

„*therascreen*[®] KRAS RGQ PCR“ rinkinio vadovas



1 versija

IVD

Kiekybinė „in vitro“ diagnostika

Skirta naudoti su „Rotor-Gene[®] Q MDx“



REF 874011



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House,
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SH, Jungtinė Karalystė

EC REP „QIAGEN GmbH“, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden VOKIETIJA

R4 MAT 1116068LT



QIAGEN mėginių ir tyrimų technologijos

QIAGEN yra pirmaujanti novatoriškų mėginių ir tyrimų technologijų, leidžiančių išskirti ir aptikti bet kokių biologinių mėginių turinį, tiekėja. Pažangūs, aukštos kokybės mūsų produktai ir paslaugos užtikrina sėkmę nuo mėginio iki rezultato.

QIAGEN nustato standartus šiose srityse:

- DNR, RNR ir baltymų gryninimas
- Nukleino rūgščių ir baltymų tyrimai
- mikroRNR tyrimai ir RNR interferencija
- Mėginių ir tyrimų technologijų automatizavimas

Mūsų tikslas – leisti jums sėkmingai dirbti ir pasiekti laimėjimų. Daugiau informacijos rasite svetainėje **www.qiagen.com**.

Turinys

Numatytoji paskirtis	5
Suvestinė ir paaiškinimas	5
Procedūros principas	7
Pateikiamos medžiagos	10
Rinkinio turinys	10
Būtinės, bet nepateikiamos priemonės	11
Perspėjimai ir atsargumo priemonės	12
Saugos informacija	12
Bendrosios atsargumo priemonės	12
Reagentų laikymas ir naudojimas	13
Mėginių rinkimas, paruošimas tyrimui ir laikymas	13
Procedūra	14
DNR išskyrimas	14
Protokolas: DNR mėginio įvertinimas	15
Protokolas: KRAS mutacijų aptikimas	27
Rezultatų aiškinimas	36
Trikčių šalinimo vadovas	37
„ <i>therascreen</i> KRAS Assay Package“ sugeneruotos žymės	38
Kokybės kontrolė	43
Apribojimai	44
Efektyvumo charakteristikos	45
Analitinis efektyvumas	45
Aptikimo riba (LOD)	49
DNR įvestis ir linijškumas	51
Trukdančios medžiagos	56
Kryžminis užteršimas	56
Specifiškumas / kryžminis reaktyvumas	57
Pasikartojamumas ir atkartojamumas	59
Mėginių apdorojimo kintamumas	61
Mėginių gavimo būdų lygiavertiškumas (tik NSCLC)	62
Literatūra	62
Simboliai	65

Kontaktinė informacija	66
1 priedas „<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR“ rinkinio rankinio paruošimo protokolas	67
Rezultatų aiškinimas (neautomatinis)	80
Programinės įrangos analizės nustatymai	80
Mėginių įvertinimo duomenų analizė	80
KRAS mutacijų aptikimo analizė	81
Mėginių analizė	83
2 priedas „<i>therascreen</i> KRAS Assay Package“ diegimas	88
Užsakymo informacija	91
Peržiūros istorija	92

Numatytoji paskirtis

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys yra realiuoju laiku atliekamas žmogaus KRAS onkogeno 7 somatinių mutacijų 12 ir 13 kodonuose aptikimo kiekybinis PGR tyrimas naudojant „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą. Rinkinys skirtas naudoti tiriant DNR, išskirtą iš kolorektalinio vėžio (CRC) formalinu fiksuotų parafine esančių (FFPE) audinių arba nesmulkiaštelinio plaučių vėžio (NSCLC) mėginių, gautų naudojant rezekciją, biopsiją šerdine adata (CNB) arba aspiraciją plona adata (FNA).

KRAS geno somatinės mutacijos – tai potencialūs prognozuojamieji biožymenys, rodantys atsparumą žmogaus epidermio augimo faktoriui (EGFR) skirtiems antikūnams, pvz., panitumumabui arba cetuksimabui, gydant CRC. Kai kurios KRAS geno mutacijos taip pat gali būti nurodomos kaip potencialus prognozuojamasis biožymuo, padedantis nuspręsti dėl tam tikrų NSCLC terapijų.

Norėdamas paskirti gydymą, gydytojas atsižvelgs į paciento mutacijų būklę ir kitus ligos faktorius. Joks vėžiu sergančių pacientų gydymas negali būti paremtas tik KRAS mutacijos būkle.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys neskirtas CRC, NSCLC ar kitai ligai diagnozuoti.

Suvestinė ir paaiškinimas

KRAS onkogeno mutacijos dažnai nustatomos žmonėms, sergantiems vėžiu (1–4). Naudojant „Scorpions[®]“ ir ARMS[®] (amplifikacijos refrakcinė mutacijų sistema) technologijas (5, 6) ir „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, laukinio tipo genomines DNR fone galima aptikti septynias 12 ir 13 KRAS onkogeno kodonų mutacijas (žr. 1 lentelę). Remiantis COSMIC duomenų bazės (2015 m. v72) duomenimis, „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniu aptiktos 7 mutacijos sudaro > 95 % visų pateiktų CRC pacientų KRAS mutacijų ir > 88 % visų pateiktų NSCLC pacientų mutacijų (7).

1 lentelė. Mutacijų ir COSMIC identifikatorių sąrašas

Mutacija	Bazinis pokytis	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

* COSMIC ID paimti iš „*Catalog of Somatic Mutations in Cancer*“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo) (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Šis tyrimas labai specifinis ir jautrus, leidžiantis laukinio tipo DNR fone aptikti nedidelę mutacinės DNR procentinę dalį. Jei yra pakankamas kiekis DNR kopijų, galimas 0,8 % mutacijos aptikimas laukinio tipo genomines DNR fone (kiekvienos mutacijos aptikimo ribos informaciją rasite „Efektyvumo charakteristikos“, 45 psl.).

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys naudojamas atliekant polimerazės grandinės reakcijos (PGR) procedūrą. Šio rinkinio pranašumas – didelis jos specifiškumas tiriamojo objekto atžvilgiu ir galimybė greitai, efektyviai ir nesubjektyviai nustatyti rezultatus.

Procedūros principas

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinyje naudojamos 2 technologijos – ARMS ir „Scorpions“ – skirtos mutacijoms aptikti atliekant realiojo laiko PGR tyrimus.

Mutacijų reakcijų mišiniai

Kiekviename reakcijų mišinyje naudojamas mutacijai būdingas ARMS pradmuo, kad būtų selektyviai amplifikuojama mutavusi DNR, tada – „Scorpions“ pradmuo, kad būtų aptiktas amplifikacijos produktas.

ARMS

Aleliams būdingą amplifikaciją užtikrina ARMS, kurioje išnaudojama *Taq* DNR polimerazės galimybė atskirti sutampančią ir nesutampančią bazę PGR pradmens 3' gale. Kai pradmuo visiškai sutampa, amplifikacija vyksta visu greičiu. Kai 3' bazė nesutampa, amplifikacija gali vykti tik fone nedideliu greičiu. Todėl mutavusios sekos gali būti selektyviai amplifikuotos net mėginiuose, kuriuose didžioji dalis DNR yra nemutavusi.

Scorpions

Amplifikacija aptinkama taikant „Scorpions“ technologiją. „Scorpions“ yra dvigubos funkcijos molekulės, turinčios PGR pradmenį, kovalentiškai sujungtą su zonda. Zonde yra fluoroforo karboksifluoresceino (FAM™) ir slopinamosios medžiagos. Pastaroji slopina fluoroforo fluorescenciją. Kai atliekant PGR zondas prisijungia prie ARMS amplifikacijos produkto, fluoroforas ir slopinamoji medžiaga atsiskiria, todėl aptinkamai padidėja fluorescencija.

Rinkinio formatas

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį sudaro 8 tyrimai:

- 1 kontrolinis tyrimas (kontrolinės reakcijos mišinį [CTRL])
- 7 mutacijų tyrimai (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Reakcijų mišiniai yra dvigubi, juose yra FAM pažymėti reagentai, skirti tiriamiesiems objektams aptikti, ir HEX™ pažymėta vidinė kontrolinė medžiaga. Reakcijų mišiniuose ir teigiamoje kontrolinėje medžiagoje yra „Tris EDTA“ buferinis tirpalas, o teigiamoje kontrolinėje medžiagoje yra Poli A RNR nešiklis.

Tyrimai

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį sudaro dviejų žingsnių procedūra. Pirmajame etape kontrolinis tyrimas naudojamas visam amplifikuojamos KRAS DNR kiekiui mėginyje įvertinti. Antrajame etape mutacijos ir kontroliniai tyrimai atliekami siekiant nustatyti mutacinės DNR buvimą ar nebuvimą.

Kontrolinė reakcija

Kontrolinės reakcijos mišinyje (CTRL) naudojamas „Scorpions“ pradmuo ir nepažymėtas pradmuo, kad būtų amplifikuojama trumpa KRAS geno 4 egzono seka. Kontrolinė reakcija naudojama norint nustatyti, ar mėginyje yra atitinkamas amplifikuotinos DNR lygis, ir kaip faktorius analitiniuose skaičiavimuose norint nustatyti mutacijos būseną.

Kontrolinis tyrimas

Kontrolinis tyrimas, pažymėtas FAM, naudojamas visam amplifikuojamos KRAS DNR kiekiui mėginyje įvertinti. Kontrolinio tyrimo metu amplifikuojamas KRAS geno 4 egzono regionas. Pradmenys ir „Scorpions“ zondas skirtas amplifikuoti nepriklausomai nuo visų žinomų KRAS polimorfizmų.

Mutacijų tyrimai

Kiekvieno mutacijų tyrimo sudėtyje yra FAM pažymėtas „Scorpions“ zondas ir ARMS pradmuo, naudojamas norint atskirti laukinio tipo DNR ir specifinę mutavusią DNR.

Kontrolės

Pastaba: visų eksperimentinių tyrimų serijose turi būti teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos.

Vidinės kontrolinės medžiagos

Kiekviename reakcijos mišinyje kartu su tikslinės reakcijos medžiaga yra vidinė kontrolinė medžiaga. Nepavykusi reakcija rodo, kad gali būti inhibitorių, dėl kurių gaunami netikslūs rezultatai, arba kad nustatydamas šį mėgintuvėlių operatorius padarė klaidą. Jei vidinės kontrolinės medžiagos klaida įvyksta dėl PGR inhibicijos, atskiedus mėginį, inhibitorių poveikį galima sumažinti. Tačiau reikia atkreipti dėmesį, kad bus atskiesta ir tikslinė DNR. Su rinkiniu pateikiamas vandens, skirtas mėginiams skiesti, mėgintuvėlis („Dil.“). Mėginiai turi būti skiedžiami naudojant vandenį mėginiams skiesti („Dil.“).

Teigiama kontrolinė medžiaga

Kiekvienoje tyrimo sekoje 1–5 mėgintuvėliuose turi būti teigiama kontrolinė medžiaga. „*therascreen* KRAS RGQ“ rinkinyje yra KRAS teigiama kontrolinė medžiaga (PC), kuri naudojama kaip teigiamos kontrolinės medžiagos reakcijos šablonas. Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai įvertinami siekiant įsitikinti, kad rinkinys veikia pagal nurodytus priimtumo kriterijus.

Neigiamos kontrolinės medžiagos

Kiekvienoje tyrimų serijoje 9–13 mėgintuvėliuose turi būti neigiama kontrolinė medžiaga („kontrolinė medžiaga be matricos“, NTC). „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinyje yra NTC skirtas vandens, naudojamas kaip nešabloninės kontrolinės medžiagos „šablonas“. Kontrolinė medžiaga be matricos naudojama norint įvertinti bet kokią galimą užteršimą nustatant tyrimą ir vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos veiksmingumą.

Mėginių įvertinimas

Su „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniu tiekiamas kontrolinės reakcijos mišinys (CTRL), naudojamas visai amplifikuotinai KRAS DNR mėginyje įvertinti. Kontrolinio tyrimo metu amplifikuojamas KRAS geno 4 egzono regionas. Rekomenduojama mėginius nustatyti naudojant tik kontrolinį tyrimą ir KRAS teigiamą kontrolinę medžiagą (PC) kaip teigiamą kontrolinę medžiagą ir NTC skirtą vandenį kaip kontrolinę medžiagą be matricos.

Platforma ir programinė įranga

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys skirtas naudoti konkrečiai su „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu. „Rotor-Gene Q“ programinę įrangą ir „*therascreen* KRAS Assay Package“ galima atsisiųsti iš interneto arba gauti atskirai CD diske.

„Rotor-Gene Q MDx“ instrumentus reikia naudoti pagal instrumento naudotojo vadove pateiktus reikalavimus. Informacijos apie instrumentą rasite naudotojo vadove.

Diegimo instrukcijas rasite „2 priedas „*therascreen* KRAS Assay Package“ diegimas“, 88 psl.

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
Katalogo Nr.				874011
Paruošimų skaičius				24
Spalva	Identifikatorius	Mėgintuvėlio identifikatorius		Tūris
Raudona	Control Reaction Mix (Kontrolinės reakcijos mišinys)	1	CTRL	2 x 600 µl
Violetinė	12ALA Reaction Mix (12ALA reakcijos mišinys)	2	12ALA	600 µl
Oranžinė	12ASP Reaction Mix (12ASP reakcijos mišinys)	3	12ASP	600 µl
Rožinė	12ARG Reaction Mix (12ARG reakcijos mišinys)	4	12ARG	600 µl
Žalia	12CYS Reaction Mix (12CYS reakcijos mišinys)	5	12CYS	600 µl
Geltona	12SER Reaction Mix (12SER reakcijos mišinys)	6	12SER	600 µl
Pilka	12VAL Reaction Mix (12VAL reakcijos mišinys)	7	12VAL	600 µl
Mėlyna	13ASP Reaction Mix (13ASP reakcijos mišinys)	8	13ASP	600 µl
Rusvai gelsva	KRAS Positive Control (KRAS teigiama kontrolinė medžiaga)	9	PC	250 µl
Žalsva	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNR polimerazė)		<i>Taq</i>	80 µl
Balta	Water for NTC (NTC skirtas vanduo)		NTC	1,9 ml
Balta	Water for Sample Dilution (vanduo mėginiams skiesti)		Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit Handbook (anglų k.)				1

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mėvėkite vienkartines pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

Reagentai

- „QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit“ (kat. Nr. 56404; žr. „DNR išskyrimas“, 14 psl.)
- Ksilenas
- Etanolis (96–100 %)*

Reikmenys

- Sterilūs pipečių antgaliai su filtrais (siekiant išvengti kryžminio užteršimo, rekomenduojame naudoti pipečių antgalius su aeroliniais barjeriais)
- Sterilūs mikrocentrifugos mėgintuvėliai, skirti pagrindiniams mišiniams ruošti
- „0.1 ml Strip Tubes and Caps“ (0,1 ml mėgintuvėlių ir dangtelių juostelės), skirtos naudoti su 72 šulinėlių rotoriumi (kat. Nr. 981103 arba 981106)

Įranga

- „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentas su fluorescenciniais kanalais, skirtais „Cycling Green“ ir „Cycling Yellow“ (atitinkamai FAM ir HEX aptikimui)
- „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos 2.3 versija ir „KRAS Assay Package“ (3.1.1 versija), diegiami automatinam mutacijų aptikimui (žr. „2 priedas „*therascreen* KRAS Assay Package“ diegimas“, 88 psl.)

Pastaba: „Rotor-Gene Q“ programinę įrangą galima naudoti be „KRAS Assay Package“, skirto automatinam mutacijų aptikimui. Žr. „1 priedas „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio rankinio paruošimo protokolas“, 67 psl.

- Termostatinis maišytuvas[†], šildomas žiedinis maišymo inkubatorius, kaitinimo blokas arba vandens vonelė, galinti inkubuoti esant 56 °C ir 90 °C temperatūrai
- Stalinė centrifuga[†] su rotoriumi 1,5 ml mėgintuvėliams
- Stalinis purtytuvas[†]
- Specialios pipetės (reguliuojamos), skirtos mėginams ruošti[†]

* Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletilketono.

† Įsitikinkite, kad visi instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

- Specialios pipetės (reguliuojamos), skirtos PGR pagrindiniams mišiniams ruošti*
- Specialios pipetės (reguliuojamos), skirtos DNR matricai paskirstyti*

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirtas „in vitro“ diagnostikai

Saugos informacija

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS).

Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete

www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

Bendrosios atsargumo priemonės

Naudotojas visada turi atkreipti dėmesį:

- Teigiamas medžiagas (mėginius ir teigiamas kontrolines medžiagas) laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo visų kitų reagentų, dėkite juos į reakcijos mišinį erdviškai atskirtoje patalpoje.
- Būkite ypač atsargūs, kad neužterštumėte PGR reakcijų sintetine kontroline medžiaga. Reakcijos mišiniams paruošti ir DNR matricai pridėti rekomenduojama naudoti atskiras specialias pipetes. Reakcijos mišiniai turi būti ruošiami ir paskirstomi kitoje vietoje nei ta, kurioje pridedama matrica. Pabaigus PGR tyrimų seriją „Rotor-Gene Q“ mėgintuvėlių atidaryti negalima. Taip išvengsite laboratorijos užteršimo galutiniais PGR produktais.
- „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio reagentai yra optimaliai atskiesti. Daugiau reagentų skiesti nerekomenduojama, nes gali sumažėti jų veiksmingumas. Nerekomenduojama naudoti mažesnių negu 25 µl reakcijos tūrių, nes tai didina klaidingai neigiamų rezultatų riziką.
- Visi reagentai, esantys „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinyje, yra specialiai sukurti siekiant užtikrinti optimalų veikimą. Visi rinkinio sudėtyje esantys reagentai numatyti naudoti tik su kitais reagentais iš to paties „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio. Norint išlaikyti optimalų rinkinio veikimą, negalima naudoti reagentų pakaitalų.
- Naudokite tik rinkinyje pateikiamą *Taq* DNR polimerazę (*Taq*). Nepakeiskite jos kita *Taq* DNR polimeraze iš to paties ar kito tipo rinkinio, taip pat nekeiskite *Taq* DNR polimeraze, gauta iš kito tiekėjo.

* Įsitinkinkite, kad visi instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

Reagentų laikymas ir naudojimas

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys pateikiamas ant sauso ledo. Jei pristačius „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį kuris nors jo komponentas nėra užšaldytas, pervežant buvo atidaryta išorinė pakuotė, nėra važtaraščio, naudojimo vadovo arba reagentų, susiekite su vienu iš QIAGEN Techninio aptarnavimo skyrių arba vietinių platintojų (žr. viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Gavus „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, jį iš karto reikia padėti laikyti nuo –30 iki –15 °C temperatūroje, pastovią temperatūrą palaikančiame ir apsaugotame nuo šviesos šaldiklyje. Kaip ir visos fluorescenciškai pažymėtos molekulės, „Scorpions“ turi būti saugomi nuo šviesos, kad neišbluktų ir nesumažėtų jų veiksmingumas.

Laikant rekomenduojamomis laikymo sąlygomis originalioje pakuotėje, „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys išlieka stabilus iki nurodytos galiojimo datos. Venkite pakartotinai atšildyti ir užšaldyti. Atlikite ne daugiau kaip 6 atšildymo ir užšaldymo ciklus.

Mėginių rinkimas, paruošimas tyrimui ir laikymas

Pastaba: su visais mėginiais turi būti elgiamasi kaip su potencialiai užkrečiama medžiaga.

Mėginių medžiaga turi būti žmogaus genomine DNR, išskirta iš FFPE audinio. Mėginius būtina transportuoti pagal standartinį patologinį metodą, kad būtų užtikrinta mėginių kokybė.

Auglio mėginiai yra heterogeniški, o auglio mėginio duomenys gali neatitikti kitų to paties auglio dalių mėginių duomenų. Auglio mėginiuose taip pat gali būti ne auglio audinių. Ne auglio audinio DNR neturi mutacijų, aptinkamų naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį.

Audinių mėginių paruošimas

Pastaba: naudokite sausus skalpelius. Neatlikite šio veiksmo laminarinio srauto arba traukos spintoje.

- Nugrandykite auglio audinį nuo atpjovų į pažymėtus mikrocentrifugos mėgintuvėlius, kiekvienam mėginiui naudodami naują skalpelį.

Audinių mėginių paruošimas DNR išskyrimui (CRC)

- Naudodami įprastas medžiagas ir metodus, užfiksuokite audinio mėginį 10 % neutraliu buferiniu skysčiu atskiestame formaline (NBF), tada audinio mėginį įdėkite į parafiną. Nuo parafino bloko mikrotomu atpjaukite 5 µm atpjovų seką ir uždėkite ant objektinių stiklelių.

- Patyręs asmuo (pvz., patologas) turi įvertinti hematoksilinu ir eozinu (H&E) nudažytą auglio ląstelių atpjovą ir nustatyti plotą. Pažymėkite nudažytą objektinį stiklėlį, kad atskirtumėte auglį nuo įprasto audinio. DNR išskyrimui naudokite sekos atpjovas.
- Atpjovas, kurių > 20 % ploto užima auglio ląstelės, naudokite be makrodisekcijos (žr. toliau).
- Nuo atpjovų, kurių < 20 % ploto užima auglio ląstelės, atskirkite vieną ar kelias atpjovas. Išmeskite ne auglio audinį.
- Jei atpjovos plotas < 4 mm², apdorokite dvi ar daugiau atpjovų, kad padidintumėte bendrą auglio plotą bent iki 4 mm² (taikoma tiek mėginiams be makrodisekcijos, tiek su ja). Išmeskite ne auglio audinį.
- Parafino perteklių nuo audinio pašalinkite naudodami naują sterilų skalpelį.

Audinių mėginių paruošimas DNR išskyrimui (NSCLC)

- Naudodami įprastas medžiagas ir metodus, užfiksuokite audinio mėginį 10 % neutraliu buferiniu skysčiu atskiestame formaline (NBF), tada audinio mėginį įdėkite į parafiną. Nuo parafino bloko mikrotomu atpjaukite 5 µm atpjovų seką ir uždėkite ant objektinių stiklelių.
- Patyręs asmuo (pvz., patologas) turi įvertinti H&E nudažytą atpjovą ir nustatyti, ar joje yra auglio ląstelių. DNR išskyrimui naudokite sekos atpjovas.
- Parafino perteklių nuo audinio pašalinkite naudodami naują sterilų skalpelį.

Laikymas

FFPE blokus ir objektinius stiklelius laikykite kambario temperatūroje. Prieš pradėdami išskirti DNR, objektinius stiklelius galima laikyti kambario temperatūroje iki 4 savaičių.

Prieš naudojimą išskirta genominė DNR gali būti laikoma 2–8 °C temperatūroje 1 savaitę, tada nuo –25 iki –15 °C temperatūroje – iki 8 savaičių.

Procedūra

DNR išskyrimas

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio efektyvumo charakteristikos sugeneruotos naudojant DNR, išskirtą pasitelkus „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ (kat. Nr. 56404). Jei naudojate „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinį, DNR išskyrimą atlikite pagal vadove pateiktas instrukcijas ir atkreipkite dėmesį į toliau nurodytus dalykus.

DNR išskyrimas (CRC mėginiai)

- „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinys turi būti naudojamas tik rankiniu būdu.
- Neatlikite ribonukleazės veiksmo, aprašyto *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* („QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadove).
- Nenaudokite QIAGEN deparafinizavimo tirpalo. Deparafinizuokite naudodami tik ksileno / etanolio metodą, aprašytą „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadove.
- Proteinazės K veikimas (11 veiksmas, aprašytas „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadove) turi tęstis 1 val.
- Mėginiai turi būti išplauti naudojant 200 µl buferinio tirpalo (ATE buferinis tirpalas) iš „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio.

DNR išskyrimas (NSCLC mėginiai)

- Naudokite 2 × 5 µm atpjuvas kiekvienam išskyrimui.
- „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinys turi būti naudojamas tik rankiniu būdu.
- Neatlikite ribonukleazės veiksmo, aprašyto *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* („QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadove).
- Nenaudokite QIAGEN deparafinizavimo tirpalo, pateikiamo „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinyje. Deparafinizuokite naudodami tik ksileno / etanolio metodą, aprašytą „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadove.
- Proteinazės K veikimas (11 veiksmas, aprašytas „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadove) turi tęstis 1 val.
- Įlašinkite 60 µl išplovimo buferinio tirpalo (ATE) iš „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio ir inkubuokite 2,5 minutės kambario temperatūroje.
- Centrifuguokite visu greičiu 1 minutę.
- Įlašinkite dar 60 µl išplovimo buferinio tirpalo (ATE) iš „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinio ir inkubuokite 2,5 minutės kambario temperatūroje.
- Centrifuguokite visu greičiu 1 minutę.

Protokolas: DNR mėginio įvertinimas

Šis protokolas naudojamas visam amplifikuojamam DNR kiekiui mėginiuose įvertinti, naudojant „KRAS CE Sample Assessment Locked Template“ („Assay Package“), skirto automatizuotam mėginių vertinimui.

Pastaba: informacijos apie neautomatinį mėginių vertinimą ieškokite „1 priedas „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio rankinio paruošimo protokolas“, 67 psl.

Svarbi informacija prieš pradedant

- Naudojant turimą kontrolinį reakcijų mišinį (CTRL) galima įvertinti iki 24 mėginių.
- Prieš tirdami įvertinkite DNR naudodami kontrolinį reakcijų mišinį (CTRL).
- **Pastaba:** vertinant kontrolinį reakcijų mišinį (CTRL) svarbu naudoti taip, kaip aprašyta toliau, o ne taikyti spektrofotometriją ar kitus alternatyvius metodus. Labai degradavusios DNR gali nepavykti amplifikuoti, net jei pradmenys sukuria trumpus DNR fragmentus.
- Norint efektyviai naudoti „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio reagentus, sudarykite kuo didesnes DNR mėginių partijas, kad galėtumėte atlikti visos apimties tyrimus. Jei mėginiai tiriami atskirai ar mažesnėmis partijomis, sunaudojama daugiau reagentų ir sumažinamas mėginių, kuriuos galima iširti naudojant vieną „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, skaičius.
- Prieš pirmą kartą naudodami „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą įsitikinkite, kad įdiegta tinkama „*therascreen* KRAS Assay Package“ programinė įranga, atitinkanti „Rotor-Gene Q“ programinės rangos versiją (žr. „2 priedas „*therascreen* KRAS Assay Package“ diegimas“, 88 psl.).

Procedūra

1. **Visiškai atšildykite kontrolinės reakcijos mišinį (CTRL), vandenį be nukleazės, skirtą kontrolinei medžiagai be matricos (NTC), ir KRAS teigiamą kontrolinę medžiagą (PC) kambario temperatūroje (15–30 °C) bent 1 val.**
 - **Pastaba:** perkeltkite *Taq* DNR polimerazę (*Taq*) į kambario temperatūrą (15–30 °C) tuo pačiu metu kaip ir kitus reagentus (žr. „Reagentų laikymas ir naudojimas“, 13 psl). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

Reagentų atšildymo, PGR nustatymo ir laikymo prieš pradedant tirti laikas nurodytas 2 lentelėje.

Pastaba: PGR nustatymą atlikite kambario temperatūroje.

2 lentelė. Atšildymo, PGR nustatymo ir laikymo laikas

Atšildymo laikas		Laikymo* temperatūra nustačius PGR	Maksimalus PGR nustatymo ir laikymo laikas
Minimalus	Maksimalus		
1 val.	4,5 val.	Kambario temperatūra (15–30 °C)	7 val.
1 val.	4,5 val.	2–8 °C	18 val.

* „Laikymas“ reiškia laiką nuo PGR nustatymo pabaigos iki tyrimo „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu pradžios.

1. **Sumaišykite atšilusius reagentus, kiekvieną mėgintuvėlį pavartydami 10 kartų, kad nesusikauptų druskos, ir trumpai centrifuguokite, kad turinį galėtumėte surinkti nuo mėgintuvėlio dugno.**

Pastaba: nevartykite *Taq* DNR polimerazės (*Taq*) arba bet kokio mišinio, kuriame yra *Taq*, nes tai gali deaktyvinti fermentą.

2. **Paruoškite pakankamai pagrindinių mišinių (kontrolinį reakcijų mišinį [CTRL] ir *Taq* DNR polimerazę [*Taq*]) pagal 3 lentelė nurodytus tūrius:**

- Visiems DNR mėginiams
- 1 KRAS teigiamos kontrolinės medžiagos (PC) reakcijai
- 1 vandens be nukleazės, skirto kontrolinės medžiagos be matricos (NTC), reakcijai
- 1 papildomam mėginiui, kad būtų pakankamas perteklius nustatant PGR

Pagrindiniame mišinyje yra visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

3 lentelė. Kontrolinio tyrimo pagrindinio mišinio ruošimas

Komponentas	Tūris
Kontrolinės reakcijos mišinys (CTRL)	19,76 µl × (n + 1)*
<i>Taq</i> DNR polimerazė (<i>Taq</i>)	0,24 µl × (n + 1)*
Bendrasis tūris	20 µl/reakcijai

* n = reakcijų skaičius (mėginių ir kontrolinių medžiagų).

Paruoškite pakankamai pagrindinio mišinio papildomam mėginiui (n + 1), kad būtų pakankamas perteklius nustatant PGR.

n reikšmė neturi viršyti 24 (ir kontrolinės medžiagos), nes vienu metu tirti galima daugiausia 24 mėginius.

Pastaba: ruošiant pagrindinį mišinį, pirmiausia į atitinkamą mėgintuvėlį pridedama reikiamo tūrio kontrolinės reakcijos mišinio (CTRL), o *Taq* DNR polimerazė (*Taq*) pridedama paskutinė.

Pastaba: pipete įlašinkite *Taq* DNR polimerazės: pipetės antgalį atsargiai įkiškite skysčio paviršiuje, kad antgalis nepasidengtų fermentų pertekliumi.

3. Į įkrovos bloką įdėkite reikiamą skaičių PGR 4 mėgintuvėlių juostelių (kiekvienoje juostelėje yra po 4 mėgintuvėlius) pagal 4 lentelėje pateiktą išdėstymą. Mėgintuvėlių neuždenkite.

Pastaba: laikykite dangtelius plastikiniame indelyje, kol jų prireiks.

3 lentelė. Tyrimo išdėstymas įkrovos bloke vertinant DNR mėginius

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

* Skaičiai reiškia vietas įkrovos bloke ir nurodo galutinę rotoriaus padėtį.

4. Kruopščiai nustatykite pipetę ties tūriu, mažesniu nei bendras reakcijos pagrindinio mišinio tūris, visiškai įsiurbkite ir išlašinkite 10 kartų.

5. Nedelsdami įpilkite 20 µl pagrindinio mišinio į kiekvieną PGR mėgintuvėlių juostelę.

Pastaba: mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 4 lentelėje. Norint įvertinti DNR mėginį, kontrolinio tyrimo pagrindinio mišinio reikia pridėti į vieną PC mėgintuvėlį, į vieną NTC mėgintuvėlį ir į vieną kiekvieno DNR mėginio mėgintuvėlį.

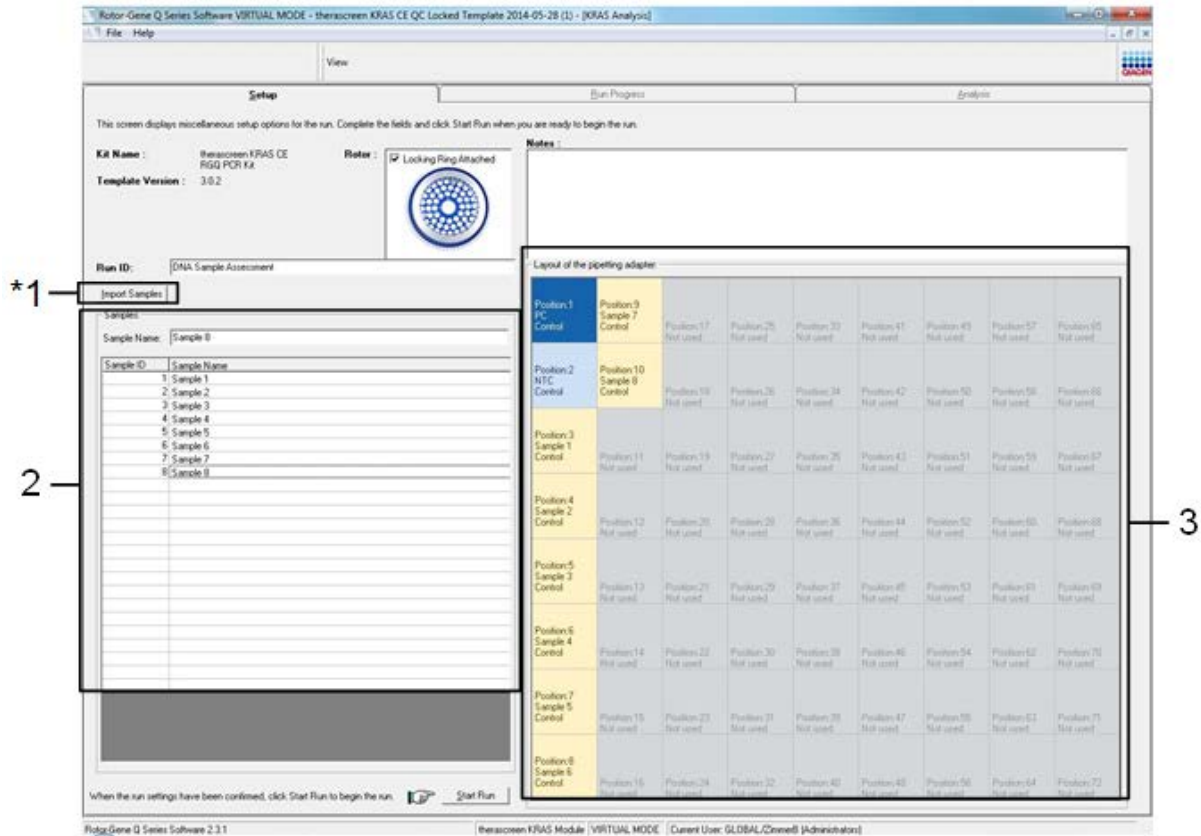
6. Iškart įpilkite 5 µl vandens be nukleazės, skirto kontrolinei medžiagai be matricos (NTC), į NTC mėgintuvėlį (2 mėgintuvėlio vieta) ir jį uždenkite.

7. Įpilkite po 5 µl kiekvieno DNR mėginio į mėginių mėgintuvėlius (3–26 mėgintuvėlių vietos) ir uždenkite juos dangteliais.
8. Pridėkite 5 µl KRAS teigiamos kontrolinės medžiagos (PC) į PC mėgintuvėlį (1 mėgintuvėlio vieta) ir uždenkite jį dangteliu.
Kiekviename mėgintuvėlyje iš viso turi būti 25 µl reakcijos tūris (20 µl pagrindinio mišinio, paruošto pagal 3 lentelę, ir 5 µl NTC / mėginio / PC).
9. Ilgalaikiu žymikliu pažymėkite PGR 4 mėgintuvėlių juostelių pirmų mėgintuvėlių, esančių mažiausių skaičių vietose, dangtelius (pvz., esančių 1, 5, ir 9 vietoje ir t. t.), kad nurodytumėte kryptį, kaip įdėti mėgintuvėlius į „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento 72 šulinėlių rotorius.
10. Pavartykite uždengtus mėgintuvėlius 4 kartus, kad susimaišytų mėginys ir reakcijos mišinys.
11. Naudodami krypties žymes, pagal tyrimo išdėstymą (4 lentelė) sudėkite visas PGR 4 mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas vietas 72 šulinėlių rotoriuje.
Pastaba: jei rotorius nevisiškai užpildytas, visas nenaudojamas rotoriaus vietas reikia užpildyti uždengtais tuščiais mėgintuvėliais. Taip užtikrinsite, kad būtų išlaikytas „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento šiluminis efektyvumas.
12. Nedelsdami įdėkite 72 šulinėlių rotorius į „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą. Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas (pateikiamas su „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu) yra uždėtas ant rotoriaus, kad tyrimo serijos metu mėgintuvėliai būtų pritvirtinti.
13. Paleiskite „Rotor-Gene Q“ programinę įrangą ir tuo pat metu atidarykite šabloną, prie „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento prijungto nešiojamojo kompiuterio darbalaukyje dukart spustelėję piktogramą „therascreen KRAS QC Locked Template“ (1 pav.).



1 pav. Piktograma „therascreen KRAS QC Locked Template“.

14. Kaip numatytasis rodomas skirtukas „Setup“ (Nustatymas) (2 pav.). Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas tinkamai uždėtas, ir pažymėkite langelį „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Uždarykite „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento dangtelį.



2 pav. Skirtukas „Setup“ (Nustatymas) ir laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). 1 = skirtukas „Setup“ (Nustatymas); 2 = laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas).

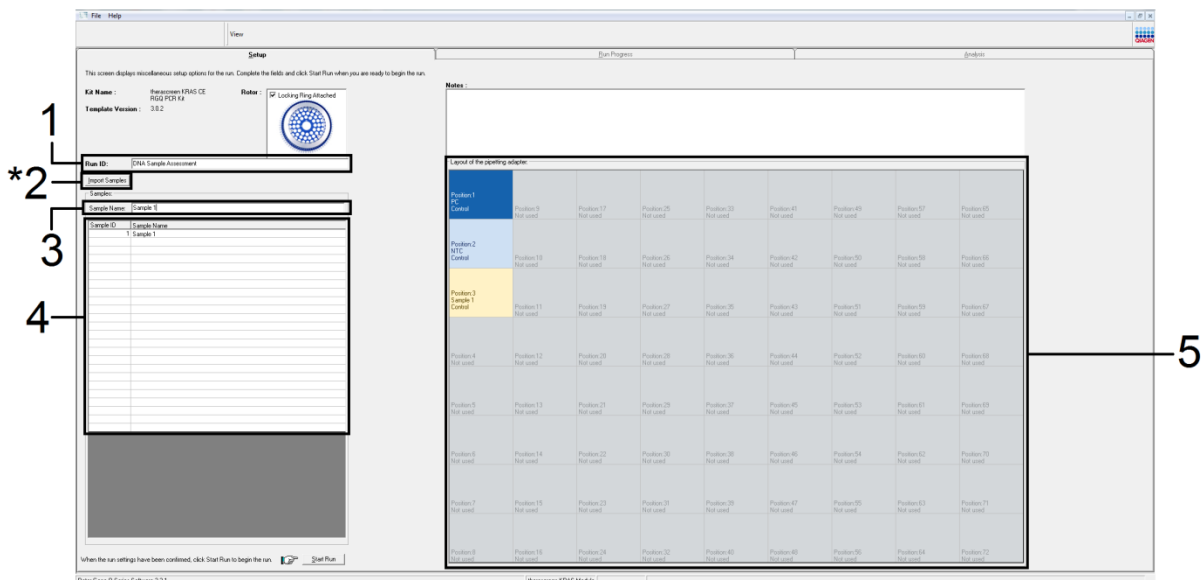
15. Dialogo lango lauke „Run ID“ (Tyrimo ID) įveskite tyrimo ID pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką. Dialogo lango lauke „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) įveskite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką.

Taip į toliau pateiktą mėginių sąrašą bus įtrauktas mėginio pavadinimas ir priskirtas „Sample ID“ (Mėginio ID) (1, 2, 3 ir t. t.). Be to, bus atnaujintas dešinėje pusėje esantis skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ir įtrauktas mėginio pavadinimas (3 pav.).

Arba *.smp („Rotor-Gene Q“ mėginio failas) ar *.csv (kableliais atskirtos reikšmės) formatais saugomus mėginių pavadinimus galima importuoti spustelėjus mygtuką „Import Samples“ (Importuoti mėginius). Naudojant šį metodą, mėginių pavadinimai įrašomi automatiškai.

Pastaba: patikrinkite, ar skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) įtraukus mėginio pavadinimą paryškinama pasikeitusia spalva, o mėginio pavadinimas yra mėginio vietoje (3 pav.).

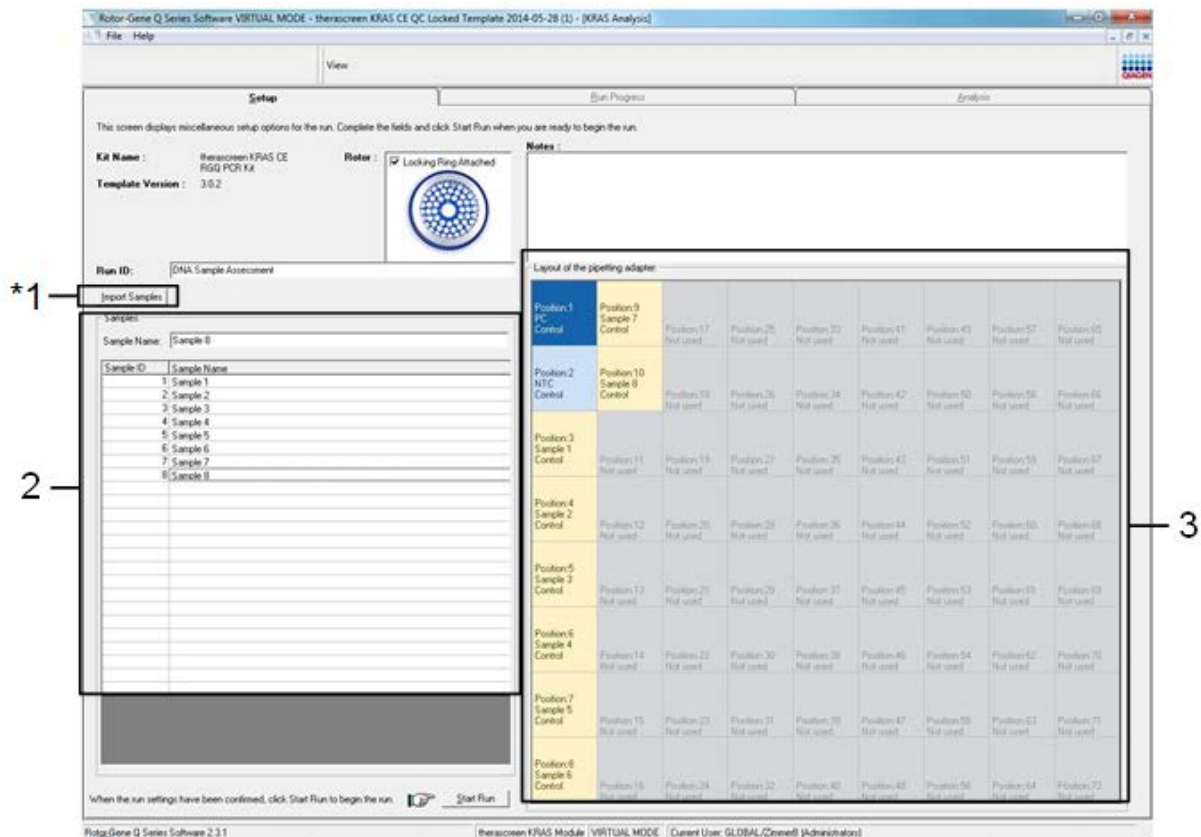
Pastaba: skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ilgesni nei 8 simbolių mėginių pavadinimai gali būti rodomi ne visi.



3 pav. „Run ID“ (Tyrimo ID) ir „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) įvedimas.
1 = dialogo lango laukas „Run ID“; 2 = mygtukas „Import Samples“ (Importuoti mėginį);
3 = dialogo lango laukas „Sample Name“; 4 = mėginių sąrašas; 5 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas).

16. Kartokite 16 veiksmą, kol įvesite visus kitus mėginių pavadinimus (4 pav.).

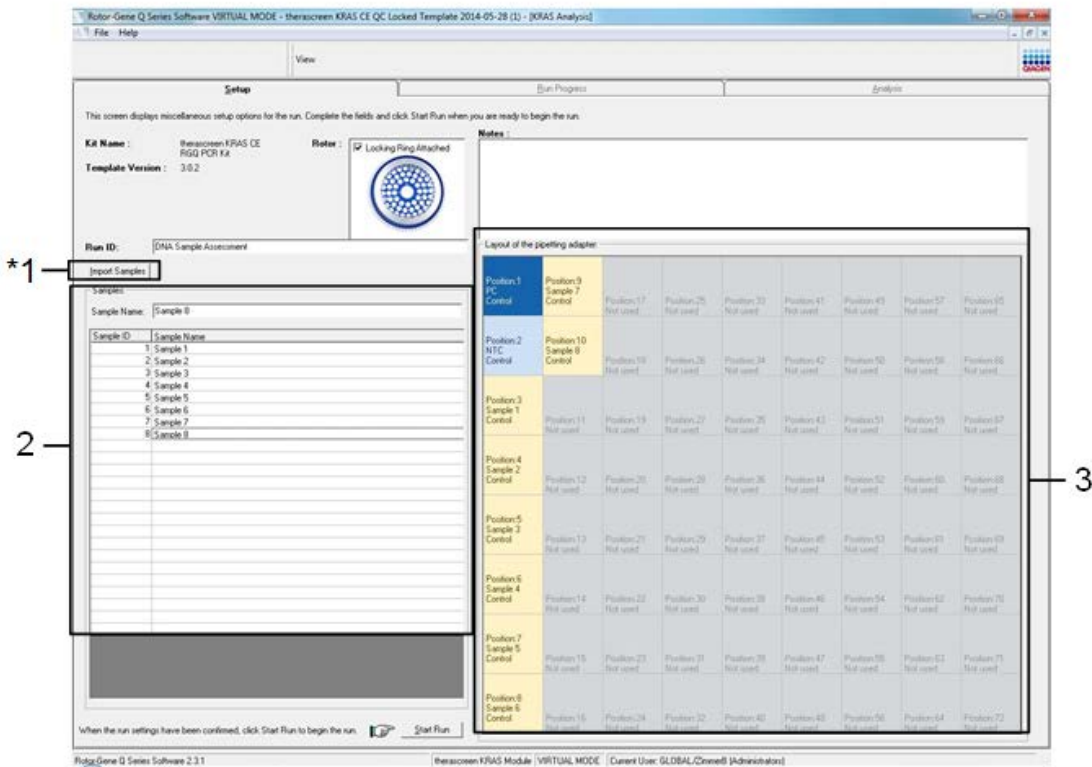
Pastaba: norėdami redaguoti mėginio pavadinimą, mėginių sąrašė spustelėkite „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) ir pasirinktas mėginys bus rodomas viršuje dialogo lango lauke „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas). Paredaguokite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką ir paspauskite įvedimo klavišą, kad pavadinimą atnaujintumėte.



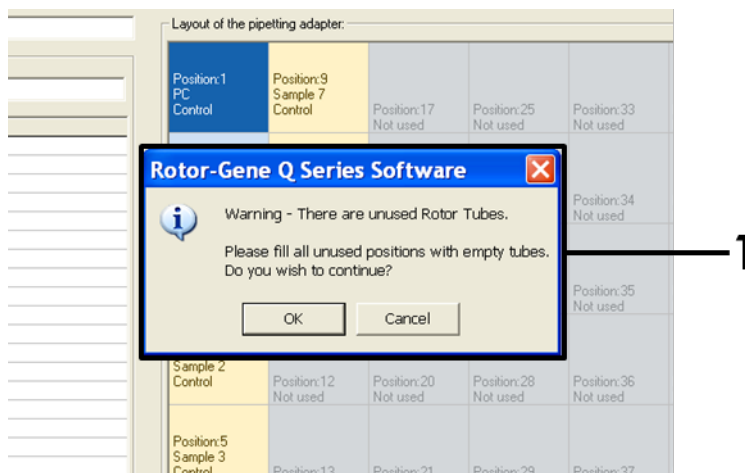
4 pav. Papildomų mėginių pavadinimų įvedimas į dialogo lango lauką „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas). *1 = mygtukas „Import Sample“ (Importuoti mėginį), 2 = dialogo lango laukas „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) ir mėginių sąrašas, 3 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ir papildomas mėginio pavadinimas.

17. Kai įvesite visus mėginių pavadinimus, patikrinkite, ar jie teisingi. Jei reikia, dialogo lango lauke „Notes“ (Pastabos) įtraukite papildomos informacijos ir spustelėkite „Start Run“ (Pradėti tyrimą) (5 pav.).

Pastaba: jei kuri nors rotorius vieta neužimta, rodomas „Warning“ (Įspėjimas) (5 ir 6 pav.), kad primintų naudotojui, jog reikia užpildyti visas nenaudojamas rotorius vietas uždengtais tuščiais mėgintuvėliais. Patikrinkite, ar visos nenaudojamos rotorius vietos užpildytos uždengtais tuščiais mėgintuvėliais, ir spustelėkite OK (Gera) norėdami tęsti.

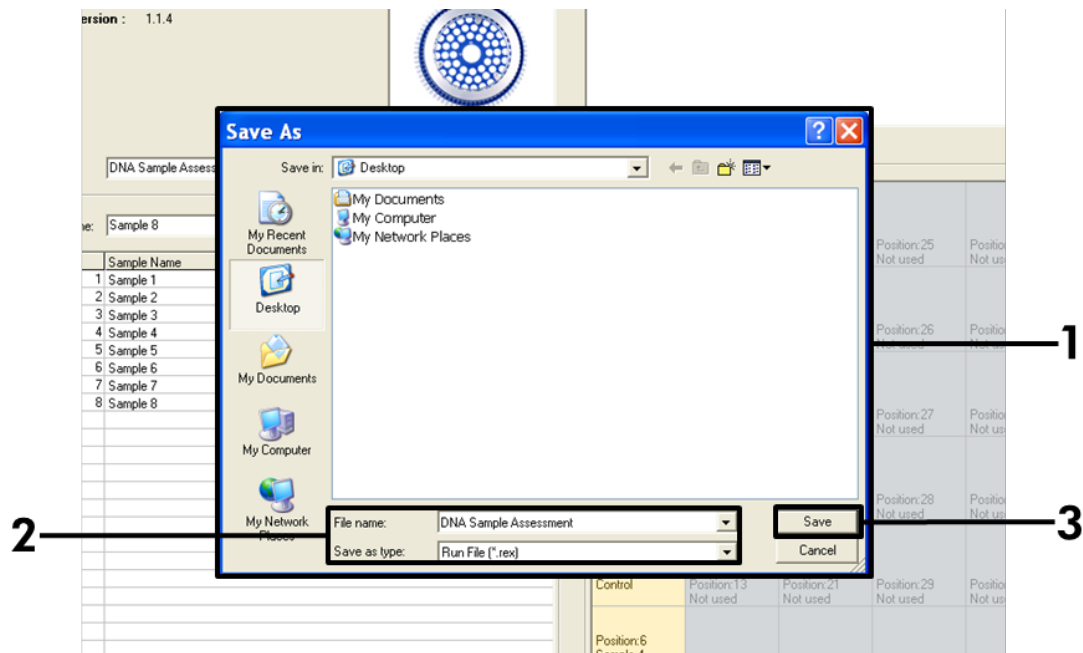


5 pav. Dialogo lango laukas „Notes“ (Pastabos), mygtukas „Start Run“ (Pradėti tyrimą) ir „Warning“ (Įspėjimas) apie neužimtas rotorius vietas.



6 pav. 1 = „Warning“ (Įspėjimas) apie nenaudojamas rotorius vietas.

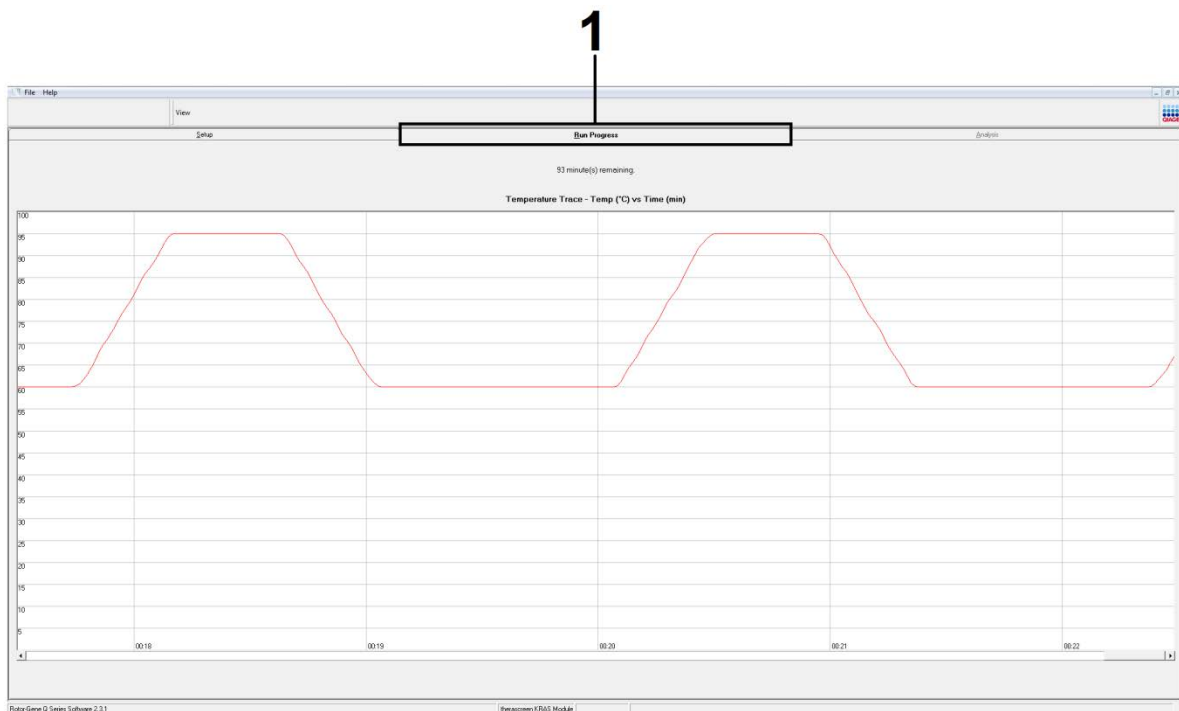
18. Rodomas langas „Save As“ (Įrašyti kaip). Pasirinkite atitinkamą failo pavadinimą ir pasirinktoje vietoje įrašykite PGR tyrimą kaip *.rex tyrimo failą. Spustelėkite „Save“ (Įrašyti) (7 pav.).



7 pav. Tyrimo failo įrašymas. 1 = langas „Save As“ (Įrašyti kaip), 2 = laukai „File Name“ (Failo vardas) ir „Save as type“ (Įrašomo failo tipas) kaip *.rex failas; 3 = „Save“ (Įrašyti).

19. Pradedamas PGR tyrimas.

Pastaba: pradėjus tirti automatiškai bus rodomas skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga), kuriame bus pateikta temperatūros kreivė ir likęs laikas (8 pav.).



8 pav. Skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga).

20. Baigus tirti, automatiškai bus rodomas skirtukas „Analysis“ (Analizė).

Pastaba: jei skirtukas „Analysis“ (Analizė) neatidaromas, spustelėkite jį (9 pav.).

Pastaba: skaičiavimo metodo paaiškinimas pateiktas skyriuje „Rezultatų aiškinimas“, 36 psl.

Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	037710708	28.39	-	Valid
4	037710718	27.38	-	Valid
5	037710728	30.07	-	Valid
6	037710738	26.53	-	Valid
7	037710748	29.55	-	Valid
8	037710758	28.45	-	Valid
9	037710768	29.95	-	Valid
10	037710778	29.02	-	Valid
11	037710788	31.42	-	Valid
12	037710798	28.93	-	Valid
13	037710818	29.60	-	Valid
14	037710828	31.44	-	Valid
15	037710838	31.02	-	Valid
16	037710848	28.09	-	Valid
17	037710858	29.91	-	Valid
18	037710878	30.33	-	Valid
19	037710888	30.22	-	Valid
20	037710898	27.17	-	Valid
21	037710908	29.87	-	Valid
22	037710918	29.32	-	Valid
23	037710928	28.22	-	Valid
24	037710938	28.57	-	Valid
25	037710948	29.80	-	Valid
26	037710958	30.41	-	Valid

9 pav. Skirtukas „Analysis“ (Analizė) ir pateikti rezultatai. 1 = skirtukas „Analysis“ (Analizė), 2 = „Sample QC Result Table“ (Mėginio KK rezultatų lentelė).

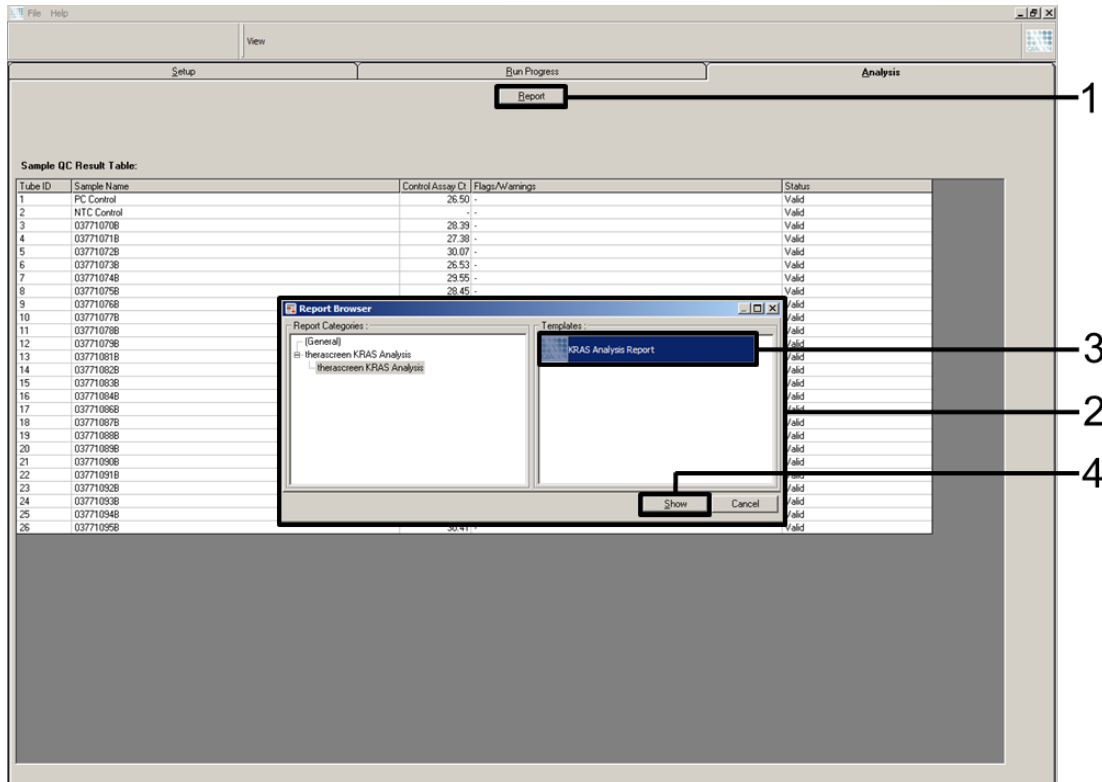
21. Kontroliniai rezultatai bus pateikti „Sample QC Result Table“ (Mėginio KK rezultatų lentelėje), kaip nurodyta toliau (9 pav., 2).

- **Tyrimo kontrolinės medžiagos (PC ir NTC, atitinkamai 1 ir 2 mėgintuvėlių vietas):** rodoma „Valid“ (Tinkama), jei rezultatai patenka į leistiną intervalą. Kitaip rodomas rezultatas „Invalid“ (Netinkama).
- **Mėginio kontrolinė reakcija $C_T > 32,00$:** rodoma „Invalid“ (Netinkama). Mutacijų analizei nepakankamas DNR kiekis. Ištirkite mėginį pakartotinai. Jei DNR kiekis vis dar per mažas, išskirkite daugiau auglio audinio, jei yra (žr. „Trikčių šalinimo vadovas“, 37 psl.).
- **Mėginio kontrolinė reakcija $C_T < 21,92$:** rodoma „Invalid“ (Netinkama). Mutacijų analizei per didelė DNR koncentracija. Atskieskite vandeniu be nukleazės, skirtu skiedimui, ir ištirkite pakartotinai. Atskieskite, kad C_T būtų 21,92–32,00. Skiedimas santykiu 1:1 padidina C_T reikšmę maždaug 1,0.
- **Mėginio kontrolinė reakcija, kai C_T yra 21,92–32,00** ($21,92 \leq$ kontrolinės medžiagos $C_T \leq 32,00$): rodoma „Valid“ (Tinkama), DNR koncentracija yra tinkama mutacijų analizei.

Pastaba: jei reikia papildomai išskirti ar atskiesti, pakartokite kontrolinę reakciją, kad patvirtintumėte DNR koncentracijos tinkamumą naudoti.

22. Ataskaitų failus galima sukurti spustelėjus „Report“ (Ataskaita). Bus rodomas langas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė). Dalyje „Templates“ (Šablonai) pasirinkite „KRAS Analysis Report“ (KRAS analizės ataskaita), tada spustelėkite „Show“ (Rodyti) (10 pav.).

Pastaba: ataskaitas galima įrašyti į kitą vietą internetinio archyvo formatu, kiekvienos ataskaitos viršutiniame kairiajame kampe spustelėjus mygtuką „Save As“ (Įrašyti kaip).



10 pav. „KRAS Analysis Report“ (KRAS analizės ataskaitos) pasirinkimas. 1 = „Report“ (Ataskaita); 2 = langas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė); 3 = parinktis „KRAS Analysis Report“ (KRAS analizės ataskaita); 4 = „Show“ (Rodyti).

Protokolas: KRAS mutacijų aptikimas

Šis protokolas skirtas KRAS mutacijoms aptikti.

Svarbi informacija prieš pradedant

- Naudojant KRAS mutacijų tyrimus mėginį galima tirti tik atlikus jo įvertinimą.
- Norėdami efektyviai naudoti „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, mėginius sugrupuokite į partijas po 7 (kad būtų užpildytas 72 šulinėlių rotorius). Naudodami mažesnes partijas, „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniu ištirsite mažiau mėginių.
- Prieš pirmą kartą naudodami „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą įsitikinkite, kad įdiegta tinkama „*therascreen* KRAS Assay Package“ programinė įranga, atitinkanti „Rotor-Gene Q“ programinės rangos versiją (žr. „2 priedas „*therascreen* KRAS Assay Package“ diegimas“, 88 psl.).

Procedūra

1. **Sumaišykite atšildytus reagentus, kiekvieną mėgintuvėlį pavartydami 10 kartų, kad nesusidarytų druskų sankaupos. Trumpai centrifuguokite, kad būtų surinktas turinys nuo mėgintuvėlių dugno.**
2. **Nustatykite pipetės tūrį, mažesnę nei bendras reakcijų mišinio tūris, ir kruopščiai sumaišykite pagrindinius mišinius visiškai įsiurbdami ir išlašindami 10 kartų.**
3. **Nedelsdami įpilkite 20 µl pagrindinio mišinio į kiekvieną atitinkamą PGR mėgintuvėlių juostelę.**

Pastaba: nustatydami reakcijų mišinius žr. 5 lentelę, kurioje pateiktas mėgintuvėlių išdėstymas. Norint aptikti KRAS mutacijas, kiekvieno DNR mėginio pagrindinius mišinius reikia įlašinti į 8 PC mėgintuvėlius, 8 NTC mėgintuvėlius ir 8 mėgintuvėlius.

4 lentelė. Tyrimo išdėstymas įkrovos bloke aptinkant KRAS mutacijas

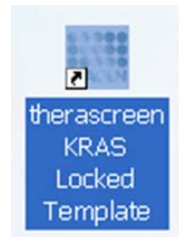
Tyrimas	Kontrolės		Mėginio numeris						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32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

* Skaičiai reiškia vietas įkrovos bloke ir nurodo galutinę rotoriaus padėtį.

- Nedelsdami pridėkite 5 µl vandens be nukleazės, skirto kontrolinei medžiagai be matricos (NTC), į NTC mėgintuvėlius (9–16 mėgintuvėlio vietas) ir juos uždenkite.
- Įpilkite po 5 µl kiekvieno DNR mėginio į mėginių mėgintuvėlius (17–72 mėgintuvėlių vietas) ir uždenkite juos dangteliais.
- Pridėkite 5 µl KRAS teigiamos kontrolinės medžiagos (PC) į PC mėgintuvėlius (1–8 mėgintuvėlio vieta) ir uždenkite juos dangteliu.
- Ilgalaikiu žymikliu pažymėkite PGR 4 mėgintuvėlių juostelių pirmų mėgintuvėlių, esančių mažiausių skaičių vietose, dangtelius (pvz., esančių 1, 5, ir 9 vietoje ir t. t.), kad nurodytumėte kryptį, kaip įdėti mėgintuvėlius į „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento 72 šulinėlių rotorius.
- Pavartykite uždengtus mėgintuvėlius 4 kartus, kad susimaišytų mėginys ir reakcijos mišinys.
- Naudodami krypties žymes, pagal tyrimo išdėstymą (5 lentelė) sudėkite visas PGR 4 mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas vietas 72 šulinėlių rotoriuje.

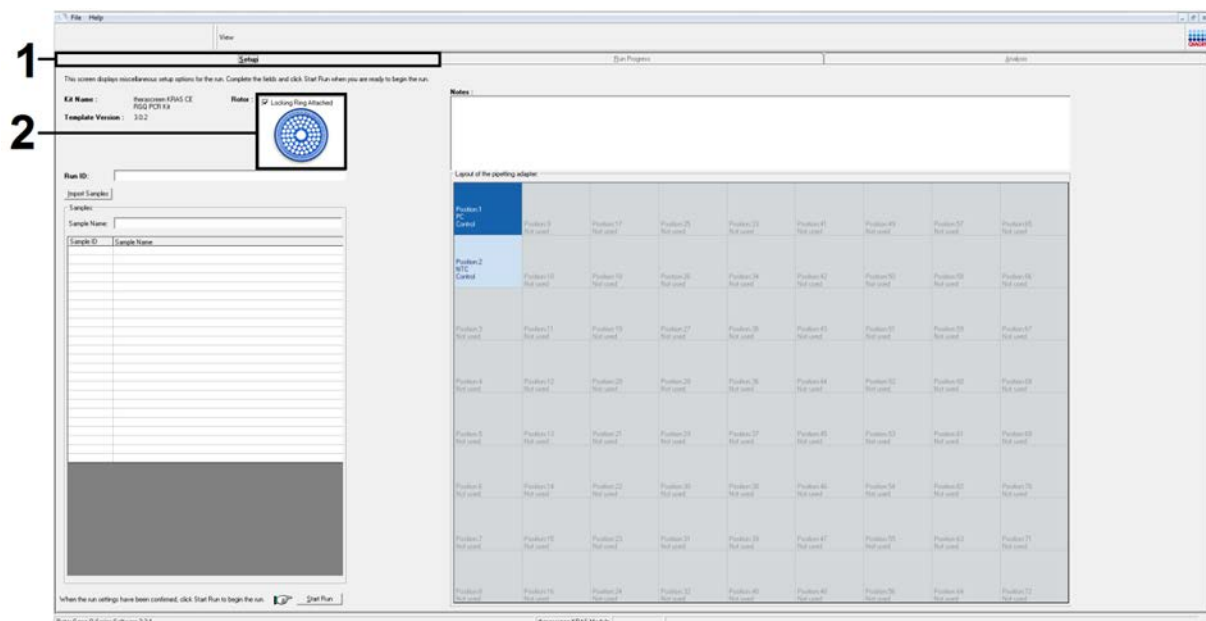
Pastaba: atliekant kiekvieną PGR tyrimą galima įtraukti daugiausia 7 mėginius. Jei rotorius nevisiškai užpildytas, visas nenaudojamas rotoriaus vietas reikia užpildyti uždengtais tuščiais mėgintuvėliais. Taip užtikrinsite, kad būtų išlaikytas „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento šiluminis efektyvumas.

10. Nedelsdami įdėkite 72 šulinėlių rotorių į „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą. Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas (pateikiamas su „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu) yra uždėtas ant rotoriaus, kad tyrimo serijos metu mėgintuvėliai būtų pritvirtinti.
11. Paleiskite „Rotor-Gene Q“ programinę įrangą ir tuo pat metu atidarykite šabloną, prie „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento prijungto nešiojamojo kompiuterio darbalaukyje dukart spustelėję piktogramą „therascreen KRAS Locked Template“ (11 pav.).



11 pav. Piktograma „therascreen KRAS Locked Template“.

12. Kaip numatytasis rodomas skirtukas „Setup“ (Nustatymas) (12 pav.). Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas tinkamai uždėtas, ir pažymėkite langelį „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Uždarykite „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento dangtelį.



12 pav. 1 = skirtukas „Setup“ (Nustatymas); 2 = laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas).

13. Dialogo lango lauke „Run ID“ (Tyrimo ID) įveskite tyrimo ID pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką.

14. Dialogo lango lauke „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) įveskite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką.

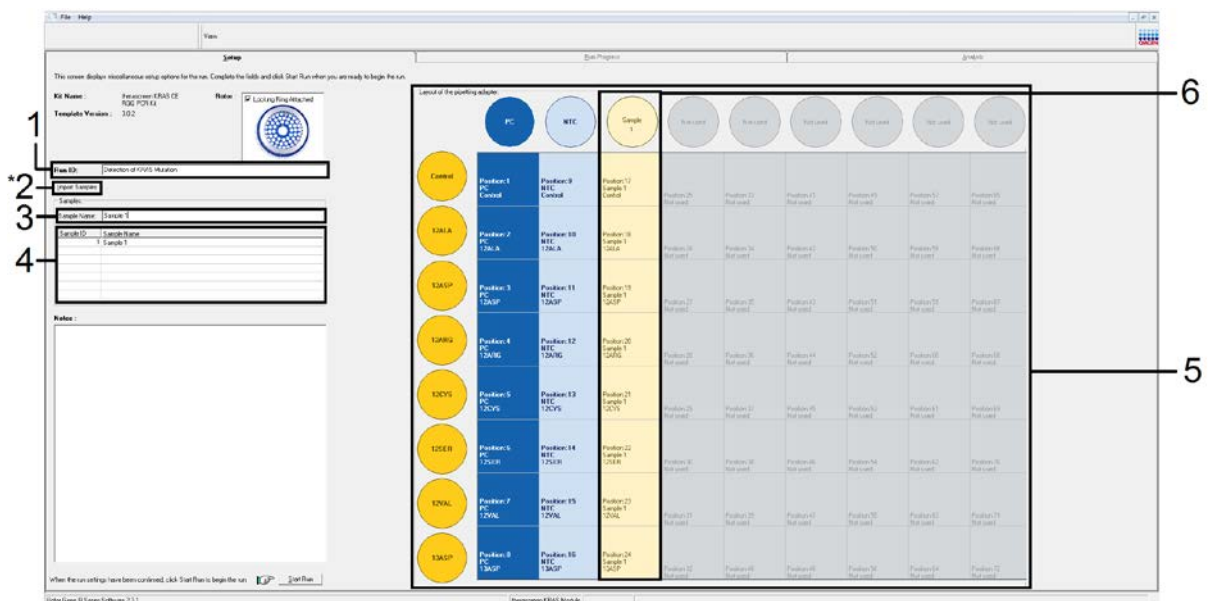
Taip į toliau pateiktą mėginių sąrašą bus įtrauktas mėginio pavadinimas ir priskirtas „Sample ID“ (Mėginio ID) (1, 2, 3 ir t. t.). Be to, bus atnaujintas dešinėje pusėje esantis skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ir įtrauktas mėginio pavadinimas (13 pav.).

Pastaba: patikrinkite, ar skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) įtraukus mėginio pavadinimą paryškinama pasikeitusia spalva ir ar yra paryškinti visi 8 tyrimai stulpelyje po mėginio skrituliu (13 pav.).

Pastaba: galima pridėti ne daugiau kaip 7 mėginius. Mėginių ID (mėginių skrituliuose) bus automatiškai priskirti nuo 1 iki 7.

Pastaba: skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ilgesni nei 8 simbolių mėginių pavadinimai gali būti rodomi ne visi.

Arba *.smp („Rotor-Gene Q“ mėginio failas) ar *.csv (kableliais atskirtos reikšmės) formatais saugomus mėginių pavadinimus galima importuoti spustelėjus mygtuką „Import Samples“ (Importuoti mėginius). Naudojant šį metodą, mėginių pavadinimai įrašomi automatiškai.

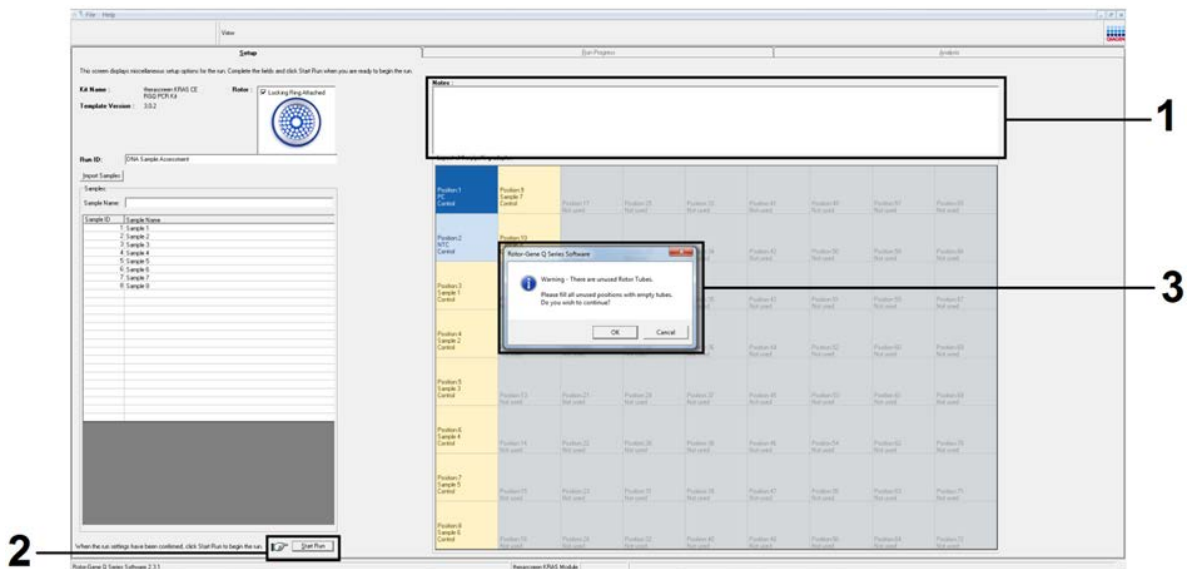


13 pav. „Run ID“ (Tyrimo ID) ir „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) įvedimas.

1 = dialogo lango laukas „Run ID“ (Tyrimo ID); 2 = mygtukas „Import Samples“ (Importuoti mėginį) (nėra programinės įrangos 2.1 versijoje); 3 = dialogo lango laukas „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas); 4 = mėginių sąrašas; 5 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas); 6 = paryškintas mėginio apskritimas ir 8 tyrimų stulpelis po juo.

15. Kartokite 14 veiksmą, kol įvesite visus kitus mėginių pavadinimus (14 pav.).

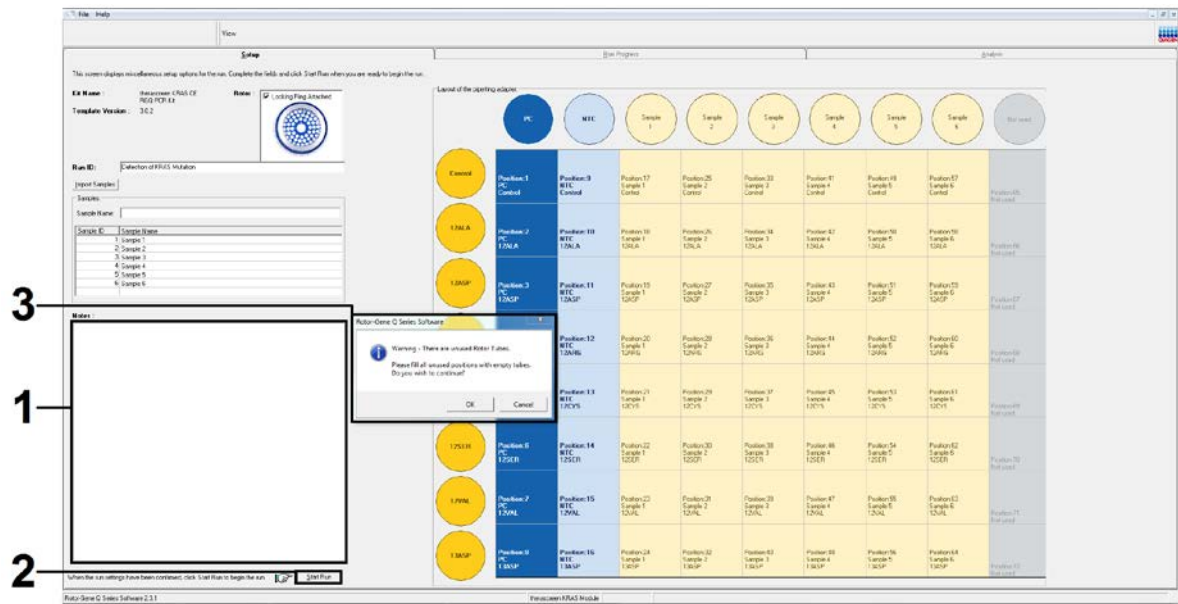
Pastaba: norėdami redaguoti mėginio pavadinimą, mėginių sąrašė spustelėkite „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) ir pasirinktas mėginys bus rodomas viršuje dialogo lango lauke „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas). Paredaguokite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką ir paspauskite įvedimo klavišą, kad pavadinimą atnaujintumėte.



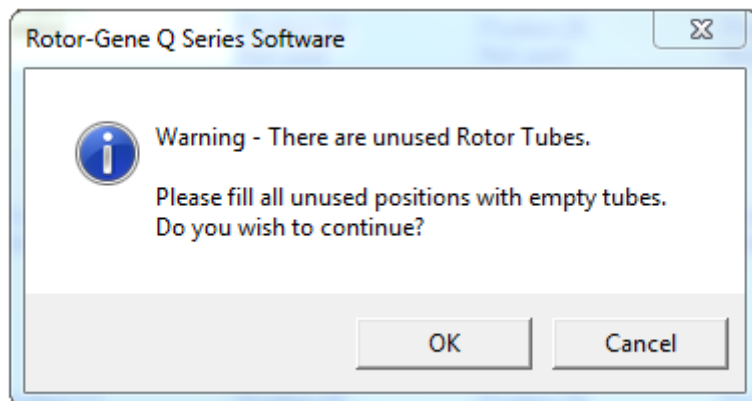
14 pav. Papildomų mėginių pavadinimų įvedimas į dialogo lango lauką „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas). 1 = dialogo lango laukas „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas), 2 = mėginių sąrašas, 3 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipėčių naudojimo adapterio išdėstymas) ir papildomi mėginių pavadinimai.

16. Kai įvesite visus mėginių pavadinimus, patikrinkite, ar jie teisingi. Jei reikia, dialogo lango lauke „Notes“ (Pastabos) pridėkite papildomos informacijos, tada spustelėkite „mygtuką Start Run“ (Pradėti tyrimą) (15 pav.).

Pastaba: jei kuri nors rotorius vieta neužimta, rodomas „Warning“ (Įspėjimas) (15 ir 16 pav.), kad primintų naudotojui, jog reikia užpildyti visas nenaudojamas rotorius vietas uždengtais tuščiais mėgintuvėliais. Patikrinkite, ar visos nenaudojamos rotorius vietas užpildytos uždengtais tuščiais mėgintuvėliais, ir spustelėkite OK (Gera) norėdami tęsti.

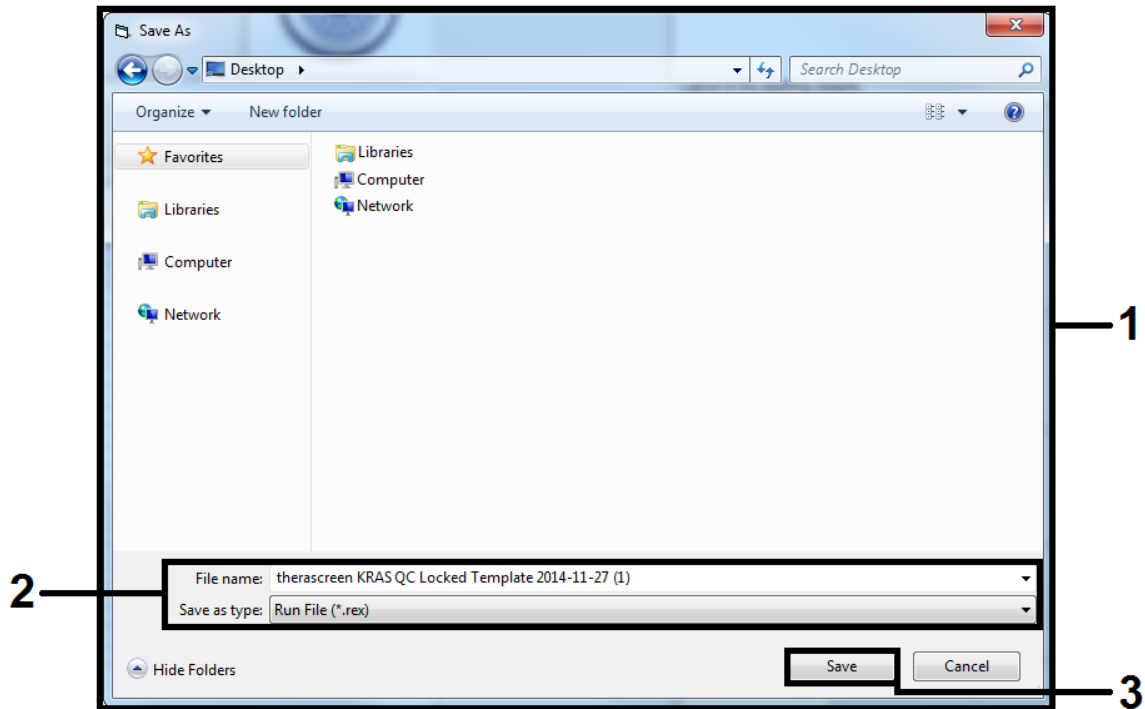


15 pav. 1 = dialogo lango laukas „Notes“ (Pastabos); 2 = „Start Run“ (Pradėti tyrimą); 3 = „Warning“ (Įspėjimas) apie neužimtas rotoriaus vietas.



16 pav. „Warning“ įspėjimas apie nenaudojamas rotoriaus vietas.

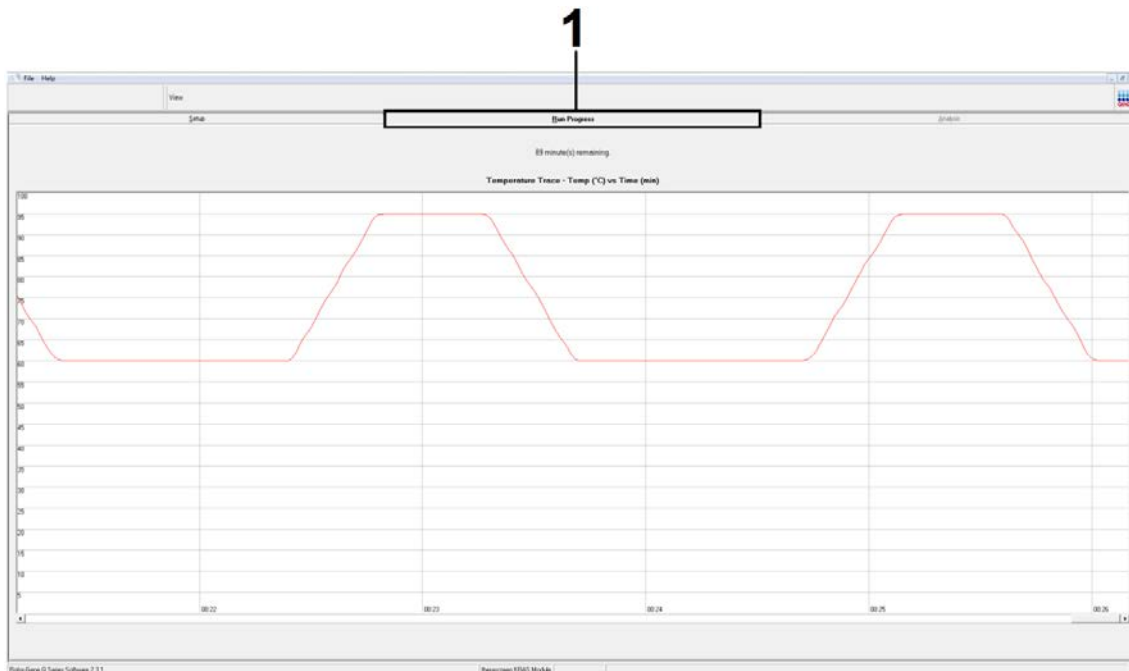
17. Rodomas langas „Save As“ (Įrašyti kaip). Pasirinkite atitinkamą failo pavadinimą ir pasirinktoje vietoje įrašykite PGR tyrimą kaip *.rex tyrimo failą (17 pav.).



17 pav. Tyrimo failo įrašymas.

18. Pradedamas PGR tyrimas.

Pastaba: pradėjus tirti automatiškai bus rodomas skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga), kuriame bus pateikta temperatūros kreivė ir likęs laikas (18 pav.).



18 pav. 1 = skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga).

19. Baigus tirti, automatiškai bus rodomas skirtukas „Analysis“ (Analizė).

Pastaba: jei skirtukas „Analysis“ (Analizė) neatidaromas, spustelėkite jį (19 pav.).

Pastaba: skaičiavimo metodo paaiškinimas pateiktas skyriuje „Rezultatų aiškinimas“, 36 psl.

2

Run Controls, Positive Control			
Rotor Position	Assay	Flags/Warnings	Positive Control Status
1	Control	Valid	Valid
2	12ALA	-	Valid
3	12ASP	-	Valid
4	12ARG	-	Valid
5	12CYS	-	Valid
6	12SER	-	Valid
7	12VAL	-	Valid
8	13ASP	-	Valid

3

Run Controls, Negative Control					
Rotor Position	Assay	NTC	Internal Control	Flags/Warnings	Negative Control Status
9	Control	Valid	Valid	-	Valid
10	12ALA	Valid	Valid	-	Valid
11	12ASP	Valid	Valid	-	Valid
12	12ARG	Valid	Valid	-	Valid
13	12CYS	Valid	Valid	-	Valid
14	12SER	Valid	Valid	-	Valid
15	12VAL	Valid	Valid	-	Valid
16	13ASP	Valid	Valid	-	Valid

4

Sample Result Table				
Sample ID	Sample Name	KRAS Status	Flags/Warnings	KRAS Mutation Status
1	03771070B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
2	03771071B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
3	03771072B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
4	03771073B	Mutation Positive	-	13ASP Detected
5	03771074B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
6	03771075B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
7	03771076B	Mutation Positive	-	13ASP Detected

5

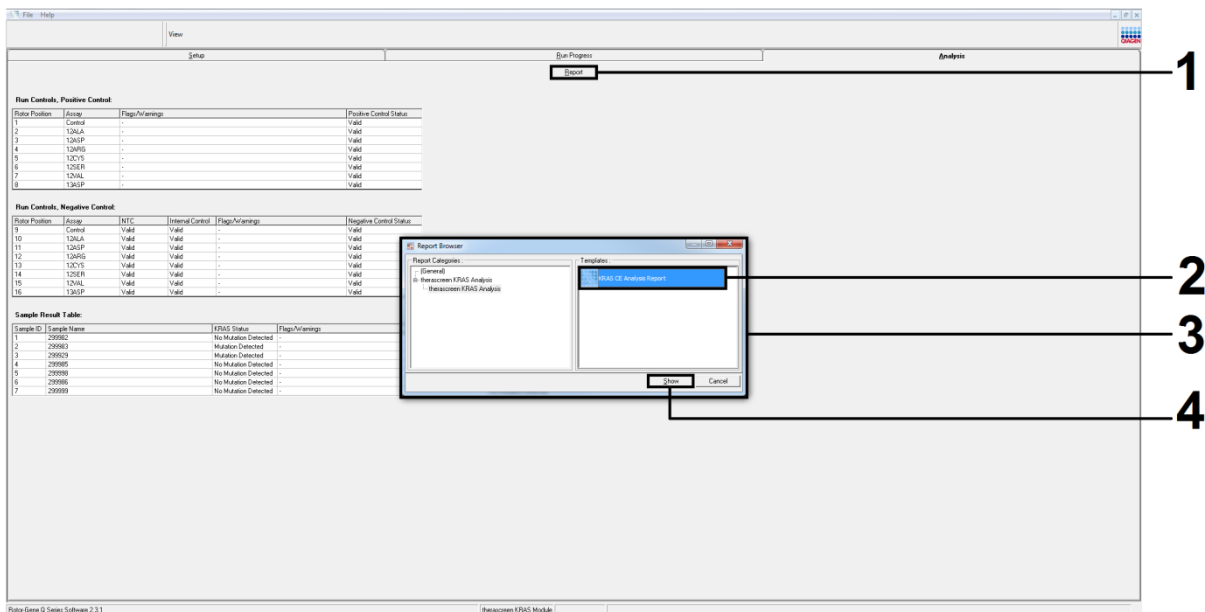
19 pav. Skirtukas „Analysis“ (Analizė) ir pateikti rezultatai. 1 = skirtukas „Analysis“ (Analizė); 2 = skydas „Run Controls, Positive Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, teigiama kontrolinė medžiaga); 3 = skydas „Run Controls, Negative Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, neigiama kontrolinė medžiaga); 4 = „Sample Result Table“ (Mėginių rezultatų lentelė); 5 = stulpelis „KRAS Mutation Status“ (KRAS mutacijos būseną).

20. Tyrimo rezultatai bus pateikti kai toliau nurodyta (19 pav.).

- **Skydas „Run Controls, Positive Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, teigiama kontrolinė medžiaga):** jei rezultatas yra priimtine intervale, stulpelyje „Positive Control Status“ (Teigiamos kontrolinės medžiagos būseną) bus rodoma „Valid“ (Tinkama), kitaip bus rodomas rezultatas „Invalid“ (Netinkama).
- **Skydas „Run Controls, Negative Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, neigiama kontrolinė medžiaga):** jei tiek NTC, tiek „Internal Control“ (Vidinė kontrolė) rezultatai yra priimtiniuose intervaluose, stulpelyje „Negative Control Status“ (Neigiamos kontrolinės medžiagos būseną) bus rodoma „Valid“ (Tinkama), kitaip bus rodomas rezultatas „Invalid“ (Netinkama).
- **Skydas „Sample Result Table“ (Mėginių rezultatų lentelė):** mutacijų turinčių mėginių konkrečios mutacijos bus pateiktos stulpelyje „KRAS Mutation Status“ (KRAS mutacijos būseną).

21. Ataskaitų failus galima sukurti spustelėjus „Report“ (Ataskaita). Bus rodomas langas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė). Dalyje „Templates“ (Šablonai) pasirinkite „KRAS Analysis Report“ (KRAS analizės ataskaita), tada spustelėkite „Show“ (Rodyti) (20 pav.).

Pastaba: ataskaitas galima įrašyti į kitą vietą internetinio archyvo formatu, kiekvienos ataskaitos viršutiniame kairiajame kampe spustelėjus „Save As“ (Įrašyti kaip).



20 pav. „KRAS Analysis Report“ (KRAS analizės ataskaitos) pasirinkimas. 1 = „Report“ (Ataskaita); 2 = langas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė); 3 = parinktis „KRAS Analysis Report“ (KRAS analizės ataskaita); 4 = „Show“ (Rodyti).

Rezultatų aiškinimas

Užbaigus tyrimą, „*therascreen* KRAS Assay Package“ automatiškai išanalizuoja ir pateikia aptiktas mutacijas. Toliau pateiktas paaiškinimas, kaip „*therascreen* KRAS Assay Package“ analizuoja ir pateikia aptiktas mutacijas.

Pastaba: informacijos apie neautomatinę analizę ieškokite „1 priedas „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio rankinio paruošimo protokolas“, 67 psl.

PGR ciklas, kurio metu konkrečios reakcijos fluorescencija viršija slenksčio reikšmę, apibrėžiamas kaip C_T reikšmė. C_T reikšmė nurodo konkrečios įvesties DNR kiekį. Mažos C_T reikšmės nurodo aukštesnius įvesties DNR lygius, o didelės C_T reikšmės – mažesnius įvesties DNR lygius. Reakcijos naudojant C_T reikšmę klasifikuojamos kaip teigiama amplifikacija.

„Rotor-Gene Q“ programinė įranga įterpia fluorescencijos signalus tarp bet kurių dviejų įrašytų reikšmių. Todėl C_T reikšmės gali būti bet kuris realusis skaičius (neapsiribojant sveikaisiais) nuo 0 iki 40.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio slenksčio vertė nustatyta kaip 0,05 santykinių fluorescencijos vienetų. „*therascreen* KRAS Assay Package“ ši reikšmė sukonfigūruota abiem – žaliai ir geltonam – fluorescencijos kanalams. Slenksčio reikšmė buvo apibrėžta kuriant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį.

Norint nustatyti ΔC_T reikšmę, skaičiuojama pagal šią formulę:

$$\Delta C_T = [\text{mutacijos tyrimo } C_T \text{ reikšmė}] - [\text{kontrolinio tyrimo } C_T \text{ reikšmė}]$$

Tyrimo kontrolinės medžiagos (teigiama kontrolinė medžiaga, NTC ir vidinės kontrolinės medžiagos) vertinamos norint užtikrinti, kad yra priimtinos C_T reikšmės ir tinkamai atliekamos reakcijos.

Mėginio ΔC_T reikšmės apskaičiuojamos kaip skirtumas tarp mutacijos tyrimo C_T ir kontrolinio tyrimo C_T iš to paties mėginio. Mėginiai klasifikuojami kaip turintys mutacijų, jei jų ΔC_T reikšmė yra mažesnė arba lygi šio tyrimo kritinės ribos ΔC_T reikšmei. Jei reikšmė yra didesnė, mėginyje gali būti mažesnis mutacijų procentas, nei galima aptikti naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį (už tyrimo ribų), arba mėginyje nėra mutacijų: apie tai bus pranešta kaip „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta).

Jei mutacijų reakcijoje nevyks amplifikacija, bus pateiktas rezultatas „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta). Visos foninės amplifikacijos ΔC_T reikšmės turėtų būti didesnės negu kritinės ribos ΔC_T reikšmės, todėl mėginys bus klasifikuojamas kaip „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta).

Tyrimo rezultatai bus pateikti kaip „Mutation Positive (Yra mutacijų)“, „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta), „Invalid“ (Netinkama) arba, jei kontrolinis tyrimas nepavyks, „Run Control Failed“ (Kontrolinis tyrimas nepavyko). Jei mėginiuose bus aptikta mutacijų, bus pranešta apie konkrečias mutacijas.

Kiti galimi rezultatai, kurie gali būti nerodomi, aptarti šio vadovo skyriuose „Protokolas: DNR mėginio įvertinimas“, 15 psl.

Retai auglyje gali būti kelios mutacijos. Tokiais atvejais bus nustatyta mutacija, pateikusi mažiausią ΔC_T reikšmę.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Frequently Asked Questions“ (dažniausiai užduodami klausimai) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninių tarnybų mokslininkai visada mielai atsako į klausimus apie šiame vadove pateiktą informaciją ir protokolus arba apie mėginių ir tyrimų technologijas (kontaktinė informacija pateikta viršelyje ir svetainėje adresu www.qiagen.com).

Pastabos ir pasiūlymai

Netinkami rezultatai

- | | |
|--|--|
| a) Vieno ar kelių rinkinio komponentų laikymo sąlygos neatitiko nurodymų, pateiktų „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (13 psl.) | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį. |
| b) Baigėsi „ <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR“ rinkinio tinkamumo laikas | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį. |

Rodomas teigiamas NTC mėginių rezultatas FAM kanale

- | | |
|---------------------------------|---|
| PGR ruošimo metu atsirado tarša | Pakartokite PGR, naudodami naujus reagentus kartotiniams tyrimams.

Jei galima, įdėję reikiamą tirti mėginį, iš karto uždarykite PGR mėgintuvėlius.

Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami. |
|---------------------------------|---|

„*therascreen* KRAS Assay Package“ sugeneruotos žymės

6 lentelėje išvardytos galimos žymės, kurias gali sugeneruoti „*therascreen* KRAS Assay Package“, jų reikšmės ir atliktini veiksmai.

5 lentelė. „*therascreen* KRAS Assay Package“ žymės

Žymė	Reikšmė	Atliktinas veiksmas
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PGR tyrimas netinkamas – kontrolinės reakcijos teigiamos kontrolinės medžiagos FAM C _T reikšmė yra už intervalo ribų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PGR tyrimas netinkamas – vienos ar kelių mutacijų kontrolinių reakcijų FAM C _T reikšmė yra už intervalo ribų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PGR tyrimas netinkamas – nepavyksta interpretuoti teigiamos kontrolinės medžiagos (kontrolinio reakcijų mišinio) fluorescencijos duomenų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PGR tyrimas netinkamas – nepavyksta interpretuoti teigiamos kontrolinės medžiagos (mutacijų reakcijos mišinio) fluorescencijos duomenų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PGR tyrimas netinkamas – vidinė kontrolinė medžiaga yra už neigiamos kontrolinės medžiagos intervalo viršutinės ribos.	Kartokite visą PGR tyrimą.

Žymė	Reikšmė	Atliktinas veiksmas
NTC_INT_CTRL _EARLY_CT	PGR tyrimas netinkamas – vidinė kontrolinė medžiaga yra už neigiamos kontrolinės medžiagos intervalo apatinės ribos.	Kartokite visą PGR tyrimą.
NTC_INVALID _CT	PGR tyrimas netinkamas – neigiamos kontrolinės medžiagos FAM reikšmė netinkama (mažesnė už ribą).	Kartokite visą PGR tyrimą.
NTC_INVALID _DATA	PGR tyrimas netinkamas – nepavyksta interpretuoti neigiamos kontrolinės medžiagos fluorescencijos duomenų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
SAMPLE_CTRL _INVALID_DATA	Mėginys netinkamas – nepavyksta interpretuoti mėginio kontrolinės medžiagos fluorescencijos duomenų.	Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai išstirkite susijusius mėginius.
SAMPLE_CTRL _HIGH_CONC	Mėginys netinkamas – mėginio kontrolinės medžiagos FAM C _T reikšmė per maža.	Atskieskite mėginį, kad padidintumėte C _T reikšmę. Skiedimas turi būti apskaičiuotas laikantis prielaidos, kad skiedžiant rinkinyje pateiktu vandeniu santykiu 1:1 C _T reikšmė padidės 1,0; atskiedę mėginį, nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai išstirkite mėginį.

Žymė	Reikšmė	Atliktinas veiksmas
SAMPLE_CTRL_FAIL	Mėginys netinkamas – mėginio kontrolinės reakcijos FAM C _T reikšmė per didelė.	Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio tyrimo, išskirkite mėginį iš naujos FFPE atpjovos. Nustatykite naują PGR tyrimą ir ištyrinkite naujai išskirtą mėginį. Jei vėl bus netinkamas, išskirkite antrą kartą. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būseną ir daugiau tyrimų atlikti nebereikės.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Vidinės kontrolinės medžiagos (HEX) C _T reikšmė per didelė (arba C _T nėra), FAM kanalas be mutacijų.	Jei pateikiama tinkama mėginio būseną, jokių veiksmų atlikti nereikia. CRC mėginiai: jei pateikiama netinkama mėginio būseną, nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio tyrimo, išskirkite mėginį iš naujos FFPE atpjovos. Nustatykite naują PGR tyrimą ir ištyrinkite naujai išskirtą mėginį. Jei vėl bus netinkamas, išskirkite antrą kartą. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būseną ir daugiau tyrimų atlikti nebereikės.

Žymė	Reikšmė	Atliktinas veiksmas
SAMPLE_INT _CTRL_FAIL (tęsinys)		<p>NSCLC mėginiai: jei pateikiama netinkama mėginio būsena, likusį mėginį atskieskite vandeniu iš mėgintuvėlio, pažymėto DIL, santykiu 1 su 8. Žiūrėkite, kad galutinis tūris būtų didesnis nei 40 µl (pvz., 10 µl DNR ir 70 µl vandens iš mėgintuvėlio, pažymėto DIL), nustatykite naują PCR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio tyrimo, išskirkite mėginį iš naujos FFPE atpjovos. Nustatykite naują PCR tyrimą ir ištyrinkite naujai išskirtą mėginį. Jei bus netinkamas, likusį mėginį atskieskite santykiu 1 su 8 vandeniu iš mėgintuvėlio, pažymėto DIL, užtikrindami, kad galutinis tūris būtų didesnis nei 40 µl. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būsena ir daugiau tyrimų atlikti nebereikės.</p>

Žymė	Reikšmė	Atliktinas veiksmas
SAMPLE_INT _CTRL_EARLY _CT	Mutacijų mėgintuvėlis netinkamas – mėginio (vidinės kontrolinės medžiagos) C _T HEX reikšmė per maža.	<p>Jei pateikiama tinkama mėginio būseną, jokių veiksmų atlikti nereikia.</p> <p>Jei pateikiama netinkama mėginio būseną, nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį.</p> <p>Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio tyrimo, išskirkite mėginį iš naujos FFPE atpjovos. Nustatykite naują PGR tyrimą ir ištyrinkite naujai išskirtą mėginį. Jei vėl bus netinkamas, išskirkite antrą kartą. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būseną ir daugiau tyrimų atlikti nebereikės.</p>
SAMPLE _INVALID _DATA	Mutacijų mėgintuvėlis netinkamas – nepavyksta interpretuoti neigiamos kontrolinės medžiagos fluorescencijos duomenų.	<p>Jei pateikiama tinkama mėginio būseną, jokių veiksmų atlikti nereikia.</p> <p>Jei pateikiama netinkama mėginio būseną, nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio tyrimo, išskirkite mėginį iš naujos FFPE atpjovos. Nustatykite naują PGR tyrimą ir ištyrinkite naujai išskirtą mėginį. Jei vėl bus netinkamas, išskirkite antrą kartą. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būseną ir daugiau tyrimų atlikti nebereikės.</p>

Žymė	Reikšmė	Atliktinas veiksmas
MUTATION _EARLY_CT	Mutacijų mėgintuvėlis netinkamas – mėginio C _T FAM reikšmė per maža.	<p>Jei pateikiama tinkama mėginio būsena, jokių veiksmų atlikti nereikia.</p> <p>Jei pateikiama netinkama mėginio būsena, nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio tyrimo, išskirkite mėginį iš naujos FFPE atpjuvos. Nustatykite naują PGR tyrimą ir ištyrinkite naujai išskirtą mėginį. Jei vėl bus netinkamas, išskirkite antrą kartą. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būsena ir daugiau tyrimų atlikti nebereikės.</p>
SAMPLE _POSITIVE _AND_INVALID	Yra viena ar kelios mėginio mutacijos ir jos tinkamos, bet tuo pačiu metu viena ar kelios to paties mėginio mutacijos yra netinkamos (įspėjimas arba klaida).	Nėra.

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

Apribojimai

Tyrimas skirtas aptikti KRAS geno 12 ir 13 kodonų 7 mutacijas. Mėginiuose, kurių pateiktas rezultatas buvo „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta), gali būti KRAS mutacijų, kurių tyrimas neaptinka (pvz., 13CYS).

Mutacijų aptikimas priklauso nuo mėginio vientisumo ir mėginyje esančio amplifikuotinos DNR kiekio. Jei pradinis mėginio DNR vertinimas rodo, kad jos kiekis nepakankamas arba per didelis norint išanalizuoti mutacijas, procedūrą reikia pakartoti.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys naudojamas atliekant polimerazės grandinės reakcijos (PGR) procedūrą. Kaip ir atliekant visas PGR procedūras, mėginiai gali būti užteršti išoriniais DNR šaltiniais tyrimo aplinkoje arba teigiamos kontrolinės medžiagos DNR. Būkite atsargūs, kad neužterštumėte mėginių ir reakcijų mišinių reagentų.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys skirtas tik atskirti laukinio tipo ir mutavusią DNR. Tyrimas sukurtas taip, kad kiekviena mutacijos reakcija būtų labiausiai jautri konkrečiai vertinamai mutacijai. Tačiau mėginiuose, kuriuose aptinkama mutacija, gali pasireikšti kryžminis reaktyvumas su kitų mutacijų reakcijomis. Jei teigiama daugiau nei viena mutacijų reakcija, rezultatas yra tas, kurio ΔC_T reikšmė yra mažiausia.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys patvirtintas naudoti tik tiriant FFPE CRC ir NSCLC audinius.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys patvirtintas naudoti tik su „QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkiniu. Naudoti su „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniu patvirtintas tik „Rotor-Gene Q MDx“.

Efektyvumo charakteristikos

Analitinis efektyvumas

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio specifinės efektyvumo charakteristikos buvo nustatytos ištyrus FFPE audinių mėginius, surinktus iš CRC ir NSCLC sergančių pacientų. Tiriant NSCLC mėginius naudoti gavimo metodai: biopsija šerdine adata (CNB), aspiracija plona adata (FNA) ir rezekcija. Buvo naudojamos kiekvieno mėginio tipo 8 FFPE žmogaus ląstelių linijos, kurias ištyrus 7-se aptiktos žinomos KRAS mutacijos ir viena laukinio tipo KRAS mutacija (t. y. nebuvo mutacijų 12 ir 13 kodonuose). Mėginių mutacijų būseną buvo patvirtinta dvikrypčiu Sangerio sekvenavimu.

Kritinė riba

Norint nustatyti tyrimo kritinę ribą, 225 FFPE mėginiai buvo ištirti naudojant pagal CLSI EP17-A (2004) (8) rekomendaciją parengtą metodą. Nustatytas kontrolinės reakcijos C_T intervalas nuo 21,92 iki 32,00. Kritinės ribos reikšmės (ΔC_T), apskaičiuotos iš mutacijų reakcijų C_T reikšmės atėmus kontrolinės reakcijos C_T reikšmę, pateiktos 7 lentelėje.

6 lentelė. Nustatytos kiekvienos mutacijos tyrimo kritinės ribos reikšmės

	Mutacijų tyrimas						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Kritinė riba ($\leq \Delta C_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Tuštumo ribos

Norint nustatyti „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio efektyvumą nesant matricos su mutacija ir užtikrinti, kad tuščias mėginys nesukuria analitinio signalo, kuris gali rodyti mažą mutacijos koncentraciją, buvo įvertinti mėginiai be matricos. Rezultatai neparodė jokių aptinkamų kontrolinės arba mutacinės medžiagos C_T reikšmių jokiam mutacijos ar kontrolinės reakcijos (visos vidinės kontrolinės medžiagos C_T reikšmės buvo tinkamos).

Palyginimas su analitiniu kontroliniu metodu: CRC

Buvo atlikti du tyrimai norint parodyti CRC mėginių, iširtų naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, mutacijų būsenos atitikimą, palyginti su dvikrypčiu sekvenavimu. Iš viso 137 FFPE mėginių pateikė tinkamus rezultatus tiek tiriant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniu, tiek atliekant dvikryptį sekvenavimą.

Bendri rezultatai, įskaitant 6 mėginius, kurių nepavyko iširti dvikrypčiu Sangerio sekvenavimu, parodyti 8 lentelėje. 9 lentelėje pateikta „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio ir dvikrypčio sekvenavimo sutapimo analizė.

7 lentelė. „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio ir dvikrypčio Sangerio sekvenavimo palyginimas

	Dvikrypčio sekvenavimo aptiktos mutacijos								Iš viso
	Neig.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
Neigiamas	80	–	–	1	–	–	–	1	82
Teigiamas 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
Teigiamas 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
Teigiamas 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
Teigiamas 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
Teigiamas 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
Teigiamas 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	16
Teigiamas 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
Iš viso	83	3	0	22	3	0	14	12	137

8 lentelė. Sutapimo analizė

Sutapimo matavimas	Dažnis (%)	95 % patikimumo intervalas (CI)
Bendras procentinis sutapimas	132/137 (96,35)	92,69–98,21
Teigiamų rezultatų procentinis sutapimas	52/54 (96,30)	89,41–98,77
Neigiamų rezultatų procentinis sutapimas	80/83 (96,39)	91,30–98,55

Norint papildyti pirmąjį tyrimą buvo ištirtas antras unikalus mėginių rinkinys. Buvo gautas 271 CRC FFPE mėginio rinkinys: 250 mėginių – nežinomos mutacijų būsenos, o 21 mėginys – žinomos mutacijų būsenos, kad būtų papildyta retomis mutacijomis. Buvo atliktas palyginimas su Sangerio dvikrypčiu sekvenavimu, kaip nurodyta anksčiau.

Dėl atitikimo buvo išanalizuoti 247 mėginiai, kurių rezultatai buvo tinkami tiriant tiek „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniu, tiek dvikrypčio sekvenavimo metodu. Buvo 9 priešaringi mėginiai. Bendras sutapimas buvo 96,4 %. Duomenys patvirtina tikslų „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio veikimą (10 ir 11 lenteles).

9 lentelė. „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio ir dvikrypčio Sangerio sekvenavimo palyginimas (antras tyrimas)

„ <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR“ rinkinio rezultatai	Dvikrypčio sekvenavimo aptiktos mutacijos								Iš viso
	Neig.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
Neigiamas	132	–	–	–	–	1	–	–	133
Teigiamas 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
Teigiamas 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	–	10
Teigiamas 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	–	31
Teigiamas 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
Teigiamas 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
Teigiamas 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
Teigiamas 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
Iš viso	140	10	5	31	11	14	25	11	247

10 lentelė. Sutapimo analizė (antras tyrimas)

Sutapimo matavimas	Dažnis (%)	95 % patikimumo intervalas (CI)
Bendras procentinis sutapimas	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Teigiamų rezultatų procentinis sutapimas	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Neigiamų rezultatų procentinis sutapimas	132/140 (94,29)	89,93–97,13

Palyginimas su analitiniu kontroliniu metodu: NSCLC

Norint parodyti NSCLC mėginių, ištirtų naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, mutacijų būsenos atitikimą su dvikrypčiu Sangerio sekvenavimu, buvo gauti klinikiniai FFPE NSCLC mėginiai naudojant rezekciją, CNB arba FNA. Prieš tyrimą naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį iš kiekvieno mėginio buvo išskirta DNR. Šio tyrimo rezultatai buvo palyginti su rezultatais, gautais atlikus dvikryptį Sangerio sekvenavimą.

Iš viso 360 mėginių rezultatai buvo tinkami tiek naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, tiek dvikryptį Sangerio sekvenavimą, o atitiko 340 mėginių rezultatai.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio ir dvikrypčio sekvenavimo sutapimas pateiktas 12 lentelėje. Atliekant dvikryptį Sangerio sekvenavimą dviejuose mėginiuose buvo aptikta dviguba mutacija. Viena mutacija buvo tokia pati kaip ir „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio rezultatas, todėl šie mėginiai buvo suklasifikuoti kaip atitinkantys pagal bendro sutapimo, teigiamo sutapimo ir neigiamo sutapimo analizę (13 lentelė).

11 lentelė. „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio ir dvikrypčio Sangerio sekvenavimo palyginimas

		„ <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR“ rinkinio rezultatai								
		Neig.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Iš viso
Dvikrypčio sekvenavimo aptiktos mutacijos	Neigiamas	261	1	–	4	6	2	5	1	280
	Teigiamas 12ALA	–	4	–	–	–	–	–	–	4
	Teigiamas 12ALA_ 12CYS	–	1	–	–	–	–	–	–	1
	Teigiamas 12ARG	–	–	3	–	–	–	–	–	3
	Teigiamas 12ASP	–	–	–	14	–	–	–	–	14
	Teigiamas 12CYS	–	–	–	–	35	–	–	–	35
	Teigiamas 12SER	–	–	–	–	–	–	1	–	1
	Teigiamas 12VAL	2	–	–	–	–	–	17	–	17
	Teigiamas 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	4	5
	Iš viso	262	6	3	18	41	2	23	5	360

12 lentelė. Sutapimo analizė

Sutapimo matavimas	Dažnis (%)	95 % patikimumo intervalas (CI)
Bendras procentinis sutapimas	340/360 (94,44)	92,03–96,29
Teigiamų rezultatų procentinis sutapimas	79/80 (98,75)	94,21–99,94
Neigiamų rezultatų procentinis sutapimas	261/280 (93,21)	90,20–95,51

Aptikimo riba (LOD)

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio darbinis intervalas pagrįstas mėginyje esančiu amplifikuotinos DNR kiekiu, nustatytu pagal kontrolinės reakcijos C_T reikšmę. Nustatytas tyrimo įvesties intervalas apibrėžiamas iš anksto apibrėžtu kontrolinių C_T reikšmių intervalu nuo 21,92 iki 32,00. LOD – tai mažiausia procentinė dalis mutacinės DNR, kurią galima aptikti laukinio tipo DNR fone, kai bendras amplifikuotinos DNR kiekis neperžengia nustatyto įvesties intervalo ribų ir vis dar yra mažesnis už slenksčio kritinės ribos ΔC_T reikšmę.

CRC

Buvo atliktas tyrimas norint nustatyti kiekvienai iš 7 mutacijų būdingų reakcijų, įtrauktų į „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, LOD. „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio mutacinės DNR aptikimo laukinio tipo DNR fone riba apibrėžiama kaip mažiausias skiedimo koeficientas, kurį naudojant būna 95 % tiriamų teigiamų kiekvienos mutacijos mėginių pakartojimų ir jie nustatomi kaip turintys mutacijas.

Kiekvienam tyrimui (atskirai mažo ir didelio įvesties DNR lygio duomenų rinkiniams) buvo pritaikyti logistinės regresijos modeliai. Šiuose modeliuose atsakymo kintamasis buvo dvejetainė išvestis – mutacija aptikta (aptikimas = 1) ir mutacija neaptikta (aptikimas = 0), o tolydusis aiškinamasis kintamasis – \log_2 (% mutacinis skiedinys). LOD reikšmės buvo apskaičiuotos kaip procentinės mutacijos skiedinys, kurio pateikta numatoma aptikimo tikimybė buvo 0,95 (14 lentelė).

13 lentelė. Kiekvienos mutacijos tyrimo, naudojant FFPE ląstelių linijas, LOD reikšmės

Tyrimas	LOD C₉₅ (mutacinės DNR, esančios laukinio tipo DNA, procentas)
12ALA	0,8
12ARG	2,6
12ASP	6,4
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

NSCLC

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio tyrimų LOD buvo nustatyta ir patikrinta naudojant CRC audinį. Šie LOD rezultatai buvo pakartotinai patikrinti naudojant NSCLC audinį.

Tyrimas buvo sudarytas iš 2 dalių. 1 dalyje 7 mutacinių FFPE NSCLC ląstelių linijų, atspindinčių kiekvieną mutaciją, 60 pakartojimų buvo atskiesti iki atitinkamo tyrimo LOD reikšmės ir ištirti. Visi 60 kiekvieno ištirto mėginio tinkamų FFPE ląstelių linijų pakartojimų parodė 100 % aptikimą pagal atitinkamą mutacijos reakciją, esant vertinamai LOD.

2 dalyje buvo ištirta klinikinių FFPE NSCLC mėginių, atspindinčių kiekvieną mutaciją ir 3 gavimo metodus (rezekciją, CNB ir FNA) 96 pakartojimų, juos atskiedus iki atitinkamo tyrimo LOD reikšmės.

96 tinkami 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL ir 13ASP pakartojimai 100 % tinkamai aptiko mutacijas. 12CYS ir 12SER tyrimai parodė 95,8 % aptikimą esant LOD.

Tai parodė, kad anksčiau nustatyta LOD reikšmė yra patikrinta ir tinka visiems mutacijų tyrimams, vertinant NSCLC audinius ir klinikinius FFPE NSCLC / FFPE ląstelių linijų / pacientų atitinkančius mėginius.

DNR įvestis ir linijiškumas

DNR įvesties lygio poveikis ΔC_T reikšmėms

Kai visos DNR skirtingų lygių mėginiuose yra toks pat mutacinės DNR santykis, numatoma kad išmatuotos ΔC_T reikšmės išliks nuoseklios. Ruošiant DNR telkinius su mažiausia pasiekama kontrolinės reakcijos C_T reikšme buvo naudojama DNR, išskirta iš 8 FFPE ląstelių linijų.

Kiekvienos mutacijos reakcijos skiedimo intervalas ir vidutinė ΔC_T reikšmė, gauta iš rezultatų, pateikti 15 ir 16 lentelėse. Bendrai visų tyrimų ΔC_T reikšmės yra nuoseklios visame „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio darbiniam intervale ir tuo parodoma, kad DNR lygis neturi įtakos mėginio mutacijos nustatymo tikslumui.

14 lentelė. DNR įvesties poveikis ΔC_T reikšmėms visame įvesties kontrolinės reakcijos C_T reikšmių intervale – CRC FFPE ląstelių linijos

Tyrimas	ΔC_T				
	1 skiedinys ~20–21 C_T	2 skiedinys ~23–24 C_T	3 skiedinys ~26–27 C_T	4 skiedinys ~29–30 C_T	5 skiedinys ~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

* Bendras 12ASP pakartojimų skaičius buvo 27.

15 lentelė. DNR įvesties poveikis ΔC_T reikšmėms visame įvesties kontrolinės reakcijos C_T reikšmių intervale – NSCLC FFPE mėginiai

Tyrimas	ΔC_T				
	1 skiedinys ~20–21 C_T	2 skiedinys ~23–24 C_T	3 skiedinys ~26–27 C_T	4 skiedinys ~29–30 C_T	5 skiedinys ~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	–*

* Nepateikta mutacijos reakcijos C_T reikšmė dėl mažos DNR koncentracijos, todėl ΔC_T neapskaičiuota.

Linijškumas / amplifikacijos efektyvumas kaip DNR įvesties funkcija

Kiekvienos mutacijos reakcijos PGR linijškumas ir amplifikacijos efektyvumas kontrolinės reakcijos atžvilgiu pasireiškė visame darbiname „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio intervale. Buvo apskaičiuotas kiekvienos mutacijos reakcijos ir kontrolinės reakcijos amplifikacijos efektyvumas $[2(-1/\text{nuolydis})] - 1$.

Kontrolinės medžiagos amplifikacijos efektyvumas, palyginti su mutacijos reakcija, parodė, kad ΔC_T , todėl ir mutacijos aptikimas yra nuoseklus visame tyrimo darbiname intervale. Duomenų suvestinė pateikta 17 ir 18 lentelėse.

Linijškumas / amplifikacijos efektyvumas kaip procentinės mutacijos funkcija

Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti serijiniu būdu atskiesto teigiamo mutacinio mėginio poveikį amplifikacijos efektyvumui visame „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio darbiname intervale, pradedant nuo C_T įvesties lygio, kai C_T reikšmė yra maždaug 22–23.

Prieš atliekant PGR su „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniu, DNR ekstraktai iš CRC FFPE ląstelių linijos ir NSCLC mėginių pirmiausia buvo įvertinti naudojant optinio tankio rodmenis. Tada buvo paruošti DNR kiekiai pagal kontrolinės reakcijos C_T , kai C_T reikšmė buvo maždaug 23. Kiekiai buvo dukart atskiesti serijiniu būdu, kiekvieną kartą naudojant laukinio tipo DNR, kad šablone būtų išlaikytas vienodas bendras laukinio tipo DNR kiekis, o mutacinės DNR procentas skirtųsi.

Buvo paruošti DNR telkiniai, kurių pakaktų 6 kiekvienos mutacijos pakartojimams iširti. Buvo apskaičiuotos kiekvienos mutacijos kiekvieno skiedimo santykio C_T ir ΔC_T reikšmės. Buvo parengtas linijinės regresijos modelis naudojant mutacijos reakcijos C_T , palyginti su \log_2 (DNR įvesties skiedinys). Tyrimas parodė, kad mutacijų skiedimas pastovios laukinio tipo DNR koncentracijos fone neturi didelės įtakos amplifikacijos efektyvumui; už reikšmių, nurodytų anksčiau minėtame linijiškumo tyrime, ribų jis svyravo nereikšmingai.

16 lentelė. Kontrolinės ir mutacijų reakcijų amplifikacijos efektyvumas: CRC ląstelių linijos

	Atkarpa	Atkarpos standartinė klaida	Apskaičiuotas nuolydis	Standartinė klaida (nuolydis)	Apatinė dvipusio 95 % patikimumo intervalo riba (nuolydis)	Viršutinė dvipusio 95 % patikimumo intervalo riba (nuolydis)	Amplifikacijos efektyvumas	Amplifikacijos efektyvumo skirtumai
12ALA	Kontrolinė C _T	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03
	12ALA C _T	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019	
12ARG	Kontrolinė C _T	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056
	12ARG C _T	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01	
12ASP	Kontrolinė C _T	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	12ASP C _T	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	Kontrolinė C _T	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032
	12CYS C _T	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058	
12SER	Kontrolinė C _T	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105
	12SER C _T	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101	
12VAL	Kontrolinė C _T	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033
	12VAL C _T	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04	
13ASP	Kontrolinė C _T	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	13ASPC _T	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Mėginys

17 lentelė. Kontrolinės ir mutacijų reakcijų amplifikacijos efektyvumas: NSCLC mėginiai

	Atkarpa	Atkarpos standartinė klaida	Apskaičiuotas nuolydis	Standartinė klaida (nuolydis)	Apatinė dvipusio 95 % patikimumo intervalo riba (nuolydis)	Viršutinė dvipusio 95 % patikimumo intervalo riba (nuolydis)	Amplifikacijos efektyvumas	Amplifikacijos efektyvumo skirtumai	
12ALA	Kontrolinė C _T	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	0,94	0,069
	12ALA C _T	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	1,01	
12ARG	Kontrolinė C _T	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94	0,093
	12ARG C _T	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04	
12ASP	Kontrolinė C _T	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96	-0,001
	12ASP C _T	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96	
12CYS	Kontrolinė C _T	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98	0,019
	12CYS C _T	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00	
12SER	Kontrolinė C _T	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97	0,127
	12SER C _T	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09	
12VAL	Kontrolinė C _T	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92	0,011
	12VAL C _T	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91	
13ASP	Kontrolinė C _T	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066
	13ASPC _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01	

Mėginys

Trukdančios medžiagos

Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti galimai trukdančių medžiagų poveikį „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio efektyvumui. Tai buvo atlikta išanalizavus kiekvienos medžiagos poveikį atliekant pridėjimo bandymus esant įvairioms koncentracijoms ir įvertinus tiriamų mėginių ΔC_T reikšmes ir mutacijų būseną. Ištirtos šios DNR išskyrimo procesui galimai trukdančios medžiagos: buferinis tirpalas AL, buferinis tirpalas ATL, etanolis, parafinas, proteinazė K, plovimo buferinis tirpalas AW1, plovimo buferinis tirpalas AW2 ir ksilenas. Kaip tuščia kontrolinė medžiaga taip pat buvo ištirtas rinkinio galutinis išplovimo buferinis tirpalas ir buferinis tirpalas ATE.

Esant koncentracijoms, su kuriomis bus dirbama įprastai naudojant, nė viena iš ištirtų galimai trukdančių medžiagų neturėjo įtakos „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio galimybei atskirti mėginius su mutacijomis ir be jų.

Be trukdančių medžiagų tyrimo, buvo įvertinta galima klinikinių mėginių nekrozės įtaka, norint nustatyti, ar didelis nekrotinių audinių lygis auglio mėginiuose turi įtakos galimybei pateikti tinkamus duomenis. Iš 421 mėginio, įvertinto kaip palyginimo su analitiniu kontroliniu metodu tyrimo dalis, 29 mėginių nekrozės lygis buvo > 50 %, kaip buvo nustatyta atliekant patologinę peržiūrą. Iš šių 29 mėginių 28 pateikė tinkamus rezultatus, kurie atitiko dvikrypčio Sangerio sekvenavimo rezultatus. Vienas mėginys buvo netinkamas dėl nepakankamo DNR kiekio.

Kryžminis užteršimas

Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti DNR mėginių kryžminio užteršimo apimtį, dėl kurios gali būti pateikti klaidingai neigiami rezultatai naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį. Kryžminis užteršimas gali įvykti dėl:

- išskiriant mėginius (pvz., grandant nuo objektinių stiklelių),
- lašinant mėginius,
- uždengiant (dangteliais) mėginių mėgintuvėlius,
- naudojant užteršus rinkinio reagentus,
- įdedant tyrimo mėgintuvėlius į „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentą.

Šiame tyrime buvo naudojami FFPE standartai: laukinio tipo standartas ir 12ALA standartas (nes 12ALA reakcija – tai reakcija naudojant mažiausią rinkinio LOD).

Šis tyrimas buvo sudarytas iš 10 PGR tyrimų, skirtų ištirti užkrėtimo potencialą tiek vieno, tiek kelių tyrimų „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu metu. Šiuose testiniuose tyrimuose mėgintuvėliai su laukinio tipo DNR buvo naudojami norint patikrinti užteršimą mutacine DNR.

Šio tyrimo rezultatai neparodė jokio aptinkamo užkrėtimo jokiuose laukinio tipo DNR ekstraktuose, skirtuose aptikti kryžminį užkrėtimą.

Specifiškumas / kryžminis reaktyvumas

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį sudaro 8 atskiros reakcijos. Tai viena kontrolinė reakcija, kuri aptinka nepolimorfinį KRAS geno regioną, ir 7 konkrečių mutacijų reakcijos. Nėra reakcijos, kuri konkrečiai išmatuotų laukinio tipo KRAS seką 12 arba 13 kodone. KRAS rezultatas „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta) (t. y. laukinis tipas) nustatomas, jei nėra nė vienos iš 7 mutacijų, kuri pateiktų teigiamą rezultatą.

Todėl būtina parodyti nespecifinės amplifikacijos apimtį arba kryžminį reaktyvumą, kuris atsiranda kiekvienos reakcijos metu, kai yra KRAS laukinio tipo DNR perteklius, kad nebūtų pateikta klaidingai teigiamų rezultatų. Panašiai vertinama nespecifinė KRAS mutacijų, kurių aptikimas šiame tyrime nenumatytas, amplifikacija. Tai parodo, kad mutacijų reakcijų kryžminio reaktyvumo apimtis neturi įtakos klaidingam mutacijų aptikimui, jei yra pertekliniai mutacinės DNR kiekiai. Šio tyrimo DNR įvestis pagrįsta kontroliniu C_T intervalu (21,92–32,00), didžiausia DNR įvesties koncentracija pagrįsta kontroline C_T reikšme, kuri lygi maždaug 22.

Nespecifinė amplifikacija / kryžminis reaktyvumas: laukinio tipo KRAS DNR

Buvo tiriama laukinio tipo DNR nespecifinės amplifikacijos apimtis naudojant reakcijų mišinius, skirtus amplifikuoti konkrečias mutacijas. Naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, iš viso buvo įvertinta 60 laukinio tipo FFPE ląstelių linijos DNR ir 60 NSCLC pakartojimų, esant didžiausios koncentracijos amplifikuotinos DNR įvesties lygiui.

Kontrolinės medžiagos C_T reikšmės buvo maždaug 22–23. Rezultatai parodė, kad ΔC_T reikšmės viršijo nustatytas ribines reikšmes ir bent 95 % laukinio tipo pakartojimų buvo nustatyta teisingai.

Nespecifinė amplifikacija / kryžminis reaktyvumas / specifiškumas: mutacijų turinti KRAS DNR

Mutacijų turintys mėginiai buvo ištirti esant didelei įvesties DNR koncentracijai naudojant visus reakcijų mišinius. DNR mėginiai buvo paruošti iš kiekvienos CRC ir NSCLC FFPE ląstelių linijos, kad kontrolinės reakcijos C_T reikšmė atitiktų maždaug 23. Iš šių skiedinių buvo įvertinta po 6 kiekvieno mutacijų mėginio pakartojimus. Mėginio mutacijos procentas buvo valdomas naudojant ląstelių linijos DNR mutacijos procentą.

Vidutinės ΔC_T reikšmės, pateiktos 19 ir 20 lentelėse, rodo, kad tarp mutacijų reakcijų pasireiškia kryžminis reaktyvumas. Visais atvejais rezultatai rodė, kad atlikus atitinkamą mutacijos reakciją aptikta tinkama mutacija (t. y. mažiausia ΔC_T reikšmė rodė aptiktą tinkamą mutaciją). Visais kitais tyrimo atvejais mutacija nebuvo aptikta arba ΔC_T reikšmė buvo už slenksčio ribų.

18 lentelė. Mutacijų reakcijų kryžminis reaktyvumas (ΔC_T) naudojant CRC FFPE ląstelių linijos DNR, esant didelei įvesties koncentracijai

Mutacinė DNR	Kritinė riba	Tyrimo ΔC_T						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,42*	12,66	Nėra	5,81†	2,78†	6,31†	13,21
12ASP	6,6	12,56	2,42*	Nėra	Nėra	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	1,12*	11,42	Nėra	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	0,98*	Nėra	7,96†	12,88
12SER	8	Nėra	13,39	13,31	Nėra	3,02*	12,99	13,97
12VAL	7,5	6,83†	Nėra	Nėra	Nėra	13,38	0,28*	13,74
13ASP	7,5	Nėra	13,29	13,89	Nėra	Nėra	14,36	4,5*

Nėra: nebuvo kryžminės reakcijos.

* Atitinkamų reakcijų ΔC_T reikšmės.

† Kryžminio reaktyvumo reakcijų ΔC_T reikšmės, mažesnės už kritinę ribą.

19 lentelė. Mutacijų reakcijų kryžminis reaktyvumas (ΔC_T) naudojant NSCLC FFPE ląstelių linijos DNR, esant didelei įvesties koncentracijai

Mutacinė DNR	Kritinė riba	Tyrimo ΔC_T						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,31*	12,8	Nėra	5,01†	2,26†	5,57†	12,65
12ASP	6,6	12,61	1,66*	Nėra	Nėra	Nėra	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	0,81*	11,24	Nėra	12,66	12,62
12CYS	8	Nėra	12,22	7,84†	0,56*	Nėra	13,06	11,84
12SER	8	Nėra	12,87	13,21	Nėra	1,93*	13,25	12,93
12VAL	7,5	5,93†	14,29	Nėra	Nėra	13,14	0,45*	12,39
13ASP	7,5	Nėra	Nėra	Nėra	Nėra	Nėra	Nėra	2,02*

Nėra: nebuvo kryžminės reakcijos.

* Atitinkamų reakcijų ΔC_T reikšmės.

† Kryžminio reaktyvumo reakcijų ΔC_T reikšmės, mažesnės už kritinę ribą.

Pasikartojamumas ir atkartojamumas

Šio tyrimo tikslas buvo parodyti „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio tikslumą vienoje laboratorijoje (pasikartojamumas) ir lyginant kelias laboratorijas (atkartojamumas). Buvo pateikti tinkamo mutacijų aptikimo rezultatai ir ΔC_T reikšmės (skirtumo tarp mutacijų reakcijos ir kontrolinės reakcijos C_T reikšmės).

CRC

Šiam vertinimui buvo naudojami klinikiniai CRC mėginiai. Naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį buvo ištirtas vienas laukinio tipo ir po vieną kiekvienos mutacijos mėginį; visus mėginius ir kontroles tyrė 2 operatoriai kiekvienoje iš 3 laboratorijų, naudodami 3 „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinių partijas, 5 dienas iš eilės atlikdami 2 tyrimus per dieną ir kiekviename tyrime naudodami po 2 kiekvieno mėginio pakartojimus. Kiekvienos reakcijos kiekvieno mėginio gautos C_T ir ΔC_T reikšmės taip pat buvo išanalizuotos naudojant variacijos komponentų analizę.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio mažo lygio mutacijų ($3 \times \text{LOD}$) ir laukinio tipo mėginių atkartojamumas buvo bent 39/40 tinkamo mutacijos aptikimo atvejų pagal visus tyrimus, visas partijas, platformas ir visus operatorius, tiek lyginant vienoje laboratorijoje atliktų eksperimentų rezultatus, tiek kelių laboratorijų rezultatus. Buvo pateiktas bendras ir kiekvienos laboratorijos apskaičiuotas $3 \times \text{LOD}$ mėginių santykis tiriant tiek mutacinius, tiek laukinio tipo mėginius. Atliekant visus tyrimus ir naudojant visus mėginių derinius, mutacija buvo aptikta tinkamai bent 79 iš 80 pakartojimų (21 lentelė).

20 lentelė. Bendras teisingo aptikimo atvejų skaičius

Mėginys	Mutacijų tyrimo teisingo aptikimo atvejų skaičius						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mutacijos $3 \times \text{LOD}$	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Laukinio tipo (mažo lygio)	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

NSCLC

Buvo naudojami kiekvienos iš 7 KRAS NSCLC mutacijų 3 mėginiai, atspindintys 3 mėginių gavimo būdus (rezekciją, CNB ir FNA). Be to, kuriant laukinio tipo DNR skiedinių telkinius papildomai buvo naudojami 6 laukinio tipo klinikiniai mėginiai (po 2 mėginius, atspindinčius kiekvieną iš 3 mėginių gavimo būdų).

Keli ekstraktai buvo sujungti į telkinius pagal kiekvienos mutacijos mėginius, kad būtų sukurta po vieną kiekvienos mutacijos telkinį. Kiekvienos mutacijos mėginių telkinys buvo atskiestas, kad būtų sukurti tyrimo mėginiai, kurių mutacijų lygis būtų 1 × LOD ir 3 × LOD.

Šiame tyrime dalyvavo 3 skirtingose vietose esančios laboratorijos. Kiekvienoje laboratorijoje buvo sudaryto skirtingos sąlygos naudojant 2 „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentus, 2 „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio partijas ir 2 operatoriams atliekant po 2 tyrimus per dieną 16 ne iš eilės einančių dienų.

Atliekant visus tyrimus ir naudojant visus mėginių derinius, mutacija buvo aptikta tinkamai bent 284 iš 288 pakartojimų. Tiriant 1 × LOD grupę, bendras teisingų aptikimo atvejų santykis visuose tyrimuose buvo 100 %. Tiriant 3 × LOD grupę, bendras teisingų aptikimo atvejų santykis visuose tyrimuose buvo 99,6 %. Bendras mutacijos nebuvimo (laukinio tipo) teisingo nustatymo atvejų santykis visuose tyrimuose buvo 100 % (22 lentelę).

21 lentelė. 1 × LOD, 3 × LOD ir laukinio tipo teisingo aptikimo atvejų skaičius

Mutacijos lygis	Tyrimas	Teisingas rezultatas	Teisingas rezultatas, %	Apatinė dvipusio 90 % CI
1 × LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
3 × LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
Laukinio tipo		285/285	100	98,95

Mėginių apdorojimo kintamumas

Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti mėginių apdorojimo, ypač DNR išskyrimo, kintamumo poveikį „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkiniui. Šis tyrimas papildytas pasikartojamumo ir atkartojamumo tyrimu, išanalizavus mėginių apdorojimo kintamumą, kai tos pačios klinikinių FFPE mėginių atpjosos ir FFPE ląstelių linijų atpjosos buvo apdorotos 3 laboratorijose, vėliau atliktas tyrimas naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį.

CRC

Nuo kiekvieno iš 10 FFPE CRC mėginių buvo atpjauta po trisdešimt nuoseklių 5 µm atpjosų (3 laukinio tipo ir po 1 kiekvienos mutacijos). Atpjosos buvo paskirstytos kiekvienai iš 3 tiriančių laboratorijų, kad kiekviena iš jų gautų po 10 kiekvieno FFPE mėginio atpjosų (iš viso 100 atpjosų). Buvo ištirta 300 DNR išskyrimų, 298 mėginiai buvo tinkami. Tarp 3 laboratorijų buvo 99,33 % atitikimas KRAS mutacijų aptikimo atvejų atžvilgiu.

Mutacinių ir laukinio tipo mėginių vidutinių ΔC_T reikšmių palyginimas pagal laboratoriją parodė labai didelį rezultatų sutapimą. Rezultatai rodo DNR išskyrimo procedūros ir mėginių apdorojimo naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį sutapimą.

NSCLC

Šiame tyrime buvo naudojama 13 klinikinių NSCLC mėginių (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL ir 3 laukinio tipo) ir 4 FFPE ląstelių linijų mėginiai (12ALA, 12ARG, 12SER ir 13ASP). Mėginiai atspindi įvairius gavimo būdus: chirurginę rezekciją, FNA ir CNB. Kai nebuvo klinikinių NSCLC audinių, retoms mutacijoms atspindėti buvo naudojamos ląstelių linijos.

Tada 3 partijos, sudarytos iš 20 FFPE atpjosų, buvo atsitiktiniu būdu paskirstytos 3 laboratorijoms. Pagal kiekvieną mutaciją ir laukinį tipą kiekvienoje iš 3 laboratorijų buvo išskirta DNR iš partijos, sudarytos iš 20 FFPE atpjosų (10 porų).

Kai visi mėginių ruošiniai 3 atskirose tyrimo laboratorijose buvo ištirti naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, kiekvienos iš 7 mutacijų ir laukinio tipo mėginiai buvo nustatyti aptikus teisingą mutaciją. Bendras kiekvienos iš 7 mutacijų ir laukinio tipo mėginių aptikimo atvejų skaičius buvo 100 %, taip parodytas nuoseklumas tarp laboratorijų jose išskiriant DNR ir aptinkant mutacijas naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį.

Mėginių gavimo būdų lygiavertiškumas (tik NSCLC)

Šio tyrimo tikslas buvo įvertinti, ar NSCLC mėginių mutacijų aptikimo atvejams, nustatytiems naudojant „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinį, turėjo įtakos mėginių gavimo būdas. Šiame tyrime buvo vertinami 3 mėginių gavimo būdai: rezekcija, FNA ir CNB.

Šiam tyrimui iš chirurginės rezekcijos auglio mėginių buvo gauti pacientų atitinkantys CNB ir FNA mėginiai, kad to paties auglio mėginiai būtų surinkti naudojant 3 gavimo būdus. Šiame tyrime iš viso buvo naudojama 169 rezekcijos, 169 CNB ir 169 FNA mėginių.

Kiekvienas mėginys apdorotas taikant išskyrimo ir tyrimo naudojant KRAS kontrolinį tyrimą procedūras. Kiekvienas mėginys, pateikęs tinkamą rezultatą (169 rezekcijos, 169 CNB ir 164 FNA), buvo ištirtas naudojant 8 KRAS tyrimus.

Be to, iš kiekvieno klinikinio FFPE NSCLC mėginio, išskirta DNR buvo naudojama „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio analizei, taip pat buvo įvertinta atlikus dvikryptį Sangerio sekvenavimą norint nustatyti atitikimo lygį tarp „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio ir dvikrypčio Sangerio sekvenavimo. Pagal visų tipų mėginius „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys, palyginti su dvikrypčiu Sangerio sekvenavimu, tiksliai nustatė mutacijos būseną, o bendras procentinio sutapimo koeficientas buvo 96,96 %.

Šio tyrimo rezultatai parodė, kad „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys pateikė lygiaverčius rezultatus pagal visus 3 ištirtus surinkimo metodus, ką rodo bendro sutapimo porų atžvilgiu koeficientai:

- CNB, palyginti su FNA – 97,52 (patikimumo ribos 94,41–99,15)
- CNB, palyginti su rezekcija – 96,39 (patikimumo ribos 92,99–98,41)
- FNA, palyginti su rezekcija – 98,76 (patikimumo ribos 96,14–99,78)

Literatūra

Naudota literatūra

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).

Naudingos nuorodos

- 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).

Simboliai

Ant pakuotės ir etikečių gali būti pateikti šie simboliai:



<N>

Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti



Tinka iki



„In vitro“ diagnostikos medicinos prietaisas



Katalogo numeris



Serijos numeris



Medžiagos numeris



Sudėtyje yra



Numeris



Įgaliotasis atstovas

Rn

R – vadovo peržiūra, o n – peržiūros numeris



Temperatūros apribojimai



Gamintojas



Skaitykite naudojimo instrukcijas



Dėmesio

Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu www.qiagen.com/Support, skambinkite tel. 00800-22-44-6000 arba kreipkitės į vieną iš mūsų QIAGEN techninio aptarnavimo skyrių ar vietinių pardavėjų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

1 priedas „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio rankinio paruošimo protokolas

Šiame skyriuje pateikiamos instrukcijos, kaip naudoti „*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit“ su 2.3 versijos RGQ programine įranga atviruoju režimu (t. y. nenaudojant „KRAS Assay Package“).

Bendra informacija

- Reikalingą medžiagą rasite „Būtinės, bet nepateikiamos priemonės“, 11 psl.
- Visų mėginių paruošimo ir išdėstymo instrukcijų ieškokite „Protokolas: DNR mėginio įvertinimas“, 15 psl., ir „Protokolas: KRAS mutacijų aptikimas“, 27 psl.

Protokolas: temperatūros profilio sukūrimas

Prieš pradėdami sukurkite KRAS analizės temperatūros profilį. Mėginių įvertinimo ir mutacijų įvertinimo ciklo parametrai yra tokie patys.

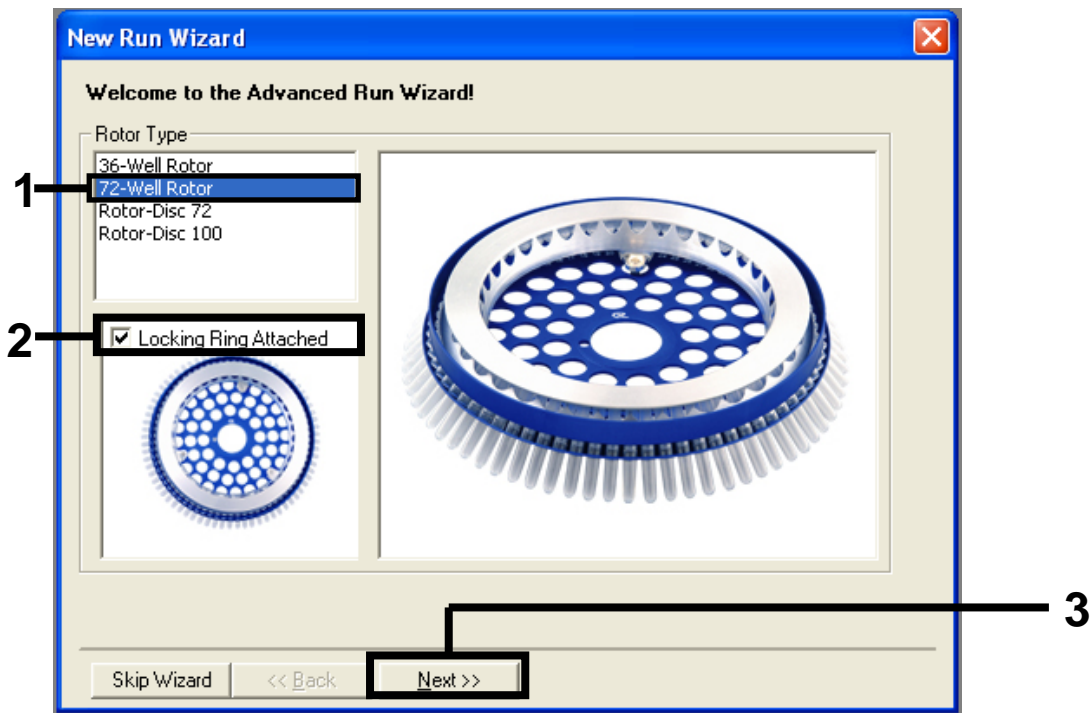
Procedūra

Ciklo parametrai pateikti 23 lentelėje.

22 lentelė. Ciklo parametrai

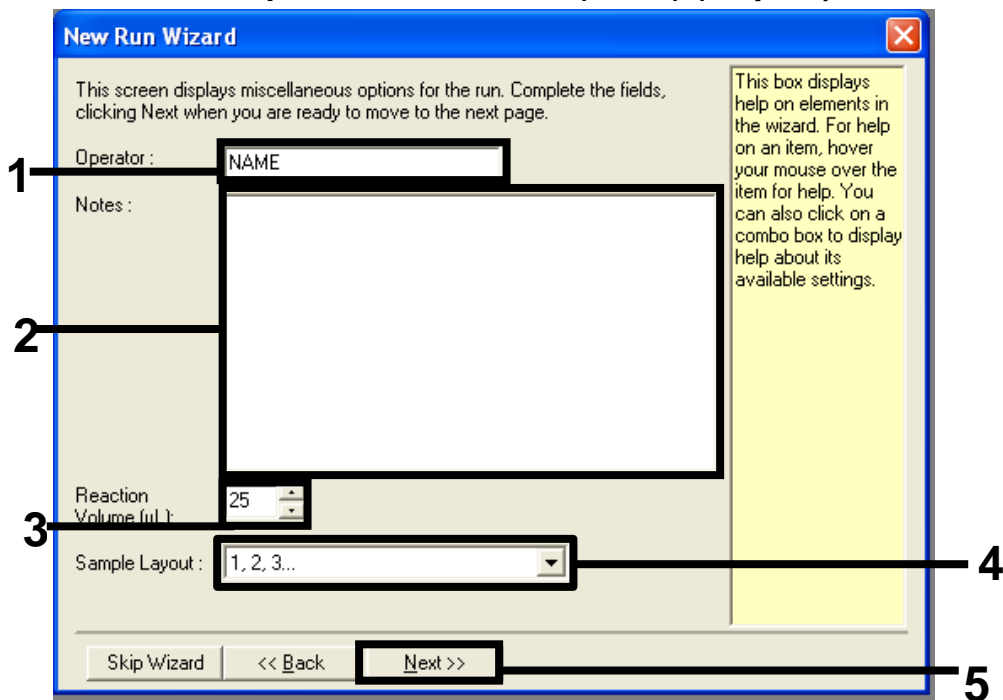
Ciklai	Temperatūra	Laikas	Duomenų gavimas
1	95 °C	15 min.	Nėra
40	95 °C	30 sek.	Nėra
	60 °C	60 sek.	Žalia ir geltona

1. Dukart spustelėkite programinės įrangos „Rotor-Gene Q Series Software 2.3“ piktogramą nešiojamojo kompiuterio, sujungto su „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu, darbalaukyje. Pasirodžiusiame dialogo lange „New Run“ (Nauja tyrimų serija) pasirinkite skirtuką „Advanced“ (Išplėstinis).
2. Norėdami sukurti naują šabloną, pasirinkite „Empty Run“ (Tuščia tyrimų serija), tada spustelėkite „New“ (Nauja) ir įveskite „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys).
3. Pasirinkite rotoriaus tipą „72-Well Rotor“ (72 šulinėlių rotorius). Patvirtinkite, kad fiksuojamasis žiedas uždėtas, ir pažymėkite langelį „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Spustelėkite „Next“ (Kitas) (21 pav.).



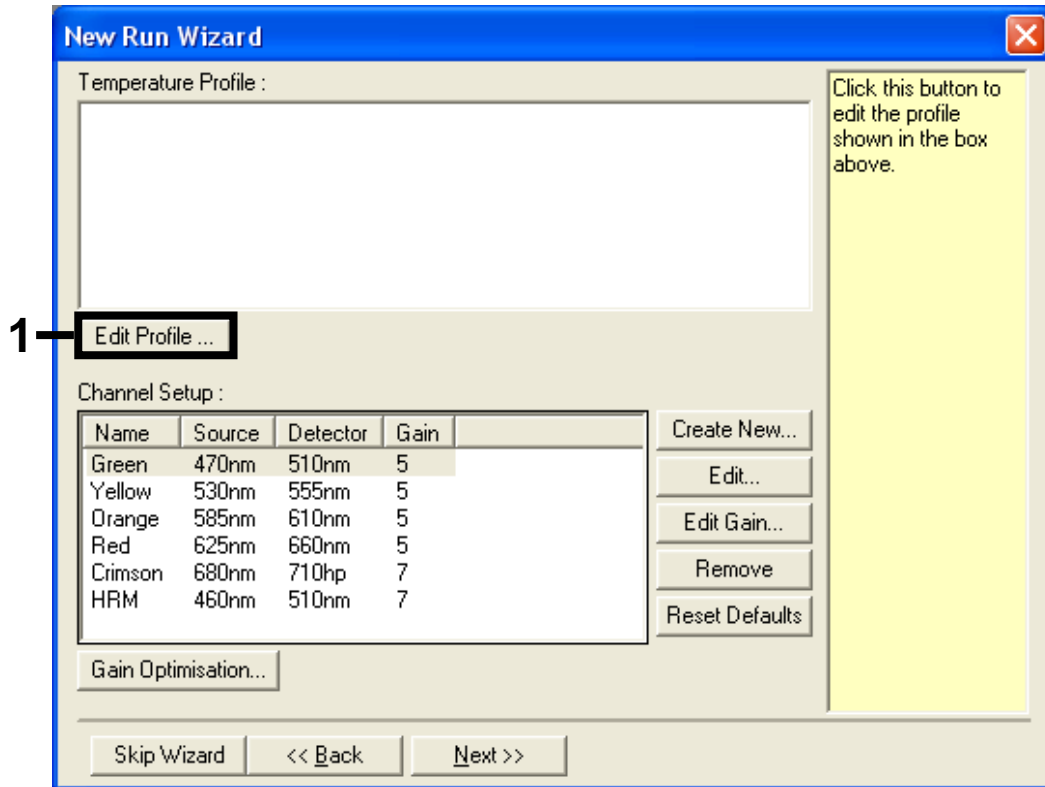
21 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys). 1 = „Rotor type“ (Rotoriaus tipas); 2 = laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas); 3 = „Next“ (Kitas).

- 4. Įveskite operatoriaus vardą. Įtraukite pastabas ir įveskite reakcijos tūrį 25. Patikrinkite, ar „Sample Layout“ (Mėginio išdėstymas) yra „1, 2, 3...“. Spustelėkite „Next“ (Kitas) (22 pav.).**



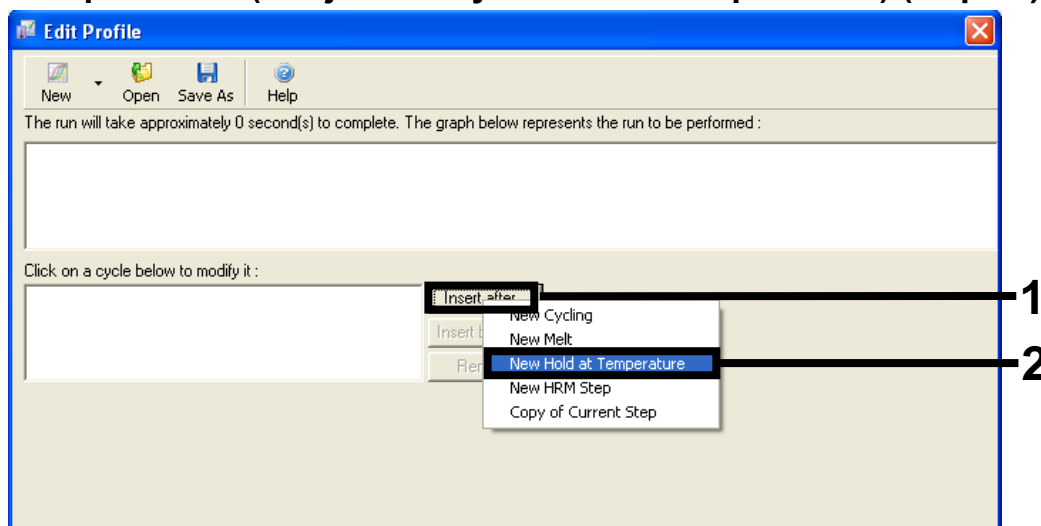
22 pav. Operatoriaus vardo ir reakcijų tūrių įvedimas. 1 = dialogo lango laukas „Operator“ (Operatorius); 2 = dialogo lango laukas „Notes“ (Pastabos); 3 = laukas „Reaction Volume“ (Reakcijos tūris); 4 = „Sample Layout“ (Mėginio išdėstymas); 5 = „Next“ (Kitas).

5. Dialogo lange „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys) spustelėkite „Edit Profile“ (Redaguoti profilį) (23 pav.) ir programokite temperatūros profilį, atlikdami toliau nurodytus veiksmus.



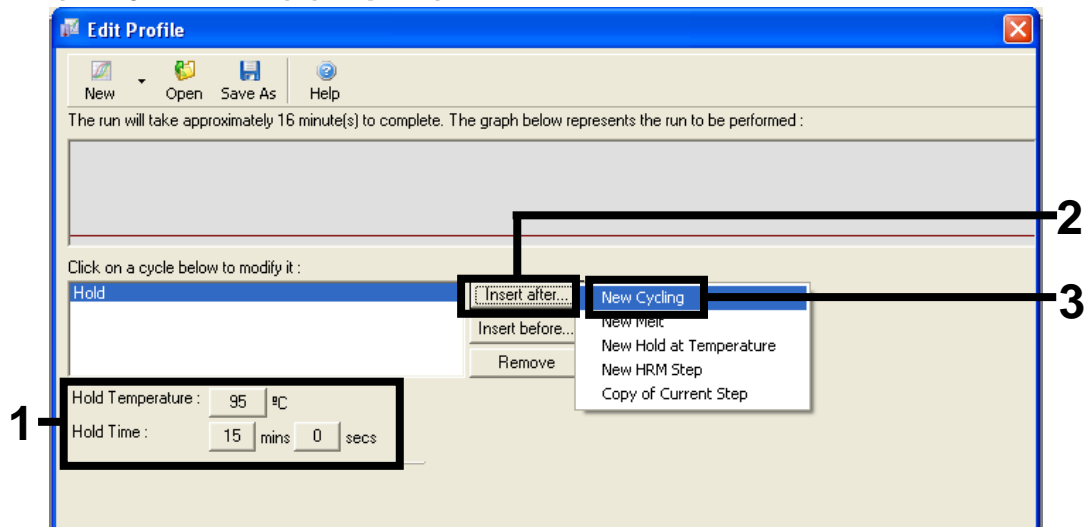
23 pav. Profilio redagavimas.

6. Spustelėkite „Insert after“ (Įterpti po) ir pasirinkite „New Hold at Temperature“ (Naujas išlaikymas esant temperatūrai) (24 pav.).



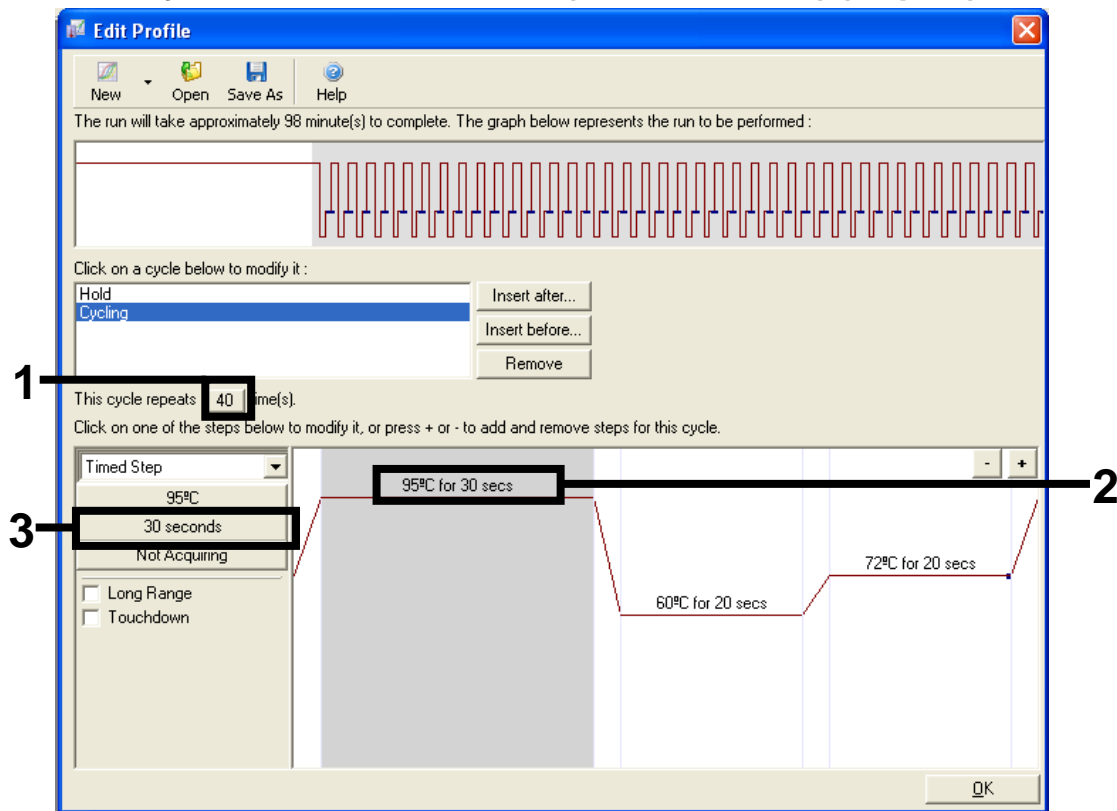
24 pav. Pradinio inkubavimo veiksmo įterpimas. 1 = „Insert After“ (Įterpti po); 2 = „New Hold at Temperature“ (Naujas išlaikymas esant temperatūrai).

7. Pakeiskite „Hold Temperature“ (Išlaikymo temperatūrą) į 95 °C ir „Hold Time“ (Išlaikymo laiką) į „15 mins 0 secs“ (15 min. 0 sek.). Spustelėkite „Insert After“ (Įterpti po), tada pasirinkite „New Cycling“ (Naujas ciklas) (25 pav.).



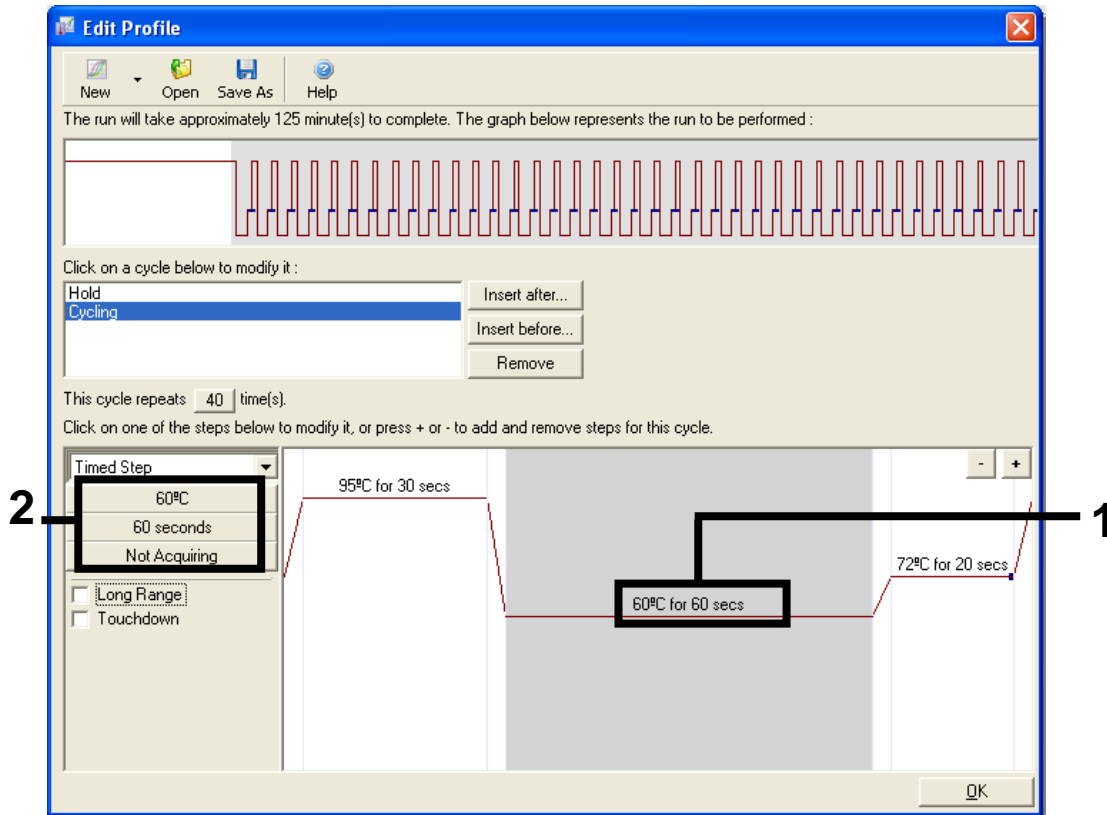
25 pav. Pradinis inkubacijos veiksmas, esant 95 °C. 1 = „Hold Temperature“ (Išlaikymo temperatūra) ir „Hold Time“ (Išlaikymo laikas); 2 = „Insert After“ (Įterpti po); 3 = „New Cycling“ (Naujas ciklas).

8. Pakeiskite ciklo kartojimų skaičių į 40. Pasirinkite pirmą žingsnį ir nustatykite „95°C for 30 secs“ (95 °C – 30 sek.) (26 pav.).



26 pav. Ciklo veiksmas, esant 95 °C. 1 = laukas „Cycle repeats“ (Ciklo kartojimų skaičius); 2 = pirmas veiksmas: temperatūros nustatymas; 3 = pirmas veiksmas: laiko nustatymas.

9. Pasirinkite antrą žingsnį ir nustatykite „60°C for 60 secs“ (60 °C – 60 sek.). Šiame žingsnyje įgalinkite duomenų gavimą pasirinkdami „Not Acquiring“ (Negaunama) (27 pav.).



27 pav. Ciklo veiksmas, esant 60 °C. 1 = antras veiksmas: temperatūros ir laiko nustatymas; 2 = „Not Acquiring“ (Negaunama).

Nustatykite „Green“ (Žalia) ir „Yellow“ (Geltona) gavimo kanalus pasirinkdami „>“, kad perkeltumėte juos iš „Available Channels“ (Pasiekiamų kanalų) sąrašo. Spustelėkite „OK“ (Gerai) (28 pav.).

Acquisition Configuration :

Same as Previous : (New Acquisition)

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange
Red

Acquiring Channels :

Name
Green
Yellow

To acquire from a channel, select it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a channel, select it in the right-hand list and click <. To remove all acquisitions, click <<.

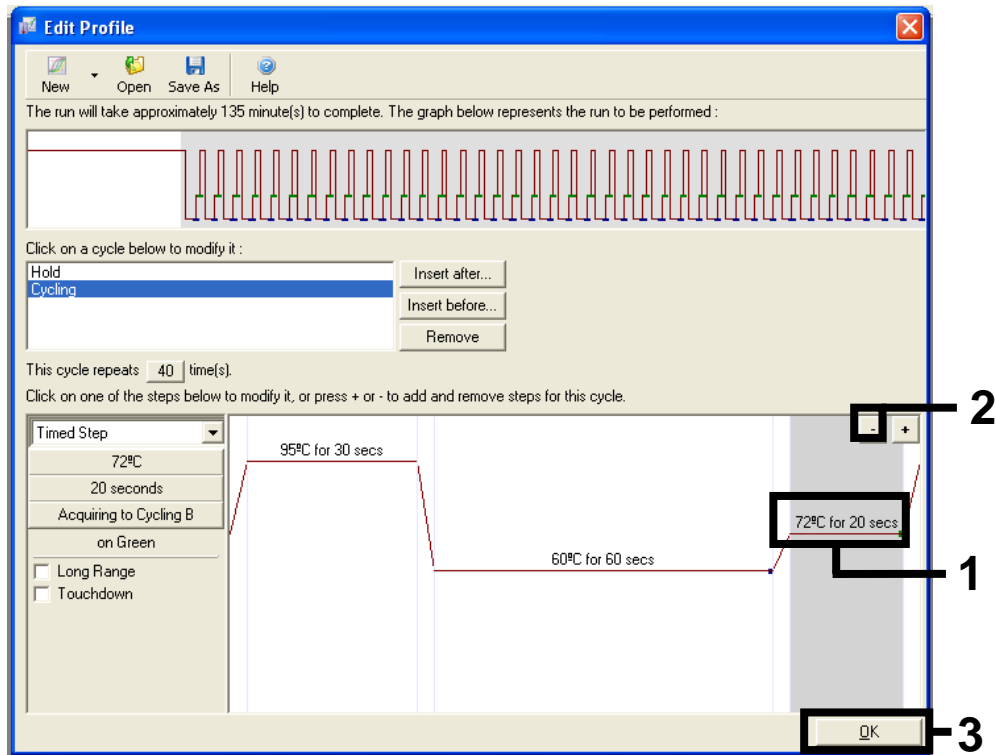
Dye Chart >> **OK** Don't Acquire Help

Dye Channel Selection Chart

Channel	Source	Detector	Dyes
Green	470nm	510nm	FAM ¹ , SYBR Green 1 ¹ , Fluorescein, EvaGreen ¹ , Alexa Fluor 488 ¹
Yellow	530nm	555nm	JOE ¹ , VIC ¹ , HEX, TET ¹ , CAL Fluor Gold 540 ¹ , Yakima Yellow ¹
Orange	585nm	610nm	ROX ¹ , CAL Fluor Red 610 ¹ , Cy3.5 ¹ , Texas Red ¹ , Alexa Fluor 568 ¹
Red	625nm	660nm	Cy5 ¹ , Quasar 670 ¹ , Alexa Fluor 633 ¹
Crimson	680nm	710hp	Quasar705 ¹ , Alexa Fluor 680 ¹
HRM	460nm	510nm	SYTO 9 ¹ , EvaGreen ¹

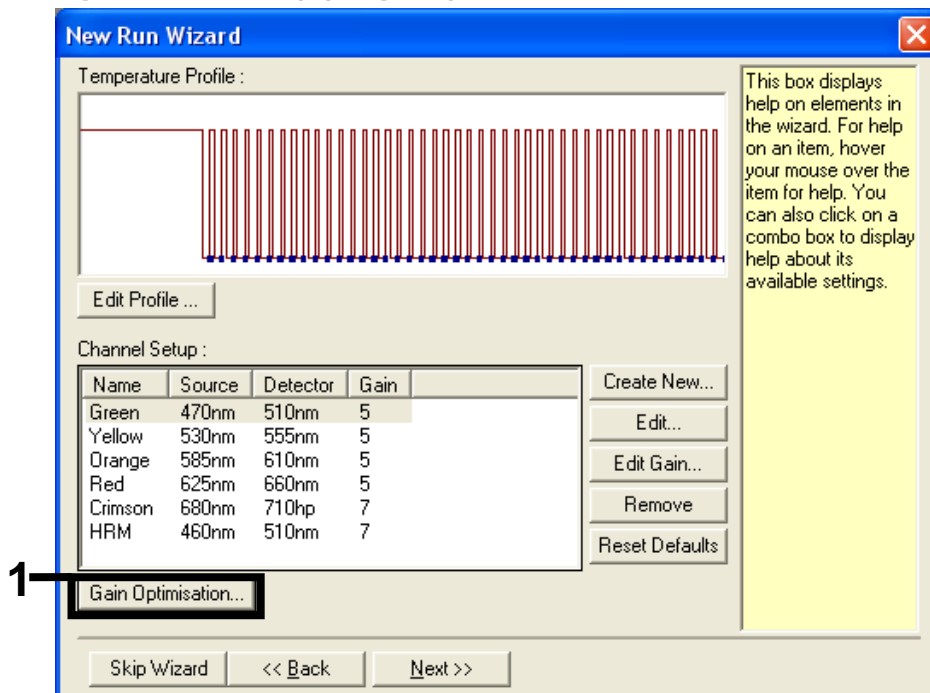
28 pav. Gavimas atliekant ciklo žingsnį esant 60 °C temperatūrai.

10. Pažymėkite trečią žingsnį ir panaikinkite spustelėdami „-“. Spustelėkite „OK“ (Gerai) (29 pav.).



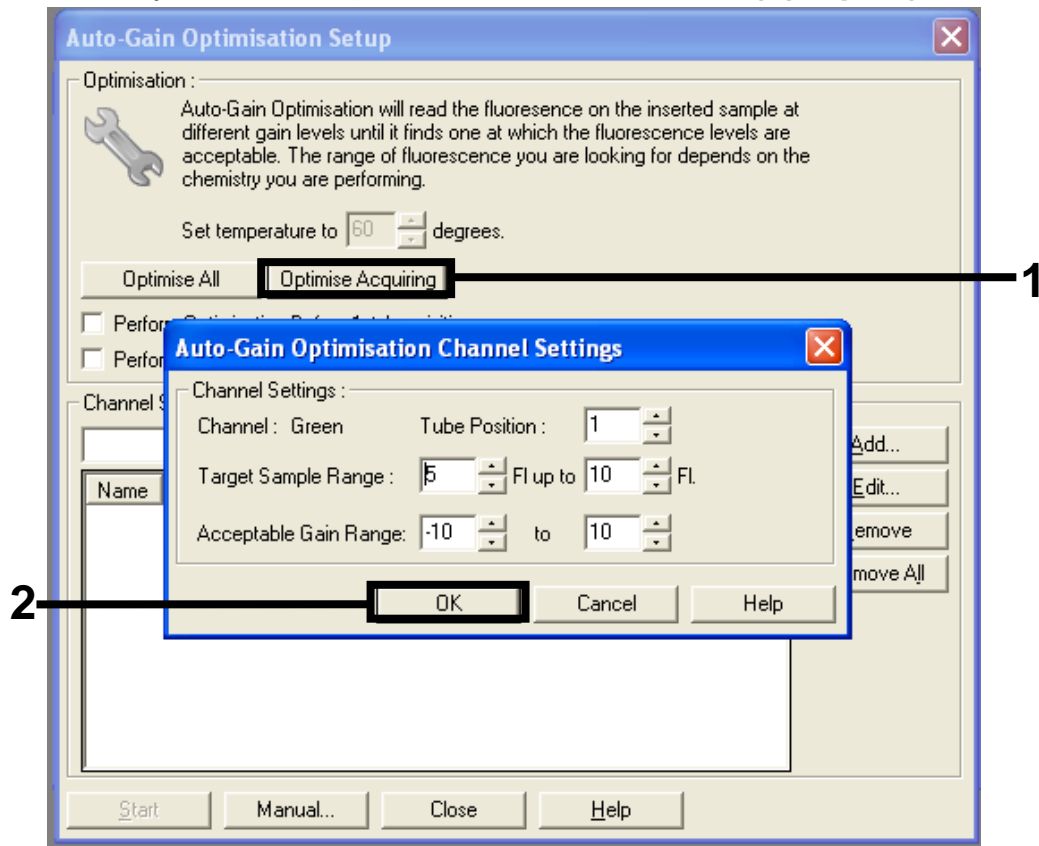
29 pav. Išplėtimo žingsnio pašalinimas.

11. Kitame dialogo lange spustelėkite „Gain Optimisation“ (Gavimo optimizavimas) (30 pav.).



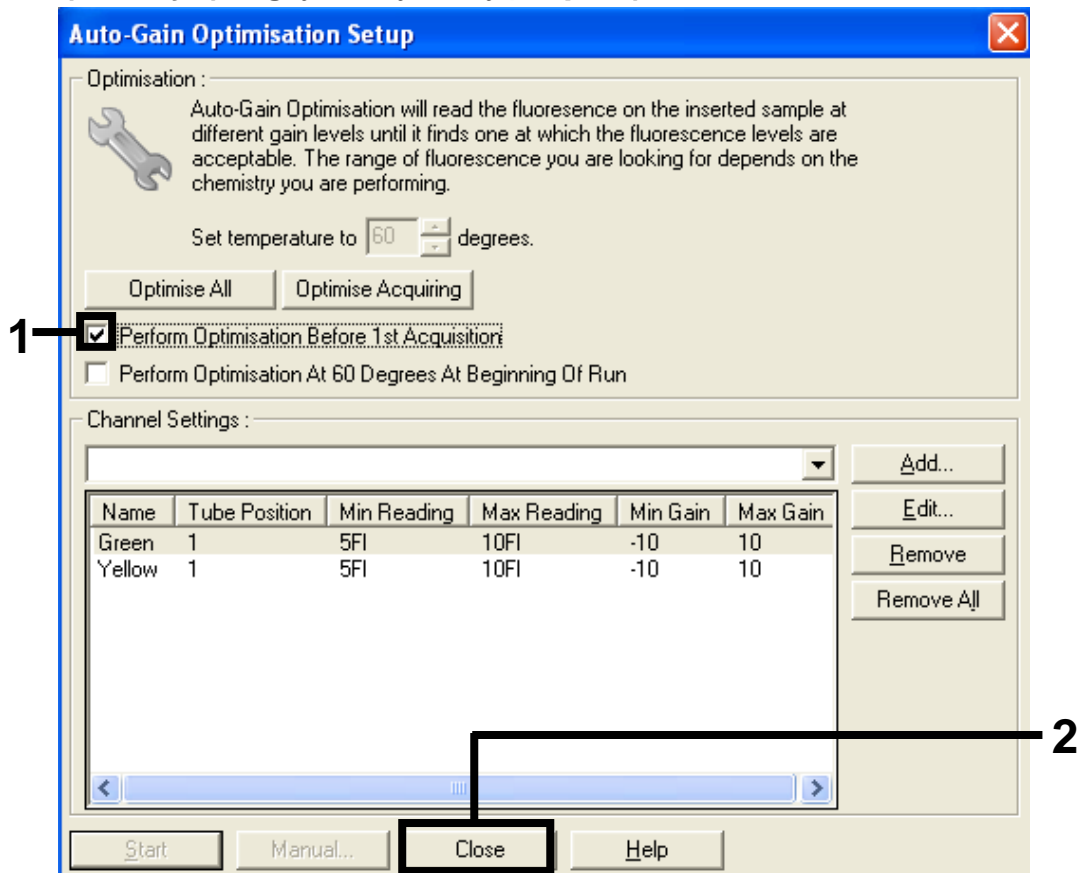
30 pav. Gavimo optimizavimas.

12. Spustelėkite „Optimise Acquiring“ (Optimizuoti gavimą). Rodomi kiekvieno kanalo nustatymai. Priimkite šias numatytąsias abiejų kanalų reikšmes spustelėdami „OK“ (Gerai) (31 pav.).



31 pav. Automatinis žalio kanalo gavimo optimizavimas.

13. Pažymėkite langelį „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Atlikti optimizavimą prieš pirmą gavimą), tada spustelėkite „Close“ (Uždaryti) ir grįžkite į vedlį (32 pav.).



32 pav. Žalio ir geltono kanalų pasirinkimas.

14. Spustelėkite „Next“ (Kitas), kad įrašytumėte matricą atitinkamoje vietoje, pasirinkdami „Save Template“ (Įrašyti matricą).

Protokolas: mėginių vertinimas (vadovas)

Šis protokolas naudojamas visam amplifikuojamos DNR kiekiui mėginiuose įvertinti ir turi būti atliekamas prieš KRAS analizę.

- Paruoškite mėginius, kaip aprašyta skyriuje „Protokolas: DNR mėginio įvertinimas“, 15 psl.
- Nustatykite PGR tyrimą „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu, kaip aprašyta skyriuje „Protokolas: „*therascreen* KRAS PCR RGQ“ rinkinio nustatymas“, 76 psl.
- Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis pagal instrukcijas, pateiktas skyriuje „Mėginių įvertinimo duomenų analizė“, 80 psl.

Protokolas: KRAS mutacijos aptikimas (neautomatinis)

Atlikus mėginio įvertinimą, jį galima tirti, norint nustatyti KRAS mutacijas.

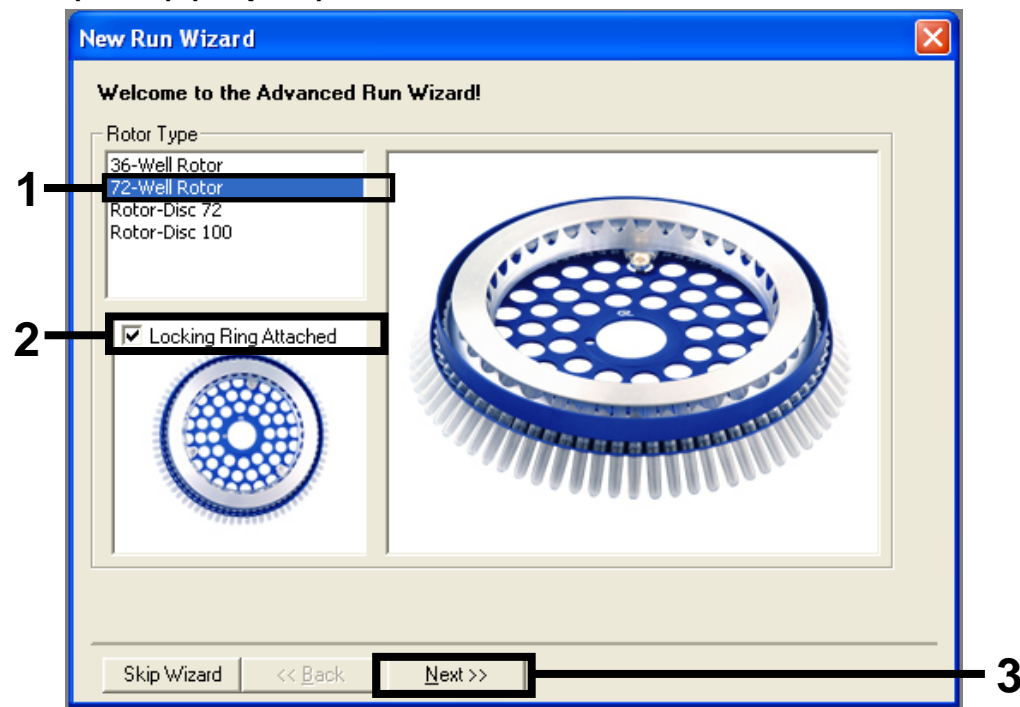
- Paruoškite mėginius, kaip aprašyta skyriuje „Protokolas: KRAS mutacijų aptikimas“, 27 psl.
- Nustatykite PGR tyrimą „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu, kaip aprašyta skyriuje „Protokolas: „*therascreen* KRAS PCR RGQ“ rinkinio nustatymas“, 76 psl.
- Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis pagal instrukcijas, pateiktas skyriuje „KRAS mutacijų aptikimo analizė“, 81 psl.

Protokolas: „*therascreen* KRAS PCR RGQ“ rinkinio nustatymas

1. Atidarykite „Rotor-Gene Q“ serijos programinės įrangos 2.3 versiją ir atitinkamą sukurtą temperatūros profilį.

Sukurkite temperatūros profilį pagal „Protokolas: temperatūros profilio sukūrimas“, 67 psl.

2. Įsitinkinkite, kad pasirinktas tinkamas rotorius, ir pažymėkite langelį, patvirtinantį, kad uždėtas fiksuojamasis žiedas. Spustelėkite „Next“ (Kitas) (33 pav.).



33 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys) ir darbo pradžios ekranas. 1 = „Rotor type“ (Rotoriaus tipas); 2 = laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas); 3 = „Next“ (Kitas).

3. Įveskite operatoriaus vardą. Įtraukite pastabų, patikrinkite, kad reakcijos tūris būtų nustatytas kaip 25, o „Sample Layout“ (Mėginio išdėstymas) būtų „1, 2, 3...“. Spustelėkite „Next“ (Kitas) (34 pav.).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. It has a blue title bar with the text 'New Run Wizard' and a close button. The main area is light gray and contains the following elements:

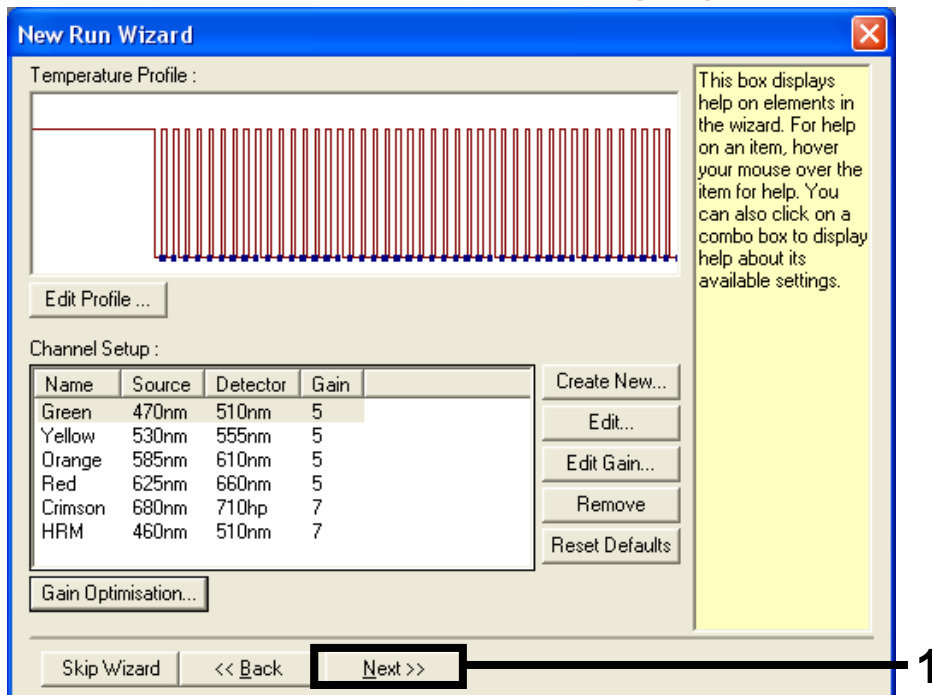
- Instructional text: "This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page."
- Operator field: A text box with the label "Operator :" and the value "NAME".
- Notes field: A large empty text area with the label "Notes :".
- Reaction Volume field: A spinner box with the label "Reaction Volume (µL):" and the value "25".
- Sample Layout field: A dropdown menu with the label "Sample Layout :" and the value "1, 2, 3...".
- Buttons: "Skip Wizard", "<< Back", and "Next >>".
- Help box: A yellow box on the right with the text: "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."

Three numbered callouts are present:

- 1: Points to the Operator and Notes fields.
- 2: Points to the Reaction Volume and Sample Layout fields.
- 3: Points to the Next button.

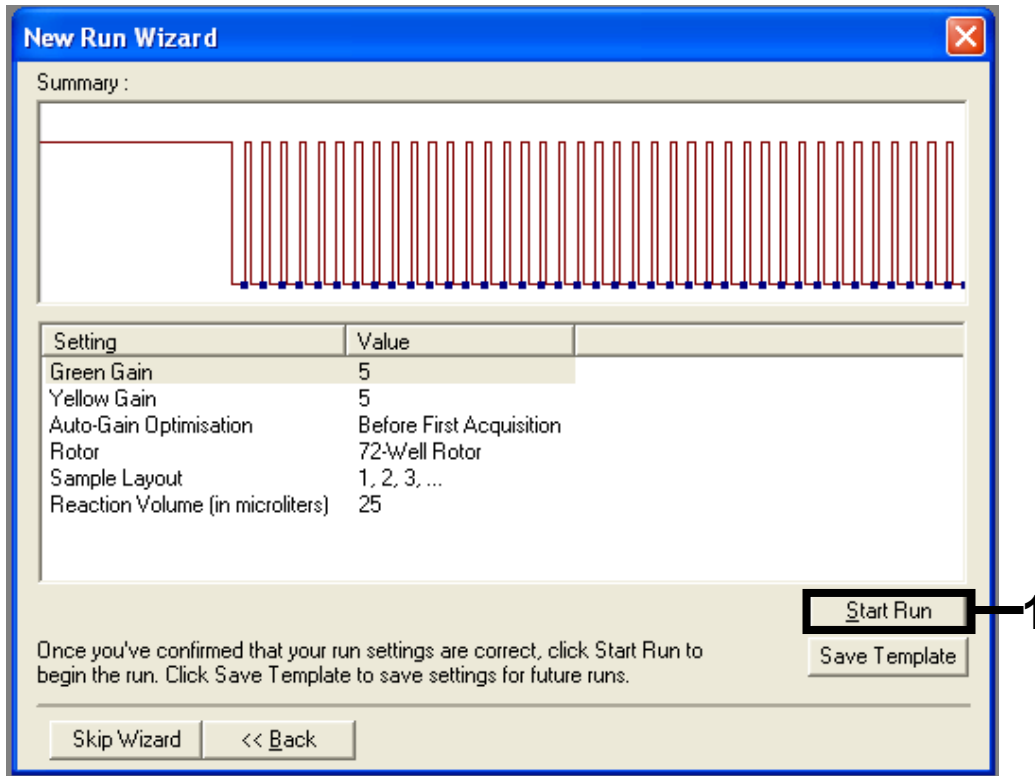
34 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys). 1 = laukai „Operator“ (Operatorius) ir „Notes“ (pastabos), 2 = laukai „Reaction Volume“ (Reakcijos tūris) ir „Sample Layout“ (Mėginių išdėstymas), 3 = „Next“ (Kitas).

4. Kitam lange galima redaguoti temperatūros profilį. Redaguoti nebūtina, nes temperatūros profilis buvo sukurtas pagal instrukcijas, pateiktas skyriuje „Protokolas: temperatūros profilio sukūrimas“, 67 psl. Spustelėkite „Next“ (Kitas) (35 pav.).



35 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys) ir temperatūros redagavimo ekranas. 1 = „Next“ (Kitas).

- Patikrinkite suvestinę, tada spustelėkite „Start Run“ (Pradėti tyrimų seriją), įrašykite tyrimų serijos failą ir pradėkite tyrimų seriją (36 pav.).



36 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys). 1 = „Start Run“ (Pradėti tyrimų seriją).

- Prasidėjus tyrimų serijai pasirodo naujas langas, kuriame dabar galite įvesti mėginių pavadinimus arba spustelėti „Finish“ (Baigti) ir įvesti juos vėliau, tyrimo sekos vykdymo metu arba tyrimų sekai pasibaigus pasirinkę mygtuką „Sample“ (Mėginys).

Jei spustelėsite „Finish and Lock Samples“ (Baigti ir užrakinti mėginius), nebegalėsite redaguoti mėginių pavadinimų. Vartotojas turėtų itin atidžiai įvesti mėginių pavadinimus, kad būtų užtikrintas tinkamas mėginių tyrimas ir analizė.

Pastaba: įvedant mėginių pavadinimus, tuščių šulinėlių laukai stulpelyje „Name“ (Pavadinimas) turi būti palikti tušti.

- Pabaigę tyrimų seriją analizuokite duomenis, kaip nurodyta skyriuje „Mėginių įvertinimo duomenų analizė“, 80 psl., arba „KRAS mutacijų aptikimo analizė“, 81 psl.
- Jei reikia kiekybinių ataskaitų, „Rotor-Gene Q“ tyrimo failo įrankių juostoje spustelėkite piktogramą „Reports“ (Ataskaitos).

Rezultatų aiškinimas (neautomatinis)

Pabaigę mėginių įvertinimo arba mutacijų analizės tyrimus, analizuokite duomenis pagal toliau pateiktą procedūrą.

Programinės įrangos analizės nustatymai

1. Atidarykite atitinkamą failą naudodami „Rotor-Gene Q“ serijos programinės įrangos versiją 2.3.
2. Jei prieš atliekant tyrimą mėginiams nebuvo suteiktas pavadinimas, spustelėkite „Edit Samples“ (Redaguoti mėginius).
3. Stulpelyje „Name“ (Pavadinimas) įterpkite mėginių pavadinimus.
4. Spustelėkite „Analysis“ (Analizė). Analizės puslapyje spustelėkite „Cycling A. Yellow“ (A Ciklas. Geltona) ir peržiūrėkite HEX kanalą.
5. Spustelėkite „Named On“ (Pavadinta).
Pastaba: taip užtikrinama, kad tušti šulinėliai nebūtų įtraukti į analizę.
6. Pasirinkite „Dynamic Tube“ (Dinaminis mėgintuvėlis).
7. Pasirinkite „Linear Scale“ (Linijinė skalė).
8. Spustelėkite „Outlier Removal“ (Išsiskiriančiojo pašalinimas) ir kaip „NTC Threshold“ (NTC slenkstis) įveskite „10%“.
9. Nustatykite slenksčio reikšmę 0,05 ir patikrinkite HEX C_T reikšmes.
10. Analizės puslapyje spustelėkite „Cycling A. Green“ (A Ciklas. Žalia), kad peržiūrėtumėte FAM kanalą.
11. Patikrinkite, ar pažymėtas „Dynamic Tube“ (Dinaminis mėgintuvėlis). Spustelėkite „Linear Scale“ (Linijinė skalė).
12. Spustelėkite „Outlier Removal“ (Išsiskiriančiojo pašalinimas) ir kaip „NTC Threshold“ (NTC slenkstis) įveskite „10%“.
13. Nustatykite slenksčio reikšmę 0,05 ir patikrinkite FAM C_T reikšmes.

Mėginių įvertinimo duomenų analizė

Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė

Žr. tyrimo kontrolinės medžiagos analizės schemą, parodytą 37 paveikslėlyje, 82 psl.

- **Neigiamos kontrolinės medžiagos:** norint užtikrinti, kad nebūtų reakcijų mišinio užteršimo, žaliame kanale neturi būti generuojama kontrolinės medžiagos be matricos C_T reikšmė, mažesnė nei 40. Norint užtikrinti tinkamą plokštelės nustatymą, NTC turi rodyti amplifikaciją 31,91–35,16 geltoname kanale. Nurodytos reikšmės turi patekti į šį diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes.
- **Teigiama kontrolinė medžiaga:** atliekant kiekvieną iš 8 tyrimų, KRAS teigiama kontrolinė medžiaga (PC) turi pateikti C_T reikšmę 23,5–29,5

žaliame kanale. Nurodytos reikšmės turi patekti į šį diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes. Reikšmė, nepatenkanti į šias ribas, nurodo tyrimo nustatymo problemą, todėl tyrimas yra klaidingas.

Pastaba: mėginio duomenų naudoti negalima, jei nepavyko kuri nors iš dviejų kontrolinių medžiagų tyrimų serijų.

Jei abi tyrimų sekos galioja, visos mėginio C_T reikšmės turi patekti į 21,92–32,00 diapazoną žaliame kanale. Toliau pateikiamos rekomendacijos, jei mėginio reikšmė nepatenka į šį diapazoną.

Mėginio analizė – kontrolinis tyrimas

- **< 21,92 mėginio kontrolinio tyrimo C_T :** mėginius, kurių kontrolinės medžiagos $C_T < 21,92$, reikia atskiesti, nes tai nurodo patvirtinto tyrimo diapazono apatinę ribą. Norėdami peržiūrėti kiekvieną nedidelio lygio mutaciją, per daug koncentruotus mėginius atskieskite taip, kad jų reikšmės patektų į anksčiau nurodytą diapazoną ir praskiedus per pusę C_T padidėtų 1. Jei mėginio reikšmė arti 21,92, rekomenduojama atskiesti, norint užtikrinti, kad atliekant mėginio tyrimų (KRAS mutacijų aptikimo) seriją būtų gautas rezultatas. Mėginius reikia skiesti rinkinyje pateiktu vandeniu (vandeniu be nukleazės skiedimui [Dil.]).
- **> 32 mėginio kontrolinio tyrimo C_T :** rekomenduojama pakartotinai išgauti mėginį, nes bus nepakankamai pradinės DNR matricos, kad būtų galima aptikti visas mutacijas esant nurodytoms ribinėms tyrimo reikšmėms.

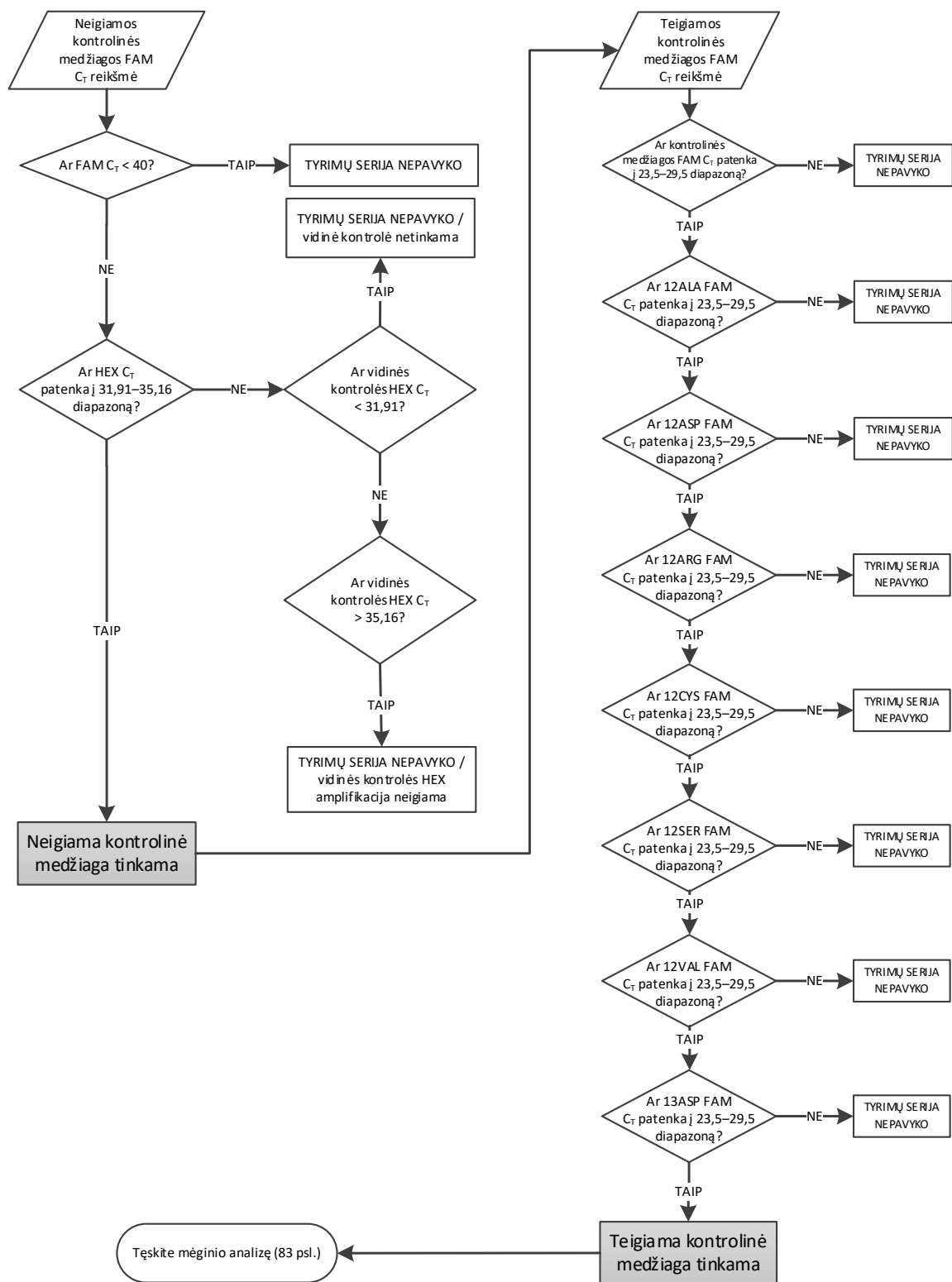
KRAS mutacijų aptikimo analizė

Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė

Žr. tyrimo kontrolinės medžiagos analizės schemą (37 pav., 82 psl.).

- **Neigiamos kontrolinės medžiagos:** norint užtikrinti, kad nebūtų reakcijų mišinio užteršimo, žaliame kanale neturi būti generuojama kontrolinės medžiagos be matricos C_T reikšmė, mažesnė nei 40. Norint užtikrinti tinkamą plokštelės nustatymą, NTC turi rodyti amplifikaciją 31,91–35,16 geltoname kanale. Nurodytos reikšmės turi patekti į šį diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes.
- **Teigiama kontrolinė medžiaga:** atliekant kiekvieną iš aštuonių tyrimų, KRAS teigiama kontrolinė medžiaga (PC) turi pateikti C_T reikšmę 23,5–29,5 žaliame kanale. Nurodytos reikšmės turi patekti į šį diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes. Reikšmė, nepatenkanti į šias ribas, nurodo tyrimo nustatymo problemą, todėl tyrimas yra klaidingas.

Pastaba: mėginio duomenų naudoti negalima, jei nepavyko kuri nors iš dviejų kontrolinių medžiagų tyrimų serijų.



37 pav. Tyrimo kontrolinės medžiagos analizės schema.

Mėginių analizė

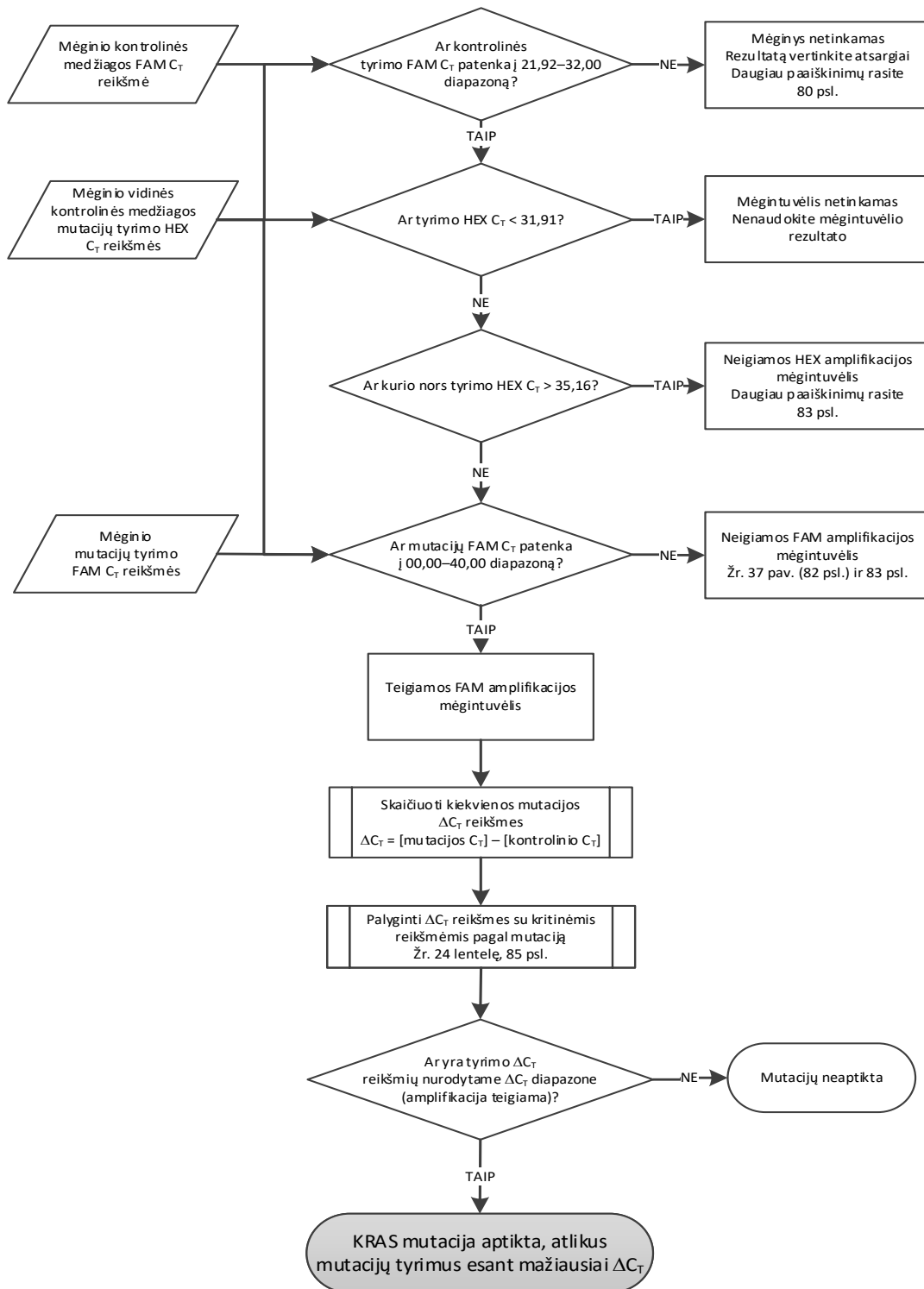
Žr. mėginio analizės schemą, parodytą 38 paveikslėlyje, 84 psl.

Mėginio kontrolinės medžiagos FAM C_T reikšmė

Jei kontrolinio tyrimo abi kontrolinės medžiagos tinkamos, visos mėginio kontrolinės medžiagos C_T reikšmės turi patekti į 21,92–32,00 diapazoną žaliame kanale.

Toliau pateikiamos rekomendacijos, jei mėginio reikšmė nepatenka į šį diapazoną.

- **< 21,92 mėginio kontrolinio tyrimo C_T**: mėginiai, kurių kontrolinės medžiagos C_T reikšmė yra < 21,92, perkraus mutacijos tyrimus, todėl juos reikia atskiesti. Norėdami peržiūrėti kiekvieną nedidelio lygio mutaciją, per daug koncentruotus mėginius atskieskite taip, kad jų reikšmės patektų į anksčiau nurodytą diapazoną ir praskiedus per pusę C_T padidėtų 1. Mėginius reikia skiesti rinkinyje pateiktu vandeniu (vandeniu be nukleazės skiedimui [Dil.]).
- **> 32 mėginio kontrolinio tyrimo C_T**: aiškinkite atsargiai, nes labai nedidelio lygio mutacijos gali būti neaptinkamos.



38 pav. Mėginio analizės schema.

Mėginio vidinės kontrolinės medžiagos mutacijų tyrimo HEX C_T reikšmė

Žr. mėginio analizės schemą, parodytą 38 paveikslėlyje, 84 psl.

Turi būti išanalizuoti visi kiekvieno mėginio šulinėliai. Patikrinkite, ar kiekvienas šulinėlis generuoja HEX signalą iš vidinės kontrolinės medžiagos. Galimi 3 variantai.

- Jei vidinės kontrolinės medžiagos C_T patenka į nurodytą (31,91–35,16) diapazoną, HEX amplifikacija teigiama.
- Jei vidinės kontrolinės medžiagos C_T yra virš nurodyto (> 35,16) diapazono, HEX amplifikacija neigiama.
- Jei vidinės kontrolinės medžiagos C_T yra žemiau nurodyto (< 31,91) diapazono, HEX amplifikacijos rezultatas netinkamas.

Jei vidinės kontrolinės medžiagos reakcija nepavyksta dėl PGR inhibicijos, inhibitorių poveikį galima sumažinti praskiedus mėginį, tačiau reikia atminti, kad praskiedžiama ir tikslinė DNR. Rinkinyje yra vandens, skirto mėginiams skiesti, mėgintuvėlis („Dil.“).

Mėginio mutacijų tyrimo FAM C_T reikšmė

Visų 7 mutacijų reakcijų mišinių FAM reikšmes reikia patikrinti pagal 24 lentelėje pateiktas reikšmes.

23 lentelė. Priimtinos mėginio mutacijų reakcijos reikšmės (FAM)*

Tyrimas	Priimtinas C _T diapazonas	ΔC _T diapazonas
12ALA	0,00–40,00	≤ 8,00
12ASP	0,00–40,00	≤ 6,60
12ARG	0,00–40,00	≤ 8,00
12CYS	0,00–40,00	≤ 8,00
12SER	0,00–40,00	≤ 8,00
12VAL	0,00–40,00	≤ 7,50
13ASP	0,00–40,00	≤ 7,50

* Priimtinos reikšmės yra patenkančios į diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes.

- Jei FAM C_T patenka į nurodytą diapazoną, FAM amplifikacija teigiama.
- Jei FAM C_T nepatenka į nurodytą diapazoną arba amplifikacijos nėra, FAM amplifikacija neigiama.

Apskaičiuokite kiekvieno mutacijos mėgintuvėlio, kuriame FAM amplifikacija yra teigiama, ΔC_T reikšmę, kaip parodyta, ir įsitikinkite, kad mutacijos ir kontrolinės medžiagos C_T reikšmės yra iš to paties mėginio.

$$\Delta C_T = [\text{mutacijos } C_T] - [\text{kontrolinio } C_T]$$

Palyginkite mėginio ΔC_T reikšmę su analizuojamo tyrimo kritinės ribos taško (24 lentelė) ir įsitikinkite, kad kiekvienam tyrimui taikomas tinkamas kritinės ribos taškas.

Kritinės ribos taškas yra taškas, kurio signalas gali būti teigiamas dėl laukinio tipo DNR ARMS pradmens foninio signalo. Jei mėginio ΔC_T yra didesnė nei kritinės ribos taško reikšmė, jis klasifikuojamas kaip neigiamas arba neaptinkamas naudojant šį rinkinį.

Pagal toliau nurodytus kriterijus bus nustatyta visų mėginių kiekvienos reakcijos būseną: mutacija aptikta, mutacija neaptikta arba netinkama.

Mutacija aptikta:

- FAM amplifikacija teigiama, o ΔC_T reikšmė yra ties kritinės ribos reikšme arba mažesnė. Jei aptinkamos kelios mutacijos, turi būti pateikta ta mutacija, kurios ΔC_T reikšmė mažiausia.

Mutacija neaptikta:

- FAM amplifikacija teigiama, o ΔC_T reikšmė yra didesnė už kritinės ribos reikšmę.
- FAM amplifikacija neigiama, o HEX (vidinės kontrolinės medžiagos) amplifikacija teigiama.

Netinkama:

- HEX (vidinė kontrolinė medžiaga) netinkama.
- FAM amplifikacija ir HEX amplifikacija neigiamos.

Jei mėginio HEX amplifikacija neigiama viename mėgintuvėlyje, bet kitame mėgintuvėlyje – FAM amplifikacija teigiama, kito mėgintuvėlio rezultatai „mutacija aptikta“ vis tiek galima laikyti tinkamu, bet negalima patikimai priskirti konkrečios nustatytos mutacijos.

- Jei mėginio HEX amplifikacija neigiama, o FAM amplifikacija teigiama tame pačiame mėgintuvėlyje, rezultatas „mutacija aptikta“ turi būti laikomas tinkamu.
- Jei mėgintuvėlyje HEX (vidinė kontrolinė medžiaga) netinkama, to mėgintuvėlio reikia nenaudoti.

Mėginio mutacijos būsenos priskyrimas

Įvertinus visus mutacijų reakcijų mėgintuvėlius, mėginio mutacijos būseną nustatoma taip:

- **Mutacija aptikta:** viena ar kelios iš 7 mutacijų reakcijų yra teigiamos. Jei aptinkamos kelios mutacijos, turi būti pateikta ta mutacija, kurios ΔC_T reikšmė mažiausia.
- **Mutacija neaptikta:** visos 7 mutacijų reakcijos yra neigiamos.
- **Netinkama:** nė viena iš mutacijų reakcijų nėra teigiama, o viena ar kelios yra netinkamos.

Pastaba: „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys skirtas mutacijoms DNR mėginio KRAS gene aptikti. Kai mėginyje aptinkama KRAS mutacija, reikia pateikti tik vieną konkrečią mutaciją. Jei aptinkamos kelios mutacijos, turi būti pateikta ta mutacija, kurios ΔC_T reikšmė mažiausia.

Tarp mutacijos reakcijų gali įvykti kryžminių reakcijų. Pavyzdžiui, jei aptinkama aukšto lygio 12ALA mutacija, kai kurių kitų mutacijų reakcijų rezultatai taip pat gali būti teigiami. Taip yra dėl to, kad ARMS pradmenys aptinka kitas viena į kitą panašių sekų mutacijas. Jei antro mutacijos tyrimo rezultatas teigiamas, greičiausiai yra kryžminė reakcija. Dvigubos mutacijos aptinkamos, bet jos yra retos.

Jei viena ar kelios mutacijų reakcijos yra netinkamos, bet viena ar kelios yra teigiamos, vis tiek galima sakyti, kad mėginyje KRAS mutacija aptikta, nes ši mutacija jame yra. Tačiau pateikta konkreti mutacija gali būti netiksli ir gali būti kryžminės reakcijos rezultatas. Todėl mėginį reikia įvardyti tik kaip „KRAS mutacija aptikta“.

2 priedas „*therascreen* KRAS Assay Package“ diegimas

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinys skirtas naudoti su „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu su 72 šulinėlių rotoriumi. „*therascreen* KRAS Assay Package“ pateikiamas atskirai CD (kat. Nr. 9022641).

„*therascreen* KRAS Assay Package“ galima atsisiųsti iš atitinkamo „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio produkto tinklalapio www.qiagen.com svetainėje. Atsisiuntimo informaciją galima rasti skyriaus „Product Resources“ (Produktų ištekliai) skirtuke „Supplementary Protocols“ (Papildomi protokolai). Tyrimų paketus galima užsisakyti ir CD diske.

Pakete yra „*therascreen* KRAS CE QC Locked Template“ ir „*therascreen* KRAS CE Locked Template“.

Pastaba: „*therascreen* KRAS Assay Package“ versija 3.1.1 (QIAGEN, kat. nr. 9023675) veikia tik su atitinkama „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos versija 2.3. Prieš pradėdami „*therascreen* KRAS Assay Package“ diegimą įsitikinkite, kad įdiegta tinkama „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos versija.

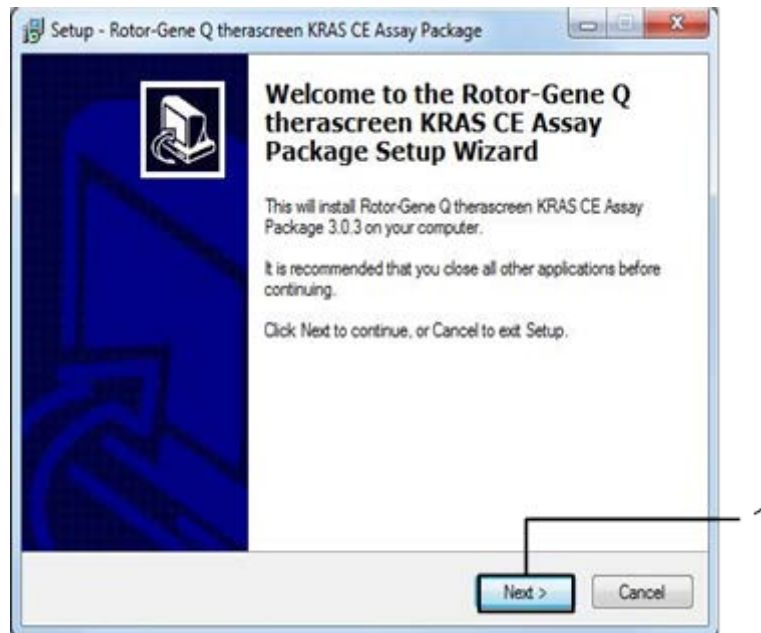
Procedūra (atsisiuntimas)

1. Atsisiųskite „*therascreen* KRAS RGQ Assay Package“ iš atitinkamo „*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio produkto tinklalapio www.qiagen.com svetainėje.
2. Dukart spustelėję atidarykite atsisiųsta „zip“ failą ir išskleiskite archyve esantį failą.
3. Pradėkite diegti dukart spustelėję išskleistą failą „*therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe*“.

Procedūra (CD)

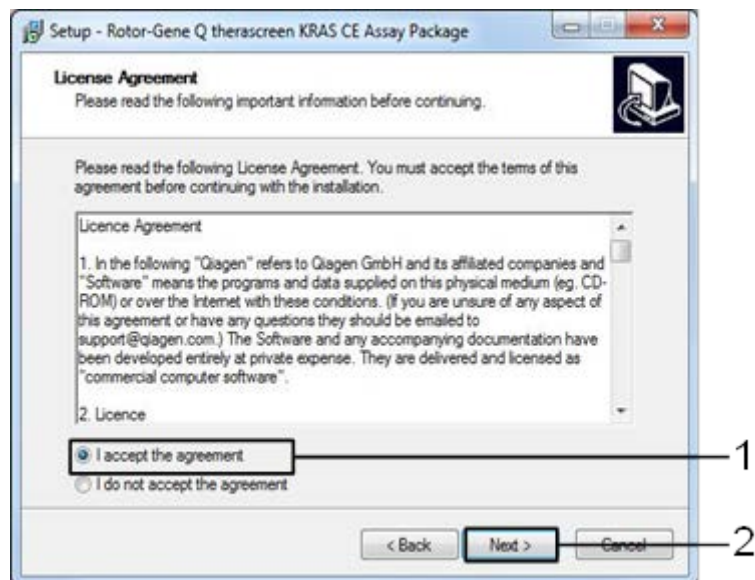
1. Užsakykite „*therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE“ CD diską, suderinamą su įdiegta „Rotor-Gene Q“ programine įranga (žr. anksčiau pateiktą informaciją), kuri gaunama atskirai iš QIAGEN. 3.1.1 versija. Kat. Nr. 9023675.
2. Įdėkite CD į nešiojamojo kompiuterio, prijungto prie „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento, CD įrenginį.
3. Pradėkite diegti dukart spustelėdami *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe*
ARBA
therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe.

4. Bus rodomas nustatymo vedlys. Norėdami tęsti spustelėkite „Next“ (Kitas) (39 pav.).



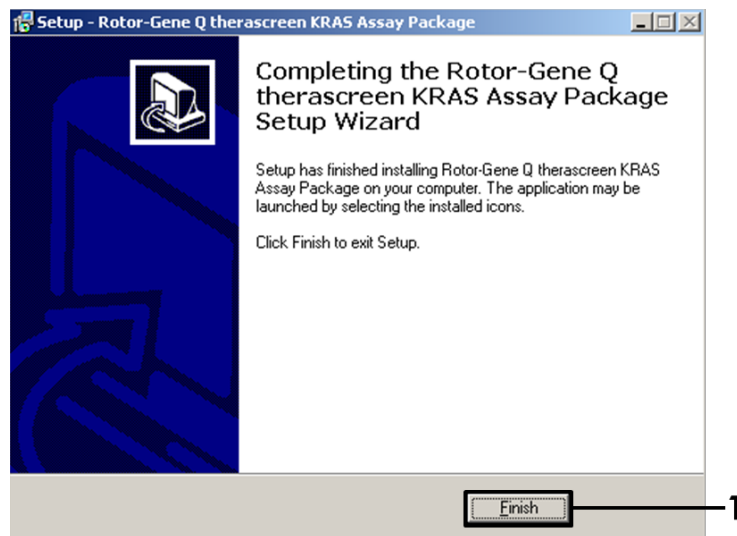
39 pav. Dialogo langas „Setup“ (Nustatymas). 1 = „Next“ (Kitas).

5. Dialogo lange „License Agreement“ (Licencijos sutartis) perskaitykite licencijos sutartį ir sutikite su jos sąlygomis pažymėję teiginį „I accept the agreement“ (Sutinku su sutarties sąlygomis). Norėdami tęsti spustelėkite „Next“ (Kitas) (40 pav.).



40 pav. Dialogo langas „License Agreement“ (Licencijos sutartis). 1 = „I accept the agreement“ (Sutinku su sutarties sąlygomis), 2 = „Next“ (Kitas).

6. Šablono nustatymas bus pradėtas automatiškai ir bus rodomas galutinis „Setup“ (Nustatymo) dialogo langas. Spustelėkite „Finish“ (Baigti), kad išeitumėte iš nustatymo vedlio (41 pav.).



41 pav. Nustatymo vedlio darbo užbaigimas.

7. Paleiskite kompiuterį iš naujo. Bus automatiškai sukurtos „therascreen KRAS QC Locked Template“ ir „therascreen KRAS Locked Template“ nuorodos ir rodomos darbalaukyje.

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	24 reakcijoms: 1 kontrolinis tyrimas, 7 mutacijų tyrimai, teigiama kontrolinė medžiaga, vanduo, <i>Taq</i> DNR polimerazė	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (3.1.1 versija)	Programinės įrangos protokolų paketas, skirtas naudoti su „ <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR“ rinkiniu ir „QIAGEN Rotor-Gene Q MDx“ instrumentu su 72 šulinėlių rotoriumi	9023675
„Rotor-Gene Q“ ir priedai		
Rotor-Gene Q MDx	Realiojo laiko PGR ciklą valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui. Diegimas ir mokymas neįtraukti	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Realiojo laiko PGR ciklą valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, diegimas ir mokymas	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete 72 x 0,1 ml mėgintuvėliuose	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 1 000 reakcijų	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 10 000 reakcijų	981106

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
„QIAamp DNA FFPE Tissue“ rinkinys, skirtas genominei DNR išgryninti iš parafine esančių audinių		56404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR paruoš.: „QIAamp MinElute®“ cilindry, proteinazė K, buferiniai tirpalai ir surinkimo mėgintuvėliai (2 ml)	

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų produktų garantinių įsipareigojimų atsisakymai pateikti atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovai arba naudotojo vadovai pateikti adresu www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninių tarnybų ar vietinio platintojo.

Peržiūros istorija

Dokumento peržiūros istorija	
R4 01/2019	Pridėtas įgaliotasis atstovas (priekinis viršelis). Atnaujintas skyrius „Simboliai“. Atnaujinta matrica.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias.

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias.

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

Registruotieji pavadinimai, prekių ženklai ir t. t., naudojami šiame dokumente, net jei specialiai nepažymėti kaip tokie, neturi būti laikomi nesaugomais įstatymo.

Netinka naudoti tiriant išmatų mėginius.

Netinka naudoti tiriant šlapimo mėginius.

Netinka naudoti tiriant iš kraujo mėginio išgautą neląstelinę nukleino rūgštį.

Netinka naudoti tiriant kaulų čiulpu be ląstelių mėginius.

Netinka naudoti tiriant seilių mėginius.

ĮSIGIJUSIAM ŠĮ PRODUKTĄ PIRKĖJUI SUTEIKIAMOS TEISĖS PAGAL KONKREČIUS „ROCHE“ PATENTUS NAUDOTI JĮ IŠIMTINAI TIK TEIKIANT ŽMOGAUS „IN VITRO“ DIAGNOSTIKOS PASLAUGAS. JOKS BENDRAS PATENTAS AR KITA LICENCIJA, IŠSKYRUS ŠIĄ KONKREČIĄ ĮSIGIJIMO SUTEIKIAMĄ TEISĘ, NESUTEIKIAMA.

„*therascreen* KRAS RGQ PCR“ rinkinio ribotosios licencijos sutartis

Šio produkto naudojimas reiškia pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, esančiuose www.qiagen.com. QIAGEN vartotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis komplektas ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Komplektui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Komplekto pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo komplektu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Naujausios licencijos sąlygos pateiktos adresu www.qiagen.com.

HB-1861-004 1116068 01-2019 © 2019 QIAGEN. Visos teisės saugomos.

Užsakymas www.qiagen.com/contact | Techninė pagalba support.qiagen.com | Svetainė www.qiagen.com

