER) | 6 | 12SER | 600 μl |
| Γκρι | 12VAL Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης 12VAL) | 7 | 12VAL | 600 μl |
| Μπλε | 13ASP Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης 13ASP) | 8 | 13ASP | 600 μl |
| Μπεζ | KRAS Positive Control (Θετικός μάρτυρας KRAS) | 9 | PC | 250 μl |
| Πράσινο της μέντας | Taq DNA Polymerase (Taq DNA πολυμεράση) | | Taq | 80 μl |
| Λευκό | Water for NTC [Νερό για μάρτυρα χωρίς μήτρα (NTC)] | | NTC | 1,9 ml |
| Λευκό | Water for Sample Dilution (Νερό για Αραίωση δειγμάτων) | | Dil. | 1,9 ml |
| Εγχειρίδιο <i>therascreen KRAS RGQ PCR Kit</i> (στα αγγλικά) | | | | 1 |

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheet, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (αρ. κατ. 56404, βλ. Εκχύλιση DNA)
- Ξυλόλιο
- Αιθανόλη (96–100%)*

Αναλώσιμα

- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας με φίλτρα (για την αποφυγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης, συνιστάται η χρήση ρυγχών πιπέτας με φραγή αερολυμάτων)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια μικροφυγόκεντρου για την προετοιμασία κύριων μειγμάτων
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, για χρήση σε 72-well rotor (αρ. κατ. 981103 ή 981106)

Εξοπλισμός

- Όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με κανάλια φθορισμού για Cycling Green και Cycling Yellow (ανίχνευση FAM και HEX, αντίστοιχα)
- Λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3 με το KRAS Assay Package (έκδοση 3.1.1) εγκατεστημένο για αυτοματοποιημένη ανίχνευση μεταλλάξεων (βλ. Παράρτημα 2: Εγκατάσταση του λογισμικού theascreen KRAS Assay Package).

* Μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη, η οποία περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλκετόνη.

Σημείωση: Το λογισμικό Rotor-Gene Q μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς το KRAS Assay Package για μη αυτόματη ανίχνευση μεταλλάξεων. Βλ. Παράρτημα 1: Μη αυτόματο πρωτόκολλο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- Συσκευή θέρμανσης και ανακίνησης (thermomixer)*, θερμαινόμενος επωαστήρας τροχιακής κίνησης, θερμαντικό μπλοκ ή λουτρό νερού με δυνατότητα επώασης σε θερμοκρασία 56°C και 90°C
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος† με ρότορα για σωληνάρια 1,5 ml
- Επιτραπέζιος αναδευτήρας†
- Ειδικές πιπέτες (ρυθμιζόμενες) για προετοιμασία δειγμάτων†
- Ειδικές πιπέτες (ρυθμιζόμενες) για την προετοιμασία του κύριου μείγματος PCR*
- Ειδικές πιπέτες (ρυθμιζόμενες) για τη διοχέτευση της μήτρας DNA*

* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

† Μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη, η οποία περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλκετόνη.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheet, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε κιτ της QIAGEN, καθώς και για τα εξαρτήματά του.

Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει να λαμβάνει πάντοτε υπόψη του τα εξής:

- Αποθηκεύετε και εξάγετε τα θετικά υλικά (δοκίμια και θετικούς μάρτυρες) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.
- Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή της επιμόλυνσης των αντιδράσεων PCR με συνθετικό υλικό μάρτυρα. Συνιστάται η χρήση ξεχωριστών, ειδικών πιπेटών για την προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης και την προσθήκη της μήτρας DNA. Η προετοιμασία και η διοχέτευση των μειγμάτων αντίδρασης πρέπει να πραγματοποιείται σε ξεχωριστό χώρο από εκείνον στον οποίο πραγματοποιήθηκε η προσθήκη της μήτρας. Τα σωληνάρια Rotor-Gene Q δεν πρέπει να ανοίγονται μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης PCR. Αυτό αποσκοπεί στην αποτροπή τυχόν εργαστηριακής επιμόλυνσης από προϊόντα που προκύπτουν μετά τον προσδιορισμό PCR.
- Τα αντιδραστήρια για το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έχουν αραιωθεί σε βέλτιστο βαθμό. Δεν συνιστάται περαιτέρω αραιώση των αντιδραστηρίων, καθώς κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης. Δεν συνιστάται η χρήση όγκων

αντίδρασης κάτω από 25 μl, καθώς στην περίπτωση αυτή αυξάνεται ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

- Όλα τα αντιδραστήρια του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έχουν παρασκευαστεί ειδικά για την επίτευξη βέλτιστης απόδοσης. Όλα τα αντιδραστήρια που παρέχονται στο kit προορίζονται για χρήση αποκλειστικά με τα άλλα αντιδραστήρια που παρέχονται στο ίδιο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Τα αντιδραστήρια του kit δεν πρέπει να αντικαθίστανται, προκειμένου να διατηρηθεί η βέλτιστη απόδοση.
- Χρησιμοποιείτε μόνο την *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) που παρέχεται με το kit. Μην την αντικαθιστάτε με *Taq* DNA πολυμεράση άλλων kit ίδιου ή διαφορετικού τύπου ή με *Taq* DNA πολυμεράση άλλου προμηθευτή.

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit αποστέλλεται σε ξηρό πάγο. Εάν οποιοδήποτε συστατικό του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit δεν είναι κατεψυγμένο κατά την παραλαβή, η εξωτερική συσκευασία έχει ανοίξει κατά τη μεταφορά ή στο κιβώτιο αποστολής δεν περιλαμβάνονται το δελτίο συσκευασίας, το εγχειρίδιο ή τα αντιδραστήρια, επικοινωνήστε με κάποιο από τα τμήματα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (ανατρέξτε στο οπισθόφυλλο ή επισκεφτείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit θα πρέπει να αποθηκεύεται αμέσως μετά την παραλαβή σε θερμοκρασία -30 έως -15°C σε καταψύκτη σταθερής θερμοκρασίας, σε σκοτεινό χώρο. Όπως ισχύει για όλα τα επισημασμένα με φθορισμό μόρια, τα Scorpiions πρέπει να προστατεύονται από το φως, ώστε να αποφευχθεί η φωτολεύκανση και η υποβάθμιση των επιδόσεων.

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit παραμένει σταθερό μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης, εφόσον αποθηκεύεται υπό τις συνιστώμενες συνθήκες αποθήκευσης στην αρχική συσκευασία. Η επανειλημμένη απόψυξη και κατάψυξη θα πρέπει να αποφεύγεται. Μην υπερβαίνετε το μέγιστο όριο 6 κύκλων κατάψυξης-απόψυξης.

Συλλογή δοκιμίων, προετοιμασία για ανάλυση και αποθήκευση

Σημείωση: Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.

Το υλικό δείγματος πρέπει να είναι γενωμικό DNA ανθρώπινης προέλευσης, που έχει εκχυλιστεί από ιστό FFPE. Η μεταφορά των δοκιμίων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την τυπική μεθοδολογία της παθολογοανατομίας, για τη διασφάλιση της ποιότητάς τους.

Τα νεοπλασματικά δείγματα είναι ετερογενή και τα δεδομένα από ένα δείγμα νεοπλασίας ενδέχεται να μη συμφωνούν με άλλες τομές της ίδιας νεοπλασίας. Επίσης, τα νεοπλασματικά δείγματα ενδέχεται να περιέχουν μη νεοπλασματικό ιστό. Το DNA από μη νεοπλασματικό ιστό δεν αναμένεται να περιέχει τις μεταλλάξεις που ανιχνεύονται από το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Προετοιμασία δειγμάτων ιστού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε στεγνά νυστέρια. Μην εκτελείτε αυτό το βήμα σε θάλαμο νηματικής ροής ή απαγωγό εστία.

- Απομακρύνετε με απόξεση τον νεοπλασματικό ιστό από τις τομές και μεταφέρετέ τον σε επισημασμένα σωληνάρια μικροφυγόκεντρου, χρησιμοποιώντας καινούριο νυστέρι για κάθε δείγμα.

Προετοιμασία δειγμάτων ιστού για εκχύλιση DNA (CRC)

- Χρησιμοποιώντας τα τυπικά υλικά και μεθόδους, μονιμοποιήστε το δοκίμιο ιστού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης (Neutral Buffered Formalin, NBF) 10% και συνεχίστε με τον εγκλεισμό του δοκιμίου ιστού σε παραφίνη. Με τη χρήση μικροτόμου, δημιουργήστε διαδοχικές τομές 5 μm από το μπλοκ παραφίνης και τοποθετήστε τις σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες.

- Η αξιολόγηση μιας τομής με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε νεοπλασματικό ιστό και του εμβαδού πρέπει να γίνεται από εκπαιδευμένο άτομο (π.χ. παθολογοανατόμο). Επισημάνετε τη χρωματισμένη αντικειμενοφόρο πλάκα για να διαχωρίσετε τον νεοπλασματικό από τον φυσιολογικό ιστό. Χρησιμοποιήστε διαδοχικές τομές για την εκχύλιση DNA.
- Χρησιμοποιήστε τομές με περιεκτικότητα σε νεοπλασματικό ιστό > 20% κατά εμβαδόν για επεξεργασία χωρίς μακροεκτομή (βλ. παρακάτω).
- Για τομές με περιεκτικότητα σε νεοπλασματικό ιστό < 20% κατά εμβαδόν, απαιτείται μακροεκτομή μίας ή περισσότερων τομών. Απορρίψτε τον μη νεοπλασματικό ιστό.
- Για τομές εμβαδού < 4 mm², υποβάλετε δύο ή περισσότερες τομές σε επεξεργασία για να αυξήσετε το συνολικό εμβαδόν της νεοπλασματικής περιοχής τουλάχιστον στα 4 mm² (ισχύει για δείγματα με ή χωρίς μακροεκτομή). Απορρίψτε τον μη νεοπλασματικό ιστό.
- Απομακρύνετε με απόξεση την περίσσεια παραφίνης από τον ιστό χρησιμοποιώντας ένα καινούριο, αποστειρωμένο νυστέρι.

Προετοιμασία δειγμάτων ιστού για εκχύλιση DNA (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC, NSCLC)

- Χρησιμοποιώντας τα τυπικά υλικά και μεθόδους, μονιμοποιήστε το δοκίμιο ιστού σε NBF 10% και συνεχίστε με τον εγκλεισμό του δοκιμίου ιστού σε παραφίνη. Με τη χρήση μικροτόμου, δημιουργήστε διαδοχικές τομές 5 μm από το μπλοκ παραφίνης και τοποθετήστε τις σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Η αξιολόγηση μιας τομής με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E) για τον προσδιορισμό της παρουσίας όγκου πρέπει να γίνεται από εκπαιδευμένο άτομο (π.χ. παθολογοανατόμο). Χρησιμοποιήστε διαδοχικές τομές για την εκχύλιση DNA.
- Απομακρύνετε με απόξεση την περίσσεια παραφίνης από τον ιστό χρησιμοποιώντας ένα καινούριο, αποστειρωμένο νυστέρι.

Αποθήκευση

Αποθηκεύστε τα μπλοκ FFPE και τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορείτε να αποθηκεύσετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για έως και 4 εβδομάδες πριν από την εκχύλιση DNA.

Μπορείτε να αποθηκεύσετε το γενωμικό DNA σε θερμοκρασία 2–8°C για 1 εβδομάδα μετά την εκχύλιση και, στη συνέχεια, σε θερμοκρασία –25 έως –15°C για έως και 8 εβδομάδες πριν από τη χρήση.

Διαδικασία

Εκχύλιση DNA

Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit προέκυψαν με χρήση DNA που εκχυλίστηκε με το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (αρ. κατ. 56404). Εάν χρησιμοποιείτε το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, εκτελέστε την εκχύλιση του DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου, προσέχοντας τα παρακάτω.

Εκχύλιση DNA (δείγματα CRC)

- Το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο μη αυτόματα.
- Μη χρησιμοποιείτε το βήμα με τη ριβονουκλεάση που περιγράφεται στο Εγχειρίδιο του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Μη χρησιμοποιείτε το διάλυμα αποπαραφίνωσης της QIAGEN. Για την αποπαραφίνωση χρησιμοποιείτε μόνο τη μέθοδο ξυλολίου/αιθανόλης που περιγράφεται στο Εγχειρίδιο του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Η διάσπαση της πρωτεΐνης K (βήμα 11 στο Εγχειρίδιο του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) πρέπει να έχει διάρκεια 1 ώρα.
- Η έκλυση των δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται με χρήση 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (Buffer ATE) από το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

Εκχύλιση DNA (δείγματα NSCLC)

- Χρησιμοποιήστε τομές 2 × 5 μm ανά εκχύλιση.
- Το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο μη αυτόματα.
- Μη χρησιμοποιείτε το βήμα με τη δεοξυριβονουκλεάση που περιγράφεται στο Εγχειρίδιο του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Μη χρησιμοποιείτε το διάλυμα αποπαραφίνωσης της QIAGEN που παρέχεται με το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Για την αποπαραφίνωση χρησιμοποιείτε μόνο τη μέθοδο ξυλολίου/αιθανόλης που περιγράφεται στο Εγχειρίδιο του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Η διάσπαση της πρωτεΐνης K (βήμα 11 στο Εγχειρίδιο του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) πρέπει να έχει διάρκεια 1 ώρα.
- Προσθέστε 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (ATE) από το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit και επωάστε για 2,5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρίστε σε πλήρη ταχύτητα επί 1 λεπτό.
- Προσθέστε άλλα 60 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (ATE) από το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit και επωάστε για 2,5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρίστε σε πλήρη ταχύτητα επί 1 λεπτό.

Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων DNA

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου DNA στα δείγματα με χρήση του κλειδωμένου προτύπου ποιοτικού ελέγχου KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) για αυτοματοποιημένη αξιολόγηση δειγμάτων.

Σημείωση: Για τη μη αυτόματη αξιολόγηση δειγμάτων, βλ. Παράρτημα 1: Μη αυτόματο πρωτόκολλο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Είναι δυνατή η αξιολόγηση έως και 24 δειγμάτων χρησιμοποιώντας το μείγμα CTRL που διατίθεται.
- Χρησιμοποιήστε το μείγμα CTRL για την αξιολόγηση του DNA πριν από τη δοκιμασία.

Σημείωση: Για την αξιολόγηση αυτή, είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται το μείγμα CTRL όπως περιγράφεται παρακάτω και όχι φασματοφωτομετρία ή άλλες εναλλακτικές μέθοδοι. Ενδέχεται να μην είναι δυνατή η ενίσχυση DNA που είναι αποδομημένο σε μεγάλο βαθμό, παρόλο που οι εκκινητές δημιουργούν μικρά θραύσματα DNA.

- Για την αποτελεσματική χρήση των αντιδραστηρίων στο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, ομαδοποιείτε τα δείγματα DNA σε παρτίδες όσο γίνεται περισσότερο για τη δημιουργία ολοκληρωμένων εκτελέσεων προσδιορισμών. Εάν τα δείγματα υποβληθούν σε δοκιμασία μεμονωμένα ή σε μικρότερους αριθμούς, χρησιμοποιούνται περισσότερα αντιδραστήρια και μειώνεται ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να εξεταστούν με ένα *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Βεβαιωθείτε ότι είναι εγκατεστημένο το σωστό λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package που αντιστοιχεί στην έκδοση του λογισμικού Rotor-Gene Q πριν χρησιμοποιήσετε για πρώτη φορά το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (βλ. Παράρτημα 2: Εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* KRAS Assay Package).

Διαδικασία

1. Αποψύξτε πλήρως το μείγμα αντίδρασης μάρτυρα (σωληνάριο CTRL), το νερό χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC) και τον θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC) KRAS σε θερμοκρασία δωματίου (15–30°C) για τουλάχιστον 1 ώρα.

Σημείωση: Αφήστε την Taq DNA πολυμεράση (Taq) να περιέλθει σε θερμοκρασία δωματίου (15–30°C) συγχρόνως με τα άλλα αντιδραστήρια (βλ. Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων). Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

Οι χρόνοι απόψυξης των αντιδραστηρίων, προετοιμασίας PCR και αποθήκευσης πριν από την έναρξη της εκτέλεσης υποδεικνύονται στον Πίνακα 2.

Σημείωση: Προβείτε στην προετοιμασία PCR σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 2. Χρόνος απόψυξης, χρόνοι προετοιμασίας PCR και θερμοκρασίες αποθήκευσης

| Χρόνος απόψυξης | | Θερμοκρασία αποθήκευσης* μετά από την προετοιμασία PCR | Μέγιστος χρόνος προετοιμασίας PCR και αποθήκευσης |
|-----------------|----------|---|--|
| Ελάχιστος | Μέγιστος | | |
| 1 ώρα | 4,5 ώρες | Θερμοκρασία δωματίου (15–30°C) | 7 ώρες |
| 1 ώρα | 4,5 ώρες | 2–8°C | 18 ώρες |

* Ο όρος «Αποθήκευση» αναφέρεται στο χρόνο μεταξύ της ολοκλήρωσης της προετοιμασίας PCR και της έναρξης της εκτέλεσης PCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

2. Αναμείξτε τα αποψυγμένα αντιδραστήρια, αναστρέφοντας κάθε σωληνάριο 10 φορές προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία τοπικών συγκεντρώσεων αλάτων και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.

Σημείωση: Μη στροβιλίζετε την Taq DNA πολυμεράση (Taq) ή οποιοδήποτε μείγμα που περιέχει Taq, καθώς υπάρχει κίνδυνος αδρανοποίησης του ενζύμου.

3. Παρασκευάστε επαρκή ποσότητα κύριων μειγμάτων [μείγμα αντίδρασης μάρτυρα (CTRL) συν Taq DNA πολυμεράση (Taq)], σύμφωνα με τους όγκους που παραθέτει ο Πίνακας 3 για τα εξής:

- Όλα τα δείγματα DNA

- 1 αντίδραση θετικού μάρτυρα (Positive Control, PC) KRAS
- 1 αντίδραση με νερό χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC)
- 1 επιπλέον δείγμα ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για την προετοιμασία της PCR

Το κύριο μείγμα περιέχει όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση PCR, εκτός από το δείγμα.

Πίνακας 3. Προετοιμασία κύριου μείγματος προσδιορισμού μάρτυρα

| Συστατικό | Όγκος |
|---|--------------------------------------|
| Control Reaction Mix [Μείγμα αντίδρασης μάρτυρα (CTRL)] | 19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)^*$ |
| <i>Taq</i> DNA polymerase [<i>Taq</i> DNA πολυμεράση (<i>Taq</i>)] | 0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)^*$ |
| Συνολικός όγκος | 20 μl /αντίδραση |

* n = αριθμός αντιδράσεων (δείγματα συν μάρτυρες).

Παρασκευάστε αρκετή ποσότητα κύριου μείγματος για ένα επιπλέον δείγμα (n+1), ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για την προετοιμασία της PCR.

Η τιμή n δεν πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 24 (συν μάρτυρες), καθώς ο μέγιστος αριθμός δειγμάτων που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία σε μια εκτέλεση είναι 24.

Σημείωση: Κατά την προετοιμασία του κύριου μείγματος, προστίθεται αρχικά ο απαιτούμενος όγκος του μείγματος αντίδρασης μάρτυρα (CTRL) στο σχετικό σωληνάριο και, στη συνέχεια, προστίθεται η *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*).

Σημείωση: Διοχετεύστε με πιπέτα την *Taq* DNA πολυμεράση τοποθετώντας προσεκτικά το ρύγχος της πιπέτας ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφευχθεί η επικάλυψη του ρύγχους με περίσσεια ενζύμου.

4. Τοποθετήστε τον κατάλληλο αριθμό σωληναρίων για PCR σε σειρές των 4 (κάθε σειρά έχει 4 σωληνάρια) στο μπλοκ φόρτωσης, σύμφωνα με τη διάταξη στον Πίνακα 4. Μην τοποθετείτε πώματα στα σωληνάρια.

Σημείωση: Αφήστε τα πώματα στον πλαστικό περιέκτη μέχρι να τα χρειαστείτε.

Πίνακας 4. Διάταξη εκτέλεσης στο μπλοκ φόρτωσης για αξιολόγηση δειγμάτων DNA

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

* Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις θέσεις στο μπλοκ φόρτωσης και υποδεικνύουν την τελική θέση του ρότορα.

5. Ρυθμίστε μια πιπέτα σε όγκο μικρότερο από τον συνολικό όγκο του κύριου μείγματος αντίδρασης και αναμειξτε σχολαστικά εκτελώντας αναρρόφηση και έγχυση ολόκληρου του όγκου της πιπέτας επί 10 φορές.

6. Προσθέστε αμέσως 20 μl κύριου μείγματος σε κάθε σωληνάριο της σειράς PCR.

Σημείωση: Για τη διάταξη των σωληναρίων, ανατρέξτε στον Πίνακα 4. Για την αξιολόγηση των δειγμάτων DNA, θα πρέπει να προσθέσετε κύριο μείγμα προσδιορισμού μάρτυρα σε ένα σωληνάριο PC, σε ένα σωληνάριο NTC και σε ένα σωληνάριο για κάθε δείγμα DNA.

7. Προσθέστε αμέσως 5 μl νερού χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC) στο σωληνάριο NTC (θέση σωληναρίου 2) και τοποθετήστε πώμα στο σωληνάριο.

8. Προσθέστε 5 μl από κάθε δείγμα DNA στα σωληνάρια δειγμάτων (θέσεις σωληναρίων 3–26) και τοποθετήστε πώματα στα σωληνάρια.

9. Προσθέστε 5 μl θετικού μάρτυρα (Positive Control, PC) KRAS στο σωληνάριο PC (θέση σωληναρίου 1) και τοποθετήστε πώμα στο σωληνάριο.

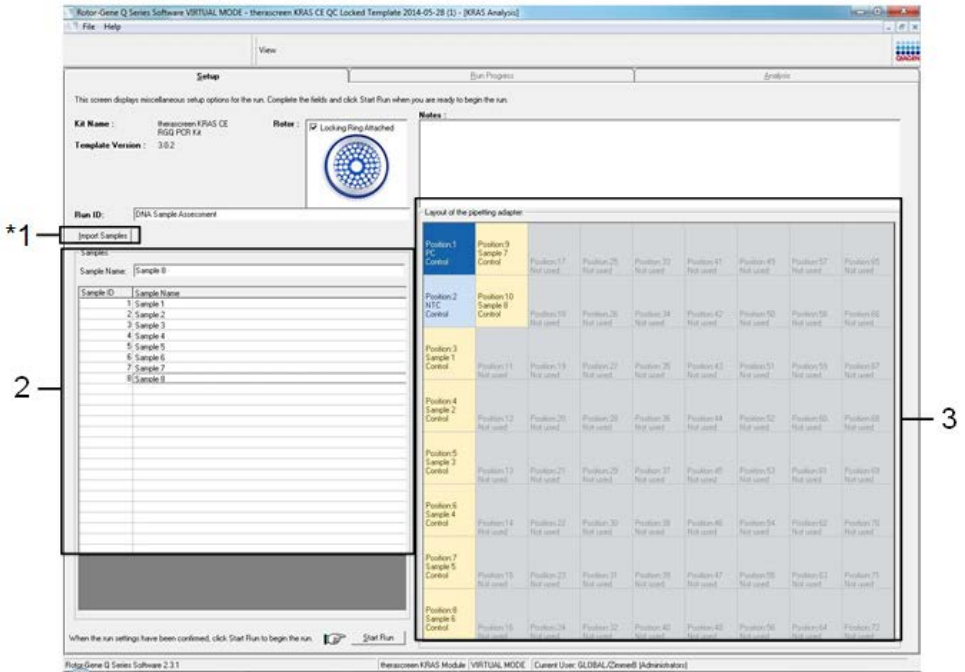
Κάθε σωληνάριο θα πρέπει να περιέχει συνολικό όγκο αντίδρασης 25 μl (20 μl προετοιμασμένου κύριου μείγματος, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, και 5 μl NTC/δείγματος/PC).

10. Με έναν ανεξίτηλο μαρκαδόρο, επισημάνετε τα καπάκια των πρώτων σωληναρίων στη χαμηλότερη αριθμητική θέση σε κάθε σωληνάριο για PCR σε σειρά των 4 (π.χ. θέσεις 1, 5 και 9 κ.λπ.) για να υποδεικνύεται ο προσανατολισμός για τη φόρτωση των σωληναρίων μέσα στον ρότορα 72 βυθισμάτων του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
11. Αναστρέψτε τα πωματισμένα σωληνάρια 4 φορές για να αναμιχθεί το δείγμα και το μείγμα αντίδρασης.
12. Τοποθετήστε όλα τα σωληνάρια για PCR σε σειρές των 4 στις κατάλληλες θέσεις του ρότορα 72 βυθισμάτων σύμφωνα με τη διάταξη της εκτέλεσης (Πίνακας 4), χρησιμοποιώντας τις επισημάνσεις για προσανατολισμό.
Σημείωση: Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, πρέπει να τοποθετήσετε ένα κενό σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις που δεν χρησιμοποιούνται. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται η διατήρηση της θερμικής απόδοσης του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
13. Τοποθετήστε τον ρότορα 72 βυθισμάτων μέσα στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (παρέχεται με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) είναι τοποθετημένος στο επάνω μέρος του ρότορα για την ασφάλιση των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.
14. Ενεργοποιήστε το λογισμικό Rotor-Gene Q κάνοντας διπλό κλικ στο εικονίδιο «**therascreen KRAS QC Locked Template**» (Κλειδωμένο πρότυπο ποιοτικού ελέγχου theascreen KRAS) στην επιφάνεια εργασίας του φορητού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Εικονίδιο «therascreen KRAS QC Locked Template» (Κλειδωμένο πρότυπο ποιοτικού ελέγχου theascreen KRAS).

Εμφανίζεται η καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) βάσει προεπιλογής (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) και πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). 1 = καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις), 2 = πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος).

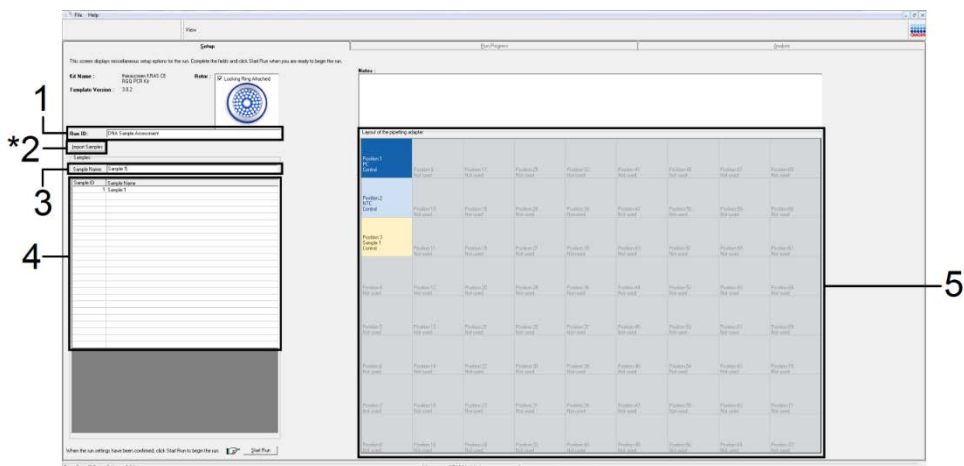
15. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος σωστά και επιλέξτε το πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κλείστε το καπάκι του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
16. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό εκτέλεσης στο πεδίο «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας. Εισαγάγετε το όνομα δείγματος στο πεδίο «Sample Name» (Όνομα δείγματος) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο Return (ή Enter).

Με τον τρόπο αυτό προστίθεται το όνομα δείγματος στην παρακάτω λίστα δειγμάτων και αντιστοιχίζεται στο δείγμα ένα «Sample ID» (Αναγνωριστικό δείγματος) (1, 2, 3 κ.λπ.). Επιπλέον, ενημερώνεται ο πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα) που βρίσκεται στη δεξιά πλευρά, ώστε να συμπεριληφθεί το όνομα δείγματος (Εικόνα 3).

Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει εισαγωγή ονομάτων δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε μορφή *.smp (αρχείο δείγματος Rotor-Gene Q) ή *.csv (τιμές διαχωρισμένες με κόμματα) με τη χρήση του κουμπιού «**Import Samples**» (Εισαγωγή δειγμάτων). Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, τα ονόματα των δειγμάτων συμπληρώνονται αυτόματα.

Σημείωση: Στον πίνακα «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα), ελέγξτε αν η προσθήκη του ονόματος δείγματος έχει επισημανθεί με αλλαγή χρώματος και αν το όνομα δείγματος υπάρχει στη θέση δείγματος (Εικόνα 3).

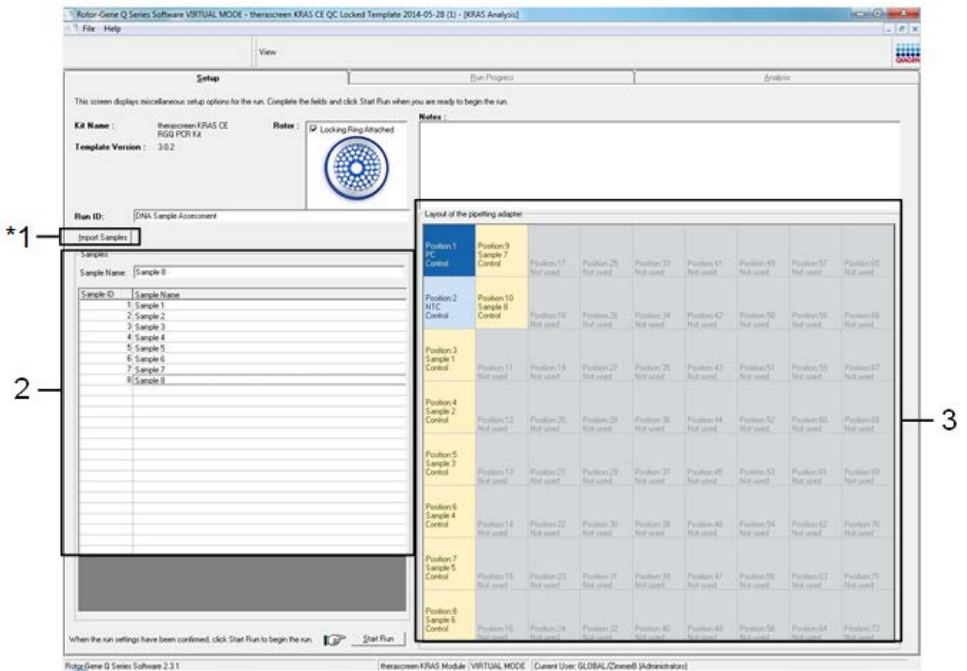
Σημείωση: Τα ονόματα δείγματος που περιέχουν περισσότερους από 8 χαρακτήρες ενδέχεται να μην εμφανίζονται ολόκληρα στον πίνακα «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα).



Εικόνα 3. Συμπλήρωση των πεδίων «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης) και «Sample Name» (Όνομα δείγματος). 1 = πεδίο διαλόγου «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης), 2 = κουμπί «Import Samples» (Εισαγωγή δειγμάτων), 3 = πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος), 4 = λίστα δειγμάτων, 5 = πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα).

17. Επαναλάβετε το βήμα 16 για να εισαγάγετε τα ονόματα όλων των πρόσθετων δειγμάτων (Εικόνα 4).

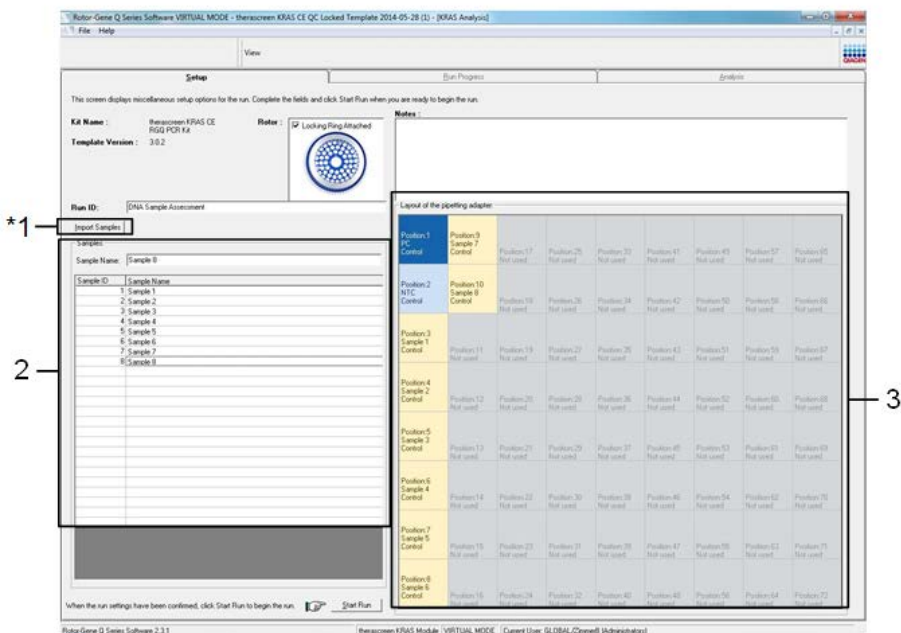
Σημείωση: Για να επεξεργαστείτε ένα όνομα δείγματος, κάντε κλικ στο όνομα δείγματος «**Sample Name**» (Όνομα δείγματος) της λίστας δειγμάτων. Το επιλεγμένο όνομα εμφανίζεται στο παραπάνω πεδίο διαλόγου «**Sample Name**» (Όνομα δείγματος). Επεξεργαστείτε το όνομα δείγματος σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο Return (ή Enter) για να ενημερωθεί το όνομα.



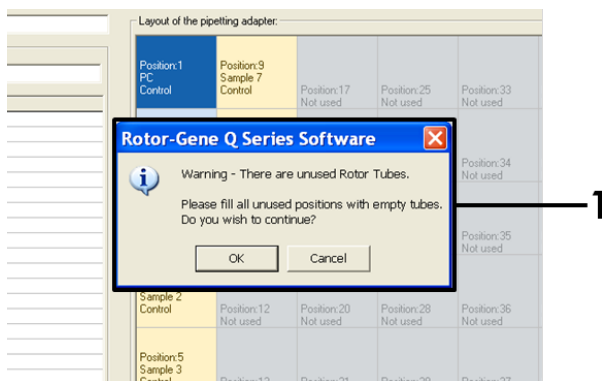
Εικόνα 4. Εισαγωγή πρόσθετων ονομάτων δειγμάτων στο πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος). *1 = κουμπί «Import Samples» (Εισαγωγή δειγμάτων), 2 = πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος) και λίστα δειγμάτων, 3 = πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα) με πρόσθετα ονόματα δειγμάτων.

18. Όταν έχετε εισαγάγει όλα τα ονόματα των δειγμάτων, επαληθεύστε την ορθότητά τους. Προσθέστε τυχόν επιπλέον πληροφορίες στο πεδίο «Notes» (Σημειώσεις) αν είναι απαραίτητο και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο κουμπί «Start Run» (Έναρξη εκτέλεσης) (Εικόνα 5).

Σημείωση: Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, εμφανίζεται ένα μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) (Εικόνα 5 και Εικόνα 6) για να υπενθυμίσει στον χρήστη ότι πρέπει να τοποθετήσει από ένα κενό σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει ένα κενό σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται και κάντε κλικ στο «OK» για να συνεχίσετε.

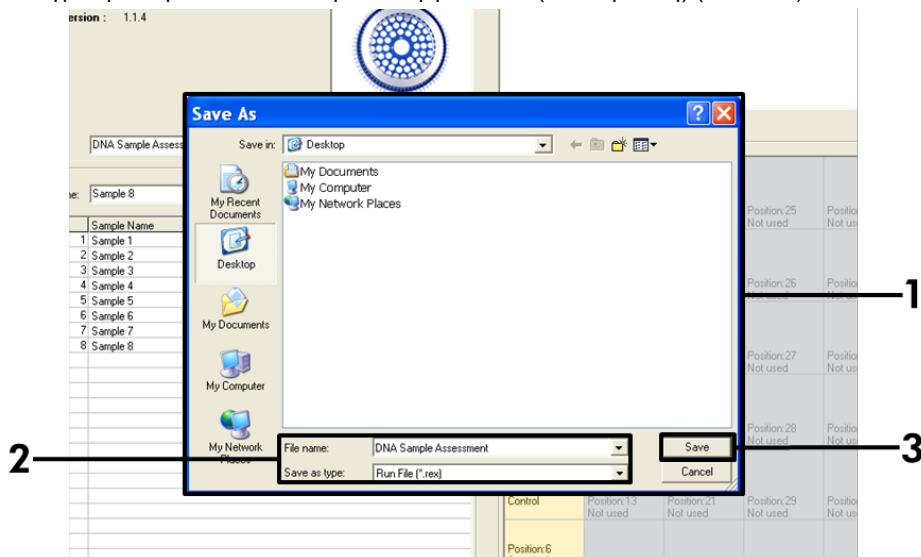


Εικόνα 5. Πεδίο διαλόγου «Notes» (Σημειώσεις), κουμπί «Start Run» (Έναρξη εκτέλεσης) και μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) σχετικά με τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται.



Εικόνα 6. 1 = μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) σχετικά με τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται.

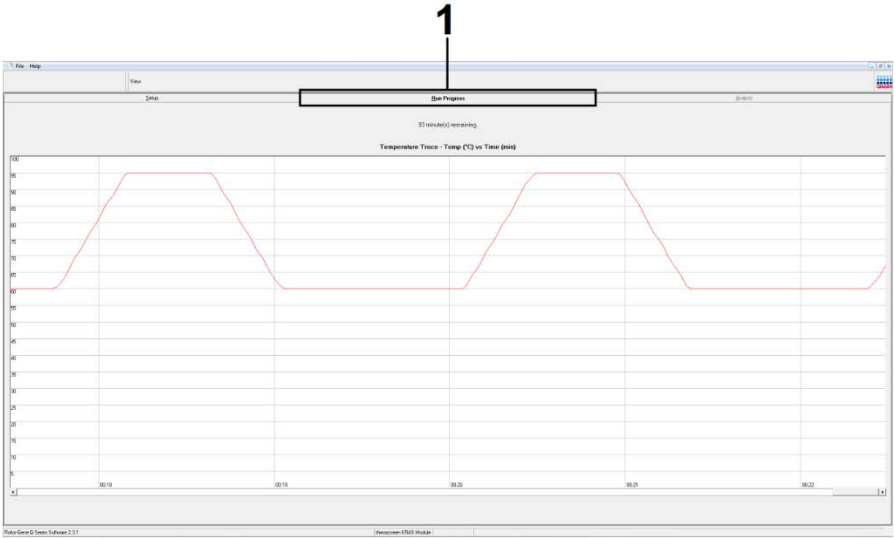
19. Εμφανίζεται ένα παράθυρο «Save As» (Αποθήκευση ως). Επιλέξτε ένα κατάλληλο όνομα αρχείου και αποθηκεύστε την εκτέλεση PCR ως αρχείο εκτέλεσης *.rex στην επιλεγμένη θέση. Κάντε κλικ στην επιλογή «Save» (Αποθήκευση) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Αποθήκευση του αρχείου εκτέλεσης. 1 = παράθυρο «Save As» (Αποθήκευση ως), 2 = όνομα αρχείου και αποθήκευση ως τύπος *.rex, 3 = «Save» (Αποθήκευση).

Ξεκινά η εκτέλεση PCR.

Σημείωση: Κατά την έναρξη της εκτέλεσης, ανοίγει αυτόματα η καρτέλα «Run Progress» (Πρόοδος εκτέλεσης), που υποδεικνύει την παρακολούθηση της θερμοκρασίας και τον υπολειπόμενο χρόνο της εκτέλεσης (Εικόνα 8).

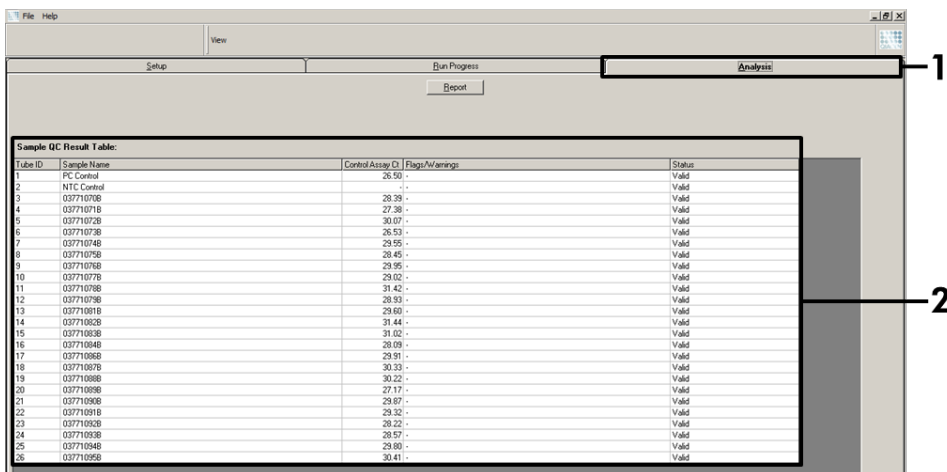


Εικόνα 8. Καρτέλα «Run Progress» (Πρόοδος εκτέλεσης).

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, ανοίγει αυτόματα η καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση).

Σημείωση: Εάν η καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) δεν ανοίξει, κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) (Εικόνα 9).

Σημείωση: Μια επεξήγηση της μεθόδου υπολογισμού παρουσιάζεται στην ενότητα «Ερμηνεία αποτελεσμάτων».



Εικόνα 9. Καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) και αναφορά αποτελεσμάτων. 1 = καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση), 2 = «Sample QC Result Table» (Πίνακας αποτελεσμάτων ποιοτικού ελέγχου δειγμάτων).

Σημείωση: Τα αποτελέσματα μάρτυρα αναφέρονται στον πίνακα «Sample QC Result Table» (Πίνακας αποτελεσμάτων ποιοτικού ελέγχου δειγμάτων) όπως φαίνεται παρακάτω (σημείο 2 στην Εικόνα 9).

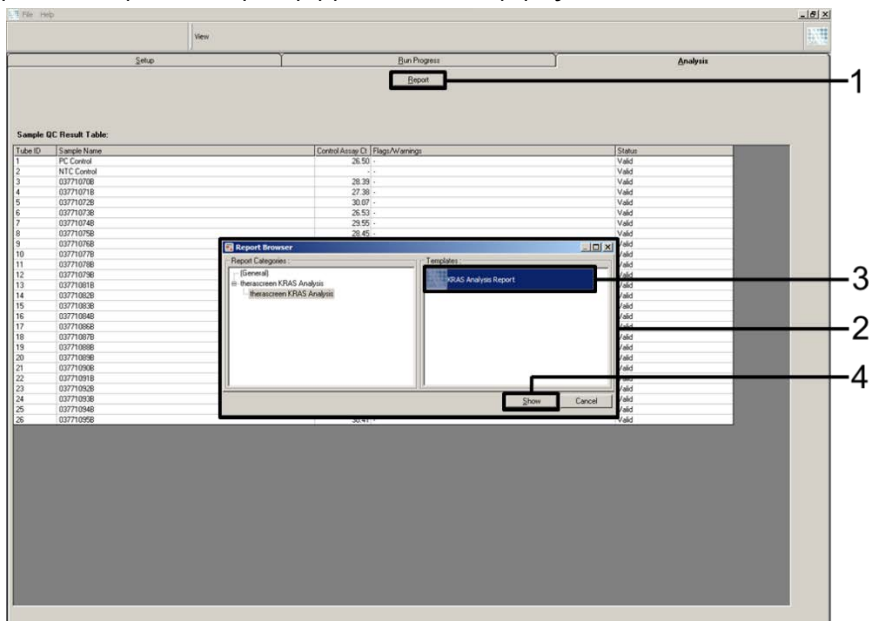
- **Μάρτυρες εκτέλεσης (PC και NTC, θέσεις σωληναρίου 1 και 2, αντίστοιχα):** Εάν τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός του αποδεκτού εύρους, εμφανίζεται η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο). Διαφορετικά, εμφανίζεται αποτέλεσμα «Invalid» (Μη έγκυρο).
- **C_T αντίδρασης μάρτυρα δείγματος > 32,00:** Εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο). Η ποσότητα του DNA δεν επαρκεί για την ανάλυση της μετάλλαξης. Επαναλάβετε τη δοκιμασία στο δείγμα. Εάν η ποσότητα του DNA εξακολουθεί να μην επαρκεί, εκχυλίστε περισσότερο νεοπλασματικό ιστό, εάν υπάρχει (βλ. «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων»).
- **C_T αντίδρασης μάρτυρα δείγματος < 21,92:** Εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο). Η συγκέντρωση του DNA είναι εξαιρετικά υψηλή για την ανάλυση της μετάλλαξης. Αραιώστε με νερό χωρίς νουκλεάση για αραιώση (Dil.) και επαναλάβετε τη δοκιμασία. Αραιώστε μέχρι η τιμή C_T να κυμαίνεται μεταξύ 21,92 και 32,00. Με αραιώση σε αναλογία 1:1 η τιμή C_T αυξάνεται κατά περίπου 1,0.

- **C_T αντίδρασης μάρτυρα δείγματος 21,92–32,00 (21,92 ≤ C_T μάρτυρα ≤ 32,00):** Εμφανίζεται η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο). Η συγκέντρωση του DNA είναι κατάλληλη για την ανάλυση της μετάλλαξης.

Σημείωση: Εάν απαιτείται επανάληψη εκχύλισης ή αραίωση, επαναλάβετε την αντίδραση μάρτυρα για να βεβαιωθείτε ότι η συγκέντρωση του DNA είναι κατάλληλη για χρήση.

20. Για να δημιουργήσετε αρχεία αναφοράς, κάντε κλικ στην επιλογή «**Report**» (Αναφορά). Εμφανίζεται το παράθυρο «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών). Επιλέξτε «**KRAS Analysis Report**» (Αναφορά ανάλυσης KRAS) στο «Templates» (Πρότυπα) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο «**Show**» (Εμφάνιση) (Εικόνα 10).

Σημείωση: Μπορείτε να αποθηκεύσετε τις αναφορές σε μια εναλλακτική θέση σε μορφή αρχείων web, κάνοντας κλικ στο κουμπί «**Save As**» (Αποθήκευση ως), που βρίσκεται στην επάνω αριστερή γωνία κάθε αναφοράς.



Εικόνα 10. Επιλογή του «KRAS Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης KRAS). 1 = «Report» (Αναφορά), 2 = παράθυρο «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών), 3 = επιλογή «KRAS Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης KRAS), 4 = «Show» (Εμφάνιση).

Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS

Το παρόν πρωτόκολλο προορίζεται για την ανίχνευση των μεταλλάξεων KRAS.

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Μετά την επιτυχή αξιολόγησή του, το δείγμα μπορεί να υποβληθεί σε δοκιμασία με χρήση των προσδιορισμών μεταλλάξεων KRAS.
- Για αποτελεσματική χρήση του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, τα δείγματα πρέπει να ομαδοποιούνται σε παρτίδες των 7 (για την πλήρωση του ρότορα 72 βυθισμάτων). Εάν το μέγεθος της παρτίδας είναι μικρότερο, θα υποβληθούν σε δοκιμασία λιγότερα δείγματα με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Βεβαιωθείτε ότι είναι εγκατεστημένο το σωστό λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package που αντιστοιχεί στην έκδοση του λογισμικού Rotor-Gene Q πριν χρησιμοποιήσετε για πρώτη φορά το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (βλ. Παράρτημα 2: Εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* KRAS Assay Package).

Διαδικασία

1. Επισημάνετε 8 σωληνάρια μικροφυγόκεντρου (δεν παρέχονται) σύμφωνα με καθένα από τα αντίστοιχα μείγματα αντίδρασης που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Παρασκευάστε επαρκείς ποσότητες κύριων μειγμάτων [μείγμα αντίδρασης μάρτυρα ή μετάλλαξης (σωληνάριο CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL ή 13ASP) συν *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*)] για τα δείγματα DNA, μία αντίδραση θετικού μάρτυρα KRAS (σωληνάριο PC) και μία αντίδραση με νερό χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα (σωληνάριο NTC), σύμφωνα με τους όγκους που αναφέρονται στον πίνακα. Συμπεριλάβετε αντιδραστήρια για 1 επιπλέον δείγμα, ώστε να υπάρχει επαρκής περίσσεια υλικού για την προετοιμασία της PCR. Τα κύρια μείγματα περιέχουν όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση PCR εκτός από το δείγμα.

| Προσδιορισμός και σωληνάριο μείγματος αντίδρασης | Όγκος μείγματος αντίδρασης | Όγκος Ταq DNA πολυμεράσης |
|--|----------------------------|---------------------------|
| Μάρτυρας (σωληνάριο CTRL) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |
| 12ALA (σωληνάριο 12ALA) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |
| 12ASP (σωληνάριο 12ASP) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |
| 12ARG (σωληνάριο 12ARG) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |
| 12CYS (σωληνάριο 12CYS) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |
| 12SER (σωληνάριο 12SER) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |
| 12VAL (σωληνάριο 12VAL) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |
| 13ASP (σωληνάριο 13ASP) | 19,76 μl × (n + 1) | 0,24 μl × (n + 1) |

* n = αριθμός αντιδράσεων (δείγματα συν μάρτυρες). Προετοιμάστε αρκετή ποσότητα κύριου μείγματος για 1 επιπλέον δείγμα (n + 1), ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για την προετοιμασία PCR. Η τιμή n δεν πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 7 (συν μάρτυρες), καθώς ο μέγιστος αριθμός δειγμάτων που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία σε μια εκτέλεση είναι 7.

2. Αναμειξτε τα αποφυγμένα αντιδραστήρια, αναστρέφοντας κάθε σωληνάριο 10 φορές ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία τοπικών συγκεντρώσεων αλάτων. Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
3. Βεβαιωθείτε ότι ο όγκος του μείγματος στην πιπέτα είναι μικρότερος από τον συνολικό όγκο του μείγματος αντίδρασης και αναμειξτε εκτενώς τα κύρια μείγματα εκτελώντας 10 φορές πλήρη αναρρόφηση και έγχυση.
4. Προσθέστε αμέσως 20 μl κύριου μείγματος στο κάθε κατάλληλο σωληνάριο σε σειρά για PCR.

Σημείωση: Κατά την προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης, ανατρέξτε στον Πίνακα 5 για τη διάταξη των σωληναρίων. Για την ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS, πρέπει να προσθέσετε τα κύρια μείγματα σε 8 σωληνάρια PC, 8 σωληνάρια NTC και 8 σωληνάρια για κάθε δείγμα DNA.

Πίνακας 5. Διάταξη εκτέλεσης στο μπλοκ φόρτωσης για την ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS

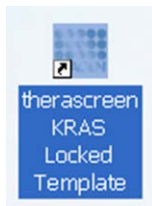
| Προσδιορισμός | Μάρτυρες | | Αριθμός δείγματος | | | | | | |
|---------------|----------|-----|-------------------|----|----|----|----|----|----|
| | PC | NTC | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| CTRL | 1* | 9 | 17 | 25 | 33 | 41 | 49 | 57 | 65 |
| 12ALA | 2 | 10 | 18 | 26 | 34 | 42 | 50 | 58 | 66 |
| 12ASP | 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 |

* Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις θέσεις στο μπλοκ φόρτωσης και υποδεικνύουν την τελική θέση του ρότορα.

5. Προσθέστε αμέσως 5 μl νερού χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC) στα σωληνάρια NTC (θέσεις σωληναρίων 9–16) και τοποθετήστε πώματα στα σωληνάρια.
6. Προσθέστε 5 μl από κάθε δείγμα DNA στα σωληνάρια δειγμάτων (θέσεις σωληναρίων 17-72) και τοποθετήστε πώματα στα σωληνάρια.
7. Προσθέστε 5 μl θετικού μάρτυρα (Positive Control, PC) KRAS στα σωληνάρια PC (θέσεις σωληναρίων 1–8) και τοποθετήστε πώματα στα σωληνάρια.
8. Με έναν ανεξίτηλο μαρκαδόρο, επισημάνετε τα καπάκια των πρώτων σωληναρίων στη χαμηλότερη αριθμητική θέση σε κάθε σωληνάριο για PCR σε σειρά των 4 (π.χ. θέσεις 1, 5 και 9 κ.λπ.) για να υποδεικνύεται ο προσανατολισμός για τη φόρτωση των σωληναρίων μέσα στον ρότορα 72 βυθισμάτων του οργάνου Rotor- Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Αναστρέψτε τα πωματισμένα σωληνάρια 4 φορές για να αναμιχθεί το δείγμα και το μείγμα αντίδρασης.
10. Τοποθετήστε όλα τα σωληνάρια για PCR σε σειρές των 4 στις κατάλληλες θέσεις του ρότορα 72 βυθισμάτων σύμφωνα με τη διάταξη της εκτέλεσης (Πίνακας 5), χρησιμοποιώντας τις επισημάνσεις για προσανατολισμό.

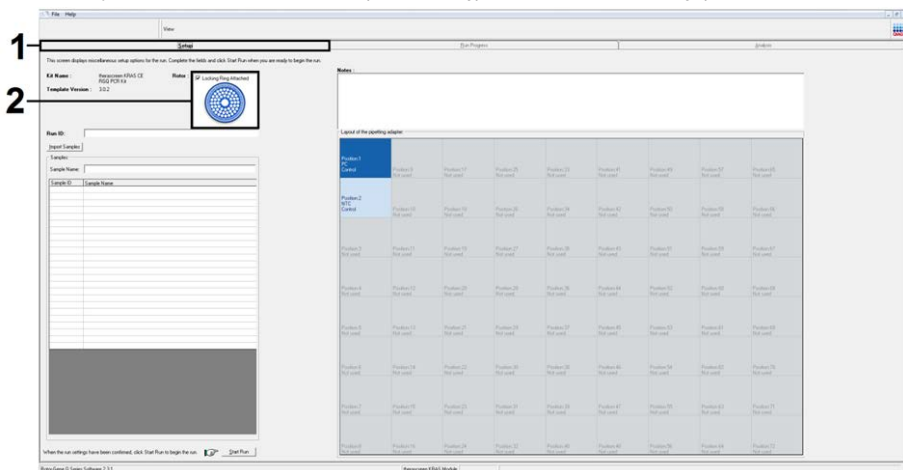
Σημείωση: Σε κάθε εκτέλεση PCR μπορεί να συμπεριληφθούν το ανώτερο 7 δείγματα. Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, πρέπει να τοποθετήσετε ένα κενό σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις που δεν χρησιμοποιούνται. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται η διατήρηση της θερμικής απόδοσης του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

11. Τοποθετήστε τον ρότορα 72 βυθισμάτων μέσα στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (παρέχεται με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) είναι τοποθετημένος στο επάνω μέρος του ρότορα για την ασφάλιση των σωληναρίων κατά την εκτέλεση.
12. Ενεργοποιήστε το λογισμικό Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM κάνοντας διπλό κλικ στο εικονίδιο «**therascreen KRAS Locked Template**» (Κλειδωμένο πρότυπο theerascreen KRAS) στην επιφάνεια εργασίας του φορητού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Εικονίδιο «**therascreen KRAS Locked Template**» (Κλειδωμένο πρότυπο theerascreen KRAS).

Εμφανίζεται η καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) βάσει προεπιλογής (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. 1 = καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) και 2 = πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος).

13. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος σωστά και επιλέξτε το πλαίσιο «**Locking Ring Attached**» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κλείστε το καπάκι του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
14. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό εκτέλεσης στο πεδίο «**Run ID**» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας.
15. Εισαγάγετε το όνομα δείγματος στο πεδίο «**Sample Name**» (Όνομα δείγματος) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο Return (ή Enter).

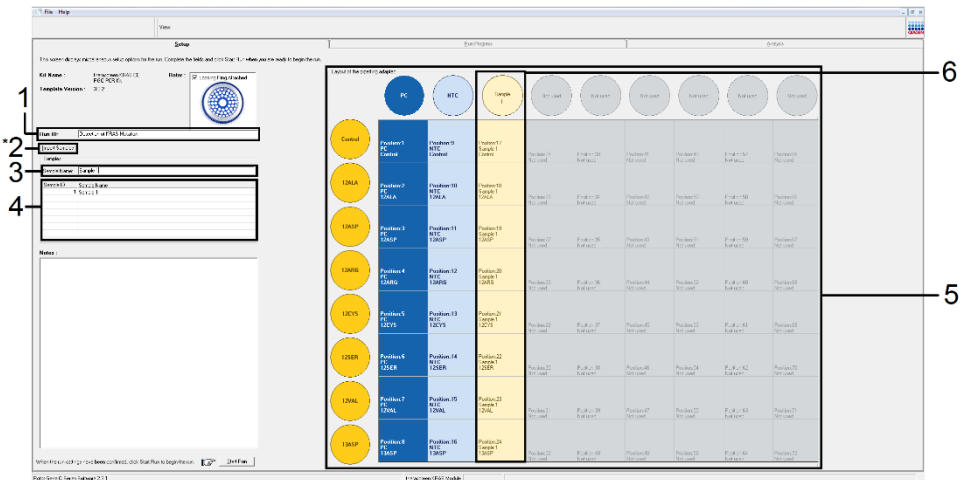
Με τον τρόπο αυτό προστίθεται το όνομα δείγματος στην παρακάτω λίστα δειγμάτων και αντιστοιχίζεται στο δείγμα ένα «Sample ID» (Αναγνωριστικό δείγματος) (1, 2, 3 κ.λπ.). Επιπλέον, ενημερώνεται ο πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα) που βρίσκεται στη δεξιά πλευρά, ώστε να συμπεριληφθεί το όνομα δείγματος (Εικόνα 13).

Σημείωση: Στον πίνακα «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα), ελέγξτε αν η προσθήκη του ονόματος δείγματος έχει επισημανθεί με αλλαγή χρώματος και αν είναι επισημασμένοι και οι 8 προσδιορισμοί στη στήλη κάτω από τον κύκλο δείγματος (Εικόνα 13).

Σημείωση: Μπορείτε να προσθέσετε έως και 7 δείγματα. Τα αναγνωριστικά δειγμάτων (στους κύκλους δειγμάτων) αντιστοιχίζονται αυτόματα με τιμές από 1 έως 7.

Σημείωση: Τα ονόματα δείγματος που περιέχουν περισσότερους από 8 χαρακτήρες ενδέχεται να μην εμφανίζονται ολόκληρα στον πίνακα «Layout of the pipetting Προσαρμογείς» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα).

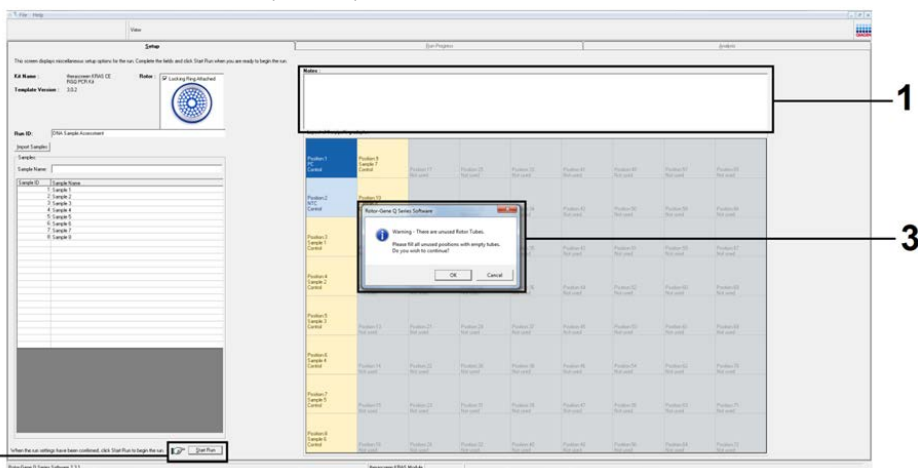
Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει εισαγωγή ονομάτων δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε μορφή *.smr (αρχείο δείγματος Rotor-Gene Q) ή *.csv (τιμές διαχωρισμένες με κόμματα) με τη χρήση του κουμπιού «**Import Samples**» (Εισαγωγή δειγμάτων). Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, τα ονόματα των δειγμάτων συμπληρώνονται αυτόματα.



Εικόνα 13. Συμπλήρωση των πεδίων «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης) και «Sample Name» (Όνομα δείγματος). 1 = πεδίο διαλόγου «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης), 2 = «Import Samples» (Εισαγωγή δειγμάτων) (δεν διατίθεται με την έκδοση λογισμικού 2.1), 3 = πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος), 4 = λίστα δειγμάτων, 5 = πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα), 6 = επισημασμένος κύκλος δείγματος και από κάτω στήλη 8 προσδιορισμών.

16. Επαναλάβετε το βήμα 14 για να εισαγάγετε τα ονόματα όλων των πρόσθετων δειγμάτων (Εικόνα 14).

Σημείωση: Για να επεξεργαστείτε ένα όνομα δείγματος, κάντε κλικ στο όνομα δείγματος της λίστας δειγμάτων «**Sample Name**» (Όνομα δείγματος). Το επιλεγμένο όνομα εμφανίζεται στο παραπάνω πεδίο «**Sample Name**» (Όνομα δείγματος). Επεξεργαστείτε το όνομα δείγματος σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο Return (ή Enter) για να ενημερωθεί το όνομα.

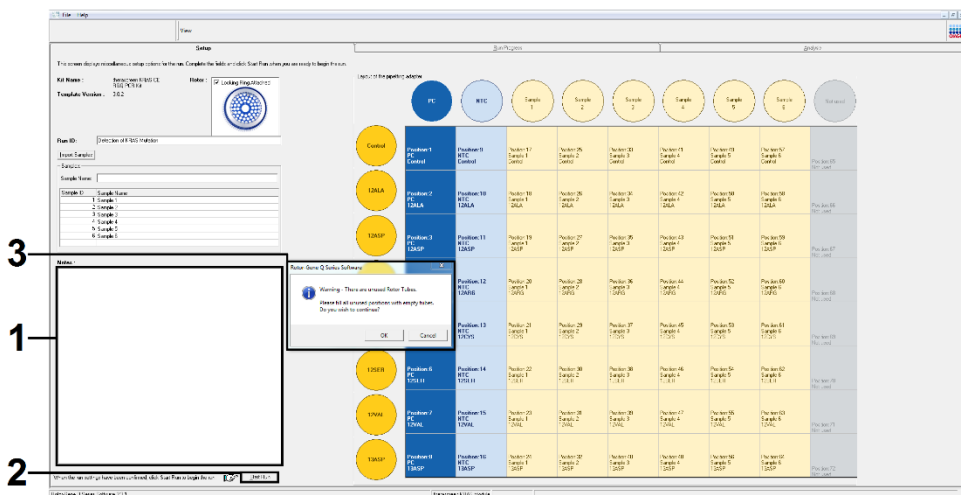


Εικόνα 14. Εισαγωγή πρόσθετων ονομάτων δειγμάτων στο πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος). 1 = πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος), 2 = λίστα δειγμάτων, 3 = «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πώπιτα) με πρόσθετα ονόματα δειγμάτων.

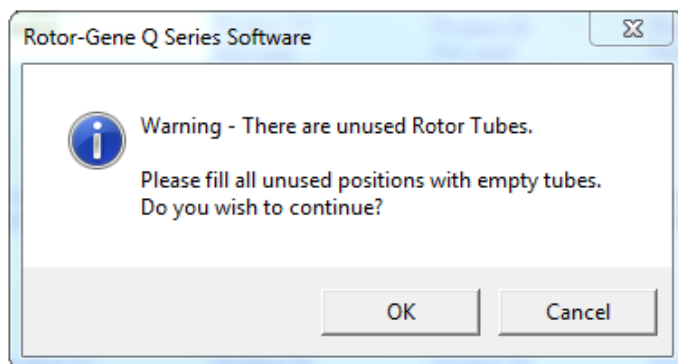
17. Όταν έχετε εισαγάγει όλα τα ονόματα των δειγμάτων, επαληθεύστε την ορθότητά τους. Προσθέστε τυχόν επιπλέον πληροφορίες στο πεδίο «Notes» (Σημειώσεις) αν είναι απαραίτητο και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο «Start Run» (Έναρξη εκτέλεσης) (Εικόνα 15).

Σημείωση: Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, εμφανίζεται ένα μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) (Εικόνα 15 και Εικόνα 16) για να υπενθυμίσει στον χρήστη ότι πρέπει να τοποθετήσει από ένα κενό σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει ένα κενό

σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται και κάντε κλικ στο «OK» για να συνεχίσετε.

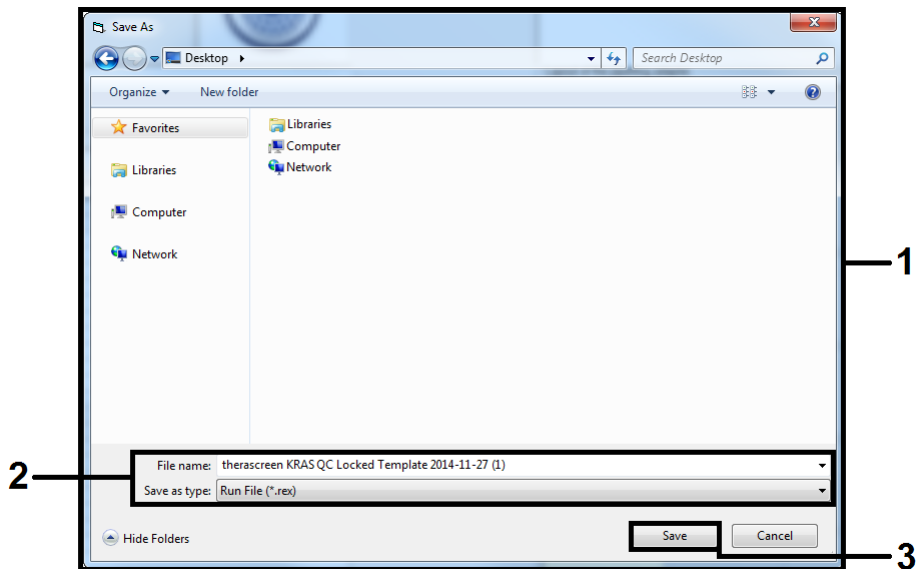


Εικόνα 15. 1 = πεδίο διαλόγου «Notes» (Σημειώσεις), 2 = «Start Run» (Εναρξη εκτέλεσης) και 3 = μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) σχετικά με τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται.



Εικόνα 16. Μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) σχετικά με τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται.

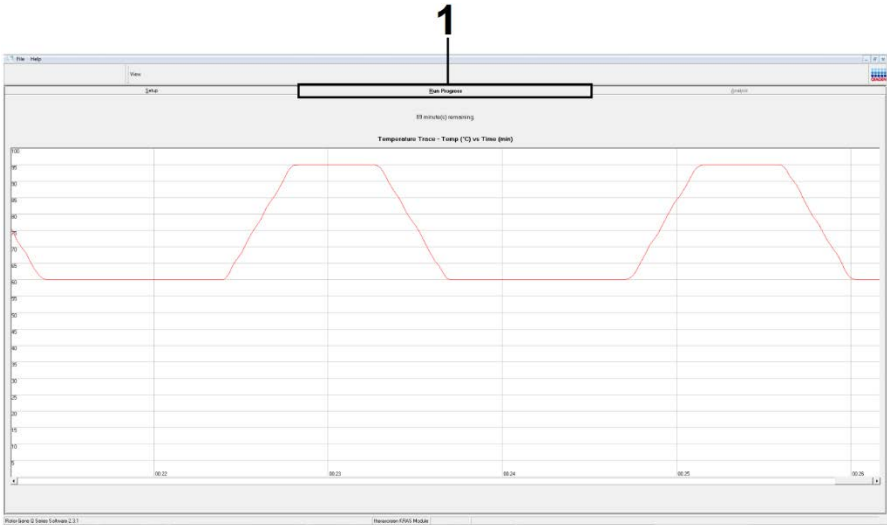
18. Στο παράθυρο «Save as» (Αποθήκευση ως), επιλέξτε ένα κατάλληλο όνομα αρχείου και αποθηκεύστε την εκτέλεση PCR ως αρχείο εκτέλεσης *.rex στην επιλεγμένη θέση (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Αποθήκευση του αρχείου εκτέλεσης.

Ξεκινά η εκτέλεση PCR.

Σημείωση: Κατά την έναρξη της εκτέλεσης, ανοίγει αυτόματα η καρτέλα «Run Progress» (Πρόοδος εκτέλεσης), που υποδεικνύει την παρακολούθηση της θερμοκρασίας και τον υπολειπόμενο χρόνο της εκτέλεσης (Εικόνα 18).

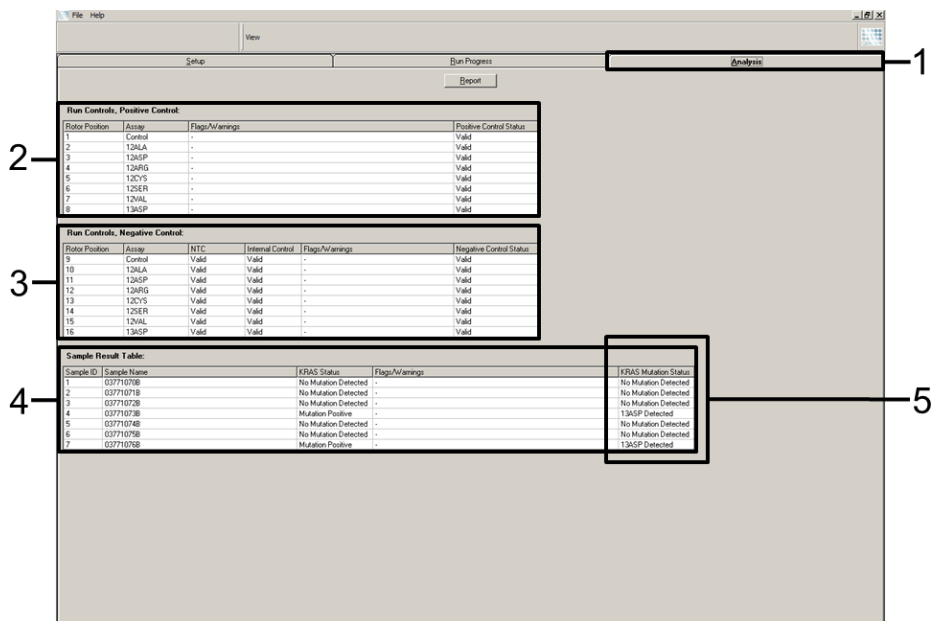


Εικόνα 18. Καρτέλα «Run Progress» (Πρόοδος εκτέλεσης).

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, ανοίγει αυτόματα η καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση).

Σημείωση: Εάν η καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) δεν ανοίξει, κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) (Εικόνα 19).

Σημείωση: Μια επεξήγηση της μεθόδου υπολογισμού παρουσιάζεται στην ενότητα «Ερμηνεία αποτελεσμάτων».



Εικόνα 19. Καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) και αναφορά αποτελεσμάτων. 1 = καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση), 2 = πίνακας «Run Controls, Positive Control» (Μάρτυρες εκτέλεσης, θετικός μάρτυρας), 3 = πίνακας «Run Controls, Negative Control» (Μάρτυρες εκτέλεσης, αρνητικός μάρτυρας), 4 = «Sample Result Table» (Πίνακας αποτελεσμάτων δειγμάτων), 5 = στήλη «KRAS Mutation Status» (Κατάσταση μετάλλαξης KRAS).

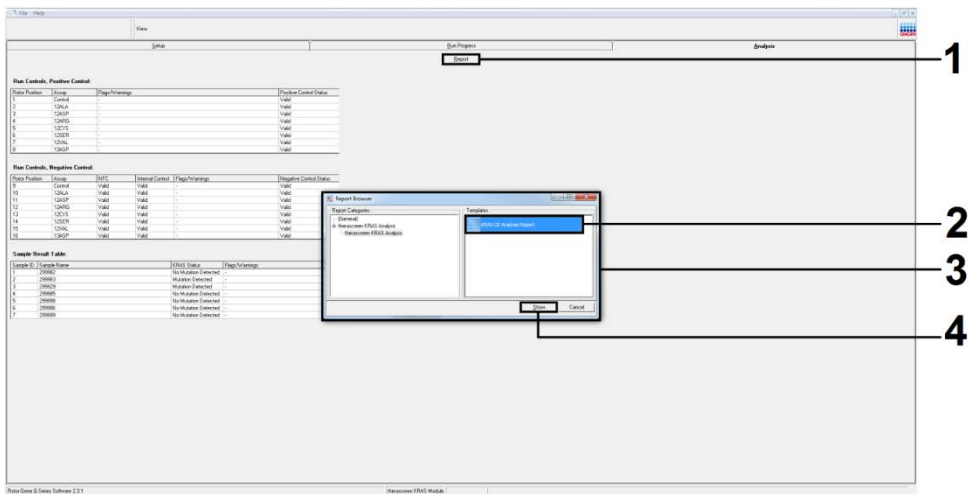
Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού αναφέρονται ως εξής (Εικόνα 19).

- **Πίνακας «Run Controls, Positive Control» (Μάρτυρες εκτέλεσης, θετικός μάρτυρας):** Εάν τα αποτελέσματα είναι εντός του αποδεκτού εύρους τιμών, στο πεδίο «Positive Control Status» (Κατάσταση θετικού μάρτυρα) εμφανίζεται η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο), διαφορετικά εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο).
- **Πίνακας «Run Controls, Negative Control» (Μάρτυρες εκτέλεσης, αρνητικός μάρτυρας):** Εάν και το αποτέλεσμα «NTC» (Μάρτυρας χωρίς μήτρα) και το αποτέλεσμα «Internal Control» (Εσωτερικός μάρτυρας) είναι εντός του αποδεκτού εύρους τιμών, στο πεδίο «Negative Control Status» (Κατάσταση αρνητικού μάρτυρα) εμφανίζεται η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο), διαφορετικά εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο).

- Πίνακας «Sample Result Table» (Πίνακας αποτελεσμάτων δειγμάτων): Για τα θετικά για μετάλλαξη δείγματα, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις αναφέρονται στη στήλη «KRAS Mutation Status» (Κατάσταση μετάλλαξης KRAS).

19. Για να δημιουργήσετε αρχεία αναφοράς, κάντε κλικ στην επιλογή «**Report**» (Αναφορά). Εμφανίζεται το παράθυρο «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών). Επιλέξτε «**KRAS Analysis Report**» (Αναφορά ανάλυσης KRAS) στο «Templates» (Πρότυπα) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο «**Show**» (Εμφάνιση) (Εικόνα 20).

Σημείωση: Μπορείτε να αποθηκεύσετε τις αναφορές σε μια εναλλακτική θέση σε μορφή αρχείων web, κάνοντας κλικ στο «**Save As**» (Αποθήκευση ως) που βρίσκεται στην επάνω αριστερή γωνία κάθε αναφοράς.



Εικόνα 20. Επιλογή του «KRAS Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης KRAS). 1 = «Report» (Αναφορά), 2 = παράθυρο «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών), 3 = επιλογή «KRAS Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης KRAS), 4 = «Show» (Εμφάνιση).

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Η ανάλυση και οι προσδιορισμοί μετάλλαξης διεξάγονται αυτόματα από το λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package μόλις ολοκληρωθεί μια εκτέλεση. Ακολουθούν πληροφορίες που εξηγούν τον τρόπο με τον οποίο το λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package διεξάγει την ανάλυση και τους προσδιορισμούς μετάλλαξης.

Σημείωση: Για μη αυτόματη ανάλυση, βλ. Παράρτημα 1: Μη αυτόματο πρωτόκολλο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Ο κύκλος PCR στον οποίο ο φθορισμός από μια συγκεκριμένη αντίδραση συμπίπτει με μια προκαθορισμένη τιμή κατωφλίου, ορίζεται ως η τιμή C_T. Οι τιμές C_T υποδεικνύουν την ποσότητα συγκεκριμένου εισαγόμενου DNA. Οι χαμηλές τιμές C_T υποδεικνύουν υψηλότερα επίπεδα εισαγόμενου DNA και οι υψηλές τιμές C_T υποδεικνύουν χαμηλότερα επίπεδα εισαγόμενου DNA. Οι αντιδράσεις με τιμή C_T ταξινομούνται ως θετικές για ενίσχυση.

Με το λογισμικό Rotor-Gene Q παρεμβάλλονται σήματα φθορισμού μεταξύ 2 οποιωνδήποτε καταχωρημένων τιμών. Επομένως, οι τιμές C_T μπορεί να είναι οποιοσδήποτε πραγματικός αριθμός (χωρίς περιορισμό σε ακέραιους αριθμούς) εντός του εύρους από 0 έως 40.

Για το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, η τιμή κατωφλίου έχει οριστεί σε 0,05 σχετικές μονάδες φθορισμού. Η τιμή αυτή έχει διαμορφωθεί στο λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package για τα κανάλια φθορισμού για το Green και το Yellow. Η τιμή κατωφλίου καθορίστηκε κατά την ανάπτυξη του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Εκτελείται υπολογισμός για τον προσδιορισμό της τιμής ΔC_T με τη χρήση της εξίσωσης:

$$\Delta C_T = [\text{τιμή } C_T \text{ προσδιορισμού μετάλλαξης}] - [\text{τιμή } C_T \text{ προσδιορισμού μάρτυρα}]$$

Οι μάρτυρες της εκτέλεσης (θετικός μάρτυρας, NTC και εσωτερικοί μάρτυρες) αξιολογούνται, ώστε να διασφαλιστεί ότι επιτυγχάνονται αποδεκτές τιμές C_T και ότι οι αντιδράσεις εκτελούνται σωστά.

Οι τιμές δείγματος ΔC_T υπολογίζονται ως η διαφορά μεταξύ της τιμής C_T του προσδιορισμού μετάλλαξης και της τιμής C_T του προσδιορισμού μάρτυρα από το ίδιο δείγμα. Τα δείγματα ταξινομούνται ως θετικά για μετάλλαξη, εάν η τιμή ΔC_T που δίνουν είναι μικρότερη ή ίση με την οριακή τιμή αποκοπής ΔC_T για τον συγκεκριμένο προσδιορισμό. Πάνω από την τιμή αυτή, το δείγμα ενδέχεται να περιέχει μετάλλαξη σε ποσοστό μικρότερο από αυτό που μπορεί να ανιχνευθεί από το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (εκτός των ορίων των προσδιορισμών) ή να είναι αρνητικό για μετάλλαξη, γεγονός που θα υποδεικνύεται από την ένδειξη «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη) στην αναφορά.

Οι αντιδράσεις μετάλλαξης χωρίς ενίσχυση ταξινομούνται ως «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη). Οι τιμές ΔC_T που υπολογίζονται από την ενίσχυση υποβάθρου αναμένεται να είναι μεγαλύτερες από τις οριακές τιμές αποκοπής ΔC_T και το δείγμα ταξινομείται ως «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη).

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εμφανίζονται ως «Mutation Positive» (Θετικό για μετάλλαξη), «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη), «Invalid» (Μη έγκυρο) ή, σε περίπτωση αποτυχίας του μάρτυρα εκτέλεσης, ως «Run Control Failed» (Αποτυχία μάρτυρα εκτέλεσης). Για τα θετικά για μετάλλαξη δείγματα, αναφέρονται συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

Τα υπόλοιπα πιθανά αποτελέσματα που ενδέχεται να εμφανιστούν περιγράφονται στην ενότητα «Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων DNA» στη σελίδα του εγχειριδίου αυτού.

Σπάνια μια νεοπλασία μπορεί να εμφανίζει περισσότερες από μία μεταλλάξεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ταυτοποιείται η μετάλλαξη που δίνει τη χαμηλότερη τιμή ΔC_T.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα «Συχνές ερωτήσεις» (Frequently Asked Questions, FAQ) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες ή/και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμού (για πληροφορίες επικοινωνίας επισκεφθείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com).

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Μη έγκυρα αποτελέσματα

- | | |
|---|--|
| a) Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα συστατικά δεν συμμορφώθηκαν με τις οδηγίες της ενότητας Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων. | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ, αν χρειαστεί. |
| b) Η ημερομηνία λήξης του <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit έχει παρέλθει. | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και, αν χρειαστεί, χρησιμοποιήστε ένα νέο κιτ. |

Τα δείγματα NTC δίνουν θετικά αποτελέσματα στο κανάλι FAM.

- | | |
|--|--|
| Προέκυψε επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR. | Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε θυγατρικούς κλώνους. Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε δοκιμασία. Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. |
|--|--|

Ενδείξεις που δημιουργούνται από το λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package

Στον Πίνακα 6 αναφέρονται οι πιθανές ενδείξεις που ενδέχεται να δημιουργηθούν από το λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package, η σημασία τους και οι ενέργειες που πρέπει να εκτελεστούν.

Πίνακας 6. Ενδείξεις του *therascreen* KRAS Assay Package

| Ένδειξη | Επεξήγηση | Ενέργεια που πρέπει να εκτελεστεί |
|--------------------------|--|--|
| PC_CTRL_ASSAY_FAIL | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — η τιμή FAM CT για τον θετικό μάρτυρα στην αντίδραση μάρτυρα είναι εκτός εύρους. | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| PC_MUTATION_ASSAY_FAIL | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — η τιμή FAM CT για μία ή περισσότερες αντιδράσεις μάρτυρα μετάλλαξης είναι εκτός εύρους. | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| PC_CTRL_INVALID_DATA | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — Δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στον θετικό μάρτυρα (μείγμα αντίδρασης μάρτυρα). | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| PC_MUTATION_INVALID_DATA | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — Δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στον θετικό μάρτυρα (μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης). | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| NTC_INT_CTRL_FAIL | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — Εσωτερικός μάρτυρας πάνω από το εύρος τιμών για αρνητικό μάρτυρα. | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| NTC_INT_CTRL_EARLY_CT | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — Εσωτερικός μάρτυρας κάτω από το εύρος τιμών για αρνητικό μάρτυρα. | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| NTC_INVALID_CT | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — Μη έγκυρη τιμή FAM (μικρότερη του ορίου) για αρνητικό μάρτυρα. | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| NTC_INVALID_DATA | Μη έγκυρη εκτέλεση PCR — Δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στον αρνητικό μάρτυρα. | Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR. |
| SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA | Μη έγκυρο δείγμα — Δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στον μάρτυρα δείγματος. | Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε την εξέταση των σχετικών δειγμάτων. |

| | | |
|-----------------------|---|--|
| SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC | Μη έγκυρο δείγμα — Η τιμή FAM C _T είναι εξαιρετικά χαμηλή στον μάρτυρα δείγματος. | Αραιώστε το δείγμα για να αυξηθεί η τιμή C _T του μάρτυρα. Η αραιώση αυτή πρέπει να υπολογιστεί βάσει της υπόθεσης ότι η αραιώση σε αναλογία 1:1 με το νερό που παρέχεται στο κιτ οδηγεί σε αύξηση της τιμής C _T κατά 1,0. Μετά την αραιώση του δείγματος, προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε την δοκιμασία του δείγματος. |
| SAMPLE_CTRL_FAIL | Μη έγκυρο δείγμα — Η τιμή FAM C _T είναι εξαιρετικά υψηλή στην αντίδραση μάρτυρα δείγματος. | Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε την δοκιμασία του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκχυλίστε το δείγμα από νέες τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για τη δοκιμασία της νέας εκχύλισης. Εάν το αποτέλεσμα είναι μη έγκυρο, επαναλάβετε αυτήν τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω δοκιμασία. |
| SAMPLE_INT_CTRL_FAIL | Η τιμή C _T είναι εξαιρετικά υψηλή (ή δεν υπάρχει τιμή C _T) για τον εσωτερικό μάρτυρα (HEX), κανάλι FAM αρνητικό για μετάλλαξη. | Εάν το δείγμα έδωσε έγκυρο αποτέλεσμα — δεν απαιτείται καμία ενέργεια. Δείγματα CRC: Εάν το δείγμα έδωσε μη έγκυρο αποτέλεσμα, προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε τη δοκιμασία του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκχυλίστε το δείγμα από νέες τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για τη δοκιμασία της νέας εκχύλισης. Εάν το αποτέλεσμα είναι μη έγκυρο, επαναλάβετε αυτήν τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω δοκιμασία. Δείγματα NSCLC: Εάν σε ένα δείγμα αντιστοιχιστεί μη έγκυρη κατάσταση, αραιώστε το υπόλοιπο του δείγματος σε αναλογία 1 προς 8 με νερό από το σωληνάριο με την ένδειξη DIL, φροντίζοντας ώστε ο τελικός όγκος να είναι μεγαλύτερος από 40 μl (π.χ. 10 μl DNA και 70 μl νερού από το σωληνάριο με την ένδειξη DIL), και προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να |

επαναλάβετε την δοκιμασία του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκχυλίστε το δείγμα από νέες τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για τη δοκιμασία της νέας εκχύλισης. Εάν το δείγμα είναι μη έγκυρο, αραιώστε το υπόλοιπο του δείγματος σε αναλογία 1 προς 8 με νερό από το σωληνάριο με την ένδειξη DIL, φροντίζοντας ώστε ο τελικός όγκος να είναι μεγαλύτερος από 40 μl, και υποβάλετε σε δοκιμασία αυτήν την αραιώση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω δοκιμασία.

SAMPLE_INT_CTRL
_EARLY_CT

Μη έγκυρο σωληνάριο μετάλλαξης — η τιμή HEX C_T είναι εξαιρετικά χαμηλή για το δείγμα (εσωτερικός μάρτυρας)

Εάν το δείγμα έδωσε έγκυρο αποτέλεσμα — δεν απαιτείται καμία ενέργεια.

Εάν το δείγμα έδωσε μη έγκυρο αποτέλεσμα, προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε τη δοκιμασία του δείγματος.

Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκχυλίστε το δείγμα από νέες τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για τη δοκιμασία της νέας εκχύλισης. Εάν το αποτέλεσμα είναι μη έγκυρο, επαναλάβετε αυτήν τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω δοκιμασία.

SAMPLE_INVALID_DATA

Μη έγκυρο σωληνάριο μετάλλαξης — δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στον εσωτερικό μάρτυρα.

Εάν το δείγμα έδωσε έγκυρο αποτέλεσμα — δεν απαιτείται καμία ενέργεια.

Εάν το δείγμα έδωσε μη έγκυρο αποτέλεσμα, προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε τη δοκιμασία του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκχυλίστε το δείγμα από νέες τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για τη δοκιμασία της νέας εκχύλισης. Εάν το αποτέλεσμα είναι μη έγκυρο, επαναλάβετε αυτήν τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν

| | | |
|---------------------------------|--|--|
| MUTATION_EARLY_CT | Μη έγκυρο σωληνάριο μετάλλαξης — η τιμή FAM C _T είναι εξαιρετικά χαμηλή για το δείγμα. | την εκτέλεση, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω δοκιμασία. |
| SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID | Το αποτέλεσμα ενός δείγματος για μία ή περισσότερες μεταλλάξεις είναι έγκυρο και θετικό, ενώ συγχρόνως τα αποτελέσματα του ίδιου δείγματος για μία ή περισσότερες μεταλλάξεις είναι μη έγκυρα (προειδοποίηση, όχι σφάλμα). | Εάν το δείγμα έδωσε έγκυρο αποτέλεσμα — δεν απαιτείται καμία ενέργεια. Εάν το δείγμα έδωσε μη έγκυρο αποτέλεσμα, προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε τη δοκιμασία του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκχυλίστε το δείγμα από νέες τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για τη δοκιμασία της νέας εκχύλισης. Εάν το αποτέλεσμα είναι μη έγκυρο, επαναλάβετε αυτήν τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω δοκιμασία. |
| | | Καμία. |

Ποιοτικός έλεγχος

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ελέγχεται ως προς κάποιες προκαθορισμένες προδιαγραφές ώστε να διασφαλίζεται η σταθερή ποιότητα των προϊόντων.

Περιορισμοί

Η δοκιμασία έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση 7 μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου KRAS. Τα δείγματα με αποτελέσματα που αναφέρονται ως «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη) ενδέχεται να φέρουν μεταλλάξεις KRAS που δεν ανιχνεύονται από τον προσδιορισμό (π.χ. 13CYS).

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων εξαρτάται από την ακεραιότητα του δείγματος και την ποσότητα του ενισχύσιμου DNA που υπάρχει στο δοκίμιο. Η διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί σε περίπτωση που η αρχική αξιολόγηση του DNA στο δείγμα υποδεικνύει ότι η ποσότητα δεν είναι επαρκής ή ότι είναι εξαιρετικά μεγάλη για την ανάλυση της μετάλλαξης.

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit χρησιμοποιείται σε μια διαδικασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Όπως συμβαίνει σε όλες τις διαδικασίες PCR, τα δείγματα ενδέχεται να επιμολυνθούν από εξωτερικές πηγές DNA στο περιβάλλον της δοκιμασίας και το DNA στον θετικό μάρτυρα. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων μείγματος αντίδρασης.

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit προορίζεται μόνο για τη διάκριση μεταξύ μεταλλαγμένου και άγριου τύπου. Η δοκιμασία είναι σχεδιασμένη έτσι, ώστε κάθε αντίδραση μετάλλαξης να είναι πιο ευαίσθητη για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη που αξιολογείται. Ωστόσο, σε δείγματα στα οποία ανιχνεύεται μια μετάλλαξη, ενδέχεται να προκύψει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλες αντιδράσεις μετάλλαξης. Εάν τα αποτελέσματα είναι θετικά για περισσότερες από μία αντιδράσεις μετάλλαξης, λαμβάνεται υπόψη το αποτέλεσμα με τη χαμηλότερη τιμή ΔC_T.

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έχει επικυρωθεί για χρήση μόνο με ιστό FFPE CRC και NSCLC.

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έχει επικυρωθεί για χρήση μόνο με το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Μόνο το Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM έχει επικυρωθεί για χρήση με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Αναλυτικά στοιχεία απόδοσης

Τα ειδικά χαρακτηριστικά απόδοσης του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit προσδιορίστηκαν βάσει μελετών σε δείγματα ιστού FFPE που συλλέχθηκαν από ασθενείς με CRC και ασθενείς με NSCLC. Οι μέθοδοι δειγματοληψίας για τα δείγματα NSCLC συμπεριλάμβαναν βιοψία με κόππουσα βελόνη (core needle biopsy, CNB), αναρρόφηση με λεπτή βελόνη (fine needle aspiration, FNA) και εκτομή. Για κάθε τύπο δείγματος, χρησιμοποιήθηκαν 8 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές FFPE, εκ των οποίων οι 7 φέρουν γνωστές μεταλλάξεις KRAS που ανιχνεύονται με αυτόν τον προσδιορισμό και η μία φέρει γονίδιο KRAS άγριου τύπου (δηλ. δεν φέρει μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13). Η κατάσταση μετάλλαξης των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε βάσει της αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger.

Οριακή τιμή αποκοπής

Υποβλήθηκαν σε δοκιμασία 225 δείγματα FFPE με χρήση μεθόδου που συμμορφώνεται με τις οδηγίες που περιλαμβάνονται στο CLSI EP17-A (2004) (8) για τον καθορισμό των οριακών τιμών αποκοπής για τον προσδιορισμό. Το εύρος τιμών C_T αντίδρασης μάρτυρα ορίστηκε μεταξύ 21,92 και 32,00. Οι οριακές τιμές αποκοπής, οι οποίες βασίζονται στην τιμή C_T της αντίδρασης μάρτυρα που αφαιρείται από την τιμή C_T των αντιδράσεων μετάλλαξης (ΔC_T), φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7 Καθορισμένες οριακές τιμές αποκοπής για κάθε προσδιορισμό μετάλλαξης.

| | Προσδιορισμός μετάλλαξης | | | | | | |
|--|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 12ALA | 12ASP | 12ARG | 12CYS | 12SER | 12VAL | 13ASP |
| Οριακή τιμή αποκοπής ($\leq \Delta C_T$) | 8,0 | 6,6 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 7,5 | 7,5 |

Όριο τυφλού

Για την αξιολόγηση των επιδόσεων του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit απουσία μήτρας θετικής για μετάλλαξη και για να διασφαλιστεί ότι ένα τυφλό δείγμα δεν δημιουργεί αναλυτικό σήμα που ενδέχεται να υποδεικνύει χαμηλή συγκέντρωση μετάλλαξης, αξιολογήθηκαν δείγματα χωρίς μήτρα. Τα αποτελέσματα δεν κατέδειξαν ανιχνεύσιμες τιμές C_T μάρτυρα ή μετάλλαξης σε κανένα σωληνάριο αντίδρασης μετάλλαξης ή μάρτυρα (οι τιμές C_T του εσωτερικού μάρτυρα ήταν όλες έγκυρες).

Σύγκριση προς την αναλυτική μέθοδο αναφοράς: CRC

Εκπονήθηκαν δύο μελέτες, οι οποίες κατέδειξαν συνέπεια στην κατάσταση μετάλλαξης των δειγμάτων CRC που εξετάστηκαν με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, η οποία σχετίζεται με την αμφίδρομη αλληλούχηση. Συνολικά 137 από τα δείγματα FFPE έδωσαν έγκυρα αποτελέσματα τόσο με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit όσο και με την αμφίδρομη αλληλούχηση.

Τα συνολικά αποτελέσματα, εκτός από 6 μη επιτυχή δείγματα αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger, εμφανίζονται στον Πίνακα 8. Στον Πίνακα 9 παρατίθεται η ανάλυση συμφωνίας μεταξύ του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit και της αμφίδρομης αλληλούχησης.

Πίνακας 8. theascreen KRAS RGQ PCR Kit έναντι αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger

| | | Προσδιορισμός μετάλλαξης βάσει αμφίδρομης αλληλούχησης | | | | | | | | |
|---|---------------|--|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
| | | Αρν. | 12ALA | 12ARG | 12ASP | 12CYS | 12SER | 12VAL | 13ASP | Σύνολο |
| Προσδιορισμός theascreen KRAS RGQ PCR Kit | Αρνητικό | 80 | - | - | 1 | - | - | - | 1 | 82 |
| | Θετικό 12ALA | - | 3 | - | - | - | - | - | - | 3 |
| | Θετικό 12ARG | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 |
| | Θετικό 12ASP | - | - | - | 20 | - | - | - | - | 20 |
| | Θετικό 12CYS | - | - | - | - | 3 | - | - | - | 3 |
| | Θετικό 12SER | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 |
| | Θετικό 12VAL | 2 | - | - | - | - | - | 14 | - | 16 |
| | Θετικό 13ASP | 1 | - | - | - | - | - | - | 11 | 12 |
| | Σύνολο | 83 | 3 | 0 | 22 | 3 | 0 | 14 | 12 | 137 |

Πίνακας 9. Ανάλυση συμφωνίας

| Βαθμός συμφωνίας | Συχνότητα (%) | 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (ΔΕ) |
|------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Συνολική ποσοστιαία συμφωνία | 152/157 (96,82) | 93,69-98,44 |
| Θετική ποσοστιαία συμφωνία | 72/74 (96,30) | 92,63-98,63 |
| Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία | 80/83 (96,39) | 91,65-98,19 |

Μια δεύτερη μοναδική ομάδα δειγμάτων αξιολογήθηκε ως συμπληρωματική στα δεδομένα της πρώτης μελέτης. Συλλέχθηκε μια ομάδα 271 δειγμάτων CRC FFPE. 250 δείγματα άγνωστης κατάστασης μετάλλαξης και 21 δείγματα γνωστής κατάστασης μετάλλαξης για εμπλουτισμό των σπάνιων μεταλλάξεων, συγκρίθηκαν με την αμφίδρομη αλληλούχηση κατά Sanger, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η ανάλυση συμφωνίας διεξήχθη σε 247 δείγματα με έγκυρα αποτελέσματα τόσο με την αμφίδρομη αλληλούχηση όσο και με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Προέκυψαν 9 ασύμφωνα δείγματα. Η συνολική συμφωνία ήταν 96,82%. Τα δεδομένα υποστηρίζουν την ακρίβεια απόδοσης του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (Πίνακας 10 και Πίνακας 11).

Πίνακας 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έναντι αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger (δεύτερη μελέτη)

| | | Προσδιορισμός μετάλλαξης βάσει αμφίδρομης αλληλούχησης | | | | | | | | |
|---|---------------|--|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | | Αρν. | 12ALA | 12ARG | 12ASP | 12CYS | 12SER | 12VAL | 13ASP | Σύνολο |
| Προσδιορισμός <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit | Αρνητικό | 132 | - | - | - | - | 1 | - | - | 133 |
| | Θετικό 12ALA | - | 10 | - | - | - | - | - | - | 10 |
| | Θετικό 12ARG | 5 | - | 5 | - | - | - | - | - | 10 |
| | Θετικό 12ASP | - | - | - | 31 | - | - | - | - | 31 |
| | Θετικό 12CYS | 1 | - | - | - | 11 | - | - | - | 12 |
| | Θετικό 12SER | - | - | - | - | - | 13 | - | - | 13 |
| | Θετικό 12VAL | 2 | - | - | - | - | - | 25 | - | 27 |
| | Θετικό 13ASP | - | - | - | - | - | - | - | 11 | 11 |
| | Σύνολο | 140 | 10 | 5 | 31 | 11 | 14 | 25 | 11 | 247 |

Πίνακας 11. Ανάλυση συμφωνίας (δεύτερη μελέτη)

| Βαθμός συμφωνίας | Συχνότητα (%) | 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (ΔΕ) |
|------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Συνολική ποσοστιαία συμφωνία | 238/247 (96,36) | 93,73-98,09 |
| Θετική ποσοστιαία συμφωνία | 106/107 (99,07) | 95,64-99,95 |
| Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία | 132/140 (94,29) | 89,93-97,13 |

Σύγκριση προς την αναλυτική μέθοδο αναφοράς: NSCLC

Προκειμένου να καταδειχθεί η συνέπεια στην κατάσταση μετάλλαξης των δειγμάτων NSCLC που εξετάστηκαν με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit σε σύγκριση με την αμφίδρομη αλληλούχηση κατά Sanger, έγινε λήψη κλινικών δειγμάτων FFPE NSCLC μέσω εκτομής, CNB ή FNA. DNA εκχυλίστηκε από κάθε δείγμα πριν από την εξέταση με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία αυτή συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από αμφίδρομη αλληλούχηση κατά Sanger.

Συνολικά 360 δείγματα έδωσαν έγκυρο αποτέλεσμα τόσο με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit όσο και με αμφίδρομη αλληλούχηση κατά Sanger, με 340 δείγματα να παρουσιάζουν συμφωνία αποτελεσμάτων.

Ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit και της αμφίδρομης αλληλούχησης παρουσιάζεται στον Πίνακα 12. Δύο δείγματα έδωσαν διπλό προσδιορισμό μεταλλάξεων μέσω αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger. Καθώς η μία μετάλλαξη συνέπιπτε με το αποτέλεσμα του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, θεωρήθηκε ότι τα δείγματα αυτά παρουσίαζαν συμφωνία για τους σκοπούς των αναλύσεων συνολικής συμφωνίας, θετικής συμφωνίας και αρνητικής συμφωνίας (Πίνακας 13).

Πίνακας 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit έναντι αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger

| | | Προσδιορισμός μετάλλαξης βάσει αμφίδρομης αλληλούχησης | | | | | | | | |
|---|--------------------|--|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | | Αρν. | 12ALA | 12ARG | 12ASP | 12CYS | 12SER | 12VAL | 13ASP | Σύνολο |
| Προσδιορισμός <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit | Αρνητικό | 132 | - | - | - | - | 1 | - | - | 133 |
| | Θετικό 12ALA | - | 10 | - | - | - | - | - | - | 10 |
| | Θετικό 12ALA_12CYS | 5 | - | 5 | - | - | - | - | - | 10 |
| | Θετικό 12ARG | - | - | - | 31 | - | - | - | - | 31 |
| | Θετικό 12ASP | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Θετικό 12CYS | 1 | - | - | - | 11 | - | - | - | 12 |
| | Θετικό 12SER | - | - | - | - | - | 13 | - | - | 13 |
| | Θετικό 12VAL | 2 | - | - | - | - | - | 25 | - | 27 |
| | Θετικό 13ASP | - | - | - | - | - | - | - | 11 | 11 |
| | Σύνολο | 140 | 10 | 5 | 31 | 11 | 14 | 25 | 11 | 247 |

Πίνακας 13. Ανάλυση συμφωνίας

| Βαθμός συμφωνίας | Συχνότητα (%) | 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (ΔΕ) |
|------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Συνολική ποσοστιαία συμφωνία | 340/360 (94,44) | 92,03-96,29 |
| Θετική ποσοστιαία συμφωνία | 79/80 (98,75) | 94,21-99,94 |
| Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία | 261/280 (93,21) | 90,20-95,51 |

Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)

Το εύρος εργασίας για το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit βασίζεται στην ποσότητα του ενισχύσιμου DNA στο δοκίμιο, όπως καθορίστηκε από την τιμή C_T της αντίδρασης μάρτυρα. Το καθορισμένο εύρος εισαγωγής για τον προσδιορισμό ορίζεται από το προκαθορισμένο εύρος τιμών C_T του μάρτυρα που κυμαίνεται μεταξύ 21,92 και 32,00. Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) είναι το ελάχιστο ποσοστό του μεταλλαγμένου DNA που μπορεί να ανιχνευτεί σε υπόβαθρο άγριου τύπου, όταν το συνολικό ενισχύσιμο DNA είναι εντός του καθορισμένου εύρους εισαγωγής και μικρότερο από την οριακή τιμή κατωφλίου ΔC_T .

CRC

Διεξήχθη μια μελέτη για τον προσδιορισμό της τιμής LOD καθεμίας από τις 7 ειδικές για μετάλλαξη αντιδράσεις που περιλαμβάνονται στο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Για το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, το όριο του ανιχνεύσιμου μεταλλαγμένου DNA σε υπόβαθρο DNA άγριου τύπου ορίζεται ως ο κατώτερος συντελεστής αραίωσης στον οποίο το 95% των αντιγράφων της δοκιμασίας για κάθε θετικό για μετάλλαξη δείγμα προσδιορίστηκε ως θετικό.

Εφαρμόστηκαν μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης σε κάθε προσδιορισμό ξεχωριστά για τις ομάδες δεδομένων εισαγόμενου DNA χαμηλού και υψηλού επιπέδου. Σε αυτά τα μοντέλα, η μεταβλητή απόκρισης ήταν η δυαδική έξοδος της μετάλλαξης που ανιχνεύτηκε (ανίχνευση = 1) και της μετάλλαξης που δεν ανιχνεύτηκε (ανίχνευση = 0) ενώ η συνεχής επεξηγηματική μεταβλητή ήταν η αραίωση μετάλλαξης \log_2 %. Οι τιμές LOD υπολογίστηκαν ως ποσοστιαία αραίωση μετάλλαξης, που έδωσε μια προβλεπόμενη πιθανότητα ανίχνευσης 0,95 (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Τιμές LOD για κάθε προσδιορισμό μετάλλαξης με χρήση κυτταρικών σειρών FFPE

| Προσδιορισμός | LOD C₉₅ (ποσοστό του μεταλλαγμένου DNA σε DNA άγριου τύπου) |
|----------------------|---|
| 12ALA | 0,77 |
| 12ARG | 2,56 |
| 12ASP | 6,43 |
| 12CYS | 1,47 |
| 12SER | 5,65 |
| 12VAL | 1,60 |
| 13ASP | 6,42 |

NSCLC

Το LOD για τους προσδιορισμούς με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit προσδιορίστηκε και επαληθεύτηκε με χρήση ιστών CRC. Αυτά τα αποτελέσματα LOD έχουν επαληθευτεί εκ νέου για ιστό NSCLC.

Η μελέτη περιλάμβανε 2 μέρη. Στο μέρος 1, 60 αντίγραφα από 7 μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές FFPE NSCLC που αντιπροσώπευαν την κάθε μετάλλαξη αραιώθηκαν μέχρι το LOD του αντίστοιχου προσδιορισμού και υποβλήθηκαν σε δοκιμασία. Και τα 60 έγκυρα αντίγραφα κυτταρικών σειρών FFPE για κάθε δείγμα που αξιολογήθηκε έδειξαν ανίχνευση 100% για την αντίστοιχη αντίδραση μετάλλαξης στο αξιολογούμενο LOD.

Στο μέρος 2, 96 αντίγραφα κλινικών δειγμάτων FFPE NSCLC που αντιπροσώπευαν την κάθε μετάλλαξη με τις 3 μεθόδους δειγματοληψίας (εκτομή, CNB και FNA) εξετάστηκαν μετά από αραιώση μέχρι το LOD του αντίστοιχου προσδιορισμού.

Τα 96 έγκυρα αντίγραφα για τις μεταλλάξεις 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL και 13ASP έδωσαν σωστό προσδιορισμό σε ποσοστό 100%. Οι προσδιορισμοί για τις 12CYS και 12SER έδωσαν ανίχνευση 95,8% στο LOD.

Αυτό δείχνει ότι η τιμή LOD που είχε προσδιοριστεί προηγουμένως επαληθεύεται για όλους τους προσδιορισμούς μεταλλάξεων κατά την αξιολόγηση δειγμάτων ιστού NSCLC και κλινικών δειγμάτων FFPE NSCLC/κυτταρικών σειρών FFPE/δειγμάτων αντίστοιχων ασθενών.

Εισαγόμενο DNA και γραμμικότητα

Επίδραση του επιπέδου εισαγόμενου DNA πάνω στις τιμές ΔC_T

Όταν τα δείγματα σε διαφορετικά επίπεδα ολικού DNA περιέχουν την ίδια αναλογία μεταλλαγμένου DNA, αναμένεται οι τιμές μέτρησης ΔC_T να παραμένουν σταθερές. Χρησιμοποιήθηκε DNA που εκχυλίστηκε από 8 κυτταρικές σειρές FFPE για την προετοιμασία δεξαμενών DNA με τη χαμηλότερη δυνατή τιμή C_T στην αντίδραση μάρτυρα.

Το εύρος αραίωσης για κάθε αντίδραση μετάλλαξης και η μέση τιμή ΔC_T που λήφθηκε από τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15 και τον Πίνακα 16. Οι συνολικές τιμές ΔC_T παρουσιάζουν συμφωνία σε ολόκληρο το εύρος εργασίας του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit για όλους τους προσδιορισμούς, γεγονός που δείχνει ότι το επίπεδο DNA δεν επηρεάζει την ορθότητα του προσδιορισμού των μεταλλάξεων των δειγμάτων.

Πίνακας 15. Επίδραση εισαγωγής DNA στις τιμές ΔC_T στο εύρος τιμών C_T της αντίδρασης μάρτυρα εισαγωγής — κυτταρικές σειρές CRC FFPE

| Προσδιορισμός | ΔC_T | | | | |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Αραίωση 1 ~20–21 C_T | Αραίωση 2 ~23–24 C_T | Αραίωση 3 ~26–27 C_T | Αραίωση 4 ~29–30 C_T | Αραίωση 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 |

* Ο συνολικός αριθμός των αντιγράφων για το 12ASP ήταν 27.

Πίνακας 16. Επίδραση της εισαγωγής DNA στις τιμές ΔC_T στο εύρος τιμών C_T της αντίδρασης μάρτυρα εισαγωγής — δείγματα NSCLC FFPE

| Προσδιορισμός | ΔC _T | | | | |
|---------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Αραίωση 1 ~20–21 C _T | Αραίωση 2 ~23–24 C _T | Αραίωση 3 ~26–27 C _T | Αραίωση 4 ~29–30 C _T | Αραίωση 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 | —* |

* Δεν ελήφθη C_T για την αντίδραση μετάλλαξης λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του DNA και, συνεπώς, δεν υπολογίστηκε ΔC_T.

Γραμμικότητα/απόδοση της ενίσχυσης ως συνάρτηση της εισαγωγής DNA

Καταδείχθηκε η γραμμικότητα και η απόδοση της ενίσχυσης της αντίδρασης PCR για κάθε αντίδραση μετάλλαξης, σε σχέση με την αντίδραση μάρτυρα, στο εύρος εργασίας του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Η απόδοση της ενίσχυσης υπολογίστηκε για καθεμία από τις αντιδράσεις προσδιορισμού μετάλλαξης και για την αντίδραση μάρτυρα, με τον τύπο $[2(-1/κλίση)] - 1$.

Η απόδοση ενίσχυσης του μάρτυρα σε σύγκριση με την αντίδραση προσδιορισμού μετάλλαξης δείχνει ότι το ΔC_T, και άρα και ο προσδιορισμός της μετάλλαξης, είναι σταθερά σε ολόκληρο το εύρος εργασίας του προσδιορισμού. Μια σύνοψη των δεδομένων παρουσιάζεται στον Πίνακα 17 και τον Πίνακα 18.

Γραμμικότητα/απόδοση της ενίσχυσης ως συνάρτηση της ποσοστιαίας μετάλλαξης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης διαδοχικά αραιωμένου, θετικού για μετάλλαξη δείγματος στην απόδοση της ενίσχυσης στο εύρος εργασίας του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, ξεκινώντας με επίπεδα εισαγωγής της τιμής C_T σε περίπου 22–23 C_T .

Τα προϊόντα εκχύλισης DNA από κυτταρικές σειρές FFPE CRC και δείγματα NSCLC αξιολογήθηκαν αρχικά βάσει ενδείξεων OD πριν από τη διεξαγωγή της αντίδρασης PCR με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν αποθέματα DNA σε τιμή C_T της αντίδρασης μάρτυρα που αντιστοιχεί σε περίπου 23 C_T . Στα αποθέματα πραγματοποιήθηκαν διπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις κάθε φορά με τη χρήση DNA άγριου τύπου, ώστε να διατηρηθεί σταθερό το ολικό DNA άγριου τύπου, διαφοροποιώντας το ποσοστό μεταλλαγμένου DNA στη μήτρα.

Προετοιμάστηκαν δεξαμενές επαρκούς ποσότητας DNA για 6 αντίγραφα ανά μετάλλαξη. Υπολογίστηκαν τα δεδομένα C_T και ΔC_T για κάθε μετάλλαξη σε κάθε σημείο αραιώσης. Εφαρμόστηκε ένα μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης με C_T αντίδρασης αραιώσης έναντι αραιώσης εισαγωγής DNA \log_2 . Η μελέτη έδειξε ότι η αραιώση των μεταλλάξεων σε υπόβαθρο σταθερής συγκέντρωσης DNA άγριου τύπου οδήγησε σε απόδοση ενίσχυσης που δεν βρισκόταν σημαντικά εκτός των τιμών οι οποίες προσδιορίστηκαν στην παραπάνω μελέτη γραμμικότητας.

Πίνακας 17. Απόδοση ενίσχυσης στις αντιδράσεις μάρτυρα και μεταλλάξης: Κυτταρικές σειρές CRC

| Δείγμα | | Σημείο τομής | Τυπικό σφάλμα σημείου τομής | Υπολογισμένη κλίση | Τυπικό σφάλμα (κλίση) | Κάτω αμφίπλευρο όριο εμπιστοσύνης 95% (κλίση) | Άνω αμφίπλευρο όριο εμπιστοσύνης 95% (κλίση) | Απόδοση ενίσχυσης | Διαφορά στην απόδοση ενίσχυσης |
|--------|------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---|--|----------------------|---|
| 12ALA | C _T μάρτυρα | 21,060 | 0,060 | -1,008 | 0,007 | -1,023 | -0,993 | 0,989 | 0,03 |
| | C _T 12ALA | 22,476 | 0,103 | -0,987 | 0,013 | -1,013 | -0,961 | 1,019 | |
| 12ARG | C _T μάρτυρα | 20,825 | 0,083 | -1,035 | 0,01 | -1,056 | -1,014 | 0,954 | 0,056 |
| | C _T 12ARG | 23,237 | 0,083 | -0,993 | 0,011 | -1,016 | -0,97 | 1,01 | |
| 12ASP | C _T μάρτυρα | 20,385 | 0,13 | -1,013 | 0,16 | -1,046 | -0,98 | 0,982 | -0,003 |
| | C _T 12ASP | 21,347 | 0,065 | -1,015 | 0,008 | -1,032 | -0,999 | 0,979 | |
| 12CYS | C _T μάρτυρα | 23,437 | 0,063 | -0,981 | 0,01 | -1,003 | -0,96 | 1,026 | 0,032 |
| | C _T 12CYS | 24,289 | 0,039 | -0,961 | 0,006 | -0,974 | -0,947 | 1,058 | |
| 12SER | C _T μάρτυρα | 22,568 | 0,050 | -1,003 | 0,008 | -1,02 | -0,986 | 0,996 | 0,105 |
| | C _T 12SER | 25,212 | 0,087 | -0,934 | 0,014 | -0,963 | -0,904 | 1,101 | |
| 12VAL | C _T μάρτυρα | 21,208 | 0,047 | -0,995 | 0,006 | -1,007 | -0,983 | 1,007 | 0,033 |
| | C _T 12VAL | 21,532 | 0,043 | -0,972 | 0,005 | -0,983 | -0,961 | 1,04 | |
| 13ASP | C _T μάρτυρα | 23,207 | 0,056 | -1,001 | 0,009 | -1,02 | -0,982 | 0,999 | 0,145 |
| | C _T 12ASP | 26,466 | 0,106 | -0,909 | 0,017 | -0,945 | -0,873 | 1,144 | |

Πίνακας 18. Απόδοση ενίσχυσης στις αντιδράσεις μάρτυρα και μετάλλαξης: Δείγματα NSCLC

| Δείγμα | | Σημείο τομής | Τυπικό σφάλμα σημείου τομής | Υπολογισμένη κλίση | Τυπικό σφάλμα (κλίση) | Κάτω αμφίπλευρο όριο εμπιστοσύνης 95% (κλίση) | Άνω αμφίπλευρο όριο εμπιστοσύνης 95% (κλίση) | Απόδοση ενίσχυσης | Διαφορά στην απόδοση ενίσχυσης |
|--------|------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---|--|----------------------|---|
| 12ALA | C _T μάρτυρα | 22,74 | 0,04 | -0,15 | 0,02 | -0,19 | -0,11 | 0,94 | 0,069 |
| | C _T 12ALA | 24,11 | 0,16 | -1,06 | 0,07 | -1,20 | -0,93 | 1,01 | |
| 12ARG | C _T μάρτυρα | 21,92 | 0,03 | -0,07 | 0,01 | -0,09 | -0,05 | 0,94 | 0,093 |
| | C _T 12ARG | 24,44 | 0,02 | -0,98 | 0,01 | -0,96 | -0,96 | 1,04 | |
| 12ASP | C _T μάρτυρα | 21,73 | 0,05 | -0,13 | -0,02 | -0,17 | -0,08 | 0,96 | -0,001 |
| | C _T 12ASP | 22,69 | 0,03 | -0,97 | 0,01 | -1,00 | -0,95 | 0,96 | |
| 12CYS | C _T μάρτυρα | 21,73 | 0,04 | -0,11 | 0,01 | -0,14 | -0,08 | 0,98 | 0,019 |
| | C _T 12CYS | 22,77 | 0,03 | -1,01 | 0,01 | -1,03 | -0,99 | 1,00 | |
| 12SER | C _T μάρτυρα | 22,03 | 0,05 | -0,06 | 0,02 | -0,10 | -0,02 | 0,97 | 0,127 |
| | C _T 12SER | 25,34 | 0,03 | -0,97 | 0,01 | -0,99 | 0,94 | 1,09 | |
| 12VAL | C _T μάρτυρα | 22,13 | 0,04 | -0,03 | 0,02 | -0,07 | 0,01 | 0,92 | 0,011 |
| | C _T 12VAL | 23,34 | 0,08 | -0,95 | 0,03 | -1,01 | -0,88 | 0,91 | |
| 13ASP | C _T μάρτυρα | 22,63 | 0,02 | -0,02 | 0,01 | 0,001 | -0,04 | 0,94 | 0,066 |
| | C _T 12ASP | 25,14 | 0,07 | -0,94 | 0,03 | -1,00 | -0,88 | 1,01 | |

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης δυνητικά παρεμβαλλόμενων ουσιών στις επιδόσεις του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Η αξιολόγηση αυτή πραγματοποιήθηκε αναλύοντας την επίδραση κάθε ουσίας, μέσω πειραμάτων εξωγενούς προσθήκης σε διάφορες συγκεντρώσεις, στις τιμές ΔC_T και στην κατάσταση μετάλλαξης των δειγμάτων δοκιμασίας. Οι δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία εκχύλισης του DNA και δοκιμάστηκαν ήταν οι εξής: Buffer AL, Buffer ATL, αιθανόλη, κηρός παραφίνης, πρωτεΐνωση Κ, ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης Wash Buffer AW1, ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης Wash Buffer AW2 και ξυλόλιο. Το τελικό ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης από το kit, το Buffer ATE, εξετάστηκε επίσης ως μάρτυρας τυφλού.

Στις συγκεντρώσεις που αναμένεται να προκύψουν κατά την κανονική χρήση, καμία από τις πιθανώς παρεμβαλλόμενες ουσίες που αξιολογήθηκαν δεν επηρεάζει την ικανότητα του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit να διακρίνει τα θετικά από τα αρνητικά για μετάλλαξη δείγματα.

Εκτός από τη μελέτη των παρεμβαλλόμενων ουσιών, αξιολογήθηκε η πιθανή επίδραση της νέκρωσης σε κλινικά δείγματα, για να προσδιοριστεί εάν τυχόν υψηλά επίπεδα νεκρωτικού ιστού σε νεοπλασματικά δείγματα επηρεάζουν την ικανότητα δημιουργίας έγκυρων δεδομένων. Από τα συνολικά 421 δείγματα που αξιολογήθηκαν στο πλαίσιο των μελετών σύγκρισης προς την αναλυτική μέθοδο αναφοράς, τα 29 δείγματα παρουσίασαν νέκρωση σε επίπεδο > 50%, όπως προσδιορίστηκε από την ιστοπαθολογική εξέταση. Από αυτά τα 29 δείγματα, τα 28 έδωσαν έγκυρα αποτελέσματα που ήταν σύμφωνα με την αμφίδρομη αλληλούχηση κατά Sanger. Ένα μόνο αποτέλεσμα ήταν άκυρο, λόγω ανεπαρκούς ποσότητας DNA.

Διασταυρούμενη επιμόλυνση

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της έκτασης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης, η οποία θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα στα δείγματα DNA, χρησιμοποιώντας το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Στις πιθανές αιτίες διασταυρούμενης επιμόλυνσης περιλαμβάνονται οι εξής:

- Εκχύλιση δείγματος (π.χ. απόξεση αντικειμενοφόρων πλακών)
- Διανομή δειγμάτων με πιπέτα
- Σφράγιση («πωματισμός») σωληναρίων δείγματος
- Επιμόλυνση των αντιδραστηρίων του kit κατά τη διάρκεια της χρήσης
- Φόρτωση των σωληναρίων προσδιορισμού στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μήτρες FFPE: η μήτρα άγριου τύπου και η μήτρα 12ALA (καθώς η αντίδραση 12ALA είναι η αντίδραση με τη χαμηλότερη τιμή LOD στο kit).

Η μελέτη αποτελούνταν από 10 εκτελέσεις PCR, σχεδιασμένες για τη διερεύνηση της πιθανότητας επιμόλυνσης τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μεταξύ των εκτελέσεων με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Σε αυτές τις εκτελέσεις δοκιμασιών, χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια με DNA άγριου τύπου για την ανίχνευση επιμόλυνσης από μεταλλαγμένο DNA.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν κατέδειξαν ανιχνεύσιμη επιμόλυνση σε κανένα από τα προϊόντα εκχύλισης DNA άγριου τύπου που προορίζονταν για την ανίχνευση διασταυρούμενης επιμόλυνσης.

Αποκλειστικότητα/διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit αποτελείται από 8 ξεχωριστές αντιδράσεις: μία μεμονωμένη αντίδραση μάρτυρα που ανιχνεύει τη μη πολυμορφική περιοχή του γονιδίου KRAS και επτά ειδικές για μετάλλαξη αντιδράσεις. Δεν υπάρχει καμία αντίδραση που να υπολογίζει συγκεκριμένα την ακολουθία KRAS άγριου τύπου στο κωδικόνιο 12 ή 13. Το αποτέλεσμα KRAS «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη) (δηλ. άγριου τύπου) προσδιορίζεται από την απουσία οποιασδήποτε από τις 7 μεταλλάξεις που οδηγούν σε θετικό για μετάλλαξη αποτέλεσμα.

Επομένως, είναι απαραίτητο να καταδειχθεί ο βαθμός μη ειδικής ενίσχυσης ή η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα που παρατηρείται σε κάθε αντίδραση με περίσσειες ποσότητες DNA άγριου τύπου KRAS, για να διασφαλιστεί ότι δεν προκύπτουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Αντίστοιχα, αξιολογείται η μη ειδική ενίσχυση των μεταλλάξεων KRAS που δεν προορίζονται για ανίχνευση από τον προσδιορισμό. Αυτό αποδεικνύει ότι ο βαθμός της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των αντιδράσεων μετάλλαξης δεν οδηγεί σε εσφαλμένους προσδιορισμούς μετάλλαξης σε περίπτωση που υπάρχει περίσσεια ποσότητα μεταλλαγμένου DNA. Καθώς η εισαγωγή DNA για αυτόν τον προσδιορισμό βασίζεται στο εύρος τιμών C_T μάρτυρα (21,92–32,00), η υψηλότερη συγκέντρωση της εισαγωγής DNA βασίζεται στην ύπαρξη τιμής C_T μάρτυρα περίπου 22.

Μη ειδική ενίσχυση/διασταυρούμενη αντιδραστικότητα: KRAS DNA άγριου τύπου

Μελετήθηκε ο βαθμός μη ειδικής ενίσχυσης DNA άγριου τύπου ανά μείγμα αντίδρασης σχεδιασμένο για την ενίσχυση συγκεκριμένων μεταλλάξεων. Συνολικά 60 αντίγραφα DNA άγριου τύπου από κυτταρική σειρά FFPE και 60 δείγματα NSCLC αξιολογήθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση εισαγόμενου ενισχύσιμου DNA με χρήση του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Οι τιμές C_T μάρτυρα ήταν περίπου 22–23. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές ΔC_T υπερέβαιναν τις καθορισμένες οριακές τιμές αποκοπής και ότι τουλάχιστον 95% των αντιγράφων άγριου τύπου προσδιορίστηκαν σωστά.

Μη ειδική ενίσχυση/διασταυρούμενη αντιδραστικότητα/αποκλειστικότητα: KRAS DNA θετικό για μετάλλαξη

Μεταλλαγμένα δείγματα με υψηλή συγκέντρωση εισαγόμενου DNA υποβλήθηκαν σε δοκιμασία έναντι όλων των μειγμάτων αντίδρασης. Παρασκευάστηκαν δείγματα DNA από καθεμία από τις κυτταρικές σειρές FFPE CRC και NSCLC, έτσι ώστε η τιμή C_T της αντίδρασης μάρτυρα να αντιστοιχεί περίπου στην τιμή 23. Από τις αραιώσεις αυτές, αξιολογήθηκαν 6 αντίγραφα από κάθε δείγμα μετάλλαξης. Το ποσοστό της μετάλλαξης στο δείγμα διέπεται από το ποσοστό της μετάλλαξης στην κυτταρική σειρά DNA.

Οι μέσες τιμές ΔC_T που παρουσιάζονται στον Πίνακα 19 και τον Πίνακα 20 δείχνουν ότι υπάρχει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των αντιδράσεων μετάλλαξης. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι προσδιορίστηκε η σωστή μετάλλαξη με την αντίστοιχη αντίδραση μετάλλαξης (δηλαδή η χαμηλότερη τιμή ΔC_T ήταν ο σωστός προσδιορισμός μετάλλαξης). Όλες οι υπόλοιπες περιπτώσεις της δοκιμασίας είτε δεν ανιχνεύτηκαν είτε ήταν εκτός της τιμής κατωφλίου ΔC_T .

Πίνακας 19. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (ΔCT) μεταξύ αντιδράσεων μετάλλαξης με χρήση DNA κυτταρικών σειρών CRC FFPE στο υψηλό εύρος εισαγωγής

| Μεταλλαγμένο DNA | Οριακή τιμή αποκοπής | ΔC _T προσδιορισμού | | | | | | |
|------------------|----------------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | | 12ALA | 12ASP | 12ARG | 12CYS | 12SER | 12VAL | 13ASP |
| 12ALA | 8 | 1,42* | 12,66 | Δ/E | 5,81† | 2,78† | 6,31† | 13,21 |
| 12ASP | 6,6 | 12,56 | 2,42* | Δ/E | Δ/E | 13,44 | 11,21 | 13,55 |
| 12ARG | 8 | 13,12 | 11,56 | 1,12* | 11,42 | Δ/E | 13,43 | 12,66 |
| 12CYS | 8 | 14,2 | 12,48 | 9,23 | 0,98* | Δ/E | 7,96† | 12,88 |
| 12SER | 8 | Δ/E | 13,39 | 13,31 | Δ/E | 3,02* | 12,99 | 13,97 |
| 12VAL | 7,5 | 6,83† | Δ/E | Δ/E | Δ/E | 13,38 | 0,28* | 13,74 |
| 13ASP | 7,5 | Δ/E | 13,29 | 13,89 | Δ/E | Δ/E | 14,36 | 4,5* |

ΔE: Καμία διασταυρούμενη αντίδραση.

* Τιμές ΔC_T από αντίστοιχες αντιδράσεις.

† ΔC_T από αντιδράσεις με διασταυρούμενη αντίδραση κάτω από την οριακή τιμή αποκοπής.

Πίνακας 20. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (ΔCT) μεταξύ αντιδράσεων μετάλλαξης με χρήση DNA κυτταρικών σειρών NSCLC FFPE στο υψηλό εύρος εισαγωγής

| Μεταλλαγμένο DNA | Οριακή τιμή αποκοπής | ΔC _T προσδιορισμού | | | | | | |
|------------------|----------------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 12ALA | 12ASP | 12ARG | 12CYS | 12SER | 12VAL | 13ASP |
| 12ALA | 8 | 1,31* | 12,8 | Δ/E | 5,01† | 2,26† | 5,57† | 12,65 |
| 12ASP | 6,6 | 12,61 | 1,66* | Δ/E | Δ/E | Δ/E | 10,3 | 12,60 |
| 12ARG | 8 | 12,98 | 11,08 | 0,81* | 11,24 | Δ/E | 12,66 | 12,62 |
| 12CYS | 8 | Δ/E | 12,22 | 7,84† | 0,56* | Δ/E | 13,06 | 11,84 |
| 12SER | 8 | Δ/E | 12,87 | 13,21 | Δ/E | 1,93* | 13,25 | 12,93 |
| 12VAL | 7,5 | 5,93† | 14,29 | Δ/E | Δ/E | 13,14 | 0,45* | 12,39 |
| 13ASP | 7,5 | Δ/E | Δ/E | Δ/E | Δ/E | Δ/E | Δ/E | 2,02* |

ΔE: Καμία διασταυρούμενη αντίδραση.

* Τιμές ΔC_T από αντίστοιχες αντιδράσεις.

† ΔC_T από αντιδράσεις με διασταυρούμενη αντίδραση κάτω από την οριακή τιμή αποκοπής.

Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα

Σκοποί της μελέτης αυτής ήταν να καταδειχθεί η ακρίβεια του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, εντός του ίδιου εργαστηρίου (επαναληψιμότητα) και μεταξύ εργαστηρίων (αναπαραγωγιμότητα). Περιγράφεται τόσο η ορθότητα των αποτελεσμάτων προσδιορισμού μεταλλάξεων όσο και η ακρίβεια των τιμών ΔC_T (διαφορά τιμών C_T μεταξύ αντίδρασης μετάλλαξης και αντίδρασης μάρτυρα).

CRC

Για την αξιολόγηση αυτή χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα CRC. Με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit εξετάστηκε ένα δείγμα άγριου τύπου και ένα δείγμα για κάθε μετάλλαξη, με 2 χειριστές σε καθένα από τα 3 κέντρα να αναλύουν όλα τα δείγματα και τους μάρτυρες από 3 παρτίδες *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, καθημερινά επί 5 ημέρες, με 2 εκτελέσεις ανά ημέρα και με 2 αντίγραφα κάθε δείγματος σε κάθε εκτέλεση. Αναλύθηκαν και οι τιμές C_T και ΔC_T που λήφθηκαν για κάθε αντίδραση σε κάθε δείγμα, με χρήση της ανάλυσης διασποράς δειγμάτων.

Η αναπαραγωγιμότητα του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit καταδείχθηκε για τα δείγματα μετάλλαξης χαμηλού επιπέδου ($3 \times LOD$) και για τα δείγματα άγριου τύπου, με τουλάχιστον 39/40 σωστές περιπτώσεις προσδιορισμού μετάλλαξης για όλους τους προσδιορισμούς σε πολλαπλές παρτίδες, πλατφόρμες και χειριστές, τόσο εντός του ίδιου εργαστηρίου όσο και μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Αναφέρθηκε συνολικά και εντός κάθε κέντρου η υπολογιζόμενη αναλογία δειγμάτων $3 \times LOD$ που έδωσαν αποτέλεσμα μετάλλαξης και άγριου τύπου. Σε όλους τους προσδιορισμούς και τους συνδυασμούς δειγμάτων, τουλάχιστον τα 79 στα 80 αντίγραφα έδωσαν σωστό προσδιορισμό μετάλλαξης (Πίνακας 21).

Πίνακας 21. Συνολικοί σωστοί προσδιορισμοί

| Δείγμα | Σωστοί προσδιορισμοί ανά προσδιορισμό μετάλλαξης | | | | | | |
|--------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 12ALA | 12ARG | 12ASP | 12CYS | 12SER | 12VAL | 13ASP |
| Μετάλλαξη $3 \times LOD$ | 79/80 | 80/80 | 80/80 | 79/80 | 80/80 | 80/80 | 80/80 |
| Άγριου τύπου (χαμηλό) | 80/80 | 79/80 | 80/80 | 80/80 | 79/80 | 79/80 | 80/80 |

NSCLC

Για καθεμία από τις 7 μεταλλάξεις KRAS NSCLC χρησιμοποιήθηκαν 3 δείγματα που αντιπροσώπευαν καθεμία από τις 3 μεθόδους δειγματοληψίας (εκτομή, CNB και FNA). Επιπλέον 6 κλινικά δείγματα άγριου τύπου (2 για καθεμία από τις 3 μεθόδους δειγματοληψίας) χρησιμοποιήθηκαν για να παραχθούν δεξαμενές DNA άγριου τύπου για αραίωση.

Τα διάφορα εκχυλίσματα για καθένα από τα δείγματα μετάλλαξης αναμείχθηκαν προκειμένου να δημιουργηθεί μια ενιαία δεξαμενή δειγμάτων ανά μετάλλαξη. Κάθε δεξαμενή δειγμάτων μετάλλαξης αραιώθηκε προκειμένου να παραχθούν δείγματα δοκιμασίας με επίπεδα μετάλλαξης $1 \times \text{LOD}$ και $3 \times \text{LOD}$.

Τα εργαστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή βρίσκονταν σε 3 διαφορετικά κέντρα. Οι εργαστηριακές συνθήκες σε κάθε κέντρο μεταβάλλονταν μέσω της χρήσης 2 οργάνων Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 2 χειριστών, 2 παρτίδων του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit και 2 εκτελέσεων ανά ημέρα (ανά χειριστή) σε διάστημα 16 μη διαδοχικών ημερών.

Σε όλους τους προσδιορισμούς και τους συνδυασμούς δειγμάτων, τουλάχιστον τα 284 από τα 288 αντίγραφα έδωσαν σωστό προσδιορισμό μετάλλαξης. Το συνολικό ποσοστό ορθών προσδιορισμών, για όλους τους προσδιορισμούς συγκεντρωτικά στην ομάδα $1 \times \text{LOD}$, ήταν 100%. Το συνολικό ποσοστό ορθών προσδιορισμών, για όλους τους προσδιορισμούς συγκεντρωτικά στην ομάδα $3 \times \text{LOD}$, ήταν 99,6%. Το συνολικό ποσοστό ορθών προσδιορισμών για τα δείγματα χωρίς ανιχνευόμενη μετάλλαξη (άγριου τύπου) ήταν 100% (Πίνακας 22).

Πίνακας 22. Σωστοί προσδιορισμοί για 1 x LOD, 3 x LOD και άγριου τύπου

| Επίπεδο μετάλλαξης | Προσδιορισμός | Σωστοί προσδιορισμοί | Σωστοί προσδιορισμοί, % | Κάτω αμφίπλευρο 90% ΔΕ |
|--------------------|---------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
| 1 x 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 x 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 |
| Άγριου τύπου | | 285/285 | 100 | 98,95 |

Διαφοροποίηση χειρισμού δειγμάτων

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της μεταβλητότητας στον χειρισμό των δειγμάτων, και συγκεκριμένα στην εκχύλιση του DNA, πάνω στο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Αυτή η μελέτη συμπληρώνει τη μελέτη επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας, αναλύοντας τη μεταβλητότητα στον χειρισμό δειγμάτων κατά τη μελέτη των ίδιων τομών κλινικών δειγμάτων FFPE και κυτταρικών σειρών FFPE σε 3 κέντρα πριν από εξέταση με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CRC

Τριάντα διαδοχικές τομές 5 μm ελήφθησαν από καθένα από τα 10 δείγματα FFPE CRC (3 άγριου τύπου και 1 ανά μετάλλαξη). Οι τομές τυχαιοποιήθηκαν σε 1 από τα 3 κέντρα εξέτασης, επομένως κάθε κέντρο έλαβε 10 τομές ανά δείγμα FFPE (συνολικά 100 τομές). Από τις 300 εκχυλίσεις DNA που υποβλήθηκαν σε δοκιμασία, τα 298 δείγματα ήταν έγκυρα. Υπήρχε συμφωνία 99,33% όσον αφορά τους προσδιορισμούς μετάλλαξης KRAS μεταξύ των 3 κέντρων.

Μια σύγκριση των μέσων τιμών ΔC_T κατά κέντρο για δείγματα μετάλλαξης και άγριου τύπου κατέδειξε πολύ στενή συμφωνία για τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν τη συμφωνία της διαδικασίας εκχύλισης DNA και της επεξεργασίας δειγμάτων σε συνδυασμό με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

NSCLC

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 13 κλινικά δείγματα NSCLC (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL και 3 άγριου τύπου) και 4 δείγματα κυτταρικών σειρών FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER και 13ASP). Τα δείγματα αντιπροσώπευαν τις διαφορετικές μεθόδους δειγματοληψίας: χειρουργική εκτομή, FNA και CNB. Κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν για να αντιπροσωπευτούν οι σπάνιες μεταλλάξεις, για τις οποίες δεν υπήρχε διαθέσιμος κλινικός ιστός NSCLC.

Οι 3 ομάδες των 20 τομών FFPE κατανεμήθηκαν κατόπιν τυχαία στα 3 κέντρα. Σε καθένα από τα 3 κέντρα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA σε μια παρτίδα 20 τομών FFPE (10 ζεύγη) ανά δείγμα μετάλλαξης και άγριου τύπου.

Αφού εξετάστηκαν όλα τα παρασκευάσματα δειγμάτων σε 3 χωριστά κέντρα δοκιμασίας με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, καθεμία από τις 7 μεταλλάξεις και το δείγμα άγριου τύπου ταυτοποιήθηκαν ως προς τον σωστό προσδιορισμό μετάλλαξης. Η συνολική ορθότητα προσδιορισμού για καθεμία από τις 7 μεταλλάξεις και το δείγμα άγριου τύπου ήταν 100%, γεγονός που δηλώνει συνέπεια μεταξύ κέντρων ως προς την εκχύλιση DNA και την ανίχνευση μεταλλάξεων με χρήση του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Ισοδυναμία μεθόδων δειγματοληψίας (NSCLC μόνο)

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσον ο προσδιορισμός μετάλλαξης για τα δείγματα NSCLC με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit επηρεάζεται από τη μέθοδο δειγματοληψίας. Οι 3 μέθοδοι δειγματοληψίας που εξετάστηκαν στη μελέτη αυτή ήταν η εκτομή, η αναρρόφηση με λεπτή βελόνη (*fine needle biopsy*, FNA) και η βιοψία με κόπτουσα βελόνη (*core needle biopsy*, CNB).

Σε αυτήν τη μελέτη, δείγματα CNB και FNA από αντίστοιχους ασθενείς παρήχθησαν από δείγματα όγκων που είχαν ληφθεί με χειρουργική εκτομή, προκειμένου να επιτευχθεί δειγματοληψία από τον ίδιο όγκο με τις 3 διαφορετικές μεθόδους. Για τη μελέτη αυτή διατέθηκαν συνολικά 169 δείγματα εκτομής, 169 δείγματα CNB και 169 δείγματα FNA.

Κάθε δείγμα εκχυλίστηκε και εξετάστηκε με τον προσδιορισμό μάρτυρα KRAS. Κάθε δείγμα που έδωσε έγκυρο αποτέλεσμα (169 δείγματα εκτομής, 169 CNB και 164 FNA) υποβλήθηκε σε δοκιμασία και με τους 8 προσδιορισμούς KRAS.

Επιπλέον, για καθένα από τα κλινικά δείγματα FFPE NSCLC, το εκχυλισμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση με το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit αξιολογήθηκε επίσης μέσω αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger, προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit και της αμφίδρομης αλληλούχησης κατά Sanger. Σε όλους τους τύπους δειγμάτων, το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit προσδιορίζει σωστά την κατάσταση μετάλλαξης σε σύγκριση με την αμφίδρομη αλληλούχηση κατά Sanger, με επίπεδο συνολικής ποσοστιαίας συμφωνίας ίσο με 96,96%.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit παρέχει ισοδύναμο αποτέλεσμα με τις 3 μεθόδους δειγματοληψίας που μελετήθηκαν, όπως φαίνεται από τα επίπεδα της κατά ζεύγη συνολικής ποσοστιαίας συμφωνίας:

- CNB έναντι FNA 97,52 (όρια εμπιστοσύνης 94,41–99,15)
- CNB έναντι εκτομής 96,39 (όρια εμπιστοσύνης 92,99–98,41)
- FNA έναντι εκτομής 98,76 (όρια εμπιστοσύνης 96,14–99,78)

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφικές αναφορές

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.
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).

Χρήσιμες βιβλιογραφικές αναφορές

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).

Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση:



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Περιεχόμενα



Αριθμός

Rn

Το R δηλώνει αναθεώρηση του εγχειριδίου και το n είναι ο αριθμός αναθεώρησης



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης



Προσοχή

Στοιχεία επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα **www.qiagen.com/Support**, καλέστε το 00800-22-44-6000 ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN ή τους κατά τόπους αντιπροσώπους (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Παράρτημα 1: Μη αυτόματο πρωτόκολλο *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

Στην παρούσα ενότητα περιλαμβάνονται οδηγίες για τη χρήση του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit με το λογισμικό RGQ, έκδοση 2.3, σε ανοιχτή κατάσταση λειτουργίας (δηλ. χωρίς χρήση του KRAS Assay Package).

Γενικές πληροφορίες

- Για τα απαιτούμενα υλικά, βλ. Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται
- Για πλήρεις πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία των δειγμάτων και τη διάταξη των δειγμάτων, βλ. ενότητες Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων DNA και Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS.

Πρωτόκολλο: Δημιουργία προφίλ θερμοκρασίας

Προτού ξεκινήσετε, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας για την ανάλυση KRAS. Οι παράμετροι κυκλοποίησης είναι οι ίδιες τόσο για την Αξιολόγηση δειγμάτων όσο και για την Αξιολόγηση μεταλλάξεων.

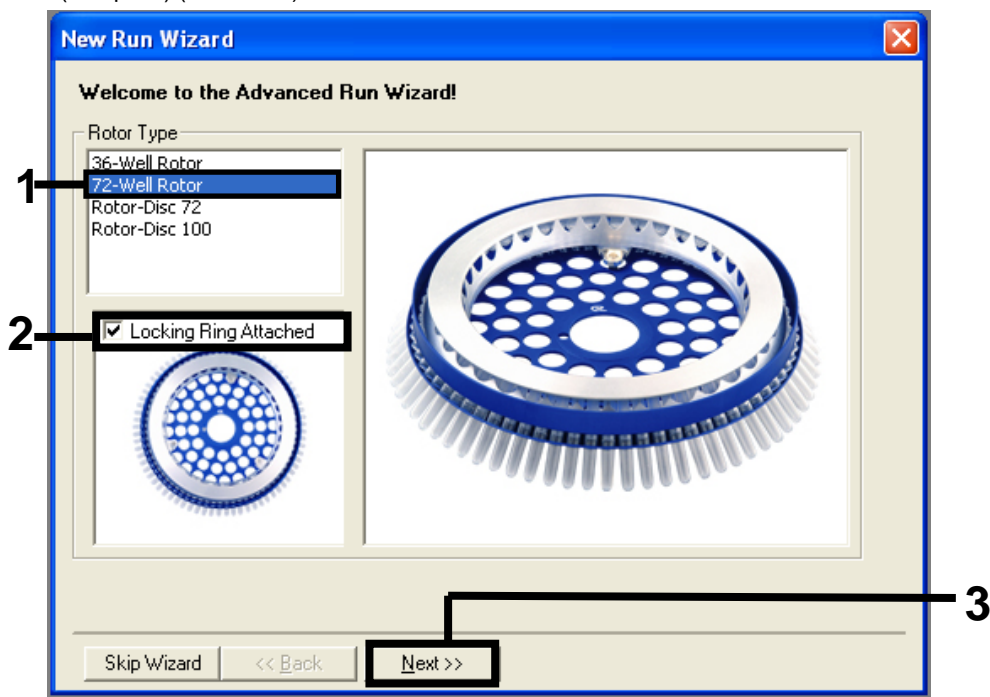
Διαδικασία

Οι παράμετροι κυκλοποίησης παρατίθενται στον Πίνακα 23.

Πίνακας 23. Παράμετροι κυκλοποίησης

| Κύκλοι | Θερμοκρασία | Ωρα | Λήψη δεδομένων |
|--------|-------------|-----------------|------------------|
| 1 | 95°C | 15 λεπτά | Καμία |
| 40 | 95°C | 30 δευτερόλεπτα | Καμία |
| | 60°C | 60 δευτερόλεπτα | Green και Yellow |

1. Κάντε διπλό κλικ στο εικονίδιο του λογισμικού σειράς Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3, στην επιφάνεια εργασίας του φορητού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Επιλέξτε την καρτέλα «Advanced» (Για προχωρημένους) στο παράθυρο «New Run» (Νέα εκτέλεση) που εμφανίζεται.
2. Για να δημιουργήσετε ένα νέο πρότυπο, επιλέξτε «**Empty Run**» (Κενή εκτέλεση) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο «**New**» (Νέα) για να μεταβείτε στο «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).
3. Στον τύπο ρότορα επιλέξτε «72-Well Rotor» (Ρότορας 72 βυθισμάτων). Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος και επισημάνετε το πλαίσιο «**Locking Ring Attached**» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης). 1 = «Rotor type» (Τύπος ρότορα), 2 = πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος), 3 = «Next» (Επόμενο).

4. Πληκτρολογήστε το όνομα του χειριστή. Προσθέστε τυχόν σημειώσεις και δώστε την τιμή 25 ως όγκο αντίδρασης. Βεβαιωθείτε ότι το πεδίο «**Sample Layout**» (Διάταξη δειγμάτων) περιέχει την τιμή 1, 2, 3... Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο) (Εικόνα 22).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

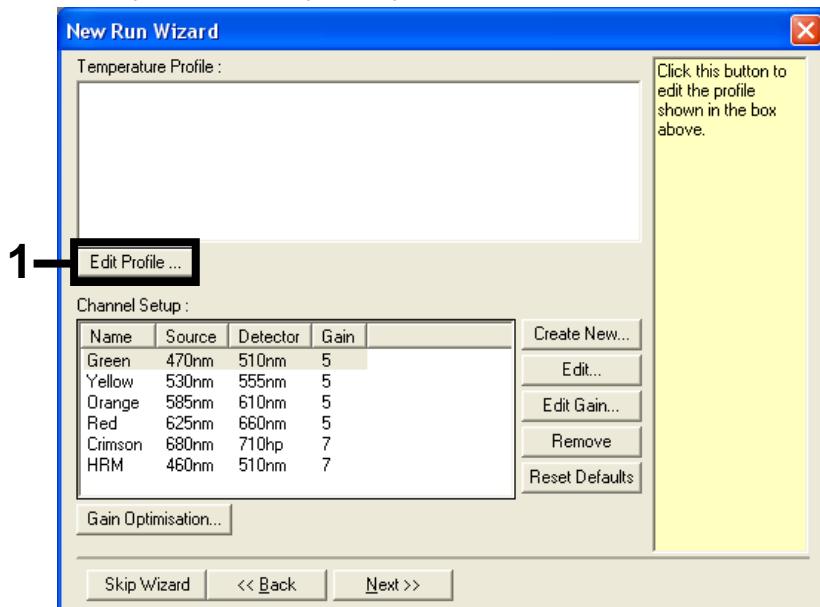
Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

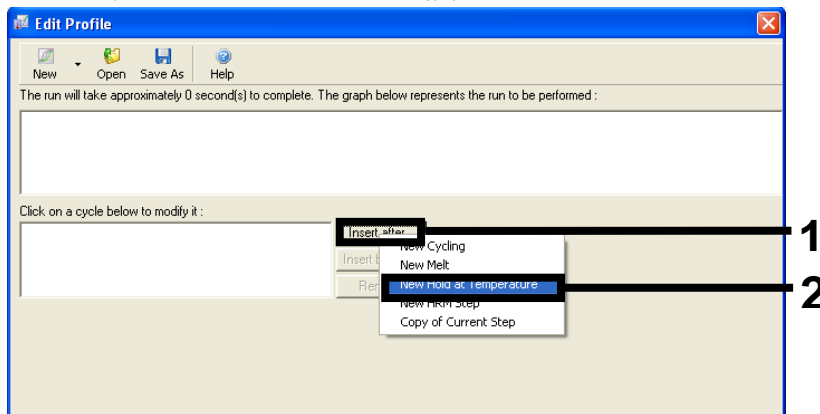
Εικόνα 22. Εισαγωγή ονόματος χειριστή και όγκων αντίδρασης. 1 = πεδίο διαλόγου «Operator» (Χειριστής), 2 = πεδίο διαλόγου «Notes» (Σημειώσεις), 3 = πεδίο «Reaction Volume» (Όγκος αντίδρασης), 4 = «Sample Layout» (Διάταξη δειγμάτων), 5 = «Next» (Επόμενο).

5. Κάντε κλικ στο «**Edit Profile**» (Επεξεργασία προφίλ) στο παράθυρο «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) (Εικόνα 23) και προγραμματίστε το προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με τις οδηγίες των παρακάτω βημάτων.



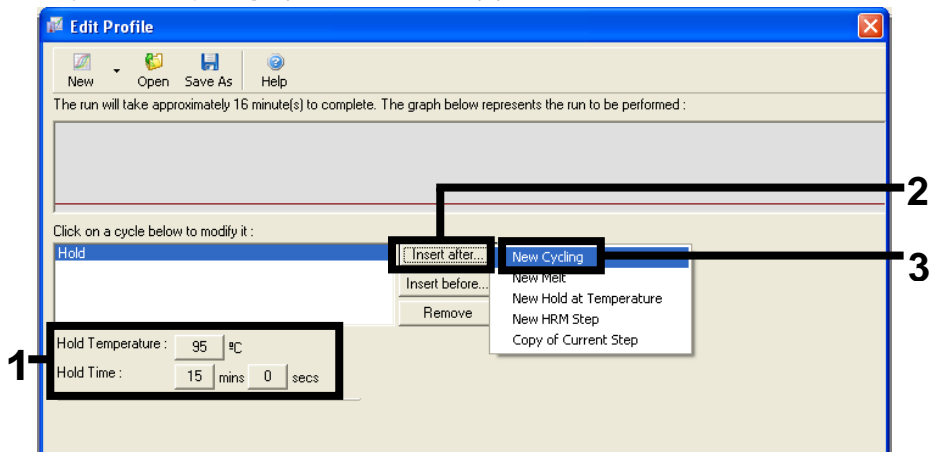
Εικόνα 23. Επεξεργασία του προφίλ.

6. Κάντε κλικ στο κουμπί «**Insert after**» (Εισαγωγή μετά από) και επιλέξτε «**New Hold at Temperature**» (Νέα θερμοκρασία διατήρησης) (Εικόνα 24).



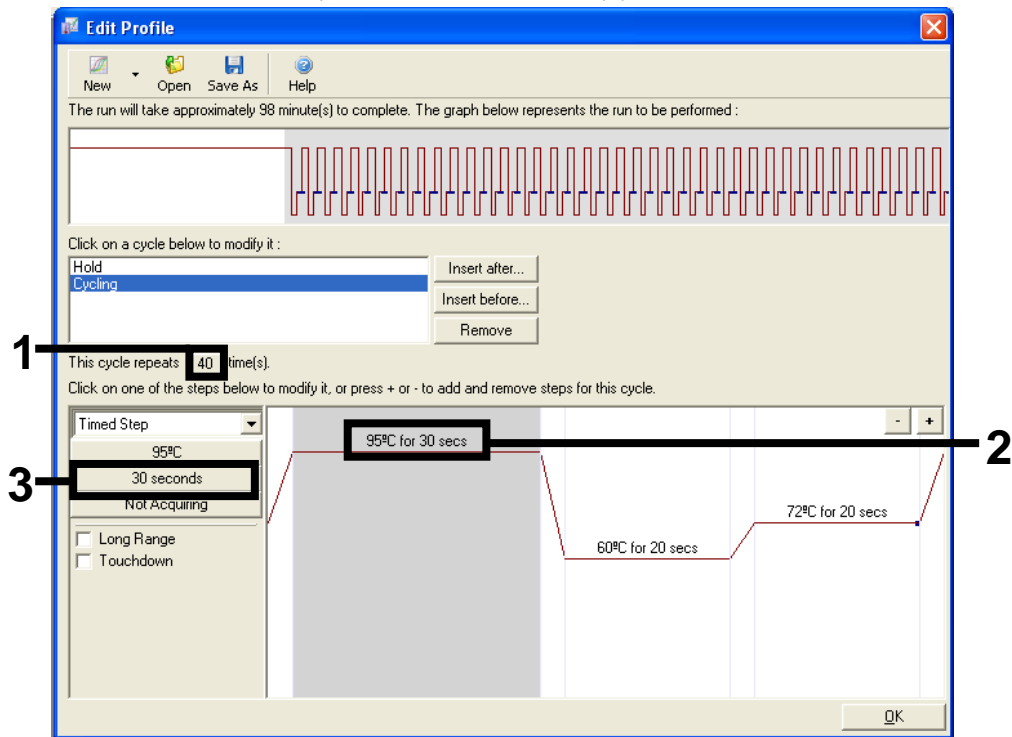
Εικόνα 24. Εισαγωγή ενός αρχικού βήματος επώασης. 1 = «Insert after» (Εισαγωγή μετά από), 2 = «New Hold at Temperature» (Νέα θερμοκρασία διατήρησης).

7. Ορίστε την τιμή στο πεδίο «**Hold Temperature**» (Θερμοκρασία διατήρησης) σε 95°C και στο πεδίο «**Hold Time**» (Χρόνος διατήρησης) σε **15 mins** (λεπτά) και **0 secs** (δευτερόλεπτα). Κάντε κλικ στο «**Insert after**» (Εισαγωγή μετά από) και, στη συνέχεια, επιλέξτε «**New Cycling**» (Νέα κυκλοποίηση) (Εικόνα 25).



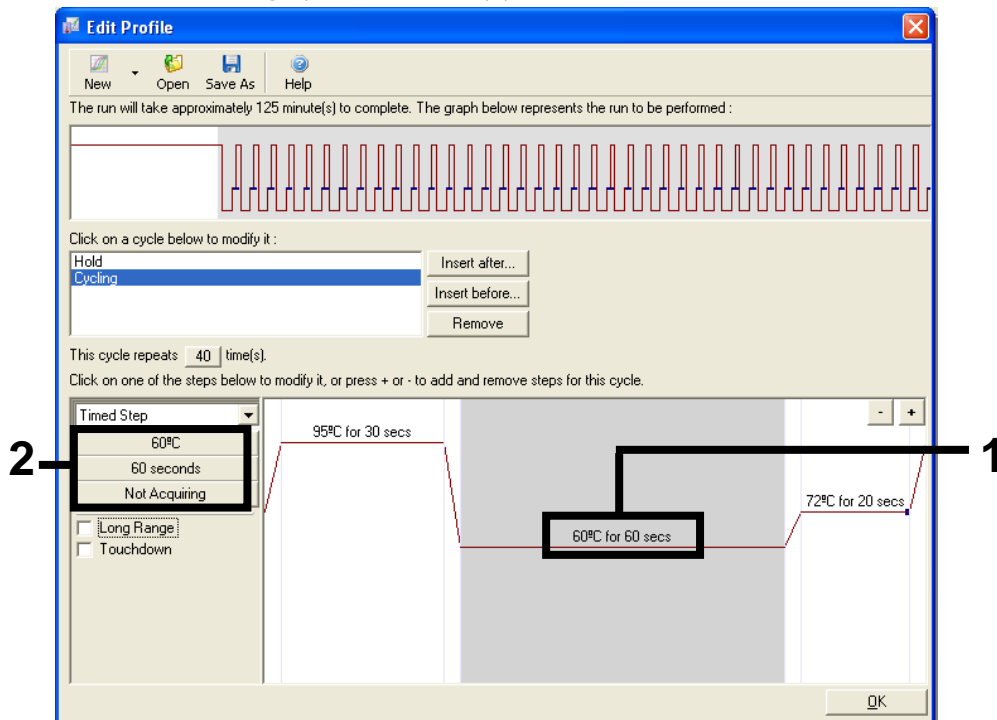
Εικόνα 25. Αρχικό βήμα επώασης στους 95°C. 1 = «Hold Temperature» (Θερμοκρασία διατήρησης) και «Hold Time» (Χρόνος διατήρησης), 2 = «Insert after» (Εισαγωγή μετά από), 3 = «New Cycling» (Νέα κυκλοποίηση).

8. Ορίστε τον αριθμό επαναλήψεων κύκλου σε **40**. Επιλέξτε το πρώτο βήμα και ρυθμίστε σε **«95°C for 30 secs»** (95°C για 30 δευτερόλεπτα) (Εικόνα 26).



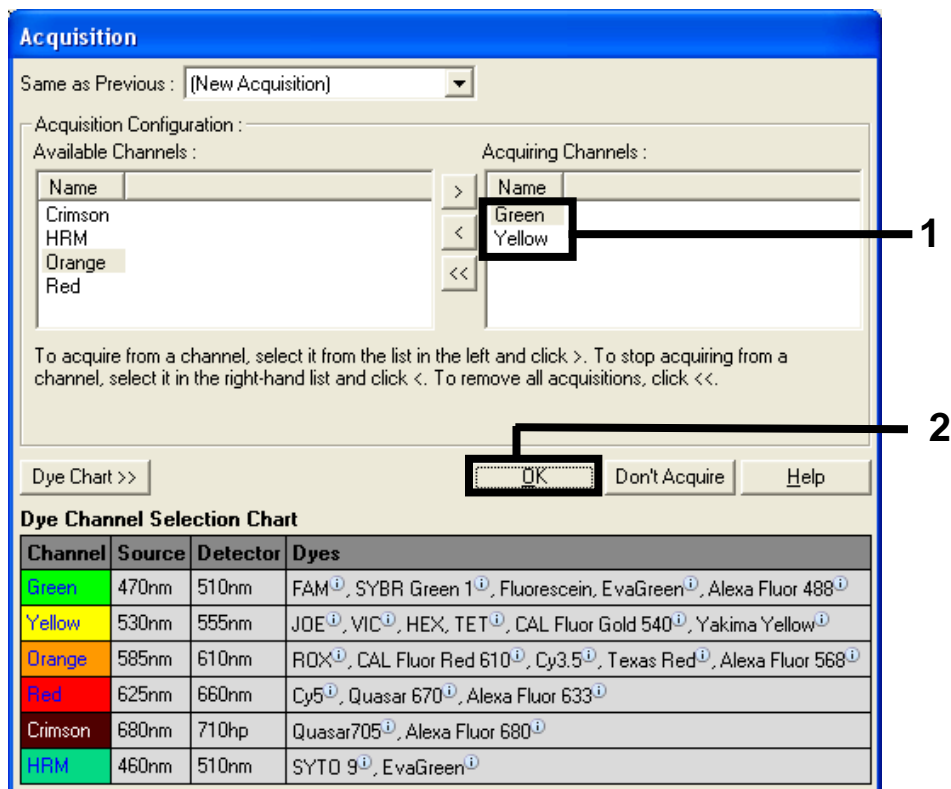
Εικόνα 26. Βήμα κυκλοποίησης στους 95°C. 1 = πλαίσιο «Cycle repeats» (Επαναλήψεις κύκλου), 2 = πρώτο βήμα: ρύθμιση θερμοκρασίας, 3 = πρώτο βήμα: ρύθμιση χρόνου.

9. Επισημάνετε το δεύτερο βήμα και ρυθμίστε σε 60°C για 60 δευτερόλεπτα. Για να ενεργοποιήσετε τη λήψη δεδομένων κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, κάντε κλικ στο «Not Acquiring» (Δεν γίνεται λήψη) (Εικόνα 27).



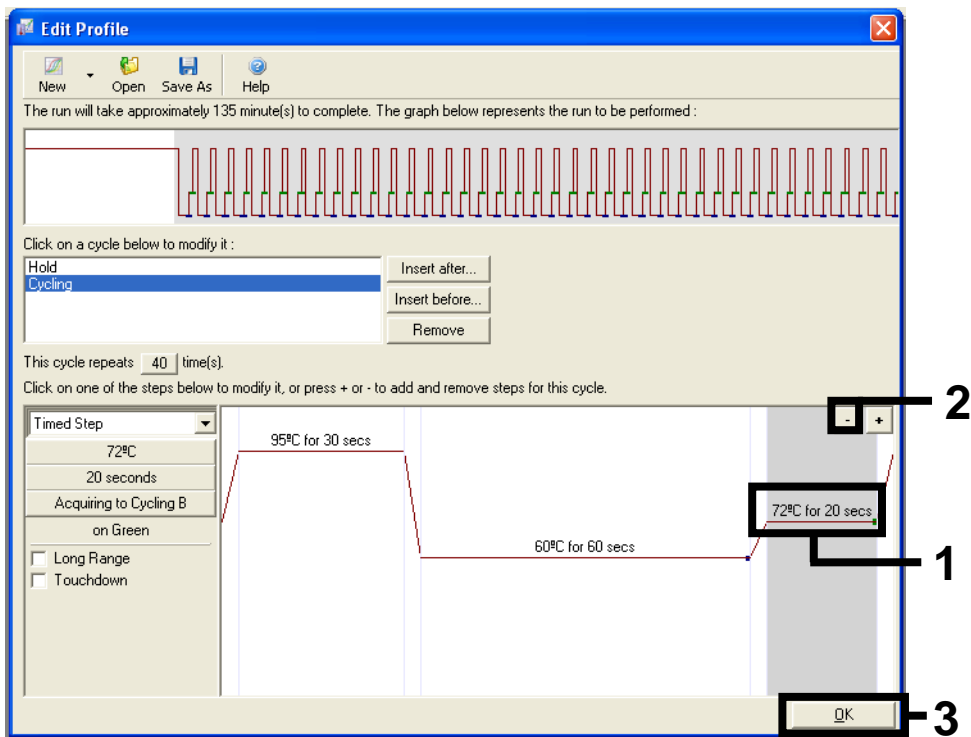
Εικόνα 27. Βήμα κυκλοποίησης στους 60°C. 1 = δεύτερο βήμα: ρύθμιση θερμοκρασίας και ρύθμιση χρόνου, 2 = «Not Acquiring» (Δεν γίνεται λήψη).

10. Στη λίστα «Available Channels» (Διαθέσιμα κανάλια), επιλέξτε «Green» και «Yellow» και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο σύμβολο > για να τα μετακινήσετε στη λίστα «Acquiring Channels» (Κανάλια λήψης). Κάντε κλικ στο «OK» (Εικόνα 28).



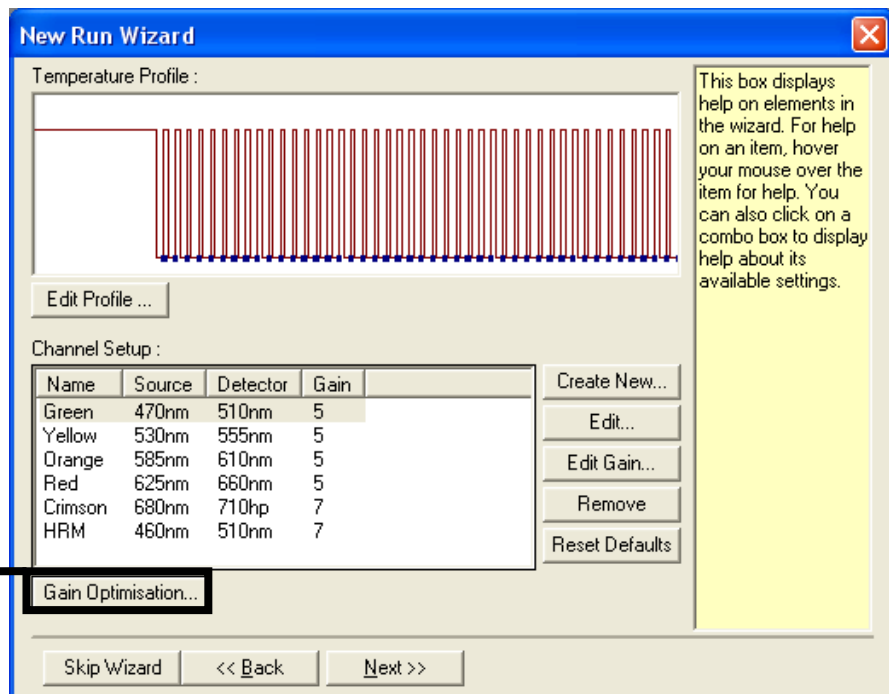
Εικόνα 28. Λήψη στο βήμα κυκλοποίησης των 60°C.

11. Επισημάνετε το τρίτο βήμα και κάντε κλικ στο σύμβολο – για διαγραφή. Κάντε κλικ στο «OK» (Εικόνα 29).



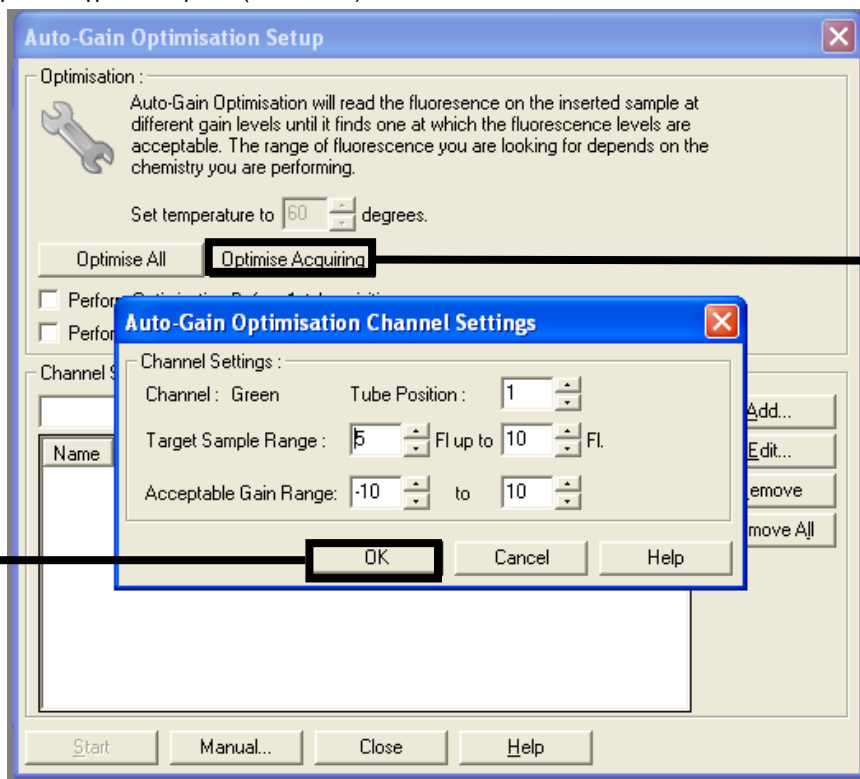
Εικόνα 29. Αφαίρεση του βήματος επέκτασης.

12. Στο επόμενο παράθυρο, κάντε κλικ στο «Gain Optimisation» (Βελτιστοποίηση απολαβής) (Εικόνα 30).



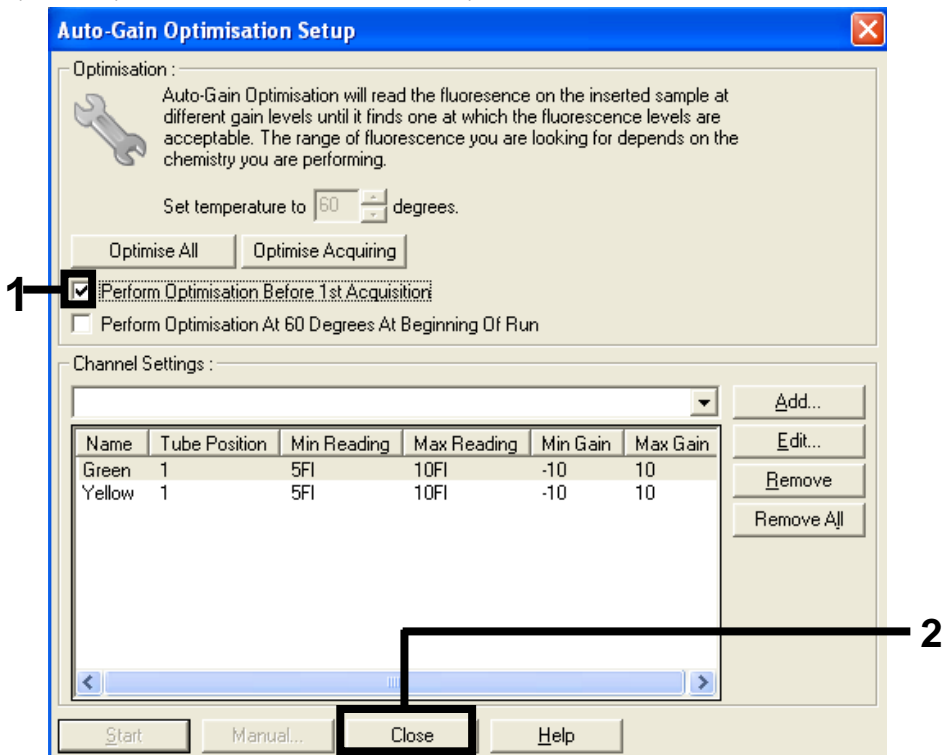
Εικόνα 30. «Gain Optimisation» (Βελτιστοποίηση απολαβής)

13. Κάντε κλικ στο «**Optimise Acquiring**» (Βελτιστοποίηση λήψης). Εμφανίζονται οι ρυθμίσεις καναλιού για κάθε κανάλι. Κάντε κλικ στο «**OK**» για αποδοχή αυτών των προεπιλεγμένων τιμών. (Εικόνα 31).



Εικόνα 31. «Auto-gain Optimisation» (Αυτόματη βελτιστοποίηση απολαβής) για το πράσινο κανάλι.

14. Επισημάνετε το πλαίσιο «**Perform Optimisation before 1st Acquisition**» (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την 1η λήψη) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο «**Close**» (Κλείσιμο) για να επιστρέψετε στον οδηγό (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Επιλογή πράσινου και κίτρινου καναλιού.

15. Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο). Στη συνέχεια, κάντε κλικ στο «**Save**» (Αποθήκευση) για αποθήκευση του προτύπου σε κατάλληλη τοποθεσία.

Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων (μη αυτοματοποιημένη)

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου DNA στα δείγματα και θα πρέπει να διεξάγεται πριν από την ανάλυση μεταλλάξεων KRAS.

- Παρασκευάστε τα δείγματα όπως περιγράφεται στην ενότητα Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων DNA.
- Προετοιμάστε την εκτέλεση στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex όπως περιγράφεται στην ενότητα Πρωτόκολλο: προετοιμασία του *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με τις οδηγίες στην ενότητα Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων.

Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS (μη αυτοματοποιημένη)

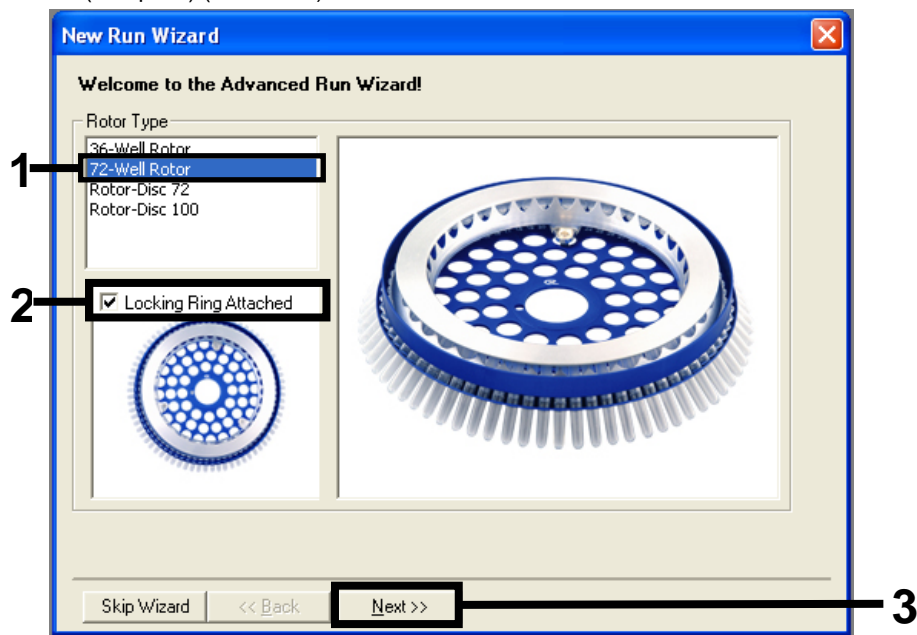
Μετά την επιτυχή αξιολόγηση του δείγματος, αυτό μπορεί να υποβληθεί σε δοκιμασία για την ανίχνευση μεταλλάξεων του KRAS.

- Παρασκευάστε τα δείγματα όπως περιγράφεται στην ενότητα Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS.
- Προετοιμάστε την εκτέλεση PCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM όπως περιγράφεται στην ενότητα Πρωτόκολλο: προετοιμασία του *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με τις οδηγίες στην ενότητα Ανάλυση ανίχνευσης μεταλλάξεων KRAS.

Πρωτόκολλο: προετοιμασία του *therascreen* KRAS RGQ PCR

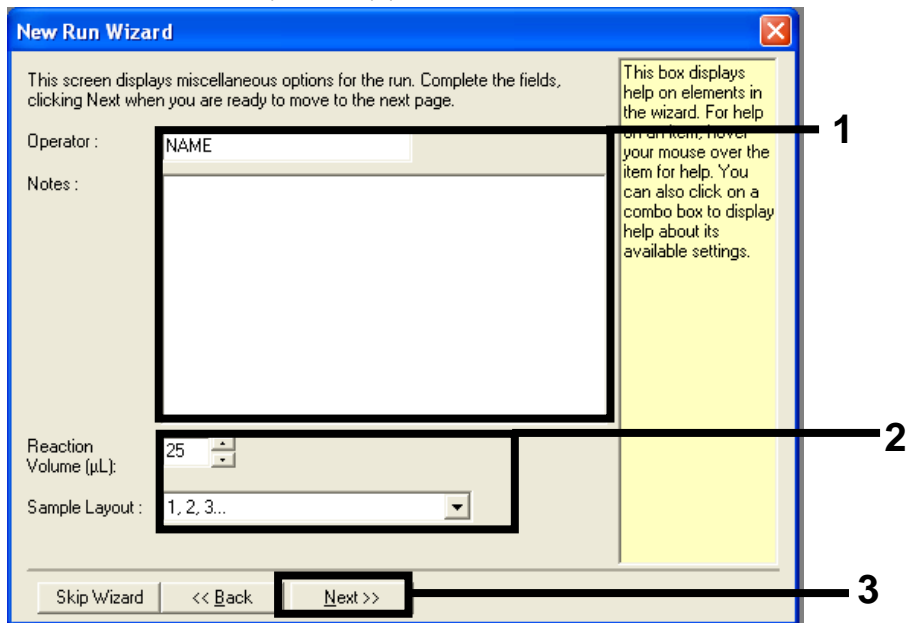
1. Τρέξτε το λογισμικό σειράς Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3, και ανοίξτε το κατάλληλο προφίλ θερμοκρασίας που δημιουργήθηκε.
2. Δημιουργήστε το προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με το Πρωτόκολλο: Δημιουργία προφίλ θερμοκρασίας.

Βεβαιωθείτε ότι είναι επιλεγμένος ο σωστός ρότορας και επισημάνετε το πλαίσιο «**Locking Ring Attached**» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο) (Εικόνα 33).



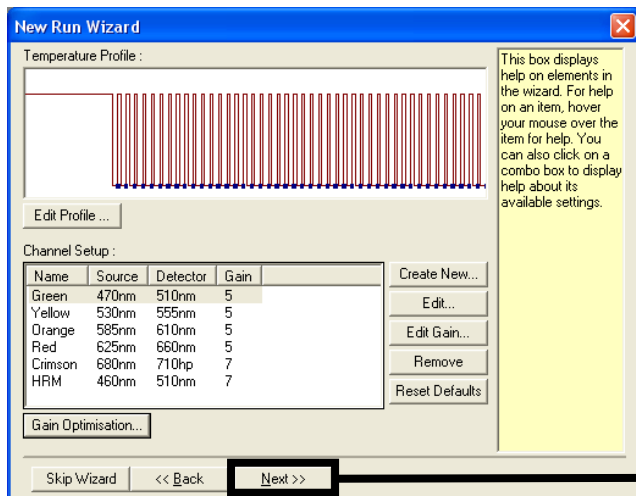
Εικόνα 33. Πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) και οθόνη υποδοχής. 1 = «Rotor type» (Τύπος ρότορας), 2 = πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος), 3 = «Next» (Επόμενο).

3. Πληκτρολογήστε το όνομα του χειριστή. Προσθέστε τυχόν σημειώσεις και ελέγξτε αν το πεδίο «**Reaction Volume**» (Όγκος αντίδρασης) έχει οριστεί στο 25 και αν το πλαίσιο πεδίου «**Sample Layout**» (Διάταξη δειγμάτων) περιέχει την τιμή 1, 2, 3... Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο) (Εικόνα 34).



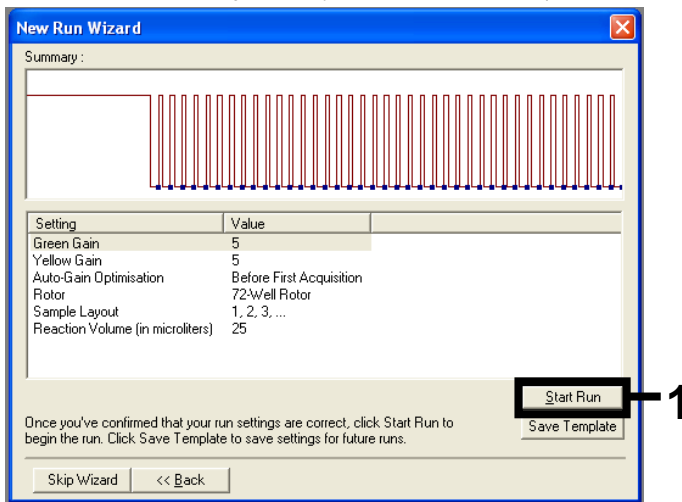
Εικόνα 34. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης). 1 = πεδία «Operator» (Χειριστής) και «Notes» (Σημειώσεις), 2 = πεδία «Reaction Volume» (Όγκος αντίδρασης) και «Sample Layout» (Διάταξη δειγμάτων), 3 = «Next» (Επόμενο).

4. Στο επόμενο παράθυρο, αφήστε όλες τις τιμές ως έχουν. Δεν απαιτείται επεξεργασία αν το προφίλ θερμοκρασίας έχει δημιουργηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες στο Πρωτόκολλο: Δημιουργία προφίλ θερμοκρασίας. Κάντε κλικ στο «Next» (Επόμενο) (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) και οθόνη επεξεργασίας της θερμοκρασίας. 1 = «Next» (Επόμενο).

5. Ελέγξτε τη σύνοψη και κάντε κλικ στο «**Start Run**» (Εναρξη εκτέλεσης) για να αποθηκεύσετε το αρχείο εκτέλεσης και να ξεκινήσει η εκτέλεση (Εικόνα 36).



Εικόνα 36. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).
1 = «Start Run» (Εναρξη εκτέλεσης).

Σημείωση: Αφού ξεκινήσει η εκτέλεση, εμφανίζεται ένα νέο παράθυρο μέσα στο οποίο έχετε τη δυνατότητα είτε να εισαγάγετε τα ονόματα των δειγμάτων τη δεδομένη στιγμή, είτε να κάνετε κλικ στο «**Finish**» (Τέλος) και να τα εισαγάγετε αργότερα επιλέγοντας το κουμπί «**Sample**» (Δείγμα) κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης ή αφού ολοκληρωθεί.

Εάν κάνετε κλικ στο «**Finish and Lock Samples**» (Τέλος και κλείδωμα δειγμάτων), δεν θα μπορείτε πλέον να επεξεργαστείτε τα ονόματα των δειγμάτων. Θα πρέπει να δίνετε ιδιαίτερη προσοχή κατά τη συμπλήρωση των ονομάτων δειγμάτων, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή δοκιμασία και ανάλυση των δειγμάτων.

Σημείωση: Κατά την ονοματοδότηση των δειγμάτων, τα πεδία για τα κενά βυθίσματα θα πρέπει να παραμείνουν κενά στη στήλη «Name» (Όνομα).

-
6. Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με την ενότητα Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων ή Ανάλυση ανίχνευσης μεταλλάξεων KRAS, όπως απαιτείται.
 7. Εάν απαιτούνται αναφορές ποσοτικοποίησης, κάντε κλικ στο εικονίδιο «**Reports**» (Αναφορές), στη γραμμή εργαλείων του αρχείου εκτέλεσης για το Rotor-Gene Q.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Μη αυτόματη μέθοδος)

Αφού ολοκληρωθεί η αξιολόγηση του δείγματος ή η ανάλυση της μετάλλαξης, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης

1. Ανοίξτε το κατάλληλο αρχείο χρησιμοποιώντας το λογισμικό της σειράς Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.
2. Εάν τα δείγματα δεν έχουν ήδη ονομαστεί πριν από την εκτέλεση, κάντε κλικ στο «**Edit Samples**» (Επεξεργασία δειγμάτων).
3. Εισαγάγετε τα ονόματα δειγμάτων στη στήλη «**Name**» (Όνομα).
4. Κάντε κλικ στο «**Analysis**» (Ανάλυση). Στη σελίδα της ανάλυσης, κάντε κλικ στο «**Cycling A. Yellow**» για να προβάλετε το κανάλι HEX.
5. Κάντε κλικ στο «**Named On**» (Ονομασμένα ενεργά).
Σημείωση: Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται ότι τα κενά βυθίσματα δεν εμφανίζονται στην ανάλυση.
6. Επιλέξτε «**Dynamic tube**» (Δυναμικό σωληνάριο).
7. Επιλέξτε «**Linear scale**» (Γραμμική κλίμακα).
8. Κάντε κλικ στο «**Outlier Removal**» (Αφαίρεση έκτοπων τιμών) και εισαγάγετε την τιμή «**10%**» στο πεδίο «**NTC Threshold**» (Τιμή κατωφλίου NTC).
9. Ορίστε την τιμή κατωφλίου σε **0,05** και ελέγξτε τις τιμές HEX CT.
10. Στη σελίδα της ανάλυσης, κάντε κλικ στο «**Cycling A. Green**» για να προβάλετε το κανάλι FAM.
11. Επαληθεύστε ότι είναι επισημασμένο το «**Dynamic Tube**» (Δυναμικό σωληνάριο). Κάντε κλικ στο «**Linear scale**» (Γραμμική κλίμακα).
12. Κάντε κλικ στο «**Outlier Removal**» (Αφαίρεση έκτοπων τιμών) και εισαγάγετε την τιμή «**10%**» στο πεδίο «**NTC Threshold**» (Τιμή κατωφλίου NTC).
13. Ορίστε την τιμή κατωφλίου σε **0,05** και ελέγξτε τις τιμές FAM CT.

Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων

Ανάλυση μαρτύρων εκτέλεσης

Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής εργασιών «Ανάλυση μαρτύρων εκτέλεσης» στην Εικόνα 37.

- **Αρνητικός μάρτυρας:** Για να διασφαλιστεί ότι δεν έχει επιμολυνθεί το μείγμα αντίδρασης, από τον μάρτυρα χωρίς μήτρα δεν πρέπει να προκύψει τιμή C_T στο πράσινο κανάλι κάτω του 40. Για να διασφαλίσετε ότι η πλάκα έχει ρυθμιστεί σωστά, το NTC πρέπει να εμφανίζει τιμή ενίσχυσης εντός του εύρους τιμών 31,91–35,16 στο κίτρινο κανάλι. Οι τιμές που ορίζονται κυμαίνονται μεταξύ αυτών των τιμών και τις περιλαμβάνουν.
- **Θετικός μάρτυρας:** Ο θετικός μάρτυρας (Positive Control, PC) KRAS πρέπει να δίνει τιμή C_T μεταξύ 23,5–29,5 στο πράσινο κανάλι σε καθέναν από τους 8 προσδιορισμούς. Οι τιμές που ορίζονται κυμαίνονται μεταξύ αυτών των τιμών και τις περιλαμβάνουν. Μια τιμή που βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους υποδεικνύει πρόβλημα ρύθμισης του προσδιορισμού και συνεπάγεται μη επιτυχή εκτέλεση.

Σημείωση: Τα δεδομένα των δειγμάτων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν ένας από αυτούς τους δύο μάρτυρες εκτέλεσης δεν είναι επιτυχής.

Υπό την προϋπόθεση ότι και οι δύο μάρτυρες εκτέλεσης είναι έγκυροι, η τιμή C_T κάθε δείγματος πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους τιμών 21,92–32,00 στο πράσινο κανάλι. Σε περίπτωση που η τιμή του δείγματος βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους τιμών, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες.

Ανάλυση δείγματος – προσδιορισμός μάρτυρα

- Τιμή C_T προσδιορισμού μάρτυρα δείγματος < 21,92: Τα δείγματα με τιμή μάρτυρα C_T < 21,92 πρέπει να αραιώνονται, καθότι η τιμή αυτή αντιστοιχεί στο κάτω όριο του εύρους εγκεκριμένων τιμών προσδιορισμού. Για την ανίχνευση κάθε μετάλλαξης σε χαμηλό επίπεδο, είναι απαραίτητη η αραιώση των υπερβολικά συμπτυκνωμένων δειγμάτων, ώστε οι

τιμές τους να κυμαίνονται εντός του παραπάνω εύρους τιμών, λαμβάνοντας υπόψη ότι, αραιώνοντας κατά το ήμισυ, η τιμή C_T αυξάνεται κατά 1 μονάδα. Αν το δείγμα προσεγγίζει την τιμή 21,92, συνιστάται αραιώση ώστε να διασφαλιστεί η λήψη αποτελέσματος από την εκτέλεση δοκιμασίας δείγματος (Ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS). Η αραιώση των δειγμάτων πρέπει να εκτελείται χρησιμοποιώντας το νερό που παρέχεται στο κιτ [Νερό χωρίς νουκλεάση για αραιώση (Dil.)].

- Τιμή C_T προσδιορισμού μάρτυρα δείγματος > 32: Συνιστάται η επανάληψη εκχύλισης του δείγματος, καθώς δεν θα υπάρχει επαρκής ποσότητα αρχικής μήτρας DNA για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων στις καθορισμένες οριακές τιμές αποκοπής για τον προσδιορισμό.

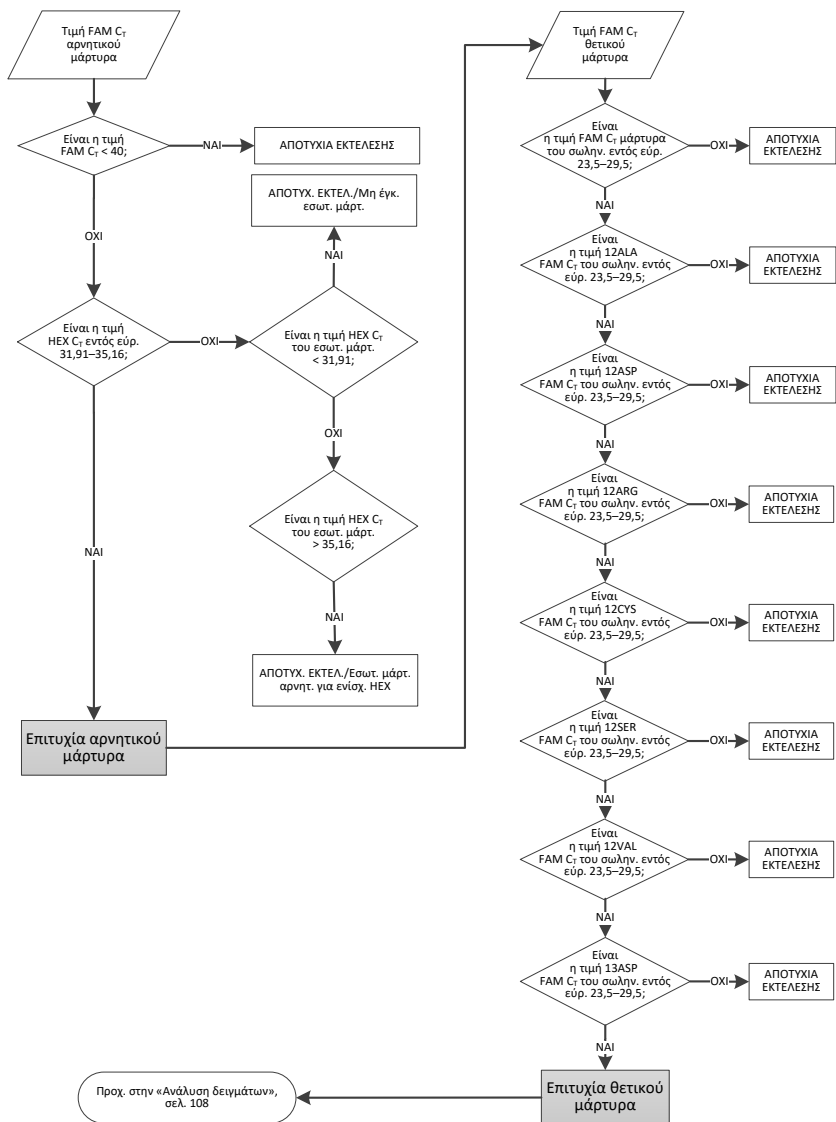
Ανάλυση ανίχνευσης μεταλλάξεων KRAS

Ανάλυση μαρτύρων εκτέλεσης

Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής εργασιών «Ανάλυση μαρτύρων εκτέλεσης» (Εικόνα 37).

- Αρνητικός μάρτυρας: Για να διασφαλιστεί ότι δεν έχει επιμολυνθεί το μείγμα αντίδρασης, από τον μάρτυρα χωρίς μήτρα δεν πρέπει να προκύψει τιμή C_T στο πράσινο κανάλι κάτω του 40. Για να διασφαλίσετε ότι η πλάκα έχει ρυθμιστεί σωστά, το NTC πρέπει να εμφανίζει τιμή ενίσχυσης εντός του εύρους τιμών 31,91–35,16 στο κίτρινο κανάλι. Οι τιμές που ορίζονται κυμαίνονται μεταξύ αυτών των τιμών και τις περιλαμβάνουν.
- Θετικός μάρτυρας: Ο θετικός μάρτυρας (Positive Control, PC) KRAS πρέπει να δίνει τιμή C_T μεταξύ 23,5–29,5 στο πράσινο κανάλι σε καθέναν από τους 8 προσδιορισμούς. Οι τιμές που ορίζονται κυμαίνονται μεταξύ αυτών των τιμών και τις περιλαμβάνουν. Μια τιμή που βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους υποδεικνύει πρόβλημα ρύθμισης του προσδιορισμού και συνεπάγεται μη επιτυχή εκτέλεση.

Σημείωση: Τα δεδομένα των δειγμάτων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν ένας από αυτούς τους 2 μάρτυρες εκτέλεσης δεν είναι επιτυχής.



Εικόνα 37. Διάγραμμα ροής εργασιών ανάλυσης μαρτύρων εκτέλεσης.

Ανάλυση δειγμάτων

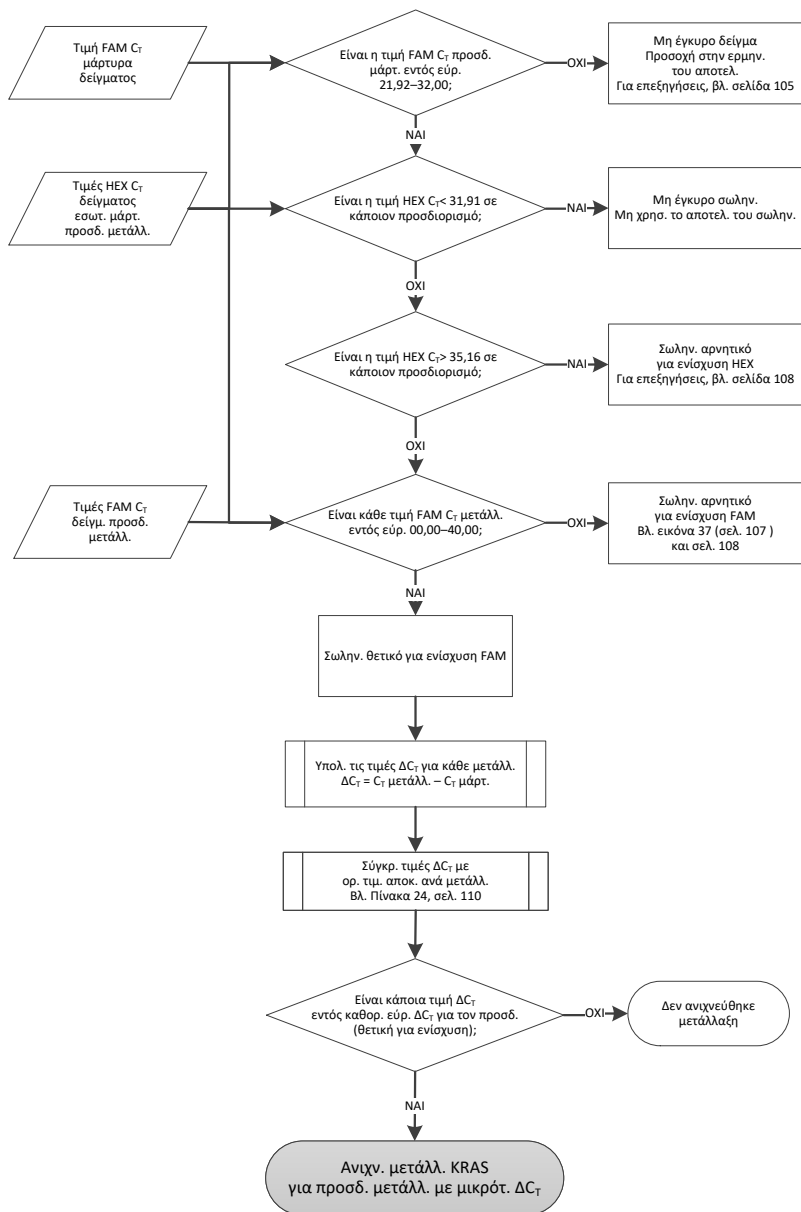
Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής εργασιών «Ανάλυση δειγμάτων» στην Εικόνα 38.

Τιμή FAM CT μάρτυρα δείγματος

Υπό την προϋπόθεση ότι και οι δύο μάρτυρες εκτέλεσης είναι έγκυροι για τον προσδιορισμό μάρτυρα, η τιμή C_T κάθε μάρτυρα δείγματος πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους τιμών 21,92–32,00 στο πράσινο κανάλι.

Σε περίπτωση που η τιμή του δείγματος βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους τιμών, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες.

- Τιμή C_T προσδιορισμού μάρτυρα δείγματος $< 21,92$: Τα δείγματα με τιμή C_T μάρτυρα $< 21,92$ θα προκαλέσουν υπερκορεσμό των προσδιορισμών μετάλλαξης και πρέπει να αραιωθούν. Για την ανίχνευση κάθε μετάλλαξης σε χαμηλό επίπεδο, είναι απαραίτητη η αρραίωση των υπερβολικά συμπυκνωμένων δειγμάτων, ώστε οι τιμές τους να κυμαίνονται εντός του παραπάνω εύρους τιμών, λαμβάνοντας υπόψη ότι, αραιώνοντας κατά το ήμισυ, η τιμή C_T αυξάνεται κατά 1 μονάδα. Η αρραίωση των δειγμάτων πρέπει να εκτελείται χρησιμοποιώντας το νερό που παρέχεται στο kit [Νερό χωρίς νουκλεάση για αρραίωση (Dil.)].
- Τιμή C_T προσδιορισμού μάρτυρα δείγματος > 32 : Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς ενδέχεται να μην ανιχνευτούν μεταλλάξεις πολύ χαμηλού επιπέδου.



Εικόνα 38. Διάγραμμα ροής εργασιών ανάλυσης δειγμάτων.

Τιμή HEX CT δείγματος εσωτερικού μάρτυρα προσδιορισμών μετάλλαξης

Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής εργασιών «Ανάλυση δειγμάτων» στην Εικόνα 38.

Πρέπει να αναλυθούν όλα τα βύθισματα κάθε δείγματος. Βεβαιωθείτε ότι κάθε βύθισμα παρέχει ένα σήμα HEX από τον εσωτερικό μάρτυρα. Υπάρχουν 3 πιθανά αποτελέσματα.

- Αν η τιμή C_T του εσωτερικού μάρτυρα βρίσκεται εντός του καθορισμένου εύρους (31,91–35,16), είναι θετική για την ενίσχυση HEX.
- Αν η τιμή C_T του εσωτερικού μάρτυρα υπερβαίνει το καθορισμένο εύρος ($> 35,16$), είναι αρνητική για την ενίσχυση HEX.
- Αν η τιμή C_T του εσωτερικού μάρτυρα βρίσκεται κάτω από το καθορισμένο εύρος ($< 31,91$), είναι μη έγκυρη.

Σε περίπτωση που η μη επιτυχής ανάλυση του εσωτερικού μάρτυρα οφείλεται σε αναστολή της PCR, η αραίωση του δείγματος μπορεί να μειώσει τη δράση των αναστολέων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτή αραιώνεται και το DNA-στόχος. Στο kit περιλαμβάνεται και ένα σωληνάριο νερού για αραίωση δειγμάτων (Dil.).

Τιμή FAM CT δείγματος προσδιορισμών μετάλλαξης

Οι τιμές FAM και για τα 7 μείγματα αντίδρασης θα πρέπει να ελέγχονται σε σχέση με τις τιμές που παρατίθενται στον Πίνακα 24.

Πίνακας 24. Αποδεκτές τιμές δειγμάτων αντίδρασης μετάλλαξης (FAM)*

| Προσδιορισμός | Εύρος αποδεκτών τιμών C_T | Εύρος ΔC_T |
|---------------|-----------------------------|--------------------|
| 12ALA | 0,00–40,00 | $\leq 8,00$ |
| 12ASP | 0,00–40,00 | $\leq 6,60$ |
| 12ARG | 0,00–40,00 | $\leq 8,00$ |
| 12CYS | 0,00–40,00 | $\leq 8,00$ |
| 12SER | 0,00–40,00 | $\leq 8,00$ |
| 12VAL | 0,00–40,00 | $\leq 7,50$ |
| 13ASP | 0,00–40,00 | $\leq 7,50$ |

* Οι αποδεκτές τιμές κυμαίνονται μεταξύ των τιμών που παρατίθενται και τις περιλαμβάνουν.

- Αν η τιμή FAM C_T βρίσκεται εντός του καθορισμένου εύρους, είναι θετική για την ενίσχυση FAM.
- Αν η τιμή FAM C_T υπερβαίνει το καθορισμένο εύρος ή δεν παρατηρείται ενίσχυση, είναι αρνητική για την ενίσχυση FAM.

Υπολογίστε την τιμή ΔC_T για κάθε σωληνάριο μετάλλαξης που είναι θετικό για την ενίσχυση FAM όπως υποδεικνύεται παρακάτω, διασφαλίζοντας ότι οι τιμές C_T μετάλλαξης και μάρτυρα προέρχονται από το ίδιο δείγμα.

ΔC_T = τιμή C_T μετάλλαξης – τιμή C_T μάρτυρα

Συγκρίνετε την τιμή ΔC_T για το δείγμα με το όριο αποκοπής για τον συγκεκριμένο προσδιορισμό (Πίνακας 24), διασφαλίζοντας ότι εφαρμόζεται το σωστό όριο αποκοπής για κάθε προσδιορισμό.

Το όριο αποκοπής είναι το σημείο πάνω από το οποίο ένα θετικό σήμα θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται στο σήμα υποβάθρου από έναν εκκινητή ARMS στο DNA άγριου τύπου. Αν η τιμή ΔC_T του δείγματος είναι υψηλότερη από εκείνη του ορίου αποκοπής, ταξινομείται ως αρνητική ή εκτός των ορίων ανίχνευσης του kit.

Για κάθε δείγμα, σε κάθε αντίδραση μετάλλαξης θα αποδίδεται ο χαρακτηρισμός «ανιχνεύθηκε μετάλλαξη», «δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη» ή «μη έγκυρο» σύμφωνα με τα παρακάτω κριτήρια:

Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη:

- Η θετική τιμή FAM για την ενίσχυση και η τιμή ΔC_T είναι ίσες ή μικρότερες από την οριακή τιμή αποκοπής. Εάν ανιχνευθούν περισσότερες από μία μεταλλάξεις, θα πρέπει να αναφερθεί η μετάλλαξη με τη μικρότερη τιμή ΔC_T.

Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη:

- Η θετική τιμή FAM για την ενίσχυση και η τιμή ΔC_T είναι μεγαλύτερες από την οριακή τιμή αποκοπής.
- Η τιμή FAM είναι αρνητική για την ενίσχυση και η τιμή HEX (εσωτερικός μάρτυρας) είναι θετική για την ενίσχυση.

Μη έγκυρη:

- Η τιμή HEX (εσωτερικός μάρτυρας) είναι μη έγκυρη.
- Η τιμή FAM και η τιμή HEX είναι αρνητικές για την ενίσχυση.

Αν ένα δείγμα είναι αρνητικό για την ενίσχυση HEX σε ένα σωληνάριο αλλά θετικό για την ενίσχυση FAM σε ένα άλλο σωληνάριο, τότε μπορεί ακόμη να θεωρηθεί έγκυρο ένα αποτέλεσμα «ανιχνεύθηκε μετάλλαξη» στο άλλο σωληνάριο, ωστόσο ενδέχεται να μην είναι δυνατή η αξιόπιστη αντιστοίχιση της συγκεκριμένης μετάλλαξης που ανιχνεύθηκε.

- Αν ένα δείγμα είναι αρνητικό για την ενίσχυση HEX αλλά θετικό για την ενίσχυση FAM στο ίδιο σωληνάριο, τότε το αποτέλεσμα «ανιχνεύθηκε μετάλλαξη» θα πρέπει να θεωρηθεί έγκυρο.
- Εάν ένα σωληνάριο είναι μη έγκυρο ως προς την τιμή HEX (εσωτερικός μάρτυρας), δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί το αποτέλεσμα αυτού του σωληναρίου.

Αντιστοίχιση κατάστασης μετάλλαξης δείγματος

Μετά την ολοκλήρωση της αξιολόγησης όλων των σωληναρίων αντίδρασης μετάλλαξης, η κατάσταση μετάλλαξης του δείγματος προσδιορίζεται ως εξής:

- Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη: Μία ή περισσότερες από τις 7 αντιδράσεις μετάλλαξης είναι θετικές. Εάν ανιχνευθούν περισσότερες από μία μεταλλάξεις, θα πρέπει να αναφερθεί η μετάλλαξη με τη μικρότερη τιμή ΔC_T .
- Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη: Και οι 7 αντιδράσεις μετάλλαξης είναι αρνητικές.
- Μη έγκυρη: Καμία αντίδραση μετάλλαξης δεν είναι θετική και μία ή περισσότερες αντιδράσεις μετάλλαξης είναι μη έγκυρες.

Σημείωση: Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit προορίζεται για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο KRAS σε ένα δείγμα DNA. Σε περίπτωση που ένα δείγμα χαρακτηρίζεται δείγμα στο οποίο ανιχνεύθηκε μετάλλαξη KRAS, πρέπει να αναφέρεται μόνο μία συγκεκριμένη μετάλλαξη. Εάν ανιχνευθούν περισσότερες από μία μεταλλάξεις, θα πρέπει να αναφερθεί η μετάλλαξη με τη μικρότερη τιμή ΔC_T .

Ενδέχεται να παρατηρηθεί διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ αντιδράσεων μετάλλαξης. Για παράδειγμα, εάν παρατηρηθεί υψηλού επιπέδου μετάλλαξη 12ALA, άλλες αντιδράσεις μετάλλαξης ενδέχεται να έχουν επίσης θετικό αποτέλεσμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι εκκινητές ARMS ανιχνεύουν άλλες μεταλλάξεις με παρόμοια αλληλουχία μεταξύ τους. Εάν ένας δεύτερος προσδιορισμός μετάλλαξης δίνει θετικό αποτέλεσμα, είναι πιθανό να πρόκειται για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Έχουν πράγματι παρατηρηθεί διπλές μεταλλάξεις, αλλά αυτές οι περιπτώσεις είναι σπάνιες.

Εάν μία ή περισσότερες αντιδράσεις μετάλλαξης είναι μη έγκυρες αλλά μία ή περισσότερες είναι θετικές, το δείγμα μπορεί να χαρακτηριστεί δείγμα στο οποίο ανιχνεύθηκε μετάλλαξη KRAS, καθώς υπάρχει μετάλλαξη. Ωστόσο, η ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης ενδέχεται να μην είναι ακριβής και η μετάλλαξη να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Επομένως, το δείγμα θα πρέπει να χαρακτηριστεί μόνο δείγμα στο οποίο ανιχνεύθηκε μετάλλαξη KRAS.

Παράρτημα 2: Εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* KRAS Assay Package

Το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit είναι σχεδιασμένο για χρήση με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με ρότορα 72 βυθισμάτων. Το λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package διατίθεται ξεχωριστά σε CD (αρ. κατ. 9022641).

Το *therascreen* KRAS Assay Package διατίθεται προς λήψη από την αντίστοιχη σελίδα προϊόντος του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com. Πληροφορίες για τη λήψη παρέχονται στην ενότητα «Product Resources» (Πόροι προϊόντος), στην καρτέλα «Supplementary Protocols» (Συμπληρωματικά πρωτόκολλα). Μπορείτε επίσης να παραγγείλετε τα Assay Packages σε CD.

Το πακέτο περιλαμβάνει τα πρότυπα «*therascreen* KRAS CE QC Locked Template» και «*therascreen* KRAS CE Locked Template».

Σημείωση: Το λογισμικό *therascreen* KRAS Assay Package λειτουργεί μόνο με την αντίστοιχη έκδοση 2.3 του λογισμικού Rotor-Gene Q με *therascreen* KRAS Assay Package έκδοση 3.1.1 (QIAGEN, αρ. κατ. 9023675). Βεβαιωθείτε ότι έχει εγκατασταθεί η σωστή έκδοση του λογισμικού Rotor-Gene Q πριν προχωρήσετε στην εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* KRAS Assay Package.

Διαδικασία (λήψη)

1. Πραγματοποιήστε λήψη του *therascreen* KRAS RGQ Assay Package από την αντίστοιχη ιστοσελίδα προϊόντος του *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, στον ιστότοπο **www.qiagen.com**.
2. Ανοίξτε το ληφθέν αρχείο zip κάνοντας διπλό κλικ στο αρχείο και πραγματοποιώντας εξαγωγή του αρχείου από την αρχειοθήκη.
3. Κάντε διπλό κλικ στο αρχείο ***therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe*** για να αρχίσει η εγκατάσταση.

Διαδικασία (CD)

1. Παραγγείλετε το CD του λογισμικού *therascreen KRAS RGQ Assay Package CE* που είναι συμβατό με το εγκατεστημένο λογισμικό *Rotor-Gene Q* (βλ. παραπάνω), το οποίο διατίθεται ξεχωριστά από την QIAGEN.

Έκδοση 3.1.1. Αρ. κατ. 9023675.

2. Εισαγάγετε το CD στη μονάδα δίσκου CD του φορητού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο *Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*.

3. Κάντε διπλό κλικ στο αρχείο *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe* ή *therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe* για να αρχίσει η εγκατάσταση.

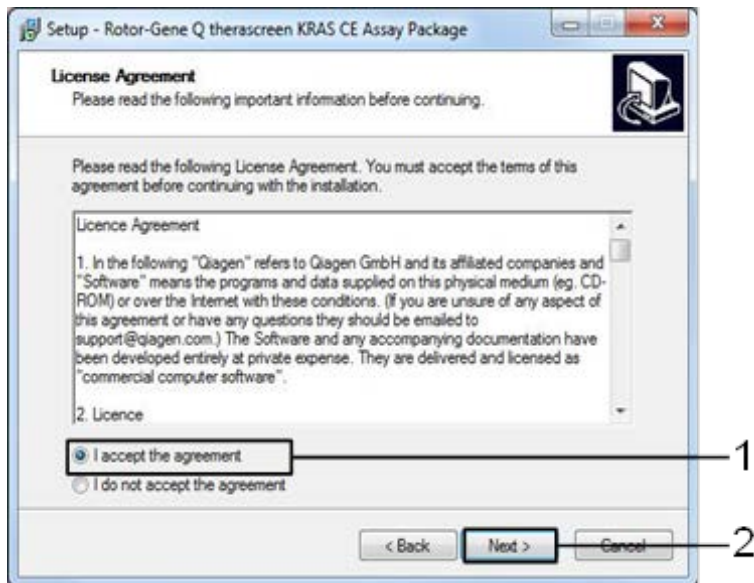
Εμφανίζεται ο οδηγός εγκατάστασης.

4. Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο) για να συνεχίσετε (Εικόνα 39).



Εικόνα 39. Πλαίσιο διαλόγου «Setup» (Εγκατάσταση). 1 = «Next» (Επόμενο).

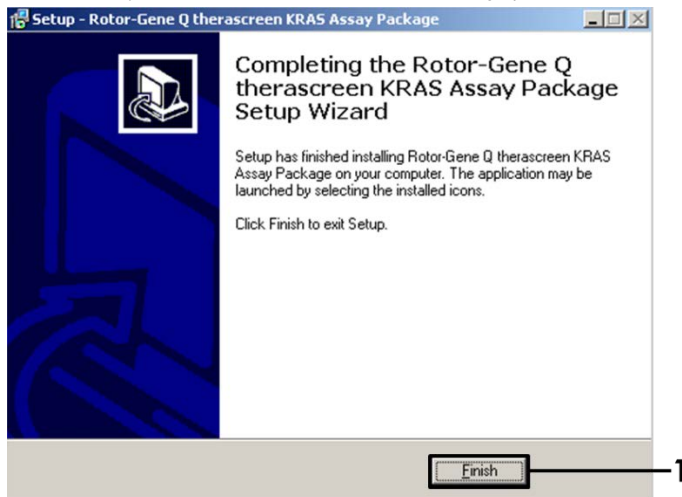
5. Διαβάστε τη Σύμβαση άδειας χρήσης στο πλαίσιο διαλόγου «License Agreement» (Σύμβαση άδειας χρήσης) και επισημάνετε το πλαίσιο «**I accept the agreement**» (Αποδέχομαι τη σύμβαση). Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο) για να συνεχίσετε (Εικόνα 40).



Εικόνα 40. Πλαίσιο διαλόγου «License Agreement» (Άδεια χρήσης). 1 = «I accept the agreement» (Αποδέχομαι τη σύμβαση), 2 = «Next» (Επόμενο).

Η εγκατάσταση του προτύπου αρχίζει αυτόματα.

6. Στο τελικό παράθυρο «Setup» (Εγκατάσταση), κάντε κλικ στο «**Finish**» (Τέλος) για να πραγματοποιήσετε έξοδο από τον οδηγό εγκατάστασης. (Εικόνα 41).



Εικόνα 41. Ολοκλήρωση του οδηγού.

7. Εκτελέστε επανεκκίνηση του υπολογιστή. Οι συντομεύσεις για τα πρότυπα «therascreen KRAS QC Locked Template» (Κλειδωμένο πρότυπο ποιοτικού ελέγχου therascreen KRAS) και «therascreen KRAS Locked Template» (Κλειδωμένο πρότυπο therascreen KRAS) δημιουργούνται αυτόματα και εμφανίζονται στην επιφάνεια εργασίας.

Πληροφορίες παραγγελίας

| Προϊόν | Περιεχόμενα | Αρ. κατ. |
|--|---|----------|
| <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24) | Για 24 αντιδράσεις: 1 προσδιορισμός μάρτυρα, 7 προσδιορισμοί μετάλλαξης, θετικός μάρτυρας, ύδωρ, <i>Taq</i> DNA πολυμεράση | 874011 |
| <i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1) | Πακέτο πρωτοκόλλου λογισμικού για χρήση με το <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit και το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM της QIAGEN με ρότορα 72 βυθισμάτων | 9023675 |
| Rotor-Gene Q και παρελκόμενα | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM | Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπροντρώ) συν κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση | 9002032 |
| Rotor-Gene Q MDx | Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπροντρώ) συν κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, συμπεριλαμβανομένης της εγκατάστασης και της κατάρτισης | 9002033 |

| | | |
|--|---|---------|
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Τεμάχιο αλουμινίου για μη αυτόματη προετοιμασία της αντίδρασης με μία πιπέτα μονού αυλού σε 72 σωληνάρια του 0,1 ml | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 1000 αντιδράσεις | 981103 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πώματα για 10.000 αντιδράσεις | 981106 |
| QIAamp DNA FFPE Tissue Kit — για καθαρισμό γενωμικού DNA από εγκλεισμένους σε παραφίνη ιστούς | | |
| QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50) | Για 50 παρασκευές DNA: Στήλες QIAamp MinElute®, πρωτεϊνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα και Collection Tubes (2 ml) | 56404 |

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο kit ή εγχειρίδιο χρήστη της QIAGEN. Τα εγχειρίδια των kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com ή μπορείτε να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN ή τον διανομέα της περιοχής σας.

Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

| Ημερομηνία | Αλλαγές |
|---------------------|---|
| R4, Ιανουάριος 2019 | Προστέθηκε εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος (εξωφύλλο) Ενημέρωση της ενότητας «Σύμβολα» Ενημέρωση προτύπου |
| R5, Νοέμβριος 2019 | Αλλαγή του νόμιμου κατασκευαστή (σελίδα εξωφύλλου) Αφαίρεση συμβόλου «EC + REP» από τη σελίδα εξωφύλλου και την ενότητα «Σύμβολα» Προσαρμογή της ονομασίας οργάνου από «Rotor-Gene Q MDx» σε «Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM» ώστε να συνάδει με την ονομασία στην ετικέτα του οργάνου Ενημέρωση του πρωτοκόλλου «Ανίχνευση μεταλλάξεων KRAS» ώστε να συμπεριληφθεί ένα επιπλέον βήμα στην προετοιμασία των κύριων μειγμάτων Διόρθωση τιμών στις στήλες «Συχνότητα» και «95% διαστήματος εμπιστοσύνης» του Πίνακα 9. Ενημέρωση της συνολικής συμφωνίας CRC από 96,4% σε 96,82% Διόρθωση τιμών στη στήλη LOD C ₉₅ του Πίνακα 14 |

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή.

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Σύμβαση άδειας περιορισμένης χρήσης για το *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή των παρακάτω όρων εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο παρόν εγχειρίδιο και μόνο με τα εξαρτήματα που περιλαμβάνονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο εγχειρίδιο αυτό και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα επιπλέον πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες χρήσης που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit ή/και η χρήση/οι χρήσεις του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του παρέχονται με άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το kit ή/και τα εξαρτήματά του.

Για τους εννημερωμένους όρους της άδειας χρήσης, ανατρέξτε στον ιστότοπο www.qiagen.com.

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

Οι κατατεθείσες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και αν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

Να μη χρησιμοποιείται με δείγματα κοπράνων.

Να μη χρησιμοποιείται με δείγματα ούρων.

Να μη χρησιμοποιείται με εξωκυττάριο νοκυκλικό οξύ από δείγμα αίματος.

Να μη χρησιμοποιείται με δείγματα μυελού των οστών χωρίς κύτταρα.

Να μη χρησιμοποιείται με δείγματα σιέλου.

ΜΕ ΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΑΥΤΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΔΙΑΣΦΑΛΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΓΟΡΑΣΤΗ ΟΣΩΝ ΑΦΟΡΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ ΕΥΡΕΣΤΕΧΝΙΑΣ ΤΗΣ ROCHE ΓΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΓΙΑ ΠΑΡΟΧΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ *IN VITRO* ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ. ΚΑΝΕΝΑ ΓΕΝΙΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΤΕΧΝΙΑΣ Ή ΑΛΛΗ ΔΕΙΞΗ ΟΠΟΙΟΥΔΗΠΟΤΕ ΕΙΔΟΥΣ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΑΥΤΟ ΤΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΔΙΚΑΙΩΜΑ ΧΡΗΣΗΣ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΕΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΕΤΑΙ ΔΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΟΝΤΟΣ.

1119793 HB-1861-005 11-2019 © 2019 QIAGEN. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Παραγγελίες www.qiagen.com/shop | Τεχνική υποστήριξη support.qiagen.com | Ιστότοπος www.qiagen.com