

Ekim 2021

therascreen[®] FGFR RGQ RT-PCR Kit Kullanım Talimatları



Sürüm 2

IVD

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir

RNeasy[®] DSP FFPE Kit ile kullanım içindir

Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM cihazları ile kullanım içindir

CE

REF

876711



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALMANYA

R1 **MAT**

1125704TR



İçerik

Kullanım Amacı	5
Test Özeti ve Açıklaması.....	6
Prosedür Prensipleri.....	9
Platform ve Yazılım	14
Sağlanan Materyaller.....	15
Kit içeriği.....	15
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler	16
Uyarılar ve Önlemler.....	18
Genel önlemler.....	20
Reaktif Saklama ve Kullanma.....	22
Sevkiyat koşulları	22
Depolama koşulları	22
Stabilite	22
Numune Kullanımı ve Saklama	23
FFPE numuneler	23
RNA örnekleri.....	23
Prosedür.....	25
RNA ekstraksiyonu ve hazırlığı	25
RNA kantifikasyonu ve normalizasyonu	26
Ters transkripsiyon.....	27
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında real-time PCR.....	31

Rotor-Gene AssayManager yazılımı sürüm 2.1'in kullanımı.....	35
Analiz.....	46
Prosedür Sınırlamaları.....	49
Sorun Giderme Kılavuzu	52
Kalite Kontrol	53
Performans Özellikleri	54
Kör sınırı (Limit of Blank, LoB)	54
Tahlil eşik değeri ve çapraz reaktivite	55
Tahlinin çapraz reaktivitesi ve analitik özgüllüğü	56
Tespit sınırı (Limit of Detection, LoD).....	57
Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik	58
Numune kullanımı	62
Lotlar arası değiştirilebilirlik	62
Çapraz kontaminasyon/analitik taşınma.....	63
Olumsuz etkileyen maddeler	64
Klinik performans	64
Referans yöntem ile korelasyon	65
Klinik sonuç verileri	67
Referanslar	70
Semboller	71
İletişim Bilgileri.....	73
Sipariş Bilgileri.....	74
Belge Revizyon Geçmişi.....	76

Kullanım Amacı

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) ürotelyal tümör dokusundan elde edilen RNA örneklerinde ekson 7'deki iki nokta mutasyonunun [p.R248C (c.742C>T) ve p.S249C (c.746C>G)], ekson 10'daki iki nokta mutasyonunun [p.G370C (c.1108G>T) ve p.Y373C (c.1118A>G)] ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3, FGFR3) genindeki iki füzyonun [FGFR3-TACC3v1 ve FGFR3-TACC3v3] kalitatif saptamasına yönelik gerçek zamanlı bir ters transkripsiyon PCR testidir. Testin, bu alterasyonları barındıran ve dolayısıyla BALVERSA™ (erdafitinib) ile tedaviye uygun olan ürotelyal kanser (Urothelial Cancer, UC) vakaları görülen hastaları belirlemede yardımcı olarak kullanımı endikedir.

Numuneler, manuel örnek hazırlama için RNeasy DSP FFPE Kit kullanılarak işlenir. Sonrasında ters transkripsiyon ve ardından Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında otomatik amplifikasyon ve saptama işlemleri uygulanır.

Test Özeti ve Açıklaması

Fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (Fibroblast Growth Factor Receptors, FGFR'ler), vücutta birçok hücre tipinde bulunan tirozin kinazlardır (transmembran reseptörleri). FGFR'ler aktive olduğunda, sitosolik adaptör proteinleri ve RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ ve STAT intraselüler sinyal yolları ile etkileşime aracılık eden spesifik tirozin kalıntıları fosforile olur. Bu sinyal yolağının, hücre çoğalması, sağkalımı ve migrasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (1) ve dolayısıyla kanser tedavileri için cazip bir hedefdir.

UC hastalarının bir alt grubunda FGFR genleri içinde aktive edici alterasyonlar tespit edilmiştir (2, 3) ve bu da, bu tür genetik bozukluğun tümör gelişimi ve ilerlemesinin bir etmeni olarak önemini ortaya koymaktadır.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) üroteliyal tümör dokusundan elde edilen RNA örneklerinde ekson 7'deki iki nokta mutasyonunun [p.R248C (c.742C>T) ve p.S249C (c.746C>G)], ekson 10'daki iki nokta mutasyonunun [p.G370C (c.1108G>T) ve p.Y373C (c.1118A>G)] ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3, FGFR3) genindeki iki füzyonun [FGFR3-TACC3v1 ve FGFR3-TACC3v3] kalitatif saptamasına yönelik gerçek zamanlı bir ters transkripsiyon PCR testidir. Testin, bu alterasyonları barındıran ve dolayısıyla BALVERSA (erdafitinib) ile tedaviye uygun olan UC vakaları görülen hastaları belirlemede yardımcı olarak kullanımı endikedir.

Numuneler, manuel örnek hazırlama için RNeasy DSP FFPE Kit kullanılarak işlenir. Sonrasında ters transkripsiyon ve ardından Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında otomatik amplifikasyon ve saptama işlemleri uygulanır.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit ayrıca, FGFR3 füzyonu FGFR3-BAIAP2L1 ve FGFR2 füzyonları FGFR2-BICC1 ile FGFR2-CASP7'yi tanımlamak için tasarlanmıştır çünkü bu FGFR füzyonlarını barındıran hastalar, BALVERSA (erdafitinib) 42756493-BLC2001 klinik çalışması için uygun bulunmuştur. Bununla birlikte test, bu üç füzyonu saptama yönünden klinik olarak doğrulanmamıştır. Bu füzyonları barındıran UC vakaları için ilaç güvenliği ve etkinliği belirlenmemiştir ve *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in BALVERSA (erdafitinib) ile tedaviye uygun hastaların seçiminde yardımcı olarak kullanımına ilişkin bir iddiada bulunulmamıştır.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit tahlillerinin FGFR alterasyon hedefleri, Tablo 1 ve Tablo 2'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Tablo 1. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit tahlillerinin hedefleri: Nokta mutasyonları

Gen	Amino asit varyantı	CDS mutasyonu	Cosmic ID	Eksonlar
FGFR3	p.R248C	c.742C>T	COSM714	7
FGFR3	p.S249C	c.746C>G	COSM715	7
FGFR3	p.G370C	c.1108G>T	COSM716	10
FGFR3	p.Y373C	c.1118A>G	COSM718	10

Tablo 2. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit tahlilinin hedefleri: Füzyonlar

Füzyon ID	İlgili genler	Genomik kırılma noktaları	Eksonlar
FGFR3-TACC3v1	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	TACC3	G chr4:1741428	11
FGFR3-TACC3v3	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	TACC3	G chr4:1739324	10
FGFR3-BAIAP2L1*	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	BAIAP2L1	A chr7:97991744	2
FGFR2-BICC1*	FGFR2	chr10:123243211 G	17
	BICC1	A chr10:60461834	3
FGFR2-CASP7*	FGFR2	chr10:123243211 G	17
	CASP7	A chr10:115457252	2

* Test, FGFR3 füzyonu FGFR3-BAIAP2L1 ve FGFR2 füzyonları FGFR2-BICC1 ile FGFR2-CASP7'yi tanımlamak için tasarlanmıştır çünkü bu FGFR füzyonu hastaları, BALVERSA (erdafitinib) 42756493-BLC2001 çalışması için uygun bulunmuştur. Bununla birlikte QIAGEN testi, bu üç füzyonu saptama yönünden klinik olarak doğrulanmamıştır.

Prosedür Prensipleri

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, FFPE UC numunelerinden ekstrakte edilen RNA'da altı FGFR3 alterasyonunun seçici amplifikasyonu yoluyla, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM system kullanılarak saptamaya dayalıdır. Alele özgü teknoloji, spesifik ileri ve ters primer ve prob setlerinin kullanımına dayalı olarak, hedef FGFR alterasyonlarının doğru ve yeniden üretilebilirliği yüksek saptamasına olanak sağlar; PCR reaksiyonunda uzatma ve amplifikasyon, ancak hedef cDNA ile primerler ve probalar arasında mükemmel bir eşleşme ile mümkün olur. Sonuç raporlama tamamen otomatiktir. Hem çalışma kontrolleri hem de örnek sonuçlarının geçerli olması ve döngü sayısı için önceden belirlenen eşik değerinin altında yeterli tahlil hedef amplifikasyonu gerçekleşmesi durumunda rapor, her bir örnekte saptanan FGFR alterasyonlarını gösterir.

RNA saflaştırma

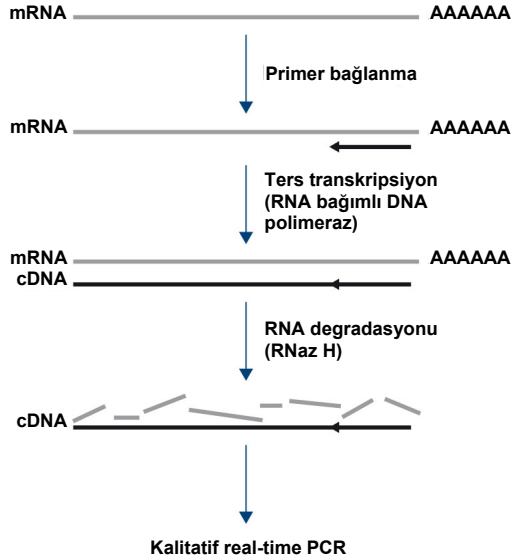
Formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (Formalin Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) örnekler, en yaygın olarak kullanılan solid tümör materyali biçimidir. Bu örnekler, stabil ve taşınması ve saklanması kolay olsa da, sabitleme ve gömme işlemi nükleik asitlere zarar verir ve bunları mumlu hidrokarbon materyalleri ile karıştırır. Dolayısıyla, *in vitro* tanı amaçlı analize uygun örnekler elde etmek için özel saflaştırma teknikleri uygulanmalıdır. Rneasy DSP FFPE Kit, FFPE materyalinden RNA saflaştırmanın getirdiği zorlukların üstesinden gelmek için özel olarak geliştirilmiştir ve bu kit kullanılarak test edilecek RNA'yı hazırlamak için kullanılmalıdır.

Ters transkripsiyon

Test prosedürünü gerçekleştirmek için, öncelikle Ters Transkriptaz kullanılarak örnek RNA'sından komplementer DNA (complementary DNA, cDNA) sentezlenir. Analitik bir PCR reaksiyonunda başlangıç şablonu olarak hareket eden de bu cDNA'dır.

Ters transkripsiyon (Reverse transcription, RT), hepsi *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile birlikte verilen Ters Transkriptaz enzimi, RT Tamponları ve RT Primer Karışımından hazırlanan bir master karışım kullanılarak gerçekleştirilir. RT reaksiyonu 42°C'de gerçekleşir ve ardından 95°C'de inkübasyon ile durdurulur.

Ters Transkriptaz, üç farklı enzim etkinliğine sahip çok işlevli bir enzimdir: RNA bağımlı DNA polimeraz, hibrit bağımlı eksoribonükleaz (RNaz H) ve DNA bağımlı DNA polimeraz. İn vitro ters transkripsiyon için, tek zincirli cDNA üretmek üzere ilk iki etkinlik kullanılır. İlk olarak, RNA bağımlı DNA polimeraz etkinliği (ters transkripsiyon) bir RNA şablonundan cDNA transkripsiyonunu gerçekleştirerek bir DNA:RNA hibridi oluşturur. Ardından, RNaz H eksonükleaz etkinliği, spesifik olarak bu hibritlerin yalnızca RNA zincirini degrade eder (Şekil 1). Dolayısıyla bu etkinlik, cDNA'ya hibritlenen RNA'yı etkiler ve saf RNA üzerinde etkili değildir. Real-time PCR öncesinde, RNaz H enzimi kullanılarak ayrı bir RNA degradasyon adımı gerekli değildir.



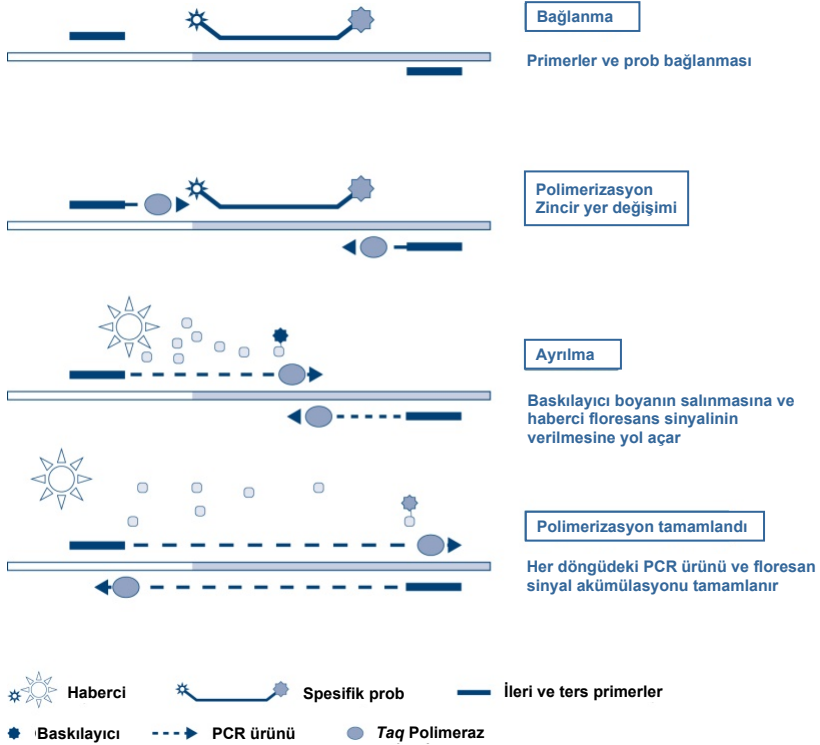
Şekil 1. cDNA sentezi. Ters transkripsiyon ve birinci zincir cDNA sentezi.

Real-time PCR

Real-time PCR kullanımı, PCR amplifikasyon işleminin sonunda değil, son nokta PCR'ında olduğu gibi işlemin ekspanansiyel fazı sırasında reaksiyon ürünlerinin saptanmasını sağlar. Bu, testin özgüllüğünü artırır ve test işlemini gerçekleştirmek için gereken süreyi kısaltır.

Tahlil, TaqMan® problemleri ile real-time PCR oligonükleotid hidroliz reaksiyonu prensibinden faydalanır (4). Her bir hedef baz sekansını saptamak için üç tip oligonükleotid kullanılır; hedef sekansın yukarı ve aşağı akışındaki sekansları tamamlayıcı nitelikte olan ve bir PCR ampikonu oluşturan bir çift konvansiyonel PCR primeri ve kesin hedef sekansı tamamlayıcı nitelikte olan ve hem floresan bir haberci boya hem de bir floresans baskılayıcıyı çok yakın bir şekilde birleştiren bir prob molekülü. Probu 3' ucu, uzamasını önlemek ve dolayısıyla reaksiyonda başka bir PCR primeri olarak hareket etmesini önlemek amacıyla bir di-deoksi bazdır.

PCR sırasında, ilgilenilen hedef sekans mevcutsa oligonükleotid probu bu sekansa bağlanır, PCR primerleri ise, prob bağlanma bölgesinin yukarı ve aşağı akışında bulunan tamamlayıcı sekanslarına bağlanır. Reaksiyonun primer uzatma fazında, *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerazın 5' ila 3' eksonükleaz etkinliği, prob oligonükleotidini ayırarak hem floresan haberciyi hem de baskılayıcı moleküllerini serbest bırakır. Bunlar birbirinden uzaklaşarak çözelti içine yayıldıkça, baskılayıcının haberci üzerindeki etkisi azalır ve bu da, saptanabilir floresansta bir artışa yol açar. Bu süreç, her PCR döngüsünde tekrarlanır ve ürünün ekspanansiyel akümülyasyonuna engel olmaz (Şekil 2).



Şekil 2. TaqMan gerçek zamanlı reaksiyon prensibi.

Floresans sinyalinde artış yalnızca, hem primerleri hem de probu tamamlayıcı nitelikte olan hedef sekansın reaksiyonda mevcut olması durumunda saptanır. Hedef sekans mevcut değilse, prob ayrılması gerçekleşmez, floresan habercinin baskılayıcıdan ayrılması gerçekleşmez ve dolayısıyla floresansta bir artış gözlemlenmez. Önceden belirlenen eşik üzerinde bir floresan sinyali saptamak için gereken PCR döngülerinin sayısına döngü eşiği (C_T) adı verilir ve bu değer, reaksiyonun başlangıcında mevcut olan hedef miktarıyla doğru orantılı olup test için bir duyarlılık limitinin belirlenmesini sağlar.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit PCR reaksiyonu karışımları, QIAGEN *Taq* DNA Polymerase'ın modifiye bir formu olan HotStarTaq® DNA Polymerase içerir. İnaktif bir durumda sağlanır ve ortam sıcaklığında enzimatik aktivite göstermez. Bu, reaksiyon ayarı ve birinci denatürasyon adımı sırasında yanlış hazırlanmış ürünlerin ve primer-dimerlerin oluşumunu önler. Böylece, PCR artefaktlarının reaktantlar için rekabete girmesinin önüne geçilir ve yüksek PCR özgüllüğü sağlanır. Enzim, bir reaksiyonun başlangıcında, 95°C'de 15 dakikalık bir inkübasyon adımıyla aktive edilir. Hot Start, reaksiyonların hızlı ve kolay bir şekilde oda sıcaklığında ayarlanmasını mümkün kılar.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit PCR reaksiyonu karışımları ayrıca, sekansa özgü problemler kullanılarak çoklu real-time PCR için spesifik olarak geliştirilen bir PCR Tamponu içerir. Bu tampon, her bir PCR döngüsünün bağlanma adımı sırasında yüksek bir spesifik-nonspesifik primer bağlanma oranını teşvik eden, özel olarak optimize edilmiş bir KCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kombinasyonu içerir. Bu sayede, sıkı primer bağlanma koşulları oluşur ve PCR özgüllüğünün artması sağlanır. Bu tampon kullanılırken, primer bağlanması MgCl_2 konsantrasyonundan yalnızca marjinal olarak etkilenir; dolayısıyla Mg^{2+} titrasyonu yoluyla optimizasyon gerekli değildir. Tampon ayrıca, çoklu PCR'ı kolaylaştıran sentetik Factor MP içerir. Factor MP, cDNA şablonundaki primerler ve problemlerin lokal konsantrasyonunu artırır ve spesifik olarak bağlı primerleri ve problemleri stabilize eder. Bu sayede, etkili bağlanma ve uzatma sağlar. PCR Tamponundaki bu çeşitli bileşenlerin kombinasyonu, birden fazla amplifikasyon reaksiyonunun birbirini engellemesini önler.

Platform ve Yazılım

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, aşağıdakilerle kurulan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazıyla kullanılmak üzere özel olarak tasarlanmıştır:

- Rotor-Gene AssayManager® sürüm 2.1
- Gamma Plug-in sürüm 1.0.0
- *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile sürüm 1.0.4

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazıyla ilgili bilgiler için *Rotor-Gene Q MDx Kullanım Kılavuzu* belgesine bakın. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının bakımı, kullanım kılavuzundaki gereklilikler doğrultusunda yapılmalıdır.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit		(24)
Katalog no.		876711
Reaksiyon sayısı		24
İçerik	Kapak rengi	Hacim
RT Buffer 1 (RT Tamponu 1)*	Beyaz	200 µl
RT Buffer 2 (RT Tamponu 2)†	Kahverengi	100 µl
RT Primer Mix (RT Primer Karışımı)	Eflatun	50 µl
Reverse Transcriptase (Ters Transkriptaz)	Mavi	50 µl
Positive Control (Pozitif Kontrol)	Kırmızı	100 µl
PC Diluent (PC Seyreltici)	Kırmızı	200 µl
Mutations-1 Reaction Mix (Mutasyon-1 Reaksiyon Karışımı)‡	Turuncu	720 µl
Mutations-2 Reaction Mix (Mutasyon-2 Reaksiyon Karışımı)‡	Eflatun	720 µl
Fusions-1 Reaction Mix (Füzyon-1 Reaksiyon Karışımı)‡	Sarı	720 µl
Fusions-2 Reaction Mix (Füzyon-2 Reaksiyon Karışımı)‡	Yeşil	720 µl
Water for Sample Dil. (Örnek Dilüsyon Suyu)	Şeffaf	1,9 ml
Water for NTC (NTC İçin Su)	Şeffaf	1,9 ml
therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit Kullanım Talimatları (El Kitabı)	–	1

* Poli(etilen glikol) içerir. Daha fazla bilgi için bkz. sayfa 18.

† Deoksiribonükleaz içerir. Daha fazla bilgi için bkz. sayfa 18.

‡ Analiz edilecek örnek hariç, gereken tüm bileşenleri içeren PCR reaksiyonu karışımı.

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler

RNA saflaştırma için ekipman, sarf malzemeleri ve reaktifler

- RNeasy DSP FFPE Kit (kat. no. 73604)
- Örnek işleme için kalibre edilmiş, özel pipetler* (ayarlanabilir) (20 µl, 200 µl ve 1 ml)
- RNaz ve nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril hidrofobik filtreli PCR pipeti uçları
- 2 ml tüpler için rotorlu masaüstü santrifüj*
- Vorteks karıştırıcı*
- Moleküler biyoloji sınıfı %100 etanol†
- Tek kullanımlık neşterler
- 56°C ile 80°C arasında inkübasyon ve 1100 rpm'de çalkalama özelliğine sahip kalibre edilmiş ısıtma bloğu

Ters transkripsiyon ve real-time PCR için ekipman ve sarf malzemeleri

- Örnek hazırlama, master karışım hazırlama ve RNA ve cDNA'yı dağıtmak için kalibre edilmiş, özel pipetler* (ayarlanabilir) (20 µl, 200 µl ve 1 ml)
- RNaz ve nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril hidrofobik filtreli PCR pipeti uçları
- 1,5 ml veya 2,0 ml nükleaz içermeyen, düşük bağlama özelliğine sahip PCR tüpleri
- 0.2 ml PCR Tubes (kat. no. 981005)
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (kat. no. 981103 veya 981106)
- 0,2 ml PCR tüplerini 42-95°C'de inkübe etme özelliğine sahip ısıtma bloğu*, su banyosu* veya ısı döngüleyici*

* Cihazların ve ekipmanın üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

† Metanol veya metiletilketon gibi başka maddeler içeren denatüre alkol kullanmayın.

- 1,5 ml ve 2,0 ml tüpleri 0-8°C'de tutma özelliğine sahip soğutma sistemi*
- 0,2 ml, 1,5 ml ve 2,0 ml tüpler için rotorlu masaüstü santrifüj*
- Vorteks karıştırıcı
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR tubes, manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok (kat. no. 9018905)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok (kat. no. 9018901)
- 72-Well Rotor (kat. no. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor (kat. no. 9018904)
- Rotor-Disc® 72 (kat. no. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (kat. no. 9018900)
- Rotor Holder (kat. no. 9018908)
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (kat. no. 9002032) veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (kat. no. 9002033)*†
- Rotor-Gene AssayManager yazılımı sürüm 2.1
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in sürüm 1.0.0
- *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile sürüm 1.0.4

* Cihazların ve ekipmanın üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

† Bazı ülkelerde, mevcutsa, üretim tarihi Mayıs 2011 veya sonrası olan Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazı kullanılabilir. Üretim tarihi bilgisi, cihazın arkasındaki seri numarasından elde edilebilir. Seri numarası, "aa" ibaresinin basamak olarak üretim ayını, "yy" ibaresinin üretim yılının son iki basamağını ve "nnn" ibaresinin benzersiz cihaz tanımlayıcıyı gösterdiği "aayynnn" biçimindedir.

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazıyla ilgili güvenlik bilgileri için cihazla birlikte verilen kullanım kılavuzuna bakın.


RNeasy DSP FFPE Kit (kat. no. 73604) ile ilgili güvenlik bilgileri için *RNeasy DSP FFPE Kit El Kitabı* belgesine bakın.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, profesyonel bir laboratuvar ortamında eğitimli personel tarafından kullanıma yöneliktir.

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı ile kullanım içindir.

RNeasy DSP FFPE Kit ile kullanım içindir.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit kullanılırken gözlemlenen genel çalışma kontrol hatası oranı (PC ve NTC) yaklaşık %5,2'dir (PC için %1 ve NTC için %4,2). Geçersiz bir çalışma sonucu elde edilmesi durumunda, örnek testleri, mevcut örnek RNA'sı kullanılarak sayfa 52, Sorun Giderme Kılavuzu kısmında açıklandığı şekilde tekrarlanmalıdır. Orijinal FFPE ekstraksiyonundan yeniden test için RNA miktarı yetersizse FFPE materyalinden yeniden ekstraksiyon yapılmalıdır.

DİKKAT 	Örnek hazırlama atığına doğrudan çamaşır suyu veya asidik solüsyonlar EKLEMEYİN.
--	--

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit bileşenleri için aşağıdaki tehlike ve önlem ifadeleri geçerlidir.

RT Tamponu 1



Poli(etilen glikol) içerir. Uyarı! Solunum yollarında tahrişe neden olabilir. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın.

RT Tamponu 2



Deoksiribonükleaz içerir. Tehlike! Alerjik cilt reaksiyonuna neden olabilir. Solunursa alerji veya astım belirtileri ya da solunum zorluklarına neden olabilir. Tozu/ buğuyu/ gazı/ dumanı/ buharı/ spreyi solumaktan kaçınınız. Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın. Solunum koruması kullanın. Maruz kalmanız veya endişelenmeniz durumunda: Bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın. Kişiyi temiz havaya çıkarın ve solunum için rahat bir pozisyonda tutun.

Genel önlemler

Her zaman aşağıdakilere dikkat edin.

RT-PCR testlerinin performansı, geçerli düzenlemeler ve ilgili standartlarla uyumlu ve moleküler biyolojiye uygun ekipman bakımı dahil iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

- Bu test, yalnızca klinik FFPE UC numuneleriyle kullanım içindir.
- Tüm kimyasal ve biyolojik materyaller potansiyel olarak tehlikelidir ve bu doğrultuda işlem görmelidir. FFPE numune materyali ve bundan hazırlanan nükleik asitlerin enfeksiyon tehlikesi oluşturma olasılığı düşüktür ancak yerel kurumsal Sağlık ve Güvenlik prosedürlerine daima uyulmalıdır.
- Örneği ve tahlil atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.
- *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile birlikte verilen reaktifler optimum ölçüde seyreltilmiştir. Performans kaybı yaşanabileceği için reaktifleri daha fazla seyreltmeyin.
- 25 µl'den daha az reaksiyon hacmi (reaksiyon karışımı ve örnek) ile işlem yapmayın.
- *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile birlikte verilen reaktifler, yalnızca aynı kit lotuna ait reaktiflerle birlikte kullanıma yöneliktir. Performansı etkileyebileceğinden, verilen reaktiflerden herhangi birini, farklı bir *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit üretim lotuna ait aynı reaktiflerle değiştirmeyin.
- İlave uyarılar, önlemler ve prosedürler için Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı kullanım kılavuzlarına başvurun.
- İnkübasyon sürelerinin ve sıcaklıkların değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilere neden olabilir.
- Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.
- Reaksiyon karışımları ışığa maruz kalırsa bozulabilir.
- Yanlış pozitif sinyale neden olabilecek RNA, cDNA veya PCR ürünü taşıma kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.

- Şablon RNA'nın bozulmasına ve testin başarısız olmasına yol açabilecek RNaz kontaminasyonunu önlemek için son derece dikkatli olun.
- Reaksiyon karışımlarını kurmak ve şablonları eklemek için birbirinden ayrı pipetler kullanın.
- Çalışma bitinceye kadar Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazını açmayın.
- Real-time PCR çalışması bittikten sonra Rotor-Gene Q tüplerini açmayın.
- Doğru örnek testi yapabilmek için yanlış örnek girişi, yükleme hataları ve pipetleme hatalarından kaçınmaya özen göstererek dikkatli olunmalıdır.
- Her zaman doğru tanımlamayı garanti etmek için örneklerin sistematik bir şekilde ve açıkça etiketlenmiş olarak kullanıldığından ve böylece izlenebilirliğin sağlandığından emin olun.

Aşağıdaki önlemlerin alınmasını öneririz:

- Tahlili gerçekleştirirken nükleaz içermeyen laboratuvar gereçleri (örn. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri) kullanın ve eldiven takın.
- Örneklerin ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek üzere tüm pipetleme adımları için yeni aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
- RT ve PCR reaktiflerini, hiçbir RNA veya DNA matrisinin (RNA, DNA, cDNA, plazmid veya PCR ürünleri) içeri sokulmadığı özel bir alanda, özel laboratuvar gereçleri (pipetler, uçlar vb.) ile kullanın. Analiz edilecek örnekleri, özel ekipmanların (pipetler, uçlar vb.) bulunduğu ayrı bir bölgeye (tercihen ayrı bir odaya veya PCR örnek hazırlama kabinine) alın.

Reaktif Saklama ve Kullanma

Sevkiyat koşulları

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit kuru buz üzerinde gönderilir ve ulaştığında donmuş halde olması gerekir. Teslimat esnasında *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in herhangi bir bileşenin donmuş halde olmadığını, dış ambalajın nakliye esnasında açılmış olduğunu veya paket içinde ambalaj notu, Kullanım Talimatları veya reaktiflerin bulunmadığını fark ederseniz, lütfen bir QIAGEN Teknik Servis Departmanı veya yerel dağıtıcılarla irtibata geçin (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Depolama koşulları

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit alındıktan sonra hemen, sabit sıcaklıkta bir dondurucuda -30 ila -15°C'de saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır. Buna, kit kutusundan çıkarılması ve belirtilen son kullanma tarihine kadar hemen -90 ila -65°C'de saklanması gereken PC Seyreltici dahil değildir.

RNeasy DSP FFPE Kit (kat. no. 73604) ile ilgili depolama bilgileri için *RNeasy DSP FFPE Kit El Kitabı* belgesine bakın.

Stabilite

Reaktifler, belirtilen son kullanma tarihine kadar orijinal ambalajlarında -30 ila -15°C'de saklanabilir (buna, her zaman -90 ila -65°C'de saklanması gereken PC Seyreltici dahil değildir). En fazla beş kez dondurma-çözdürme döngüsü uygulayın.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit reaktifleri, minimum 30 dakika ve maksimum 3 saat boyunca çözdürülmelidir. Reaktifler kullanıma hazır olduğunda, RT veya PCR reaksiyonları kurulabilir. RT veya PCR çalışmasından önce toplam kurulum süresi 4 saati aşmamalıdır.

Numune Kullanımı ve Saklama

FFPE numuneler

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, RNeasy DSP FFPE Kit kullanılarak FFPE UC numunelerinden ekstrakte edilen RNA örnekleriyle kullanıma yöneliktir.

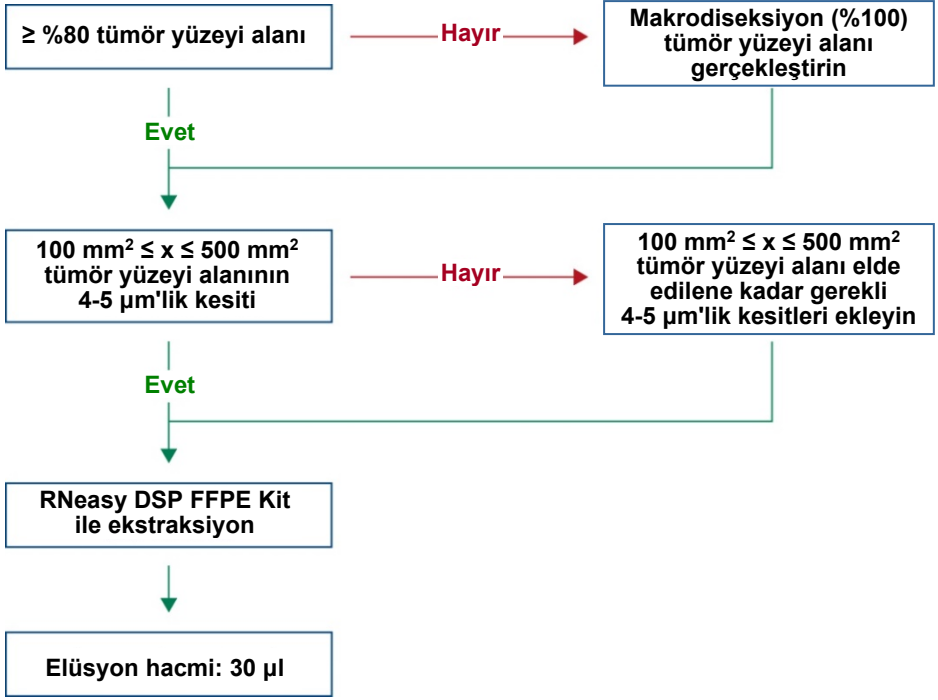
RNA örnekleri

RNA örnekleri ekstrakte edildikten sonra, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile hemen test edilmeli veya -90 ila -65°C'de saklanmalıdır. En fazla beş kez dondurma-çözdürme döngüsü uygulayın.

Doku örneklerinin RNA ekstraksiyonuna hazırlanması için:

- Mikrotom kullanarak FFPE örneği bloğundan 4-5 µm'lik seri kesitler alın ve bunları cam slaytlar üzerine yerleştirin.
- Eğitilmiş bir görevli (örn. bir patolog), tümör dokusunun mevcut olduğunu doğrulamak ve sınırlarını işaretlemek için Hematoksilin ve Eozin (H&E) ile boyanmış bir kesiti değerlendirmelidir. Tümör yüzey alanını belirlemek ve gerekirse makrodiseksiyona rehberlik etmek için ekstrakte edilecek kesitlere bitişik bir slayt gereklidir.
- H&E ile boyanmış kesitler RNA ekstraksiyonu için kullanılmamalıdır.
- Tüm FFPE bloklarını ve slaytlarını oda sıcaklığında (15-25°C) saklayın.

Gereken FFPE girişi, 100 mm² ile 500 mm² arasında toplam tümör yüzeyi alanı ile (kapsayıcı) 4-5 µm'lik bir slayt kalınlığına eşdeğerdir. Bu, birden fazla slayttan materyaller birleştirilerek oluşturulabilir (Şekil 3).



Şekil 3. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR System ile kullanılacak klinik FFPE UC örnek saflaştırma iş akışı.

- Minimum %80 tümör yüzeyi alanı elde etmek için makrodiseksiyon gerçekleştirilmelidir. Tümör yüzeyi alanı 100 mm² altında olursa ve/veya tümör yüzeyi alanı %80'in altında olursa minimum örnek gerekliliklerini karşılamak için ek kesitler kullanılmalıdır.

Not: Neşter kullanırken gereken özeni ve dikkati gösterin ve neşter bıçağının daima vücuttan uzağa dönük olduğundan emin olun.

Prosedür

RNA ekstraksiyonu ve hazırlığı

RNA, RNeasy DSP FFPE Kit (kat. no. 73604) kullanılarak saflaştırılmalıdır.

Kullanılacak reaktiflerin son kullanma tarihinin geçmediğinden ve bunların doğru koşullarda nakledilip saklandığından emin olun.

Not: *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in performansı yalnızca, RNeasy DSP FFPE Kit (kat. no. 73604) ile birlikte doğrulanmıştır. Başka bir RNA saflaştırma ürünü kullanmayın.

Başlamadan önce önemli noktalar

- RNeasy DSP FFPE Kit'i ilk defa kullanıyorsanız *RNeasy DSP FFPE Kit El Kitabı* belgesinde yer alan "Önemli Notlar" başlığını okuyun.
- İlk defa RNA ile çalışıyorsanız "Ek: RNA Muamelesiyle İlgili Genel Notlar" (*RNeasy DSP FFPE Kit El Kitabı*) kısmını okuyun.
- Buffer RBC, içinde guanidin tuzu bulunduğundan, çamaşır suyu içeren dezenfeksiyon reaktifleriyle uyumlu değildir. Güvenlik bilgileri için *RNeasy DSP FFPE Kit El Kitabı* belgesine bakın.
- Aksi belirtilmediği sürece, prosedürün tüm adımlarını oda sıcaklığında (15-25°C) gerçekleştirin. Prosedür sırasında hızlı çalışın ve adımlar arasında durmayın.
- Tüm santrifüleme adımlarını, 15-25°C'de tutulan bir santrifüj kullanarak gerçekleştirin. Soğutulmuş bir mikrosantrifüj kullanıyorsanız cihazı oda sıcaklığına ayarlayın; aksi takdirde, 15°C altına önemli ölçüde soğuma meydana gelebilir.
- Buffer RPE ve RNase-Free DNase I ürününü ilk defa kullanıyorsanız bunları, *Rneasy DSP FFPE Kit El Kitabı* belgesinde açıklandığı şekilde sulandırın.

- Tüm tamponları oda sıcaklığına getirin (15-25°C). Sulandırılmış Buffer RPE'yi çalkalayarak karıştırın.
- Adım 5 ve 9'da kullanılmak üzere, çalkalama fonksiyonuna sahip bir ısıtma bloğunu 56°C'ye ayarlayın. Bekleme süresini kısaltmak için, adım 9'da kullanılmak üzere, çalkalama fonksiyonuna sahip ikinci bir ısıtma bloğunu 80°C'ye ayarlayın.

Not: İnkübasyon sürelerinin uzaması RNA kaybına veya degradasyonuna yol açabileceğinden, inkübasyonlar arasında saflaştırma prosedürünü durdurmayın.

Prosedür

- *RNeasy DSP FFPE Kit El Kitabı* belgesinde açıklandığı şekilde RNA saflaştırma prosedürünü izleyin. "FFPE Doku Kesitlerinden Total RNA'nın Saflaştırılması" protokolünde, >3-4 kesitlerini (I ile işaretlenmiştir) işlemek için kullanılan hacimlere uyulduğundan emin olun.
- RNA'yı, RNeasy DSP FFPE Kit ile birlikte verilen 30 µl RNaz İçermeyen Su içinde elüsyona tabi tutun.
- Elüsyona tabi tutulan RNA'nın 3 µl'sini kantifikasyon için alikotlara ayırın.
- RNA elüatlarını -90 ila -65°C'de saklayın.

RNA kantifikasyonu ve normalizasyonu

Prosedür

- RNeasy DSP FFPE Kit ile birlikte verilen ve RNA elüsyonu için kullanılan RNaz İçermeyen Suyu kullanarak spektrofotometriyi boşaltın.
- RNA miktarı 260 nm'deki optik yoğunluğun ölçümü ile belirlenir.
- Saflaştırılmış toplam RNA miktarı = konsantrasyon × örneğin µl cinsinden hacmi.
- RNA konsantrasyonu 16,67 ng/µl altında olursa örnek daha fazla işlenmemelidir. İleri analiz için yeni bir FFPE numuneden yeni bir RNA ekstraksiyonu kullanılmalıdır.

- RNA, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile birlikte verilen Örnek Dilüsyon Suyu kullanılarak 16,67 ng/µl'ye seyreltilmelidir.
- Ters transkripsiyon reaksiyonu, 15 µl nihai hacimde seyreltilen saflaştırılmış 250 ng RNA için (15 µl x 16,67 ng/µl = 250 ng RNA girdisi) optimize edilir.

Ters transkripsiyon

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, düşük miktarda bulunanlar dahil olmak üzere, tüm hedef transkriptlerin hassas bir şekilde saptanması için yüksek cDNA verimi sağlar. Ters transkripsiyon, cDNA üretmek için, bir RNA şablonu ve RNA'nın 3' ve 5' uçlarını tamamlayıcı nitelikte olan primerlerin bir karışımını kullanır. Ters transkriptaz (Reverse Transcriptase, RT) enzimi, daha sonra *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit PCR reaksiyonunda girdi olarak kullanılan birinci zincir cDNA'yı sentezler.

Başlamadan önce önemli noktalar

- RNA degradasyonu riskini en aza indirmek için tüm reaksiyonları 0-8°C'ye ayarlayın.
- RNaz inhibitörü ve dNTP'ler, kit bileşenlerine önceden dahil edilmiştir. İlave RNaz inhibitörü ve dNTP'ler eklemeyin.
- RT Primer Karışımı (birlikte verilen) kullanılmalıdır. RT Primer Karışımı, RNA transkriptlerinin tüm bölgeleri için yüksek cDNA verimleri sağlayacak şekilde optimize edilmiştir.
- Ters transkripsiyon reaksiyonunu başlatmadan önce ayrı denatürasyon ve bağlanma adımları gerekli değildir.
- Ters transkripsiyon sonrasında reaksiyon, ters transkriptazı deaktive etmek için 3 dakika boyunca 95°C'de inkübasyon ile durdurulmalıdır.

Prosedür

1. Reaksiyon kurulumundan önce, 96 x 0,2 ml PCR tüplerini tutma kapasitesine sahip bir yükleme bloğu ve 12 veya daha fazla 2 ml tüpü en az 60 dakika boyunca 0-8°C'de tutma kapasitesine sahip bir soğutma bloğu yerleştirin.
2. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile birlikte verilen RT Tamponu 1, RT Tamponu 2, Ters Transkriptaz, RT Primer Karışımı ve NTC İçin Suyu, RT reaksiyon kurulumu başlangıcından önce 30 dakika ila 3 saat boyunca oda sıcaklığında çözündürün.
3. Test örnekleri, PC ve PC Seyrelticiyi, RT reaksiyon kurulumu başlangıcından önce 30 dakika ila 3 saat boyunca 0-8°C'de çözündürün.
4. Tamamen çözündürüldüğünden ve çözelti içinde çözündüğünden emin olmak için tüm RT reaktiflerini yakından inceleyin. Varsa RT Tamponu 2 içindeki çökeltileri vorteksleme yoluyla çözündürün. Gerekirse çökeltiler çözünene kadar tamponu 37°C'de kısa süreliğine inkübe edin.
5. Tüm RT reaktiflerine, reaktiflerin iyice karıştırıldığından emin olmak için her defasında 3 saniye boyunca 3 defa puls vorteksleme uygulayın.
6. Tüplerin kapaklarında ve yanlarında kalan sıvıyı toplamak için tüm RT reaktiflerini kısa süreliğine santrifüjleyin.
7. Test edilecek örnek sayısı için yeterli miktarda ve ayrıca çalışma kontrolleri, pozitif kontrol (Positive Control, PC) ve şablonsuz kontrol (No Template Control, NTC) için iki adet olmak üzere ters transkripsiyon master karışımı hazırlayın. Ters transkripsiyon master karışımı, Tablo 3'e göre 0-8°C'de hazırlanmalıdır.

Not: RT kurulumu için yeterli ek hacim sağlamak üzere, ≤ 16 örnek kullanıyorsanız 2 ekstra reaksiyon ($n + 2$) için yeterli miktarda ve > 16 örnek kullanıyorsanız dört ekstra reaksiyon ($n + 4$) için yeterli miktarda master karışım hazırlayın.

Not: RT Tamponu 1 ve Ters Transkriptaz viskoz bileşenlerdir. Dolayısıyla bunların yavaşça pipetlenmesi önerilir.

Tablo 3. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı

Bileşen	RT reaksiyonu başına hacim
RT Tamponu 1*	5 µl
RT Tamponu 2	2,5 µl
RT Primer Karışımı	1,25 µl
Ters Transkriptaz†	1,25 µl
Toplam master karışım hacmi	10 µl

* Mg²⁺ ve dNTP'ler içerir.

† Ayrıca RNaz inhibitörü içerir.

- RT reaksiyonu karışımına, her bir reaktifin iyice karıştırıldığından emin olmak için her defasında 3 saniye boyunca 3 defa puls vorteksleme uygulayın.
- Tüpün kapağında ve yanlarında kalan sıvıyı toplamak için RT reaksiyonu karışımını kısa süreliğine santrifüjleyin.
- RT reaksiyonu karışımını soğutma bloğunda saklayın.
- Yükleme bloğunu, gerekli sayıda 0,2 ml PCR tüpüyle doldurun.
- Her bir 0,2 ml tüpe RT reaksiyonu karışımının 10 µl'sini ayırın.
- therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile birlikte verilen NTC için Su, PC Seyreltici ve PC'ye ve normalize edilmiş RNA örneklerine, her birinin iyice karıştırıldığından emin olmak amacıyla, 3'er saniye boyunca 3 defa puls vorteksleme uygulayın.
- Tüplerin kapaklarında ve yanlarında kalan sıvıyı toplamak için, NTC için Su, PC Seyreltici, PC ve normalize edilmiş RNA örneklerini kısa süreliğine santrifüjleyin.
- Örnekleri, Tablo 4'e göre, ters transkripsiyon master karışımı içeren her bir tüpe ekleyin. Her örneği doğrudan tüpün RT reaksiyon karışımına pipetleyin; PC örneği için, ilk olarak PC'yi ve ardından PC Seyrelticiyi pipetleyin. Her örneği ekledikten sonra, pipeti 15 µl'ye ayarlayın, karıştırmak için 5-10 defa yukarı ve aşağı pipetleyin ve hemen tüplerin kapağını kapatın.

Not: RT reaksiyon karışımı ve örnek (PC, NTC veya test örneği), RT reaksiyonunun etkili bir şekilde ilerlemesi için iyice karıştırılmalıdır.

Tablo 4. Her bir ters transkripsiyon reaksiyon karışımına eklenen örnek

Örnek adı	Örnek tipi	Hacim
Şablonsuz kontrol	NTC için su	15 µl
Test örneği	Örnek	15 µl
Pozitif kontrol	Pozitif kontrol (Positive Control, PC)	5 µl
	PC Seyreltici	10 µl

16. RT reaktiflerinin ve şablonun karıştırıldığından emin olmak için tüm tüplere 3 saniye puls vorteksleme uygulayın.
17. Tüm kabarcıkların giderildiğinden ve RT reaktifleri ile şablonun tüpün tabanında olduğundan emin olun.
18. Tüpleri 15 dakika boyunca oda sıcaklığında yükleme bloğuna bırakın.
19. RNA'nın ters transkripsiyonu için örnekleri, bir ısıtma bloğunda, su banyosunda veya ısı döngüleyicide 30 dakika boyunca 42°C'de inkübe edin.
20. Ters Transkriptaz enzimini inaktive etmek için örnekleri, bir ısıtma bloğunda, su banyosunda veya ısı döngüleyicide 3 dakika boyunca 95°C'de inkübe edin.
21. cDNA örneklerini, PCR adımında girdi olarak kullanılabilecek kadar saklayın. Kısa süreli saklama için örnekler, en fazla 5 gün boyunca 2-8°C'de veya en fazla 30 gün boyunca -30 ila -15°C'de saklanabilir.

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında real-time PCR

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, çoklu bir formatta, belirtilen FGFR alterasyonlarının doğru real-time PCR saptamasını sağlar. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, HotStarTaq DNA Polymerase ve PCR Tamponu dahil olmak üzere, kullanıma hazır formatta sunulan dört adet PCR reaksiyonu karışımı içerir.

Başlamadan önce önemli nokta

- PCR, HotStarTaq DNA Polymerase'ı aktive etmek için 95°C'de 15 dakikalık ilk inkübasyon adımıyla başlamalıdır.

Prosedür

1. Reaksiyon kurulumundan önce, 72 x 0,1 ml tüpleri en az 60 dakika boyunca 0-8°C'de tutma kapasitesine sahip bir yükleme bloğu bulundurun.
2. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit PCR reaksiyonu karışımlarını, PCR reaksiyon kurulumundan önce 30 dakika ila 3 saat boyunca oda sıcaklığında çözündürün.
3. Tüm PCR reaksiyonu karışımlarına, her birinin iyice karıştırıldığından emin olmak için her defasında 3 saniye boyunca 3 defa puls vorteksleme uygulayın.
4. Tüplerin kapaklarında ve yanlarında kalan sıvıyı toplamak için tüm PCR reaksiyonu karışımlarını kısa süreliğine santrifüjleyin.
5. Yükleme bloğunu, gerekli sayıda 0,1 ml PCR strip tüpüyle doldurun.
6. 20 µl PCR reaksiyonu karışımını, Şekil 4'te yer alan pipetleme şemasına göre 0,1 ml PCR strip tüplerine dağıtın.

72 Kuyulu Plaka									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Tüp 1 Mut-1	Tüp 9 Mut-1	Tüp 17 Mut-1	Tüp 25 Mut-1	Tüp 33 Mut-1	Tüp 41 Mut-1	Tüp 49 Mut-1	Tüp 57 Mut-1	Tüp 65 Mut-1
B	Tüp 2 Mut-2	Tüp 10 Mut-2	Tüp 18 Mut-2	Tüp 26 Mut-2	Tüp 34 Mut-2	Tüp 42 Mut-2	Tüp 50 Mut-2	Tüp 58 Mut-2	Tüp 66 Mut-2
C	Tüp 3 Füz-1	Tüp 11 Füz-1	Tüp 19 Füz-1	Tüp 27 Füz-1	Tüp 35 Füz-1	Tüp 43 Füz-1	Tüp 51 Füz-1	Tüp 59 Füz-1	Tüp 67 Füz-1
D	Tüp 4 Füz-2	Tüp 12 Füz-2	Tüp 20 Füz-2	Tüp 28 Füz-2	Tüp 36 Füz-2	Tüp 44 Füz-2	Tüp 52 Füz-2	Tüp 60 Füz-2	Tüp 68 Füz-2
E	Tüp 5 Mut-1	Tüp 13 Mut-1	Tüp 21 Mut-1	Tüp 29 Mut-1	Tüp 37 Mut-1	Tüp 45 Mut-1	Tüp 53 Mut-1	Tüp 61 Mut-1	Tüp 69 Mut-1
F	Tüp 6 Mut-2	Tüp 14 Mut-2	Tüp 22 Mut-2	Tüp 30 Mut-2	Tüp 38 Mut-2	Tüp 46 Mut-2	Tüp 54 Mut-2	Tüp 62 Mut-2	Tüp 70 Mut-2
G	Tüp 7 Füz-1	Tüp 15 Füz-1	Tüp 23 Füz-1	Tüp 31 Füz-1	Tüp 39 Füz-1	Tüp 47 Füz-1	Tüp 55 Füz-1	Tüp 63 Füz-1	Tüp 71 Füz-1
H	Tüp 8 Füz-2	Tüp 16 Füz-2	Tüp 24 Füz-2	Tüp 32 Füz-2	Tüp 40 Füz-2	Tüp 48 Füz-2	Tüp 56 Füz-2	Tüp 64 Füz-2	Tüp 72 Füz-2

Şekil 4. PCR reaksiyonu karışımının pipetleme şeması. A ve E Satırları (turuncu): Mutasyon-1 Reaksiyon Karışımı. **B ve F Satırları (mor):** Mutasyon-2 Reaksiyon Karışımı, **C ve G Satırları (sarı):** Füzyon-1 Reaksiyon Karışımı. **D ve H Satırları (yeşil):** Füzyon-2 Reaksiyon Karışımı. Renkler, kitteki PCR tüpü kapaklarına karşılık gelir.

- cDNA örneklerini 3 saniye boyunca vorteksleyin, ardından tüplerin kapaklarında ve yanlarında kalan damlaları toplamak için kısa süreliğine santrifüjleyin.
- Ters Transkripsiyon reaksiyonundan 5 µl NTC, test örneği veya PC'yi Şekil 5'teki pipetleme şemasına göre 0,1 ml PCR strip tüplerine ekleyin. Pipeti 5 µl'ye ayarlayın ve her bir örneği karıştırmak için 5-10 defa yukarı ve aşağı pipetleyin; tüplerin kapağını hemen kapatın.

Not: Mümkün olduğunda, tüplere PC cDNA şablonu ekleme işlemi, farklı bir alan veya laboratuvarında, NTC ve örnek cDNA'sı eklemek için kullanılan alan veya laboratuvarın uzağında gerçekleşmelidir. Bunun amacı örnek kontaminasyonu olasılığını en aza indirmektir.

72 Kuyulu Plaka									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Tüp 1 PC	Tüp 9 Örnek 1	Tüp 17 Örnek 3	Tüp 25 Örnek 5	Tüp 33 Örnek 7	Tüp 41 Örnek 9	Tüp 49 Örnek 11	Tüp 57 Örnek 13	Tüp 65 Örnek 15
B	Tüp 2 PC	Tüp 10 Örnek 1	Tüp 18 Örnek 3	Tüp 26 Örnek 5	Tüp 34 Örnek 7	Tüp 42 Örnek 9	Tüp 50 Örnek 11	Tüp 58 Örnek 13	Tüp 66 Örnek 15
C	Tüp 3 PC	Tüp 11 Örnek 1	Tüp 19 Örnek 3	Tüp 27 Örnek 5	Tüp 35 Örnek 7	Tüp 43 Örnek 9	Tüp 51 Örnek 11	Tüp 59 Örnek 13	Tüp 67 Örnek 15
D	Tüp 4 PC	Tüp 12 Örnek 1	Tüp 20 Örnek 3	Tüp 28 Örnek 5	Tüp 36 Örnek 7	Tüp 44 Örnek 9	Tüp 52 Örnek 11	Tüp 60 Örnek 13	Tüp 68 Örnek 15
E	Tüp 5 NTC	Tüp 13 Örnek 2	Tüp 21 Örnek 4	Tüp 29 Örnek 6	Tüp 37 Örnek 8	Tüp 45 Örnek 10	Tüp 53 Örnek 12	Tüp 61 Örnek 14	Tüp 69 Örnek 16
F	Tüp 6 NTC	Tüp 14 Örnek 2	Tüp 22 Örnek 4	Tüp 30 Örnek 6	Tüp 38 Örnek 8	Tüp 46 Örnek 10	Tüp 54 Örnek 12	Tüp 62 Örnek 14	Tüp 70 Örnek 16
G	Tüp 7 NTC	Tüp 15 Örnek 2	Tüp 23 Örnek 4	Tüp 31 Örnek 6	Tüp 39 Örnek 8	Tüp 47 Örnek 10	Tüp 55 Örnek 12	Tüp 63 Örnek 14	Tüp 71 Örnek 16
H	Tüp 8 NTC	Tüp 16 Örnek 2	Tüp 24 Örnek 4	Tüp 32 Örnek 6	Tüp 40 Örnek 8	Tüp 48 Örnek 10	Tüp 56 Örnek 12	Tüp 64 Örnek 14	Tüp 72 Örnek 16

Şekil 5. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile test edilen örneklerin pipetleme şeması. Renkler, kitteki PCR tüpü kapaklarına karşılık gelir.

9. PCR reaksiyonu karışımının, 0,1 ml PCR strip tüplerinin tabanında toplandığından emin olun.
10. Rotor-Gene AssayManager yazılımı sürüm 2.1'de *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile sürüm 1.0.4'ü açın. Döngüleme koşulları için Tablo 5'e bakın.
11. Dört strip PCR tüpünü de 72-Well Rotor'a yerleştirin. Tüplerin, 72-Well Rotor içinde doğru konumlara aktarılmasını sağlamaya özellikle dikkat edin (72-Well Rotor'daki tüp konumu, yükleme bloğundaki tüp konumuyla aynı olmalıdır).

Not: Rotordaki kullanılmayan tüm konumlar kapaklı ve boş tüplerle doldurulmalıdır. Böylece, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının termal verimliliği korunmuş olur.

12. 72-Well Rotor'u Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına yerleştirin. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazıyla birlikte verilir) çalışma sırasında tüpleri sabitlemek için rotorun üstüne yerleştiğinden emin olun.
13. Real-time PCR çalışmasını başlatmak için sayfa 35, "Rotor-Gene AssayManager yazılımı sürüm 2.1'in kullanımı" başlığında yer alan talimatları izleyin.

Not: *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile kullanım için Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı döngüleme koşulları Tablo 5'te ayrıntılarıyla açıklanmıştır.


Tablo 5. Döngüleme koşulları

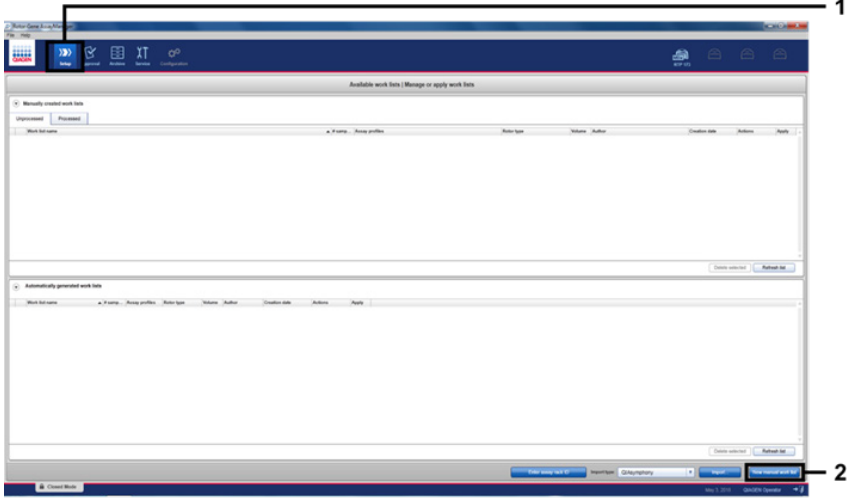
Adım	Süre	Sıcaklık	Ek yorumlar
PCR ilk aktivasyon adımı	15 dk	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase bu ısıtma adımı ile aktive edilir.
2 adımlı döngüleme*:			
Denatürasyon	60 sn	94°C	Floresans verilerini toplama ile
Bağlanma/uzatma	90 sn	60°C	birleştirilmiş bağlanma/uzatma adımı.
Döngü sayısı	45		

* Optimum performans yalnızca bu döngüleme koşullarının kullanılmasıyla sağlanır.

Rotor-Gene AssayManager yazılımı sürüm 2.1'in kullanımı

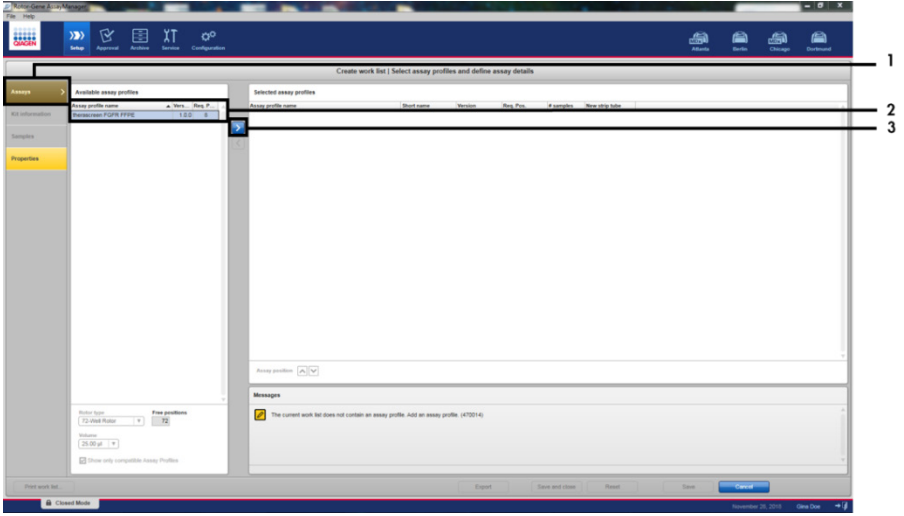
Prosedür

1. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına bağlı olan dizüstü bilgisayarın masaüstündeki Rotor-Gene AssayManager yazılımı sürüm 2.1 simgesine çift tıklayın. 
2. "Setup" (Kurulum) ortamı varsayılan olarak görüntülenir. Yeni bir çalışma listesi oluşturmak için "**New manual work list**" (Yeni manuel çalışma listesi) öğesine tıklayın (Şekil 6).



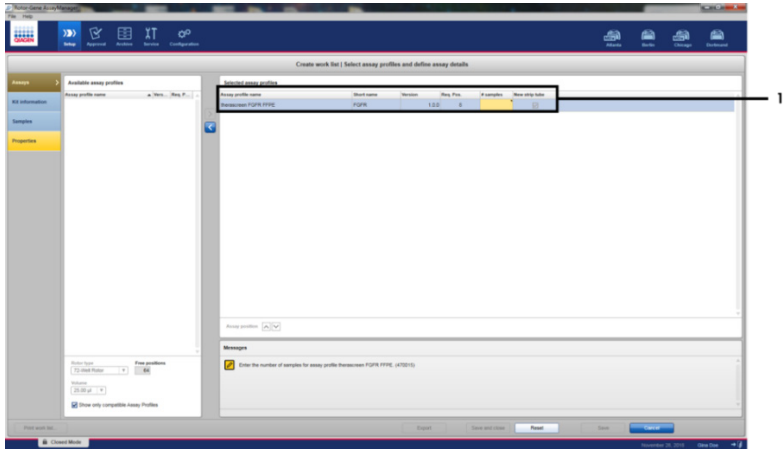
Şekil 6. Yeni manuel çalışma listesi ayarlama. 1 = "Setup" (Kurulum) ortamını seçin, 2 = "New manual work list" (Yeni manuel çalışma listesi).

Ana pencerenin sol kısmındaki "Assays" (Tahliller) sekmesini seçin. Mevcut tahlil profilleri listesinden "**therascreen FGFR FFPE Assay Profile**" seçimini yapın ve tahlil profilini seçmek için mavi oka tıklayın. Tahlil profilinin adı kısaltılmışsa tam adını görmek için fare imlecini tahlil profili üzerine getirin (Şekil 7).



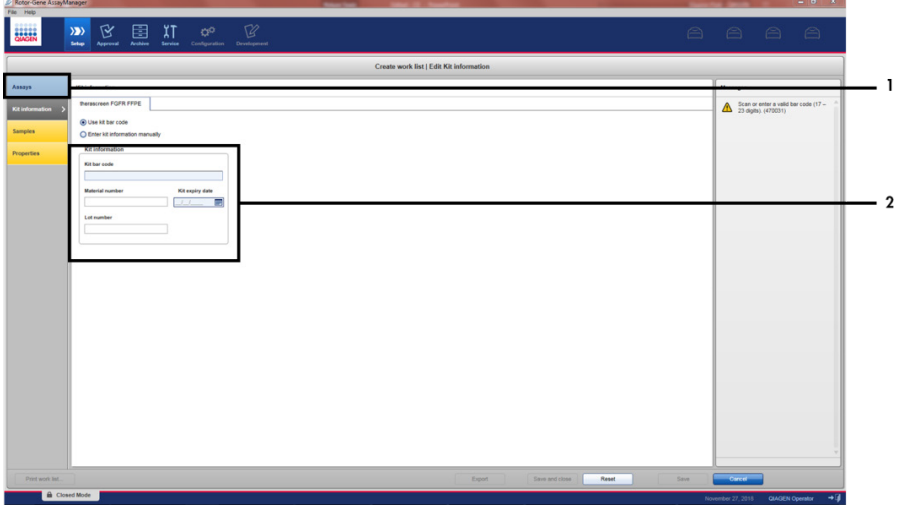
Şekil 7. Yeni manuel çalışma listesi ayarlama; tahlil profili adını seçme. 1 = "Assays" (Tahliller) sekmesi, 2 = Mevcut tahlil profilleri arasından "therascreen_FGFR_FFPE" seçimi yapın, 3 = Oka tıklayın.

3. "Selected assay profiles" (Seçilen tahlil profilleri) penceresine, çalışma kontrollerinin sayısını hariç tutarak, test edilecek test örneklerinin sayısını girin (Şekil 8).



Şekil 8. Create work list (Çalışma listesi oluştur) ana penceresi. 1 = "Assay profile name" (Tahlil profili adı) kısmına örneklerin sayısını ekleyin.

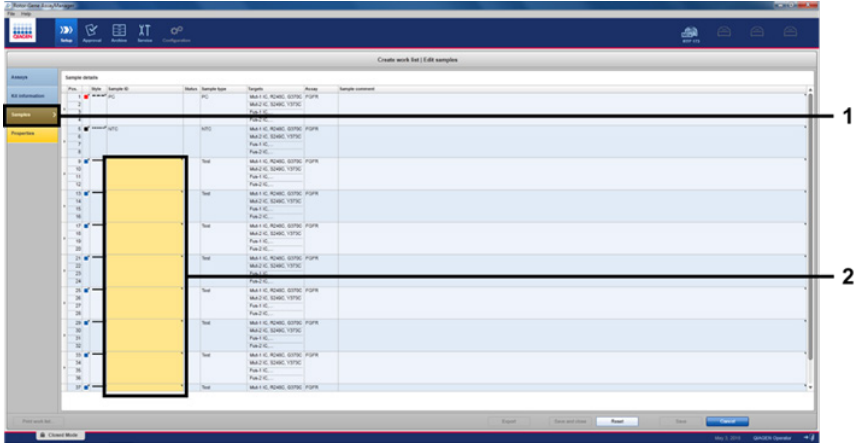
4. "Kit information" (Kit bilgileri) sekmesine tıklayın. **"Enter kit information manually"** (Kit bilgilerini manuel olarak girin) ögesini seçin ve kit bilgilerini girin (Şekil 9).



Şekil 9. Create work list (Çalışma listesi oluştur) ana penceresi. 1 = "Kit information" (Kit bilgileri) sekmesi, 2 = Kit bilgilerini girin.

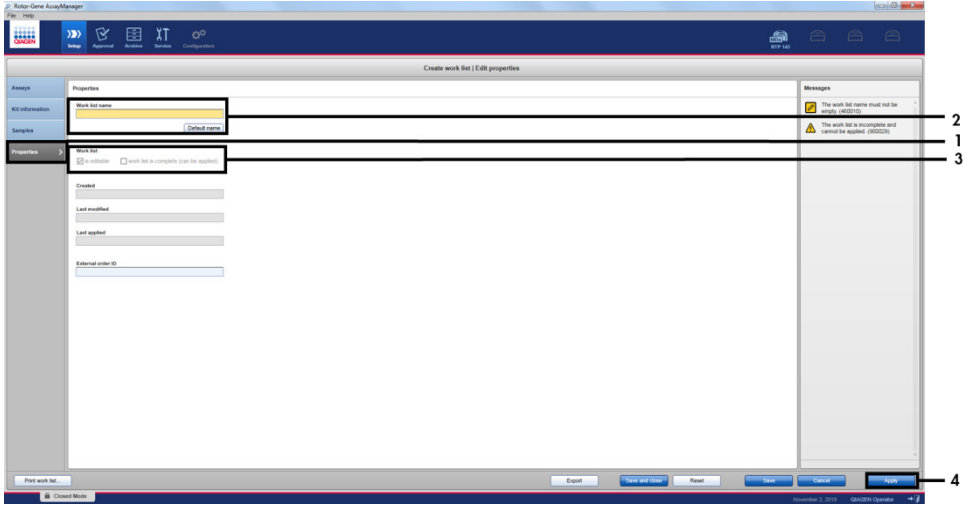
5. Örnek bilgilerini girmek için "Samples" (Örnekler) sekmesine tıklayın. Örnek adlarını manuel olarak girin (Şekil 10).

Önemli: Önceki bir Rotor-Gene AssayManager çalışması için oluşturulan bir çalışma listesi kullanıyorsanız doğru örnek adlarının girildiğinden emin olun.

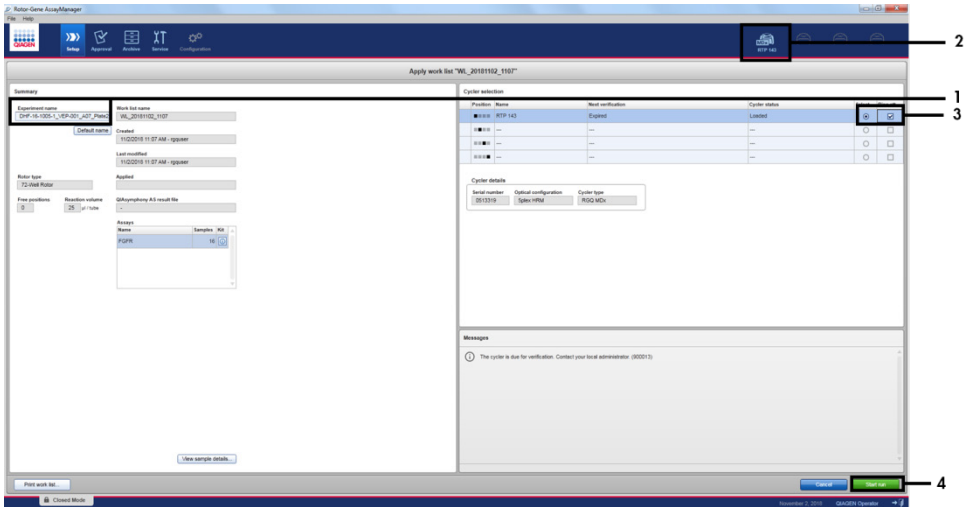


Şekil 10. Create work list (Çalışma listesi oluştur) ana penceresi. 1= "Samples" (Örnekler) sekmesi, 2 = Örnek adlarını girin.

6. "Properties" (Özellikler) sekmesine tıklayın ve çalışma listesinin adını girin. Çalışma listesinin adını girdikten sonra **"is editable"** (düzenlenebilir) ve **"work list is complete"** (çalışma listesi tamamlandı) onay kutularının işaretli olduğundan emin olun. Ardından, çalışma listesini uygulamak için sağ alt köşedeki **"Apply"** (Uygula) ögesine tıklayın (Şekil 11).
7. Deney adını "Experiment name" (Deney adı) alanına girin. Kullanılabilir döngüleyiciler listesinden bir döngüleyici seçin ve **"Ring attached"** (Halka takılı) onay kutusunun işaretli olduğundan emin olun. Tüm adımlar uygulandıktan sonra **"Start run"** (Çalışmayı başlat) ögesine tıklayın. Ekranın sağ üst kısmındaki Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM simgesinin altında, çalışmanın başlatıldığını belirten bir ilerleme göstergesi görüntülenir (Şekil 12).
8. **Not:** "Cycler" (Döngüleyici) simgesinin görünümü, ilerlemeye ve çalışmanın sonucuna bağlı olarak değişir (Şekil 13). Bu döngüleyici simgelerinin tam açıklamalarını, *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application Kullanım Kılavuzu* belgesinde bulabilirsiniz.



Şekil 11. Create work list (Çalışma listesi oluştur) ana penceresi. 1 = "Properties" (Özellikler) sekmesi, 2 = Çalışma listesi adını girin, 3 = "is editable" (düzenlenebilir) ve "work list is complete" (çalışma listesi tamamlandı) onay kutularını seçin, 4 = "Apply" (Uygula).



Şekil 12. Çalışma listesini uygulama ve çalışmayı başlatma. 1 = Deneş adını girin, 2 = Cihazın mevcut durumu, 3 = Cihazı seçin, 4 = Çalışmayı başlatın.



Şekil 13. Görüntülenebilecek Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Cyclar simgeleri.

9. Çalışma tamamlandığında "Finish run" (Çalışmayı bitir) ögesine tıkladığınızda "Finish run" (Çalışmayı bitir) iletişim kutusu görüntülenir (Şekil 14).

Not: Çalışma sırasında, amplifikasyon eğrileri gerçek zamanlı olarak görüntülenir ve güncellenir. Sol alt kısımdaki bir ilerleme göstergesi kalan süreyi gösterir.

Önemli: Veri kaybına neden olabileceğinden, çalışma devam ederken pencereyi kapatmayın!



Şekil 14. Çalışmayı bitirme. 1 = "Finish run" (Çalışmayı bitir).

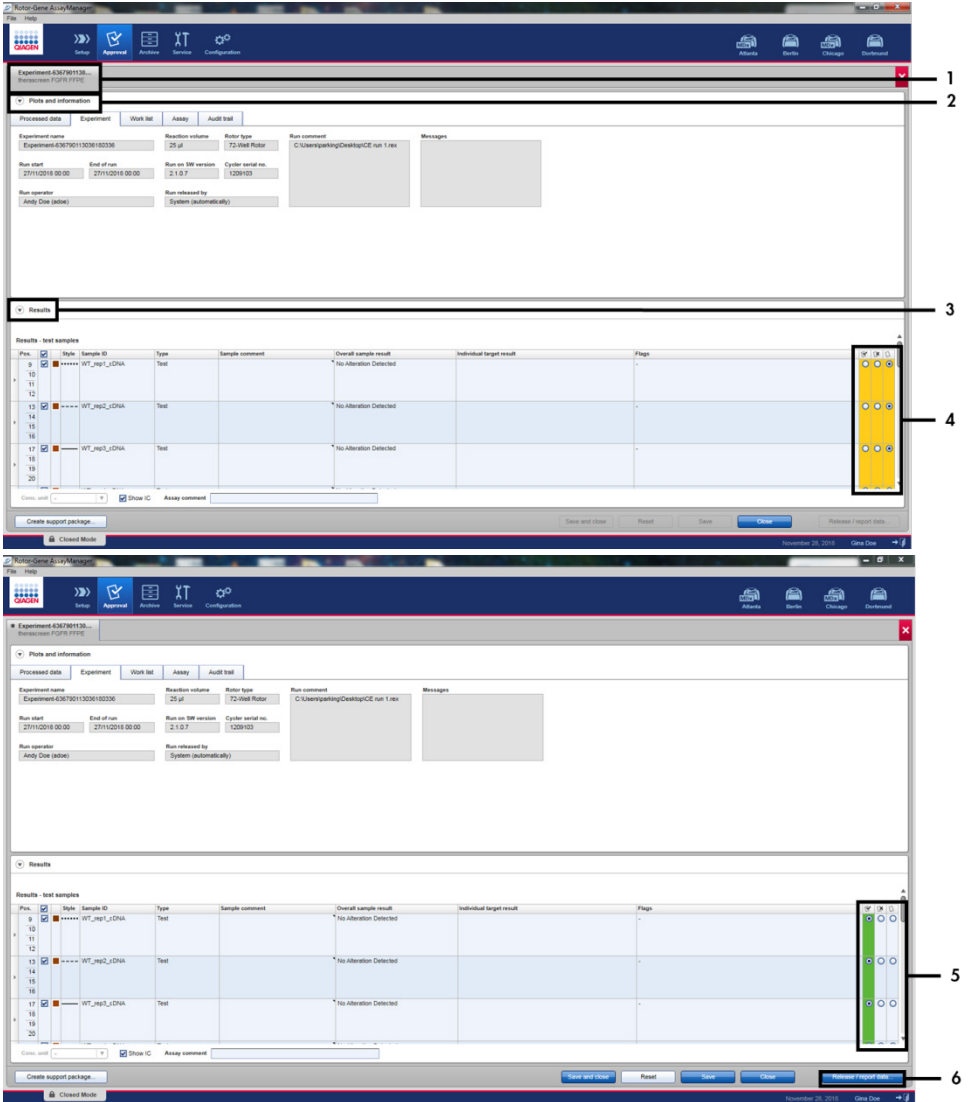
10. "Approval" (Onay) ortamına girmek ve Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazını serbest bırakmak için **"Release and go to approval"** (Serbest bırak ve onaya git) ögesine tıklayın. Ekranın sağ üst kısmındaki RGQ simgesi yeşilden maviye dönerek RGQ cihazının başka bir çalışma yapmaya hazır olduğunu gösterir. Çalışmanın başarılı veya başarısız olmasından bağımsız olarak RGQ cihazı serbest bırakılmalıdır (Şekil 15).



Şekil 15. "Finish Run" (Çalışmayı Bitir) açılır penceresi. 1 = "Release and go to approval" (Serbest bırak ve onaya git).

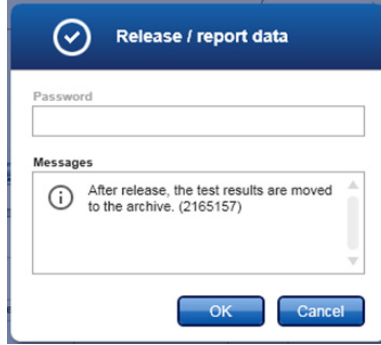
"Raw data" (Ham veriler), "Processed data" (İşlenmiş veriler), "Experiment" (Deney), "Assay" (Tahlil) ve "Audit trail" (Denetim izi) bilgilerini "Plots and information" (Grafikler ve bilgiler) bölümünde bulabilirsiniz. Tahlil sonuçlarını "Results" (Sonuçlar) bölümünde bulabilirsiniz (Şekil 16).

Not: *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile ilgili "*therascreen* FGFR FFPE" tahlil profili dosyası, otomatik örnek analizi ve sonuç yorumlama için gereken tüm yazılım talimatlarını içerir. PCR döngülemesinin ardından, Rotor-Gene AssayManager yazılımı çalışma kontrollerinin ve örneklerin geçerliliğini otomatik olarak değerlendirir. Pozitif Kontrol ve Şablonsuz Kontrol verileri, test için önceden ayarlanan kabul edilebilir aralık dahilindeyse çalışma kontrolleri "Valid" (Geçerli) olarak raporlanır. Her iki çalışma kontrolü geçerliyse örnekler ayrı ayrı analiz edilir; dahili kontrol verileri, test için önceden ayarlanan kabul edilebilir aralık dahilindeyse örnek "Valid" (Geçerli) olarak raporlanır; test için önceden ayarlanan kabul edilebilir aralığın dışındaysa örnek "Invalid" (Geçersiz) olarak raporlanır. Harici kontroller test için önceden ayarlanan kabul edilebilir aralığın dışındaysa genel örnek sonucu "Invalid" (Geçersiz) olarak raporlanır. Çalışma kontrollerinden herhangi biri başarısız olursa çalışmanın tamamı geçersiz kılınır. Tüm örnekler "ASSAY_INVALID" olarak işaretlenir. Böyle bir durumda nasıl ilerleneceğine dair talimatlar için bkz. "Analiz", sayfa 46.



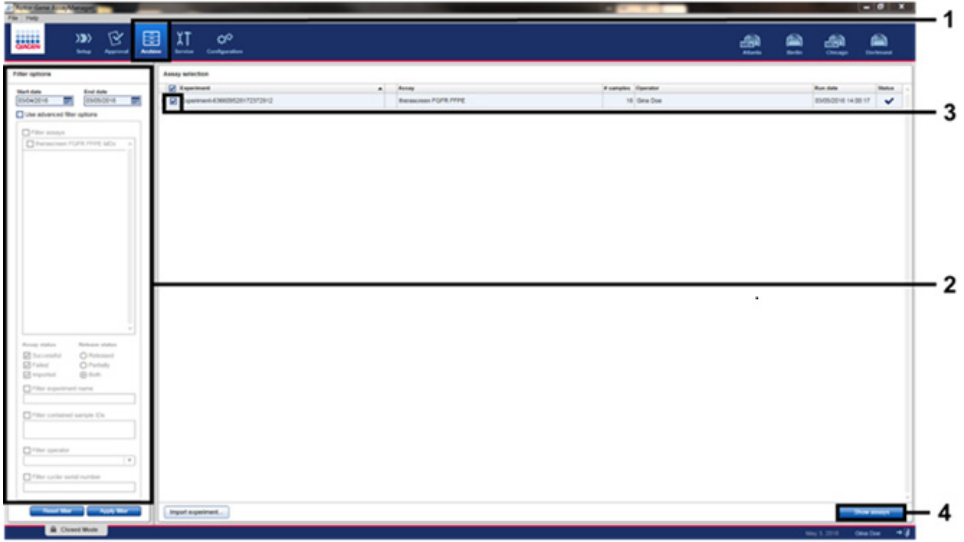
Şekil 16. Tahsil sonuçları ana pencerelerine örnek. 1 = "Experiment" (Deney) sekmesi. 2 = "Plots and information" (Grafikler ve bilgiler) alanı. 3 = "Results" (Sonuçlar) alanı. 4 = "Release/report data" (Verileri çıkar/raporla). 5 = Kabul etme veya reddetme seçenek düğmeleri. 6 = Release/report data (Verileri çıkar/raporla).

11. Tüm test örneklerinin sonuçları "Approval" (Onay) ortamının "Results" (Sonuçlar) alanında onaylanmalı (kabul edilmeli veya reddedilmeli) ve çıkarılmalıdır.
12. **"Release/report data"** (Verileri çıkar/raporla) ögesine tıklayın. Şekil 17'de gösterildiği şekilde "Release/report data" (Verileri çıkar/raporla) iletişim kutusu görüntülenir.
13. Deneyi arşive kaydetmek ve bir LIMS çıktısı ile çalışma raporu oluşturmak için **"OK"** (Tamam) ögesine tıklayın. Çalışma raporları ve LIMS çıktıları varsayılan rapor dizinine kaydedilir. Varsayılan dizin, yazılım ortamının "Configuration" (Yapılandırma) bölümündeki "Default data export directories" (Varsayılan veri dışa aktarma dizinleri) kısmında bulunabilir.



Şekil 17. "Release/report data" (Verileri çıkar/raporla) iletişim kutusu.

14. Deney arşivinde saklanan bir deneyi görüntülemek için "Archive" (Arşiv) ortamına tıklayın ve "Filter Options" (Filtre Seçenekleri) kısmındaki arama kriterlerini kullanarak deneyi arayın. Aramak için **"Apply filter"** (Filtreyi uygula) ögesine tıklayın. Görüntülemek istediğiniz deneyin yanındaki onay kutusunu işaretleyerek bir deney seçin ve **"Show assays"** (Tahlilleri göster) ögesine tıklayın (Şekil 18).
15. Bir deney başarısız olur ve bir hata kodu görüntülenirse, Rotor-Gene AssayManager tarafından sunulabilecek potansiyel hataların ve hata kodlarının listesini *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Kullanım Kılavuzu* ve/veya *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in Kullanım Kılavuzu* belgesinde bulabilirsiniz.



Şekil 18. "Experiment Archive" (Deney Arşivi) ana penceresi. 1 = "Archive" (Arşiv) ortamı seçimi, 2 = Arama seçenekleri, 3 = Deney adı seçimi, 4 = "Show assays" (Tahillileri göster) kontrolü.

Analiz

Tüm veri analizi adımları, manuel yorumlama gerektirmeden otomatik olarak gerçekleştirilir. Rotor-Gene AssayManager, çalışma geçerlilik ve örnek geçerlilik kriterlerini otomatik olarak kontrol eder ve geçersiz çalışma veya örnek söz konusu olduğunda mutasyon durumu sonuçlarını raporlamaz. Analitik sonuç, *therascreen* FGFR FFPE tahlil profilinde tanımlanan temel analiz algoritmalarına göre tüm ilgili PCR verileri birleştirilerek belirlenir.

Öncelikle çalışma kontrolü analizleri gerçekleştirilir:

- PC reaksiyonu, pozitif kontrol tahlillerinde ve IC tahlillerinde amplifikasyon varlığı bakımından kontrol edilir. Her bir PC'nin C_T değeri ilgili PC spesifikasyonları dahilindeyse bu çalışma kontrolü geçerlidir.
- NTC reaksiyonu, şablonsuz kontrol tahlillerinde ve IC tahlillerinde spesifik amplifikasyon yokluğu bakımından kontrol edilir. Hiçbir C_T değeri gözlemlenmemesi veya C_T değerinin NTC spesifikasyonu üzerinde olması durumunda bu çalışma kontrolü geçerlidir.

Bu çalışma kontrollerinden herhangi biri spesifikasyonlara uymazsa, çalışma geçersiz kılınır ve analizin, ters transkripsiyon adımından başlanarak tekrar gerçekleştirilmesi gerekir.

Tüm çalışma kontrolü analizleri spesifikasyonlara uyarsa, örnek reaksiyonlarının analizi gerçekleştirilir. Önceden belirlenen C_T değerlerine dayalı olarak, her bir cDNA örneğinin FGFR geni alterasyon durumu kalitatif olarak belirlenir ve raporlanır.

Aşağıdaki sonuçlar ayrı bir örneğe atanabilir:

- FGFR Alteration Detected ("Valid") (FGFR Alterasyonu Saptandı ("Geçerli"))
- No Alteration Detected ("Valid") (Alterasyon Saptanmadı ("Geçerli"))

- INVALID (Geçersiz): Analiz sırasında örneğe, Rotor-Gene AssayManager v2.1 tarafından, FGFR alterasyon sonucunu "INVALID" (Geçersiz) olarak ayarlamak üzere tanımlanmış bir veya birden fazla işaret atanırsa

Not: Bir tümör birden fazla FGFR alterasyonu içerebilir. Bu gibi durumlarda, birden fazla FGFR alterasyonu raporlanır.

Not: Çalışmanın sonunda oluşturulan rapor, deneysel örneklerden ve çalışma kontrollerinden elde edilen sonuçları gösterir ve varsa geçersiz sonuçların önünde geçersiz kılma işaretleri görüntülenir. Rotor-Gene Q çalışması sırasında bir hata meydana gelirse, cihazdaki örneklerin atılması ve ekstrakte edilen RNA örneğinden tekrar testinin gerçekleştirilmesi gerekir.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in ile ilgili tüm olası işaretler, *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in Kullanım Kılavuzu* belgesinde listelenmiştir. "*therascreen_FGFR_FFPE*" Tahlil Profiline özgü olan ek işaretler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Görüntülenebilecek örnek yazılım işaretleri

Yazılım İşaretleri	Bu işaretin gösterildiği durum	Yapılacak eylem
PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	PC, spesifikasyon aralığının üzerindedir	Geçersiz çalışma. Testin mevcutsa ekstrakte edilen RNA'dan tekrarlanması veya mevcut değilse yeniden ekstraksiyon yapılması gerekir.
PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	PC, spesifikasyon aralığının altındadır	Geçersiz çalışma. Testin ekstrakte edilen RNA'dan tekrarlanması gerekir.
PC_NO_CT_VALUE	PC tüplerinde PC için C _T değeri yoktur	Geçersiz çalışma. Testin ekstrakte edilen RNA'dan tekrarlanması gerekir.
NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE	NTC'de C _T değeri tespit edilmiştir	Geçersiz çalışma. Testin ekstrakte edilen RNA'dan tekrarlanması gerekir.
(Alterasyon) IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Örnek, spesifikasyon aralığının üzerindedir	Geçersiz örnek. Örneğin yeniden ekstrakte edilmesi gerekir.
(Alterasyon) IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Örnek, spesifikasyon aralığının altındadır	Geçersiz örnek. Örneğin yeniden ekstrakte edilmesi gerekir.
(Alterasyon) IC_NO_CT_VALUE	Örnek için C _T değeri yoktur	Geçersiz örnek. Test, ekstrakte edilen RNA'dan tekrarlanabilir veya örneğin yeniden ekstrakte edilmesi gerekir.
(Alterasyon) UNEXPECTED_EARLY_CT	Amplifikasyon eğrisi, döngülemeye eşiği erken geçmiştir	Anormal örnek sonucu. Testi ekstrakte edilen RNA'dan tekrarlayın.

Not: Yinelenen geçersiz çalışmalar elde edilirse QIAGEN Teknik Servisleri ile iletişime geçin.

Prosedür Sınırlamaları

Üründen elde edilen sonuçlar tüm ilgili klinik ve laboratuvar bulguları çerçevesinde yorumlanmalıdır ve tek başına tanı amaçlı olarak kullanılamaz.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit yalnızca, FFPE UC tümörü numunelerinden elde edilen RNA'yı test etmek için kullanılmalıdır.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit yalnızca, RNeasy DSP FFPE Kit (kat. no. 73604) kullanılarak hazırlanan RNA'yı test etmek için kullanılmalıdır.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit ayrıca, FGFR3 füzyonu FGFR3-BAIAP2L1 ve FGFR2 füzyonları FGFR2-BICC1 ile FGFR2-CASP7'yi tanımlamak için tasarlanmıştır çünkü bu FGFR füzyonu hastaları, BALVERSA (erdafitinib) 42756493-BLC2001 klinik çalışması için uygun olmuştur. Bununla birlikte test, gerekli klinik numunelerin bulunmaması nedeniyle bu üç füzyonu saptama yönünden klinik olarak doğrulanmamıştır. Bu füzyonları barındıran UC vakaları için ilaç güvenliği ve etkinliği belirlenmemiştir ve *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in BALVERSA (erdafitinib) ile tedaviye uygun hastaların seçiminde yardımcı olarak kullanımına ilişkin bir iddiada bulunulmamıştır.

"No Alteration Detected" (Alterasyon Saptanmadı) olarak raporlanan sonuçlara sahip örneklerde, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit tarafından saptanmayan FGFR alterasyonları bulunabilir.

FGFR alterasyonlarının saptanması, örnek bütünlüğüne ve örnekten elde edilebilen amplifiye edilebilir cDNA miktarına bağlıdır.

Belirli bir örnek için dahili kontrol (Internal Control, IC) tahlilinin C_T değeri yoksa veya değer belirtilen aralığın dışındaysa test prosedürü bu örnek için tekrarlanmalıdır.

Ürün yalnızca, in vitro tanı amaçlı prosedürler ve Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının kullanımı konusunda özel olarak bilgilendirilmiş ve eğitim almış personel tarafından kullanım içindir.

Ürün, yalnızca Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR döngüleyici üzerinde kullanıma yöneliktir.

En iyi sonuçlar için *therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit Kullanım Talimatları* belgesine tam olarak uyulması gereklidir. Bu el kitabında açıklanan dışında reaktiflerin seyreltilmesi tavsiye edilmez ve performans kaybına neden olur.

Bu el kitabında verilen talimatlar, Gamma Plug-in sürüm 1.0.0 ve *therascreen FGFR FFPE Assay Profile* sürüm 1.0.4 ile birlikte, otomatik FGFR alterasyon durumu belirleme özelliğine sahip Rotor-Gene AssayManager yazılımı sürüm 2.1 ile kullanıma yöneliktir.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, içerdiği FGFR geni alterasyon tahlilleri arasında saptanabilir bir çapraz reaktivite ("Alteration Detected" (Alterasyon Saptandı) bildirimiyile sonuçlanır) sergilemez.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, her bir FGFR alterasyonu için pozitif veya negatif bir sonuç oluşturarak kalitatif bir test sonucu sağlar.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, iki adımlı bir RT-PCR prosedürü kullanır. Tüm benzer prosedürlerde olduğu gibi, örnekler test ortamındaki harici kaynaklar veya potansiyel olarak pozitif kontrol ile kontamine olabilir. Test operatörleri, örneklerin ve kit reaktiflerinin kontaminasyonunu önlemek için gereken özeni göstermelidir.

Mikrobiyal kontaminasyonun *therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* performansı üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Operatörlerin, test prosedürleri sırasında mikrobiyal kontaminant girişini önlemek için gereken özeni göstermeleri ve mikrobiyal büyüme belirtisi gözlemlenirse kit bileşenlerini kullanmamaları gerekir.

Tüm bileşenlerin kutusunda ve etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servislerindeki uzmanlar bu el kitabındaki bilgiler ve protokoller ya da örnek ve tahlil teknolojileriyle ilgili tüm sorularınızı yanıtlamaktan daima mutluluk duyar (iletişim bilgileri için arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Yorumlar ve öneriler

NTC örneği geçersiz sonuç gösteriyor

Şablon materyali yokken bir tahlil hedefi saptanmıştır

Mevcutsa örnek RNA'sını kullanarak testi RT adımından itibaren tekrarlayın. Örnek RNA'sı mevcut değilse testi RNA ekstraksiyon adımından itibaren tekrarlayın.

Mümkünse PCR tüplerini test edilecek örneğin eklenmesinden hemen sonra kapatın.

Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun.

PC örneği geçersiz sonuç gösteriyor

a) Hatalı RT veya PCR yapılandırması

Çalışma adımlarınızı pipetleme şeması yoluyla kontrol edin ve gerekirse RT adımından itibaren tekrarlayın.

b) Bir veya birden fazla kit bileşeninin saklama koşulları, "Reaktif Saklama ve Kullanma" (sayfa 22) başlığında verilen talimatlara uygun değildir

Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.

c) *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in süresi dolmuştur

Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın.

IC geçersiz sonuç gösteriyor

IC, önceden ayarlanan kabul edilebilir aralığın dışındadır; RNA örneğinin kalitesi *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile test için uygun değildir

Yeterli FPPE doku mevcutsa RNA ekstraksiyonunu tekrarlayın.

Kalite Kontrol

QIAGEN'in ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi (ISO 13485) uyarınca, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş spesifikasyonlara göre test edilir.

Performans Özellikleri

Kör sınırı (Limit of Blank, LoB)

Kör sınırı (Limit of Blank, LoB), CLSI yönergesi EP17-A2'de, "belirli bir hata olasılığı için, boş bir örnekten (sıfır veya sıfıra yakın konsantrasyona sahip örnek) makul ölçüde beklenebilecek en yüksek sonuç a" olarak tanımlanır. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit için bu değer, FGFR alterasyonu bakımından negatif örneklerin üst 95'lik yüzde dilimine karşılık gelen veri noktasıdır. LoB, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in dokuz FGFR alterasyon tahlilinin her biri için dönüm noktası seviyeleri ölçülerek belirlenmiştir. Dönüm noktası, FGFR alterasyonu bakımından negatif bir RNA örneğinin spesifik olmayan, düşük seviyede amplifikasyonu olarak tanımlanır. LoB, tahlil başına 180 veri noktası kullanılarak, üç *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit lotu ve üç cihazda 60 klinik yabancı tip örneğin analizi yoluyla belirlenmiştir. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit dahilindeki her bir tahlilin LoB değeri Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. LoB sonuçlarının özeti

FGFR tahlili	LoB (C _T değeri)
p.R248C (c.742C>T)	39,64
p.S249C (c.746C>G)	Amplifikasyon yok
p.G370C (c.1108G>T)	Amplifikasyon yok
p.Y373C (c.1118A>G)	Amplifikasyon yok
FGFR3-TACC3v1	Amplifikasyon yok
FGFR3-TACC3v3	Amplifikasyon yok
FGFR3-BAIAP2L1*	Amplifikasyon yok
FGFR2-BICC1*	Amplifikasyon yok
FGFR2-CASP7*	Amplifikasyon yok

* FGFR3 füzyonu FGFR3-BAIAP2L1 ve FGFR2 füzyonları FGFR2-BICC1 ile FGFR2-CASP7, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ve klinik numuneler ile analitik olarak doğrulanmamıştır.

Tahlil eşik değeri ve çapraz reaktivite

Tahlil eşik değeri

Tahlil eşik değeri, bir örneğin bir FGFR alterasyonu bakımından pozitif olarak mı yoksa negatif olarak mı sınıflandırılacağını belirlemede kullanılan spesifik bir C_T değeridir. Eşik değerinde veya eşik değerinin altında C_T değerleri sağlayan örnekler FGFR alterasyonu pozitif (FGFR Alterasyonu Saptandı) olarak, eşik değerinin üzerinde C_T değerleri sağlayan örnekler ise FGFR alterasyonu negatif (Alterasyon Saptanmadı) olarak sınıflandırılır. Her bir tahlilin yanlış negatif ve yanlış pozitif oranları, eşik değerine eşit veya eşik değerinin altındaki bir sonuç, FGFR Alterasyonu Saptandı sınıflandırması ile sonuçlanacak şekilde, her bir FGFR alterasyonuna özgü tahlilin eşik değerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit dahilindeki her bir tahlilin eşik değeri Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8. Tahlil eşik değeri sonuçlarının özeti

FGFR tahlili	Tahlil eşik değeri (C _T değeri)
p.R248C (c.742C>T)	36,00
p.S249C (c.746C>G)	39,09
p.G370C (c.1108G>T)	41,00
p.Y373C (c.1118A>G)	43,00
FGFR3-TACC3v1	43,00
FGFR3-TACC3v3	43,00
FGFR3-BAIAP2L1*	43,00
FGFR2-BICC1*	43,00
FGFR2-CASP7*	42,00

* FGFR3 füzyonu FGFR3-BAIAP2L1 ve FGFR2 füzyonları FGFR2-BICC1 ile FGFR2-CASP7, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ve klinik numuneler ile analitik olarak doğrulanmamıştır.

Tahlilin apraz reaktivitesi ve analitik özgüllüğü

Tahlilin apraz reaktivitesi

Tahlilin apraz reaktivitesi, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit reaktifleri tarafından, bir tahlilin amaçlanan hedefi dışındaki bir FGFR alterasyonunun spesifik olmayan bir amplifikasyonu olarak tanımlanır ve ilgili tahlilin seçilen eşik değerinin altında bir C_T değeri verir. Yüksek FGFR alterasyonu seviyesine sahip örnekler, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile test edilmiş ve tahlillerin herhangi birinde, eşik değerinin altında hedef dışı amplifikasyon gözlemlenmemiştir. Dolayısıyla, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'i kapsayan FGFR alterasyonları için tahliller arasında çapraz reaktivite gözlemlenmemiştir.

Analitik zgllk

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit içinde kullanılan primerler, problar ve blokerler ile insan ve insan dışı genomlarda bulunan *FGFR* dışı hedefler arasındaki potansiyel çapraz reaktivite seviyesi ve potansiyel heterodimer oluşumu seviyesi araştırılmıştır. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit tahlilleri ile kullanılan primerler, problar ve blokerlerin, insan genomu dahil herhangi bir genomda nonspesifik olarak bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için bir in siliko analiz gerçekleştirilmiştir. Her bir çoklu tahlilde kullanılan oligonükleotidlerin, birbirine nonspesifik olarak bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için ek bir in siliko analiz gerçekleştirilmiştir.

Oligo heterodimerlerinin in siliko analizi, heterodimer oluşumu prevalansının düşük olduğunu göstermiştir. Primerler ve problar, yabani tip *FGFR* alelleri ile veya *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit tarafından saptanmayan herhangi bir FGFR alterasyonu ile çapraz reaksiyona girmemektedir ve dolayısıyla yanlış bir sinyal oluşurmaz.

Tespit sınırı (Limit of Detection, LoD)

LoD, %95 olasılıkla saptanabilen her bir hedef için en düşük *FGFR* alterasyonu RNA kopya/μl değeri olarak tanımlanır. *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit'in *FGFR* alterasyonuna özgü tahlilleri için LoD, *FGFR* alterasyonu RNA kopya/μl olarak raporlanır. Her bir alterasyon için bir adet olmak üzere, ayrı *FGFR* alterasyonu in vitro transkriptleri, yabani tip klinik numunelerden ekstrakte edilen normalize edilmiş RNA havuzuna eklenmiş ve her bir tahlilin tahmini LoD değerinin üzerinde, altında ve bu değerde seri olarak seyreltilmiştir.

Serideki her bir dilüsyon noktasının altmış tekrarı, üç *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit lotu kullanılarak test edilmiştir. Her bir tahlilin LoD değeri, bir Probit modeli kullanılarak belirlenmiş ve test edilen üç *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit lotu genelinde saptanan en yüksek RNA kopya sayısı/μl (en kötü durum) LoD'si olarak raporlanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. LoD sonuçlarının özeti

FGFR tahlili	LoD (kopya/μl)
p.R248C (c.742C>T)	75,80
p.S249C (c.746C>G)	289,82
p.G370C (c.1108G>T)	141,57
p.Y373C (c.1118A>G)	274,71
FGFR3-TACC3v1	25,26
FGFR3-TACC3v3	45,75
FGFR3-BAIAP2L1*	9,07
FGFR2-BICC1*	14,34
FGFR2-CASP7*	27,18

* FGFR3 füzyonu FGFR3-BAIAP2L1 ve FGFR2 füzyonları FGFR2-BICC1 ile FGFR2-CASP7, *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit ve klinik numuneler ile analitik olarak doğrulanmamıştır.

p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G), p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v1 ve FGFR3-TACC3v3 tahlillerinin LoD değerleri, FGFR alterasyonu bakımından pozitif klinik UC örnekleri kullanılarak doğrulanmıştır.

Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit'in tekrarlanabilirliği (laboratuvar içi), *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit tarafından saptanan dokuz alterasyonu temsil eden, 3x LoD seviyesinde klinik performansı oluşturulmuş örneklerin ve bir adet *FGFR* alterasyonu bakımından negatif örneğin test edilmesiyle değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik, bu örneklerin tek bir tesiste, farklı günler, Rotor-Gene Q cihazları ve operatörler genelinde test edilmesiyle değerlendirilmiş ve örnek başına toplam 60 tekrar elde edilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Tahsil tekrarlanabilirliği: Bir tesiste test edilen 3x LoD seviyesinde her bir FGFR alterasyonu ve yabancı tip örnekler için doğru sonuçların sayısı ve iki taraflı %95 güven limitleri

Şablon	Doğru sonuç sayısı	Doğru sonuç yüzdesi	İki taraflı %95 güven aralığının alt limiti	İki taraflı %95 güven aralığının üst limiti
p.R248C (c.742C>T)	60/60	%100	%94,04	%100,00
p.S249C (c.746C>G)	60/60	%100	%94,04	%100,00
p.G370C (c.1108G>T)	60/60	%100	%94,04	%100,00
p.Y373C (c.1118A>G)	60/60	%100	%94,04	%100,00
FGFR3-TACC3v1*	59/60	%98,3	%91,06	%99,96
FGFR3-TACC3v3	59/60	%98,3	%91,06	%99,96
FGFR3-BAIAP2L1	60/60	%100	%94,04	%100,00
FGFR2-BICC1	60/60	%100	%94,04	%100,00
FGFR2-CASP7	60/60	%100	%94,04	%100,00
WT (Mut-1 Reaksiyon Karışımı)	60/60	%100	%94,04	%100,00
WT (Mut-2 Reaksiyon Karışımı)	60/60	%100	%94,04	%100,00
WT (Füz-1 Reaksiyon Karışımı)	60/60	%100	%94,04	%100,00
WT (Füz-2 Reaksiyon Karışımı)	59/60	%98,3	%91,06	%99,96

* 1x LoD seviyesinde örneklerden.

Yeniden üretilebilirlik, üç farklı tesiste (Birleşik Krallık'ta bulunan bir kurum içi QIAGEN tesisi ve ABD'de bulunan iki harici tesis), 3x LoD seviyesinde klinik performansı oluşturulmuş örneklerin, LoD seviyesine yakın klinik örneklerin ve yabancı tip örneklerin test edilmesiyle ölçülmüştür. Tüm FGFR alterasyonları için 3x LoD seviyesinde klinik performansı oluşturulmuş örnekler ve yabancı tip örnekler, her bir harici tesiste, üç Rotor-Gene Q MDx cihazı kullanılarak, beş gün boyunca üç operatör (tesis başına) tarafından test edilmiştir. Ayrıca, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) UC klinik örneklerinden ekstrakte edilen RNA, cihaz yeniden üretilebilirliğini test etmek için kullanılmıştır. Testler, klinik örnekler kullanılarak, her bir hedef [p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G), p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v1 ve FGFR3-TACC3v3] için LoD seviyesinde gerçekleştirilmiştir. FGFR3-BAIAP2L1, FGFR2-BICC1 veya FGFR2-CASP7 için klinik örnekler temin edilememiştir. Analiz ayrıca, çalışma tasarımındaki lotlar arası değişkenliği de bir araya getirmiştir. 1x LoD seviyesindeki tüm klinik örnekler, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit kullanılarak üç tesisin her birinde test edilmiştir (iki biyolojik tekrar x iki *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit lotu x iki operatör x üç gün = her tesiste 24 tekrar). Bu toplam tekrarlar, her bir tesiste üç Rotor-Gene Q MDx cihazında test edilmiş ve üç *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit lotunun ikisi her bir tesiste alternatif olarak kullanılmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. Tahsil yeniden üretilebilirliği: Tüm tesislerde test edilen LoD ve 3x LoD seviyesinde her bir FGFR alterasyonu ve yabancı tip örnekler için doğru sonuçların sayısı ve iki taraflı %95 güven limitleri

Mutasyon	Hedef seviyesi	Numune tipi	Doğru sonuç sayısı	Doğru sonuç yüzdesi	İki taraflı %95 güven aralığının alt limiti	İki taraflı %95 güven aralığının üst limiti
p.R248C (c.742C>T)	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	1x LoD	Klinik	72/72	%100,00	%95,01	%100,00
p.S249C (c.746C>G)	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	1x LoD	Klinik	72/72	%100,00	%95,01	%100,00
p.G370C (c.1108G>T)	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	1x LoD	Klinik	71/72	%98,61	%92,50	%99,96
p.Y373C (c.1118A>G)	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	1x LoD	Klinik	71/72	%98,61	%92,50	%99,96
FGFR3-TACC3v1	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	119/120	%99,17	%95,44	%99,98
	1/2x LoD	Klinik	63/72	%87,50	%77,59	%94,12
FGFR3-TACC3v3	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	119/120	%99,17	%95,44	%99,98
	1x LoD	Klinik	71/72	%98,61	%92,50	%99,96
FGFR3-BAIAP2L1*	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	1x LoD	Klinik	NA	NA	NA	NA
FGFR2-BICC1*	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	1x LoD	Klinik	NA	NA	NA	NA
FGFR2-CASP7*	3x LoD	Klinik Performansı Oluşturulmuş	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	1x LoD	Klinik	NA	NA	NA	NA
WT (Mut-1)	NA	Klinik	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
WT (Mut-2)	NA	Klinik	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
WT (Füz-1)	NA	Klinik	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
WT (Füz-2)	NA	Klinik	116/120	%96,67	%91,69	%99,08

*Bu alterasyonlar için klinik UC FFPE örnekleri temin edilememiştir. NA: Değerlendirilmemiştir.

Numune kullanımı

Bu çalışmada, özellikle RNA ekstraksiyon adımı sırasında, örnek kullanım değişkenliği değerlendirilmiştir. FFPE UC klinik numuneleri, üç bağımsız laboratuvarda RNeasy DSP FFPE Kit ile ekstrakte edilmek üzere üç ayrı sete bölünmüştür. Her bir sette, önceden tanımlanan sayıda FGFR yabani tip ve FGFR pozitif (FGFR Alteration Detected (FGFR Alterasyonu Saptandı)) numuneler yer almıştır. Tüm numuneler ekstraksiyon öncesinde körleştirilmiştir. Her bir set, üç tesiste iki operatör tarafından üç defa ekstrakte edilmiştir. Ardından bir tesiste *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit kullanılarak tüm RNA örnekleri test edilmiştir.

Tüm FGFR alterasyonları genelinde, doğru sonuçların oranı %96,22 olmuş ve bu da, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR System'in, RNA izolasyonunun ön analiz adımıyla yeniden üretilebilirliği ve tekrarlanabilirliğini desteklemiştir.

Lotlar arası değiştirilebilirlik

Bu çalışmada, lotlar arası değişkenliğin, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit tarafından *FGFR* alterasyonu saptamasını etkileme potansiyeli ele alınmıştır. FGFR Sistemi iki ayrı kit kullanır: RNA'nın klinik UC FFPE numunelerinden izolasyonu için RNeasy DSP FFPE Kit ve FGFR alterasyonlarının amplifikasyonu ve saptanması için *therascreen* FGFR RGQ-RT-PCR Kit.

Lotlar arası değiştirilebilirlik, üç RNeasy DSP FFPE Kit lotu ve üç *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit lotu kullanılarak ortaya konmuştur. Bu çalışmada klinik örneklerin ve klinik performansı oluşturulmuş örneklerin bir kombinasyonu kullanılmıştır. p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G), FGFR3-TACC3v1 alterasyonlarını barındıran dört adet klinik FFPE numunesi ve klinik yabani tip FFPE numune, üç RNeasy DSP FFPE Kit lotu kullanılarak ikili olarak ekstrakte edilmiş ve üç farklı *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit lotu ile test edilmiştir. Ayrıca, p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v3, FGFR3-BAIA2PL1, FGFR2-BICC1 ve FGFR2-CASP7 alterasyonlarına yönelik klinik performansı oluşturulmuş örnekler 3x LoD seviyesinde üretilmiş ve üç *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit lotu kullanılarak test edilmiştir. Tüm rnekler, her bir tahlil için normalize edilmiş ve 3x LoD seviyesine seyreltilmiştir. Her bir örnek için toplam 36 tekrar oluşturulmuştur. Tüm *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ve RNeasy DSP FFPE Kit lotları genelinde tüm örnekler için doğru sonuçların genel yüzdesi %99,65 (286/287 örnek) olmuştur.

Çapraz kontaminasyon/analitik taşınma

Bu çalışmada, yüksek *FGFR* alterasyonu pozitif rnekler *FGFR* alterasyonu negatif örneklerin yanında test edildiğinde, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit'in taşınma bakımından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, ekstraksiyondan PCR amplifikasyonuna kadar *FGFR* Sisteminin tamamı incelenmiş ve örnekler, ekstraksiyonlar arasında ve çalışma içinde veya çalışmalar arasında taşınma gerekleşiş gerçekleşmediği araştırılmıştır.

Klinik UC FFPE rnekleri iki bağımsız sete bölünmüştür. Her iki sette 18 yabani tip örnek ve 12 *FGFR* alterasyonu pozitif örnek yer almıştır. RNA ekstraksiyonu, RT ve PCR reaksiyonu kurulumu, örnek çapraz kontaminasyon riskini belirlemek için tasarlanmış bir matrisi takip etmiştir. Her set, aynı *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit lotu kullanılarak farklı bir operatör tarafından test edilmiştir. Toplam 128 yabani tip tekrar test edilmiş ve yabani tip örneklerle ilişkin yanlış pozitif sonuçların yüzdesi %3,13 (4/128 örnek) olmuştur.

Olumsuz etkileyen maddeler

Bu çalışmada, potansiyel endojen ve ekzojen olumsuz etkileyen maddelerin, RNeasy DSP FFPE Kit ve *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit genelinde *FGFR* alterasyon durumunu saptama üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ekstraksiyon adımı veya RNA örneği normalizasyon adımı sırasında örneklere, olumsuz etkileyen dört maddeden (hemoglobin, Buffer RPE, Deparaffinization Solution veya parafin mumu) biri eklenmiştir. Dokuz *FGFR* alterasyonu pozitif örneğin ve yabancı tip örneklerin her birinde olumsuz etkileyen madde başına toplam 60 tekrar test edilmiştir. Olumsuz etkileyen dört madde, kontrol örnekleri ile test örnekleri arasında sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir farka yol açmamış, olumsuz etkileyen maddelerin varlığı tahlil performansını veya hedef sonucunu etkilememiştir.

Klinik performans

pan-FGFR TKI ilacı BALVERSA (erdafitinib) ile UC tedavisi kapsamındaki *FGFR* alterasyonu görülen vakalarda, Körlenmiş Bağımsız İnceleme Komitesi'ne (Blinded Independent Review Committee, BIRC) göre hastalarda genel yanıt oranı %34,3 olmuştur (5).

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit, spesifik *FGFR* geni alterasyonları barındıran ve dolayısıyla BALVERSA (erdafitinib) ile tedaviye uygun olan ürotelyal kanser (Urothelial Cancer, UC) vakaları görülen hastaları belirlemede yardımcı olan tanı amaçlı bir test olarak kullanıma yöneliktir.

Referans yöntem ile korelasyon

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit'in doğruluğunu (RT damlacık dijital PCR (RT droplet digital PCR, RT-ddPCR) yöntemine göre) göstermek amacıyla, 42756493-BLC2001 klinik çalışmasından numuneler ile bir doğruluk çalışması yürütülmüş ve bu numuneler, aynı kullanım amacı (teşhis amacı) popülasyonundan elde edilen numunelerle desteklenmiştir. FGFR alterasyonları için *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ve ddPCR testleri, 307 numuneden (271 klinik çalışma numunesi ve 36 tedarik edilmiş numune) ekstrakte edilen aynı örnekler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Hem *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit hem de ddPCR için geçerli sonuçlar veren örnekler (n = 306), genel FGFR alterasyon durumu bakımından iki yöntem (FGFR Alteration Detected (FGFR Alterasyonu Saptandı) veya No Alteration Detected (Alterasyon Saptanmadı)) arasındaki uyumluluğa dayalı olarak, Pozitif Uyumluluk Oranını (Positive Percent Agreement, PPA), Negatif Uyumluluk Oranını (Negative Percent Agreement, NPA) ve Genel Uyumluluk Oranını (Overall Percent Agreement, OPA) değerlendirmek üzere analiz edilmiştir. Bu yüzde değerleri, ilgili iki taraflı %95 güven aralıkları (Confidence Intervals, CI) ile birlikte Tablo 12'de özetlenmiştir.

Tablo 12. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit / ddPCR (ortogonal yöntem olarak ddPCR ile)

Uyumluluk ölçütü	Uyumluluk yüzdesi % (N)	İki taraflı %95 CI
Pozitif uyumluluk oranı (Positive Percent Agreement, PPA)	%99,04 (103/104)	94,76, 99,98
Negatif uyumluluk oranı (Negative Percent Agreement, NPA)	%97,52 (197/202)	94,32, 99,19
Genel uyumluluk oranı (Overall Percent Agreement, OPA)	%98,04 (300/306)	95,78, 99,28

FGFR alterasyon durumu uyumsuz toplam altı sonuç için, bir örnek *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile Alterasyon Saptanmadı sonucu vermiş ve ddPCR ile FGFR Alterasyonu Saptandı sonucu vermiştir. Beş örnek ise, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile FGFR Alterasyonu Saptandı sonuçları vermiş ve ddPCR ile Alterasyon Saptanmadı sonuçları vermiştir. Tablo 13'te, referans yöntem olarak ddPCR ile hedef alterasyonun PPA değeri gösterilmiştir.

Tablo 13. Alterasyonlara göre iki taraflı %95 güven aralıkları ile birlikte, ortogonal yöntem olarak ddPCR ile PPA

Alterasyon	Uyumluluk yüzdesi % (N doğru/N Toplam)	İki taraflı %95 CI
p.R248C (c.742C>T)	%93,33 (14/15)	68,05, 99,83
p.S249C (c.746C>G)	%100,00 (56/56)	93,62, 100,00
p.G370C (c.1108G>T)	%100,00 (2/2)	15,81, 100,00
p.Y373C (c.1118A>G)	%100,00 (18/18)	81,47, 100,00
FGFR3-TACC3v1	%100,00 (16/16)	79,41, 100,00
FGFR3-TACC3v3	%100,00 (5/5)	47,82, 100,00
FGFR3-BAIAP2L1	%100,00 (1/1)	2,50, 100,00

Klinik sonuç verileri

42756493-BLC2001 çalışmasının 3. Rejimi, FGFR genomik alterasyonları içeren, metastatik veya cerrahi olarak çıkarılamayan UC görülen kişilerde seçilen BALVERSA (erdafitinib) dozunun (günde bir kez 8 mg) etkinliği ve güvenliğini belirlemeye yönelik bir Faz 2 çalışması olmuştur. Hastaların uygun olabilmesi için, klinik çalışma tahlili (Clinical Trial Assay, CTA) ile prospektif olarak belirlendiği şekilde, FGFR2 veya FGFR3 genlerinde spesifik alterasyonlar bulunması şart koşulmuştur. 42756493-BLC2001 klinik çalışması için muayene edilmiş hastalardan alınan numunelerin retrospektif testleri, tanı amaçlı *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit'in 42756493-BLC2001 klinik çalışması için hasta seçmek amacıyla kullanılan CTA ile uyumluluğunu değerlendirmek üzere destekleyici bir çalışma yapılmıştır. Destekleyici çalışmada 300 hasta örneği yer almıştır.

Hem *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit hem de CTA için geçerli sonuçlar veren örnekler (n = 292), genel *FGFR* gen alterasyonu durumu bakımından iki yöntem (FGFR Alterasyonu Saptandı veya Alterasyon Saptanmadı) arasındaki uyumluluğa dayalı olarak, PPA, NPA ve OPA değerlerini değerlendirmek üzere analiz edilmiştir. Bu yüzde değerleri, ilgili iki taraflı %95 CI ile birlikte Tablo 14'te özetlenmiştir.

Tablo 14. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit / CTA (referans yöntem olarak CTA ile)

Uyumluluk ölçütü	Uyumluluk yüzdesi % (N)	İki taraflı %95 CI
Pozitif uyumluluk oranı (Positive Percent Agreement, PPA)	%87,2 (82/94)	79,0, 92,5
Negatif uyumluluk oranı (Negative Percent Agreement, NPA)	%97,0 (192/198)	93,5, 98,6
Genel uyumluluk oranı (Overall Percent Agreement, OPA)	%93,8 (274/292)	90,5, 96,1

FGFR alterasyon durumu uyumsuz toplam 18 sonuç için, 12 örnek *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile "Alterasyon Saptanmadı" sonucu vermiş ancak CTA ile "FGFR Alterasyonu Saptandı" sonucu vermiştir. Altı örnek ise, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile "FGFR Alterasyonu Saptandı" sonuçları vermiş ancak CTA ile "Alterasyon Saptanmadı" sonuçları vermiştir. 94 CTA pozitif örneğin 81'inin, kemoterapide hastalığı nüks eden/tedaviye yanıt vermeyen hastalardan alındığını dikkate alın. Bu gruptaki pozitif uyumluluk Tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 15. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile CTA arasındaki pozitif uyumluluk (referans yöntem olarak CTA ile); kemoterapide hastalığı nüks eden/tedaviye yanıt vermeyen kişiler

		CTA FGFR+
QIAGEN Tahlili	FGFR +	69
	FGFR –	12
	Toplam	81
	PPA (%95 CI)	%85,2 (%75,9-91,3)

42756493-BLC2001 çalışmasının esas hedefi, araştırmacı değerlendirmesi ile değerlendirildiği şekilde RECIST kriterlerine göre, objektif yanıt oranını (objektif yanıt oranı [Objective Response Rate, ORR] = tam yanıt [Complete Response, CR] + kısmi yanıt [partial response, PR]) değerlendirmek olmuştur. BIRC'ye göre ORR değeri de belirlenmiştir. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile FGFR Alterasyonu Saptandı sonucu elde edilen hasta alt setinde (n = 81) gözlemlenen klinik fayda, tam çalışma popülasyonunda (n = 99) gözlemlenen klinik faydaya benzer olmuştur. FGFR3-BAIAP2L1, FGFR2-BICC1 ve FGFR2-CASP7 füzyonları için ORR verisi mevcut olmadığından, bu alterasyonlar için klinik geçerliliğin gösterildiğini öne sürmek mümkün değildir. Genel etkililik sonuçları Tablo 16'da özetlenmiştir.

Tablo 16. 42756493-BLC2001 klinik çalışması Rejim 3 popülasyonunda, *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ile test edilen hastalarla ilgili klinik fayda

Parametre	<i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit+ popülasyon, n = 81	CTA+ popülasyon, n = 99
BIRC'e göre objektif yanıt oranı (Objective Response Rate, ORR)		
Yanıt sayısı (N)	29	34
ORR, % (%95 CI)	%35,8 (%26,2-46,7)	%34,3 (%25,0-43,7)
Araştırmacılara göre objektif yanıt oranı (Objective Response Rate, ORR)		
Yanıt sayısı (N)	37	40
ORR, % (%95 CI)	%45,7 (%35,3-56,5)	%40,4 (%30,7-50,1)

BIRC: Körlenmiş Bağımsız İnceleme Komitesi; **CI:** güven aralığı; **CTA:** Klinik çalışma tahlili.

Kit+: CDx ile saptanan FGFR alterasyonu; **CTA+:** CTA ile saptanan FGFR alterasyonu.














therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit'in 42756493-BLC2001 klinik çalışması için hasta seçme amacıyla kullanılmadığı dikkate alınarak, CTA kullanılan örnek testlerinden No Alteration Detected (Alterasyon Saptanmadı) sonucu elde edildiği için çalışmaya dahil edilmeyen (ancak örnek *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (*therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit+/CTA-) kullanılarak test edilseydi FGFR Alteration Detected (FGFR Alterasyonu Saptandı) sonucu atanabilecek) hastaları değerlendirmek adına ek etkililik analizleri yürütülmüştür. Çalışmaya kaydolan ancak *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit kullanılarak geçerli yeniden test sonucu elde edilemeyen hastalar da dikkate alınmıştır (*therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit bilinmeyen/CTA+). Tüm varsayımsal analizlerden gelen sonuçlar birincil etkililik analizinde gözlemlenen sonuçlara genel olarak benzerdir.

Referanslar

1. Ornitz, D.M. and Itoh, N. (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. **4**, 215.
2. Knowles, M.A. and Hurst, C.D. (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. Nat. Rev. Cancer **15**, 25.
3. Rodriguez-Vida, A., Saggese, M., Hughes, S., et al. (2015) Complexity of FGFR signaling in metastatic urothelial cancer. J. Hematol. Oncol. **24**, 119.
4. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 7276.
5. BALVERSA (Erdafitinib) Prescribing Information.

Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:

Sembol	Sembol tanımı
	Avrupa uyumluluğu için işaret
	<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir
	Son kullanma tarihi
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Katalog numarası
	Lot numarası
	Materyal numarası
	Bileşenler
	İçindekiler
	Numara
	Işığa maruz bırakmayın
	Küresel Ticaret Parça Numarası
Rn	R Kullanma Talimatı (El Kitabı) revizyonudur ve n revizyon numarasıdır
	Sıcaklık sınırlaması

Sembol**Sembol tanımı**



Üretici



Kullanma talimatlarına bakın



Dikkat

İletişim Bilgileri

Teknik destek ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezi'ne bakın, 00800-22-44-6000 numarasını arayın ya da QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden birine veya yerel dağıtıcılara başvurun (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Sipariş Bilgileri

Ürün	İçerik	Kat. no.
<i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: RT Tamponu 1, RT Tamponu 2, RT Primer Karışımı, Ters Transkriptaz, Pozitif Kontrol, PC Seyreltici, Mutasyon-1 Reaksiyon Karışımı, Mutasyon-2 Reaksiyon Karışımı, Füzyon-1 Reaksiyon Karışımı, Füzyon-2 Reaksiyon Karışımı, Örnek Dilüsyon Suyu, NTC İçin Su	876711
RNeasy DSP FFPE Tissue Kit		
RNeasy DSP FFPE Kit	50 RNA hazırlığı için: RNeasy MinElute® Döndürme Kolonları, Toplama Tüpleri, Elüsyon Tüpleri, Deparaffinization Solution, Proteinaz K, RNaz İçermeyen DNaz I, DNaz Destek Tamponu, RNaz İçermeyen Tamponlar ve RNaz İçermeyen Su.	73604
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ve aksesuarları		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanal artı HRM kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti dahildir, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032

Ürün	İçerik	Kat. no.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Eritme analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar: parçalar ve işçilik için 1 yıllık garanti, kurulum ve eğitim dahildir	9002033
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 reaksiyon için 20-50 µl'lik 1000 ince duvarlı tüp	981005
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 10 x 250 strip	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0,1 ml'lik tüplerde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	96 x 0,2 ml'lik PCR tüplerinde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018905
72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps, 0.1 ml ürünü için, 10-50 µl reaksiyon hacimleriyle; Locking Ring 72-Well Rotor gerektirir	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	72-Well Rotor içindeki Strip Tubes and Caps, 0.1 ml ürünü kilitlemek için	9018904

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanım kılavuzuna bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Belge Revizyon Geçmişi

Revizyon	Açıklama
R1, Ekim 2021	İlk sürüm

Bu sayfa özellikle boş bırakılmıştır

Bu sayfa özellikle boş bırakılmıştır

therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürüne birlikte ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca panelin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu panel ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenler dışında bu panelin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde test edilmiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu panel ve/veya kullanımının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu panel ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açık olarak belirtilenler dışında açık veya zımni herhangi bir başka lisansı özellikle reddeder.
5. Panelin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisinin bu eylemlerde bulunmasına izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları ve ürüne özgü ret beyanları için www.qiagen.com adresine bakın.

Ticari Markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, MinElute®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, RNeasy®, *therascreen*® (QIAGEN Group); Balversa™ (Janssen Research & Development, LLC); TaqMan® (Roche Group). Bu belgede geçen tescilli adlar, ticari markalar vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarda korunmaktadır.

1125704 10-21 HB-2952-001 © 2021 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

Sipariş www.qiagen.com/shop | Teknik Destek support.qiagen.com | Web Sitesi www.qiagen.com