

Nisan 2022

therascreen[®] KRAS RGQ PCR Kit Kullanım Talimatları (El Kitabı)



24

Sürüm 1

IVD

Kalitatif in vitro tanı amaçlı

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

QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit ile kullanım içindir



REF

874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALMANYA

R6

MAT

1127513TR

İçerik

Kullanım Amacı	4
Özet ve Açıklama	5
Prosedür Prensipleri	6
Sağlanan Materyaller.....	10
Kit içeriği	10
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller	11
Uyarılar ve Önlemler.....	13
Güvenlik bilgileri	13
Genel önlemler	13
Reaktif Saklama ve Kullanma	15
Numune Alma, Analize Hazırlama ve Saklama	16
Prosedür	18
Protokol: DNA örneğinin değerlendirilmesi	21
Sonuçların Yorumlanması (Manuel)	33
Yazılım analiz ayarları	33
Örnek değerlendirme veri analizi	34
Örnek analizi	37
Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti	43
Sonuçların Yorumlanması	57
Analiz ve mutasyon sonuçları	57
Sınırlamalar	59
Performans Özellikleri	60

Analitik Performans	60
Eşik Değer.....	60
Kör sınırı.....	61
Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma: CRC	61
Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma: NSCLC	64
Tespit sınırı (Limit of detection, LOD).....	66
DNA girişi ve doğrusalılık	67
Olumsuz etkileyen maddeler	72
Çapraz kontaminasyon	73
Münhasırlık/çapraz reaktivite.....	73
Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik	76
Örnek kullanım değişkenliği	89
Örnek alma yöntemlerinin eşdeğerliği (yalnızca NSCLC)	91
Klinik Performans	94
Sorun Giderme Kılavuzu	101
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package tarafından oluşturulan işaretler.....	102
Kalite Kontrol	108
Referanslar	109
Semboller	112
İletişim Bilgileri.....	113
Ek 1: <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokolü	114
Ek 2: <i>therascreen</i> KRAS Assay Package'ın kurulumu.....	131
Sipariş Bilgileri.....	135
Belge Revizyon Geçmişi.....	137

Kullanım Amacı

therascreen[®] KRAS RGQ PCR Kit, insan KRAS onkojeninin kodon 12 ve 13'ünde 7 somatik mutasyonun Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı kullanılarak tespit edilmesine yönelik bir kalitatif real-time PCR tahlilidir. Kit, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE), kolorektal kanser (Colorectal Cancer, CRC) dokusu veya küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) örneklerinden kazıma, kalın iğne biyopsisi (Core Needle Biopsy, CNB) ya da ince iğne aspirasyonu (Fine Needle Aspiration, FNA) yöntemi ile alınan ekstrakte edilmiş DNA ile kullanım içindir.

KRAS genindeki somatik mutasyonlar, CRC tedavisinde kullanılan panitumumab ve setuksimab gibi epidermal büyüme faktörü reseptörüne (Epidermal Growth Factor, EGFR) yönelik tedavilerin potansiyel belirleyici direnç biyobelirteçleridir. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ayrıca, saptanan bir KRAS G12C mutasyonu sonucuna dayalı olarak sotorasib (LUMYKRAS[®]) ile tedavi için NSCLC hastalarının belirlenmesinde yardımcı olarak kullanıma yöneliktir.

KRAS genindeki somatik mutasyonlar aynı zamanda, diğer NSCLC tedavileri için karar almada kullanılan potansiyel belirleyici biyobelirteçler olarak da karşımıza çıkabilir.

Hastanın mutasyon durumu, tedavi kararının verilmesi adına, diğer hastalık faktörleriyle beraber bir klinisyen tarafından değerlendirilecektir. Kanser hastaları için, yalnızca KRAS mutasyon durumuna dayanarak bir tedavi kararı verilemez.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, CRC, NSCLC veya diğer bir hastalığı tanılama amaçlı kullanılmaz.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, in vitro tanı amaçlı bir tıbbi cihazdır.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, profesyonel bir laboratuvar ortamında eğitimli personel tarafından kullanıma yöneliktir.

Özet ve Açıklama

KRAS onkogenindeki mutasyonlar, insan kanserlerinde sıklıkla görülür (1-4). ARMS® (Allel Refrakter Mutasyon Sistemi) ve Scorpions® teknolojilerini kullanan (5, 6) *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, KRAS onkogenindeki 12 ve 13 kodonlarında yabancı tip genomik DNA arka planına kıyasla görülen 7 mutasyonun tespit edilmesini sağlar (Tablo 1). COSMIC veri tabanındaki verilere dayalı olarak (2015 v72), *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile tespit edilen 7 mutasyon, CRC hastalarında bildirilen tüm KRAS mutasyonlarının > %95'ini ve NSCLC hastalarında bildirilen tüm mutasyonların > %88'ini oluşturmaktadır (7).

Tablo 1. Mutasyon listesi ve COSMIC tanımları

Mutasyon	Baz değişimi	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'ler *Kanserdeki Somatik Mutasyonların Kataloğu*'ndan (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) alınabilir.

Test, yüksek oranda spesifik ve hassastır; yabancı tip DNA arka planına kıyasla görülen mutant DNA oranının düşük yüzdeli olsa bile tespit edilmesini sağlar. Yeterli sayıda DNA kopyası olduğu takdirde, yabancı tip genomik DNA arka planında %0,8 mutant tespit edilmesi mümkündür.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) prosedüründe kullanılır. Bu kitin avantajı, hedefe yönelik olarak yüksek oranda spesifik olmasının yanı sıra, sonuçların belirlenmesinde öznellikten uzak bir şekilde hızlı ve verimli olmasıdır.

Prosedür Prensipleri

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, real-time PCR'da mutasyonların tespiti için 2 teknoloji – ARMS ve Scorpions – kullanır.

Mutasyon reaksiyon karışımları

Her bir reaksiyon karışımı, mutasyona uğramış DNA'nın seçimli olarak çoğaltılması için mutasyon spesifik bir ARMS primeri, sonrasında ise amplifikasyon ürününün tespiti için bir Scorpions primer kullanır.

ARMS

Allele özgü amplifikasyon, PCR primerin 3' ucundaki eşleşen ve eşleşmeyen tabanın ayrıştırılması amacıyla, *Taq* DNA polimerazının yetisini kullanan ARMS tarafından gerçekleştirilir. Primer tam olarak eşleştiğinde, amplifikasyon tam verimlilikle ilerler. 3' baz eşleşmesi olmadığında, yalnızca düşük düzeyli arka plan amplifikasyonu oluşabilir. Bu şekilde, örneklerdeki DNA'nın büyük çoğunluğu mutasyon taşıyor olduğunda bile, mutasyona uğramış sıra seçimli olarak çoğaltılır.

Scorpions

Amplifikasyonun tespiti Scorpions primerler kullanılarak gerçekleştirilir. Scorpions primerler bir proba kovalent olarak bağlı PCR primerini içeren iki işlevli moleküllerdir. Prob, florofor karboksifloresin (FAM™) ve bir baskılayıcı molekül içerir. Baskılayıcı molekül, floroforun floresan ışımmasını söndürür. Prob, PCR esnasında ARMS amplikonuna bağlandığında, florofor ve baskılayıcı molekül ayrılır, bu da floresan ışımının belirgin şekilde yükselmesine yol açar.

Kit formatı

therascreen KRAS RGQ PCR Kit 8 tahlil içerir:

- 1 kontrol tahlili (Kontrol Reaksiyon Karışımı [Control Reaction Mix, CTRL])
- 7 mutasyon tahlili (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Reaksiyon karışımları iki içeriğe sahiptir; hedefleri saptamak için FAM etiketli reaktifler ve dahili kontrolleri saptamak için HEX™ etiketli reaktifler içerir. Reaksiyon karışımları ve pozitif kontrol reaktifleri, Tris EDTA tamponu içerir, pozitif kontrol ise taşıyıcı Poli A RNA içerir.

Tahliller

therascreen KRAS RGQ PCR Kit 2 adımlı bir prosedürden oluşur. İlk adımda, örnekteki total çoğaltılabilir KRAS DNA'yı değerlendirmek için kontrol tahlili gerçekleştirilir. İkinci adımda, hem mutasyon hem de kontrol tahlilleri mutant DNA'nın olup olmadığını belirlemek için gerçekleştirilir.

Kontrol reaksiyonu

CTRL, KRAS geninin 4. eksonundaki kısa sırayı çoğaltmak için bir Scorpions primeri ve etiketlenmemiş bir primer kullanır. Kontrol reaksiyonu, örnekteki çoğaltılabilir DNA'nın yeterli düzeyde olup olmadığını belirlemede kullanılır ve mutasyon durumunu belirlemek için kullanılan analitik hesaplarda kullanılan bir faktördür.

Kontrol tahlili

FAM ile işaretli kontrol tahlili örnekteki total çoğaltılabilir KRAS DNA'yı değerlendirmek için kullanılır. Kontrol tahlili KRAS geninin ekson 4 bölgesini çoğaltır. Primerler ve Scorpions probu, bilinen herhangi bir KRAS polimorfizmini bağımsız olarak çoğaltmak için tasarlanmıştır.

Mutasyon tahlilleri

Her bir mutasyon tahlili yabancı tip DNA'nın ve spesifik mutant DNA'nın ayırt edilmesi için FAM işaretli Scorpions probu ve ARMS primeri içerir.

Kontroller

Not: Tüm deneysel çalışmalar pozitif ve negatif kontrolleri içermelidir.

Dahili kontrol

Her bir reaksiyon karışımı hedef reaksiyona ek olarak dahili kontrol içerir. Hata, yanlış sonuçlara yol açabilecek inhibitör varlığının olabileceğini veya bu tüp için operatör çalışma hazırlığı hatasının oluşmuş olduğunu gösterir. Dahili kontrol hatasının nedeni PCR inhibisyonuysa, örneğin dilüsyonu inhibitörlerin etkisini azaltabilir. Ancak, bu işlemin hedef DNA'yı da seyrelteceği göz önünde bulundurulmalıdır. Kitle birlikte bir tüp örnek dilüsyon suyu (Dil.) verilir. Örnek dilüsyonu, örnek dilüsyon suyu (Dil.) kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

Pozitif kontrol

Her bir çalışma 1-5 tüplerindeki pozitif bir kontrolü içermelidir. *therascreen* KRAS RGQ Kit, pozitif kontrol reaksiyonunda şablon olarak kullanılacak bir KRAS Pozitif Kontrolü (Positive Control, PC) içerir. Pozitif kontrol sonuçları kitin belirtilen kabul edilebilirlik kriterleri içinde çalıştığından emin olmak için değerlendirilir.

Negatif kontrol

Her bir çalışma, 9-13 tüplerinde bir negatif kontrol (Şablonsuz Kontrol) içermelidir. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, Şablonsuz Kontrol için şablon olarak kullanılacak NTC İçin Su (No Template Control, NTC) içerir. Şablonsuz Kontrol, çalışma hazırlığı sırasında herhangi bir potansiyel kontaminasyonu belirlemek ve dahili kontrol reaksiyon performansını değerlendirmek için kullanılır.

Örnek değerlendirmesi

Örnekteki total çoğaltılabilir KRAS DNA'yı değerlendirmek için *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile sağlanan Kontrol Reaksiyon Karışımı (CTRL) kullanılır. Kontrol tahlili KRAS geninin ekson 4 bölgesini çoğaltır. Örneklerin yalnızca, pozitif kontrol olarak KRAS Pozitif Kontrol (Positive Control, PC) ve Şablonsuz Kontrol olarak NTC Suyu kullanan kontrol tahlili ile ayarlanmasını öneririz.

Platform ve yazılım

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı ile birlikte kullanım için özel olarak tasarlanmıştır. Rotor-Gene Q Yazılımı ve *therascreen* KRAS Assay Package, www.qiagen.com adresinden indirilebilir veya CD'de ayrı olarak bulunabilir.

- Uyumlu RGQ yazılımı ve *therascreen* KRAS Assay Package sürümleri için bkz. Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller, sayfa 11.
- Cihazla ilgili bilgiler için cihazın kullanım kılavuzuna başvurun.
- Kontroller ve örneklere ilişkin işaretleri en aza indirmek için, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının Kurulum Prosedürleri ve tesis gereklilikleri doğrultusunda yerleştirilmesi ile ilgili olarak, *therascreen KRAS RGQ PCR Kit Kullanım Talimatları* belgesinde sunulan rehberliğe harfiyen uyulmalıdır.
- Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package kurulumu ile ilgili talimatlar için bkz. Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu, sayfa 131.

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazlarına, cihazın kullanım kılavuzundaki gereklilikler uyarınca bakım yapılmalıdır. Cihazla ilgili bilgiler için kullanım kılavuzuna başvurun. Kurulum talimatları için bkz. Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

therascreen KRAS RGQ PCR Kit				(24)
Katalog no.				874011
Terkip sayısı		Tüp tanımı		24
Renk	Kimlik			Hacim
Kırmızı	Control Reaction Mix (Kontrol Reaksiyon Karışımı)	1	CTRL	2 x 600 µl
Mor	12ALA Reaction Mix (12ALA Reaksiyon Karışımı)	2	12ALA	600 µl
Turuncu	12ASP Reaction Mix (12ASP Reaksiyon Karışımı)	3	12ASP	600 µl
Pembe	12ARG Reaction Mix (12ARG Reaksiyon Karışımı)	4	12ARG	600 µl
Yeşil	12CYS Reaction Mix (12CYS Reaksiyon Karışımı)	5	12CYS	600 µl
Sarı	12SER Reaction Mix (12SER Reaksiyon Karışımı)	6	12SER	600 µl
Gri	12VAL Reaction Mix (12VAL Reaksiyon Karışımı)	7	12VAL	600 µl
Mavi	13ASP Reaction Mix (13ASP Reaksiyon Karışımı)	8	13ASP	600 µl
Bej	KRAS Positive Control (KRAS Pozitif Kontrol)	9	PC	250 µl
Nane Yeşili	Taq DNA Polymerase (Taq DNA Polimeraz)		<i>Taq</i>	80 µl
Beyaz	Water for NTC (NTC İçin Su)		NTC	1,9 ml
Beyaz	Water for Sample Dilution (Örnek Dilüsyon Suyu)		Dil.	1,9 ml
therascreen KRAS RGQ PCR Kit El Kitabı (İngilizce)				1

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden temin edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (Safety Data Sheets, SDS'ler) başvurun.

Reaktifler

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat. no. 56404)
- Ksilen
- Etanol (%96-100)*

Sarf Malzemeleri

- Filtreli steril pipet uçları (çapraz kontaminasyonu önlemek için aerosol bariyerli pipet uçlarını öneriyoruz)
- Master karışımları hazırlamak için steril mikrosantrifüj tüpleri
- 72-well rotor ile birlikte kullanım için 0.1 ml Strip Tubes and Caps (kat. no. 981103 veya 981106)

Ekipman

- Cycling Green ve Cycling Yellow (sırasıyla FAM ve HEX tespiti) için floresan kanallı Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM
- Otomatik mutasyon tespiti için KRAS Assay Package (sürüm 3.0.3) yüklü Rotor-Gene Q yazılımı sürüm 2.3.1 veya üzeri

Not: Manuel mutasyon tespiti için Rotor-Gene Q yazılımı, KRAS Assay Package olmadan kullanılabilir. Bkz. Ek 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokolü.

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

-
- Termomikser*, ısıtılmal orbital inkübatör, ısıtma bloğu veya 56°C ve 90°C dahilinde inkübasyon sağlayabilen su banyosu
 - 1,5 ml tüp için rotora sahip masaüstü santrifüj†
 - Masaüstü tüp karıştırıcı†
 - Örnek hazırlığı için özel pipetler (ayarlanabilir)†
 - PCR master karışım hazırlığı için özel pipetler (ayarlanabilir)*
 - Şablon DNA'nın dağıtımı için özel pipetler (ayarlanabilir)*

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

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

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım içindir

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

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ile kullanım içindir

Güvenlik bilgileri

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

Genel önlemler

Kullanıcı, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'i kullanırken aşağıdaki hususlara mutlaka dikkat etmelidir:

- Test, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş doku numuneleriyle kullanım içindir.
- Tüm kimyasallar ve biyolojik materyaller potansiyel olarak tehlikeli maddedir. Numuneler ve örnekler potansiyel olarak enfeksiyözdür ve biyolojik tehlikeli materyal olarak ele alınmalıdır.
- Örneği ve tahlil atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'e yönelik reaktifler, en uygun biçimde seyreltilmiştir. Performans kaybı yaşanabileceği için reaktifleri daha fazla seyreltmeyin. 25 µl'den daha az reaksiyon hacmi (reaksiyon karışımı ve örnek) ile işlem yapmayın.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'te yer alan tüm reaktifler, kit ile verilen testlerle birlikte kullanım için özel olarak formüle edilmiştir.

- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'te yer alan tüm reaktifler, yalnızca *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'te yer alan diğer reaktiflerle birlikte kullanıma yöneliktir. Performansı etkileyebileceği için *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'lerde yer alan reaktifleri birbiri yerine kullanmayın.
- Yalnızca *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile birlikte verilen *Taq* DNA polimerazı (*Taq* tüpü) kullanın. Aynı veya başka tipte bir kitten alınan *Taq* DNA polimerazla veya başka bir tedarikçiden alınan *Taq* DNA polimerazla değiştirmeyin.
- Süresi dolmuş veya yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.
- Kontroller ve örneklerle ilişkin işaretleri en aza indirmek için, aşağıdakiler dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Kullanım Talimatları belgesinde sunulan rehberliğe harfiyen uyulmalıdır:
 - Reaktifin doğru karıştırılması gereklidir ve tahlil kurulumu sırasında her karıştırma adımında doğru karıştırma sağlanmalıdır.
 - Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının, Kurulum Prosedürleri ve tesis gereklilikleri doğrultusunda yerleştirilmesi.

Not: Kontrol ve reaksiyon karışımı reaktiflerinin pozitif kontrol reaktifi içinde bulunan sentetik materyallerle kontamine olmasını önlemek için çok dikkatli olun.

Not: Reaksiyon karışımlarını kurmak ve pozitif kontrol reaktifleri eklemek için birbirinden ayrı pipetler kullanın.

Not: Reaksiyon karışımlarını, pozitif kontrolün eklenmesi için kullanılan alandan başka bir alanda hazırlayın ve dağıtın.

Not: Çalışma bitene kadar Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazını açmayın.

Not: Çalışma bittikten sonra Rotor-Gene Q tüplerini açmayın.

Not: Doğru örnek testi yapabilmek için yanlış örnek girişi, yükleme hatası ve pipetleme hatası gibi durumlara karşı dikkatli olunmalıdır.

Reaktif Saklama ve Kullanma

therascreen KRAS RGQ PCR Kit kuru buz üzerinde taşınır ve teslim edilir. Teslimat esnasında *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in herhangi bir bileşeninin donmuş olmadığını, dış ambalajın nakliye esnasında açılmış olduğunu veya paket içinde ambalaj notu, el kitabı veya reaktiflerin bulunmadığını fark ederseniz, lütfen QIAGEN Teknik Servis Departmanı ile veya yerel dağıtıcılarla irtibata geçin (arka kapağa bakın veya www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

therascreen KRAS RGQ PCR Kit teslim alınmasından hemen sonra -30 ile -15°C arasında sabit sıcaklıkta bir dondurucuda saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır. Tüm floresanla işaretlenen moleküller gibi, Scorpions da flor ışıltama bozulmasından veya performans kaybından kaçınmak için ışıktan korunmalıdır.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, önerilen saklama koşullarında orijinal ambalajında saklandığı zaman belirtilen son kullanma tarihine kadar stabil kalır. Tekrarlanan çözündürme ve dondurma işlemlerinden kaçınılmalıdır. En fazla 6 kez çözündürüp dondurmanız tavsiye edilir.

Numune Alma, Analize Hazırlama ve Saklama

Not: Tüm örneklere potansiyel enfeksiyöz madde olarak bakılmalıdır.

Örnek materyali, FFPE dokusundan alınmış insan genomik DNA'sı olmalıdır. Numuneler, numune kalitesini sağlamak için standart patoloji metodolojisine göre nakledilmelidir.

Tümör örnekleri heterojendir ve tümör örneğinden elde edilen veri aynı tümörden alınan diğer kısımlarla uyumlu olmayabilir. Ayrıca, tümör örnekleri tümör olmayan doku da içerebilir. Tümör olmayan dokudan elde edilen DNA'nın *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit aracılığıyla tespit edilen mutasyonlarını içermesi beklenmez.

Doku örneklerinin hazırlanması

Not: Kuru bir neşter kullanın. Bu adımı laminar hava akımı veya davlumbaz altında gerçekleştirmeyin.

- Tümör dokusunu, her bir örnek için yeni bir neşterle kazıyarak kesitlerden etiketli mikrosantrifüj tüplerine aktarın.

CRC dokusundan DNA ekstraksiyonu için doku örneklerinin hazırlanması

- Standart malzemeler ve yöntemler kullanarak, doku numunesini %10 nötr tamponlu formalin (Neutral Buffered Formalin, NBF) içinde sabitleyin ve parafine gömün. Mikrotom kullanarak parafin bloğundan 5 µm'lik seri kesitler alın ve bunları cam slaytlar üzerine yerleştirin.
- Eğitilmiş bir görevli (*örn.* bir patolog), Hematoksilin ve Eozin (H&E) ile boyanmış bir kesiti tümör içeriği ve alan tayini açısından değerlendirmelidir. Tümörün normal dokudan ayırt edilebilmesi için, boyanmış slaytı işaretleyin. DNA ekstraksiyonu için seri kesitler kullanın.
- Alana göre > %20 tümör içeriğine sahip kesitleri, makrodiseksiyon yapmaksızın işleme için kullanın (aşağıya bakın).

- Alana göre \leq %20 tümör içeriğine sahip kesitlere makrodiseksiyon yapın ve bunları bir veya daha fazla kesite ayırın. Tümörsüz dokuyu atın.
- Alanı <4 mm² olan kesitler için, toplam tümör alanını en az 4 mm² olarak artırmak için 2 veya daha fazla kesit daha işleyin (makrodiseksiyon yapılmış ve yapılmamış örnekler için geçerlidir). Tümörsüz dokuyu atın.
- Yeni, steril bir neşter kullanarak doku etrafındaki fazla parafini kazıyarak ortadan kaldırın.
Not: Kuru bir neşter kullanın. Bu adımı laminar hava akımı veya davlumbaz altında gerçekleştirilmeyin.
- Tümör dokusunu, her bir örnek için yeni bir neşterle kazıyarak kesitlerden etiketli mikrosantrifüj tüplerine aktarın.

NSCLC dokusundan DNA ekstraksiyonu için doku örneklerinin hazırlanması

- Standart malzemeler ve yöntemler kullanarak, doku numunesini %10 NBF içinde sabitleyin ve parafine gömün. Mikrotom kullanarak parafin bloğundan 5 µm'lik seri kesitler alın ve bunları cam slaytlar üzerine yerleştirin.
- Eğitimli bir görevli (örn. bir patolog), tümör varlığı açısından H&E ile boyanmış bir kesiti değerlendirmelidir. DNA ekstraksiyonu için seri kesitler kullanın.
- Yeni, steril bir neşter kullanarak doku etrafındaki fazla parafini kazıyarak ortadan kaldırın.
- Tümör numunelerini, bloklarını, slaytlarını, örneklerini ve ekstraksiyon için hazır mikrosantrifüj tüplerini, kontrollü bir şekilde ve yerel prosedürlere uygun olarak etiketleyin, kullanın ve saklayın.

Numune saklama

FFPE bloklarını ve slaytlarını oda sıcaklığında saklayın. Slaytlar, DNA ekstraksiyonu öncesinde ortam sıcaklığında 4 haftaya kadar saklanabilir.

Genomik DNA, alındıktan sonra 1 hafta boyunca 2-8°C sıcaklıkta, ardından kullanım öncesinde 8 haftaya kadar -25 ila -15°C sıcaklıkta saklanabilir.

Prosedür

CRC örnekleri için DNA ekstraksiyonu

FFPE CRC numunelerinden hazırlanan örneklerden genomik DNA'yı saflaştırmak için aşağıda açıklanan protokol üzerinde değişiklikler yaparak QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, kat. no. 56404) ürününü kullanın.

Not: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit kullanılarak ekstrakte edilen DNA kullanılarak doğrulanmıştır. Başka bir DNA ekstraksiyon ürünü kullanmayın.

DNA ekstraksiyon işlemini, aşağıdaki hususları dikkate alarak, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* (Versiyon 1) belgesindeki talimatlar doğrultusunda gerçekleştirin:

- DNA ekstraksiyonu öncesinde numunelerin hazırlanmasıyla ilgili olarak *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesine bakın.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit yalnızca manuel kullanım içindir.
- *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde açıklanan RNase adımını kullanmayın.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ile birlikte verilen QIAGEN Deparaffinization Solution'ı kullanmayın. Yalnızca, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde açıklanan ksilen/etanol deparafinizasyon yöntemini kullanın.
- Gereken tüm adımlar için moleküler biyoloji sınıfı etanol kullanın.*
- Ekstraksiyon başına 1 slayt kullanın.
- Proteinaz K sindirimi (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde adım 11) 1 saat süreyle gerçekleştirilmelidir.
- Örnekler, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'teki 200 µl elüsyon tamponu (Buffer ATE) kullanılarak elüe edilmelidir.

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

Not: Genomik DNA'yı, ekstraksiyondan sonra 1 hafta boyunca 2-8°C sıcaklıkta, ardından kullanım öncesinde 8 haftaya kadar -25 ila -15°C sıcaklıkta saklayın.

NSCLC örnekleri için DNA ekstraksiyonu

FFPE NSCLC numunelerinden hazırlanan örneklerden genomik DNA'yı saflaştırmak için aşağıda açıklanan protokol üzerinde değişiklikler yaparak QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, kat. no. 56404) ürünü kullanın.

Not: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit kullanılarak ekstrakte edilen DNA kullanılarak doğrulanmıştır. Başka bir DNA ekstraksiyon ürünü kullanmayın.

DNA ekstraksiyon işlemini, aşağıdaki hususları dikkate alarak, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesindeki talimatlar doğrultusunda gerçekleştirin:

- *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde açıklanan RNase adımını kullanmayın.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ile birlikte verilen QIAGEN Deparaffinization Solution'ı kullanmayın. Yalnızca, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde açıklanan ksilen/etanol deparafinizasyon yöntemini kullanın.
- Gereken tüm adımlar için moleküler biyoloji sınıfı etanol kullanın.*
- Ekstraksiyon başına 2 x 5 µm kesitler kullanın.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit yalnızca manuel kullanım içindir.
- *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde yer alan RNase adımını kullanmayın.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ile birlikte verilen QIAGEN Deparaffinization Solution'ı kullanmayın. Yalnızca, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde açıklanan ksilen/etanol deparafinizasyon yöntemini kullanın.
- Proteinaz K sindirimi (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit El Kitabı* belgesinde adım 11) 1 saat süreyle gerçekleştirilmelidir.

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

-
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'ten 60 µl elüsyon tamponu (ATE) ekleyin ve 2,5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
 - Son hızda 1 dakika santrifüj edin.
 - QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'ten ikinci bir 60 µl elüsyon tamponu (ATE) ekleyin ve 2,5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
 - Son hızda 1 dakika santrifüj edin.

Not: Genomik DNA'yı, ekstraksiyondan sonra 1 hafta boyunca 2-8°C sıcaklıkta, ardından kullanım öncesinde 8 haftaya kadar -25 ila -15°C sıcaklıkta saklayın.

Protokol: DNA örneğinin değerlendirilmesi

Bu protokol, otomatik örnek değerlendirmesi KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) kullanılarak örneklerdeki total çoğaltılabilir DNA'yı değerlendirmek amacıyla kullanılır.

Not: Manuel örnek değerlendirmesi için bkz. Ek 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokolü.

Başlamadan önce önemli noktalar

Not: DNA örnek değerlendirmesi, PCR inhibitörlerinin varlığını saptamak için tasarlanmamıştır çünkü kontrol reaksiyonu kullanılarak yalnızca, bir örnekteki toplam amplifiye edilebilir DNA değerlendirilir.

Not: Bu değerlendirme için spektrofotometri veya diğer alternatif yöntemleri kullanmamak, aşağıda açıklandığı şekilde Kontrol Reaksiyon Karışımını kullanmak önemlidir. Büyük oranda bozulmuş DNA, primerler kısa DNA fragmentleri oluştursa bile amplifiye olmayabilir.

- Mevcut Kontrol Reaksiyon Karışımı (CTRL tüpü) kullanılarak 24'e kadar örnek değerlendirilebilir.
- Mutasyon değerlendirme tahlili ile test öncesinde DNA'yı değerlendirmek için CTRL'yi kullanın.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit içindeki reaktiflerin etkin kullanılabilmesi için, tam çalışma döngüleri oluşturmak amacıyla DNA örneklerini mümkün olduğunca büyük sayıda gruplara ayırın. Örnekleri kendi başına veya küçük sayıda gruplar halinde test etmek, daha fazla reaktif kullanılmasına, dolayısıyla *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile test edilebilecek örnek sayısının azalmasına neden olur.
- *Taq* DNA polimerazı (*Taq* tüpü) veya *Taq* DNA polimeraz içeren herhangi bir karışımı enzimi etkisiz hale getirebileceği için vorteksle karıştırmayın.
- Ucun fazla enzimle kaplanmasını engellemek için *Taq* DNA polimerazı, pipet ucunu sıvı yüzeyinin hemen altına dikkatlice yerleştirerek pipetle çekin.

- Kontrollere ilişkin işaretleri en aza indirmek için, doğru reaktif karıştırma ile ilgili olarak *therascreen KRAS RGQ PCR Kit Kullanım Talimatları* belgesinde sunulan rehberliğe harfiyen uyulmalı ve tahlil kurulumu sırasında her karıştırma adımında talimatlara uyulduğundan emin olunmalıdır.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının ilk kullanımından önce, Rotor-Gene yazılım sürümüne karşılık gelen Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package yazılımının yüklendiğinden emin olun (bkz. Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu).
- Her kullanımdan önce, tüm reaktiflerin oda sıcaklığında (15-25°C) en az 1 saat boyunca tam olarak çözdürülmesi, 10 kez ters yüz edilerek karıştırılması ve içeriği tüpün tabanında toplamak için kısa süreliğine santrifüjlenmesi gerekir. Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.
- Her kullanımdan önce *Taq* DNA polimerazın (*Taq* tüpü) oda sıcaklığında (15-25°C) olduğundan emin olun. Enzimi tüpün tabanında toplamak için tüpü kısa süreliğine santrifüjleyin.

Prosedür

1. Kontrol reaksiyon karışımını (CTRL tüpü), Şablonsuz Kontrol (No Template Control, NTC) için nükleaz içermeyen suyu ve KRAS Pozitif Kontrolü (Positive Control, PC) oda sıcaklığında (15-25°C) en az 1 saat boyunca bekleterek tamamen çözdürün.

Reaktifleri çözdürme, PCR kurulumu ve çalışmayı başlatmadan önce saklama süreleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çözdürme süresi, PCR kurulum süreleri ve saklama sıcaklıkları

Çözdürme süresi		PCR kurulumu sonrası saklama* sıcaklığı	Maksimum PCR kurulumu ve saklama süresi
Minimum	Maksimum		
1 saat	4,5 saat	Oda sıcaklığı (15-30°C)	7 saat
1 saat	4,5 saat	2-8°C	18 saat

* Saklama ifadesi, PCR kurulumunun tamamlanması ile Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında PCR çalıştırılmasının başlangıcı arasında geçen süredir.

Not: PCR kurulumu oda sıcaklığında yapılmalıdır.

2. Bölgesel tuz yoğunlaşmalarını önlemek için her tüpü 10 kez ters yüz ederek çözdürülen reaktifleri karıştırın ve ardından içeriği tüpün tabanında toplamak için kısa süreliğine santrifüjleyin.

Not: Taq DNA polimerazı (Taq) veya Taq içeren herhangi bir karışımı enzimi etkisiz hale getirebileceği için vorteksle karıştırmayın.

Not: Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.

3. Tablo 3'te yer alan hacimlere uygun olarak aşağıdakiler için yeterli miktarda master karışım (Kontrol Reaksiyon Karışımı [CTRL] artı Taq DNA polimeraz [Taq]) hazırlayın:

- Tüm DNA örnekleri
- 1 KRAS Pozitif Kontrol (Positive Control, PC) reaksiyonu
- 1 Şablonsuz Kontrol (No Template Control, NTC) için nükleaz içermeyen su reaksiyonu
- PCR kurulumu için yeterli farkı sağlamak amacıyla 1 fazla örnek

Kontrol tahlili master karışımı, örnek hariç PCR için gerekli bileşenlerin tümünü içerir.

Tablo 3. Kontrol tahlili master karışımının hazırlanması

Bileşen	Hacim
Kontrol Reaksiyon Karışımı (CTRL)	19,76 µl × (n + 1)*
Taq DNA polimeraz (Taq)	0,24 µl × (n + 1)*
Toplam hacim	20 µl/reaksiyon

* n = Reaksiyon sayısı (örnekler artı kontroller).

PCR kurulumu için yeterli farkı sağlamak amacıyla fazladan bir örnek (n+1) için yeterli miktarda master karışım hazırlayın. n değeri 24'ü aşmamalıdır (kontroller hariç) çünkü bir çalışmada kullanılacak en fazla örnek sayısı 24'tür.

Not: Master karışımı hazırlarken, önce gerekli hacimde Kontrol Reaksiyon Karışımı (CTRL) ilgili tüpe eklenir, en son olarak Taq DNA polimeraz (Taq) eklenir.

Not: Ucun fazla enzime kaplanmasını engellemek için Taq DNA polimerazı, pipet ucunu sıvı yüzeyinin hemen altına dikkatlice yerleştirerek pipetle çekin.

4. Uygun sayıdaki PCR 4 strip tüpü (her stripte 4 tüp vardır), Tablo 4'teki düzene uygun olarak yükleme bloğuna yerleştirin. Tüplerin kapağını kapatmayın.

Not: Kapakları, gerekinceye kadar plastik kap içinde tutun.

Tablo 4. DNA örneği değerlendirmesi için yükleme bloğundaki çalışma düzeni

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

* Sayılar, yükleme bloğu içindeki pozisyonları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

5. Reaksiyon master karışımının toplam hacminden daha az bir hacme bir pipet koyun ve 10 defa çekip iterek tamamen karıştırın.

Not: Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.

6. Hemen 20 µl master karışımı her bir PCR strip tüpüne ekleyin.

Not: Tüp düzeni için Tablo 4'e bakın. DNA örneği incelemesi için, Kontrol tahlili master karışımı, bir PC tüpüne, bir NTC tüpüne ve her bir DNA örneği için birer tüpe eklenmelidir.

7. NTC tüpüne (tüp konumu 2) hemen 5 µl Şablonsuz Kontrol (No Template Control, NTC) için nükleaz içermeyen su ekleyin ve tüpü kapatın.

8. Örnek tüplerine (tüp konumları 3-26) her bir DNA örneğinden 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın.

9. PC tüpüne (tüp konumu 1) KRAS Pozitif Kontrol (Positive Control, PC) 5 µl ekleyin ve tüpü kapatın.

Not: Her bir tüpün toplam reaksiyon hacmi 25 µl olmalıdır (Tablo 3 uyarınca hazırlanmış 20 µl master karışım, artı 5 µl NTC/örnek/PC).

10. Her bir PCR 4 strip tüpü içindeki en düşük numaralı konumda bulunan ilk tüplerin kapaklarını kalıcı bir kalemle işaretleyerek (örn. 1, 5 ve 9 vb. konumları), tüplerin Rotor Gene Q MDx 5plex HRM cihazındaki 72 kuyulu rotor içine yükleneceği yönü belirtin.

11. Kapatılmış tüpleri 4 defa ters çevirerek örnek ve reaksiyon karışımını karıştırın.

Not: Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.

12. Tüm PCR 4 strip tüpleri, yön işaretlerinden yararlanarak çalıştırma düzenine göre (Tablo 4) 72 kuyulu rotor içinde uygun pozisyonlara yerleştirin.

Not: Rotor tamamen dolmamışsa, tüm kullanılmayan pozisyonlar kapatılmış boş bir tüple doldurulmalıdır. Böylece, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının termal verimliliği korunmuş olur.

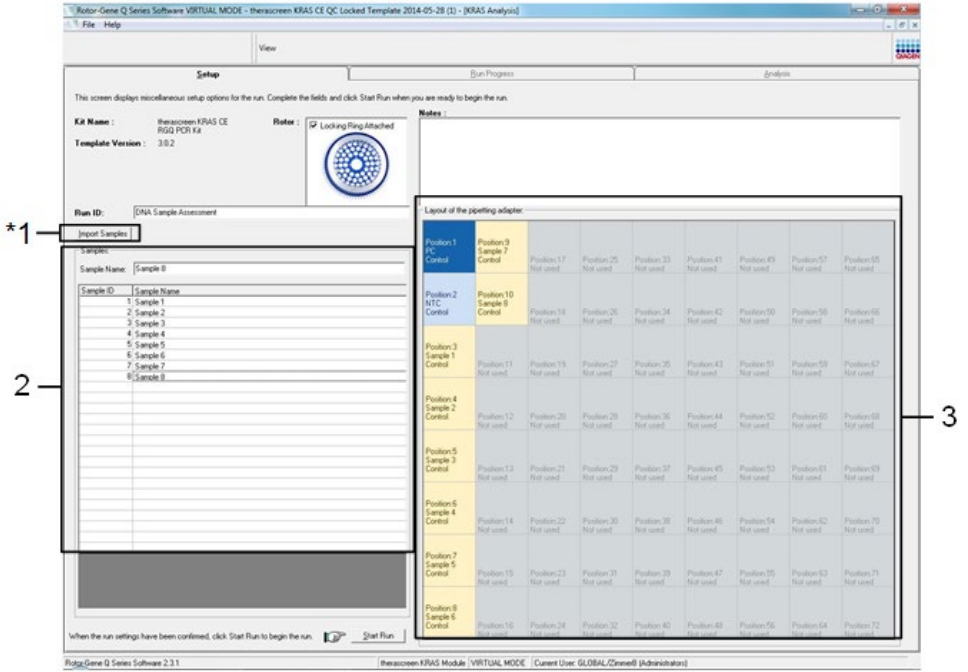
13. 72 kuyulu rotoru Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına yerleştirin. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazıyla birlikte verilir) çalışma sırasında tüpleri sabitlemek için rotorun üstüne yerleştiğinden emin olun.

14. Rotor Gene Q yazılımını başlatmak için Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına bağlı dizüstü bilgisayarın masaüstündeki **therascreen KRAS QC Locked Template** (therascreen KRAS QC Kilitli Şablon) simgesine çift tıklayın (Şekil 1).



Şekil 1. thetherascreen KRAS QC Locked Template (therascreen KRAS QC Kilitli Şablon) simgesi.

Varsayılan olarak Setup (Kurulum) sekmesi görünür (Şekil 2).



Şekil 2. Setup (Kurulum) sekmesi ve Locking Ring Attached (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu. 1 = Setup (Kurulum) sekmesi, 2 = Locking Ring Attached (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu.

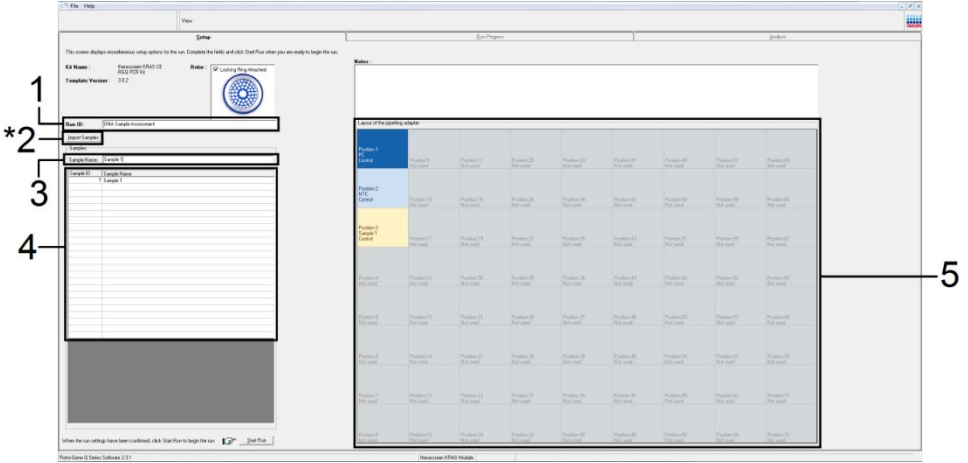
15. Kilitleme halkasının uygun şekilde takıldığını doğrulayın ve **Locking Ring Attached** (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının kapağını kapatın.
16. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre **Run ID** (Çalıştırma Kimliği) alanına çalıştırma kimliğini girin. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre **Sample Name** (Örnek Adı) alanına örnek adını girin ve **Return** tuşuna basın.

Böylece, örnek adı aşağıdaki örnek listesine eklenir ve örneğe bir Sample ID (Örnek Kimliği) (1, 2, 3 vb.) atanır. Ek olarak, sağ taraftaki Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli, örnek adını içerecek şekilde güncellenir (Şekil 3).

Alternatif olarak, *.smp (Rotor-Gene Q örnek dosyası) veya *.csv (virgülle ayrılan değerler) biçimlerinde saklanan örnek adları, **Import Samples** (Örnekleri Al) düğmesi kullanılarak alınabilir. Örnek adları, bu yöntem kullanılarak otomatik şekilde doldurulur.

Not: Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) paneline örnek adının eklendiğinden ve bu adın renk değişimi ile vurgulandığından, ayrıca örnek adının örnek konumunda bulunduğundan emin olun (Şekil 3).

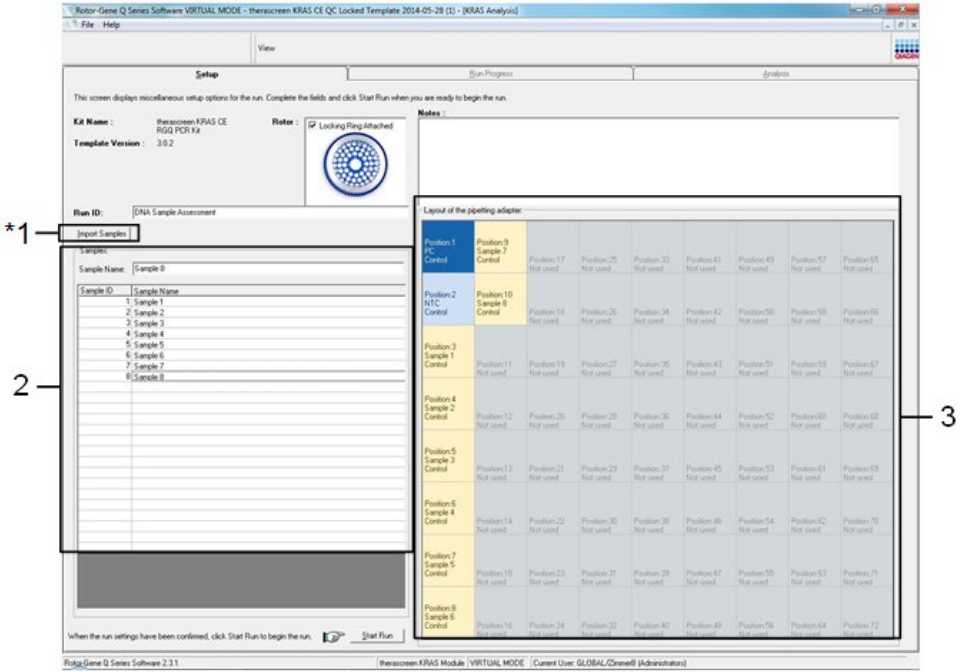
Not: 8 karakterden uzun örnek adları, Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) panelinde tamamıyla görüntülenemeyebilir.



Şekil 3. Run ID (Çalıştırma Kimliği) ve Sample Name (Örnek Adı) girilmesi. 1 = Run ID (Çalıştırma Kimliği) diyalog alanı, 2 = Import Samples (Örnekleri Al) düğmesi 3 = Sample Name (Örnek Adı) diyalog alanı, 4 = Örnek Listesi, 5 = Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli.

17. Tüm ilave örneklerin adını girmek için 16. adımı tekrarlayın (Şekil 4).

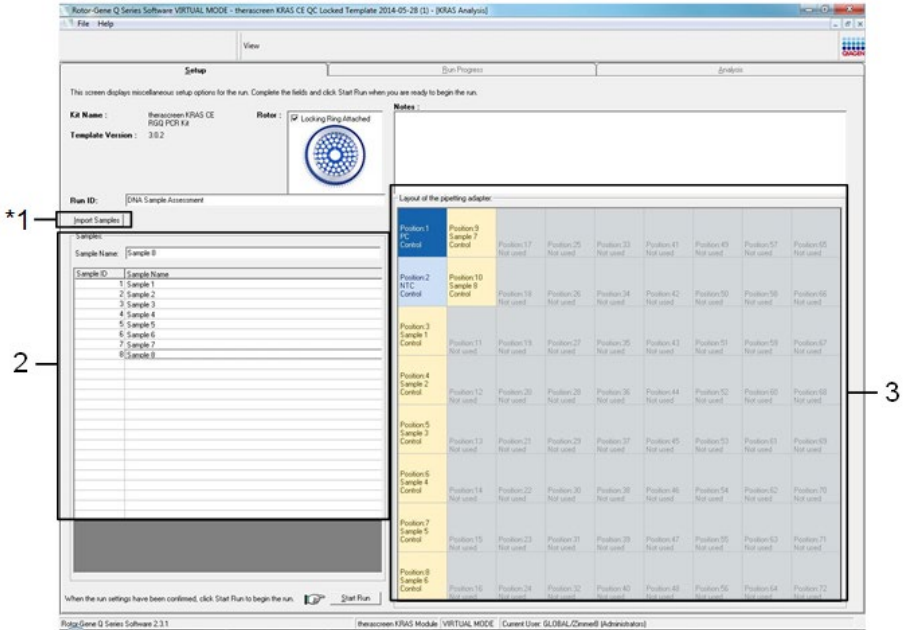
Not: Bir örnek adını düzenlemek için, örnek listesinden **Sample Name** (Örnek Adı) seçeneğine tıklayın; seçilen örnek yukarıdaki **Sample Name** (Örnek Adı) alanında görünür. Örnek adını, lokal isimlendirme mevzuatınıza göre düzenleyin ve adı güncellemek için **Return** tuşuna basın.



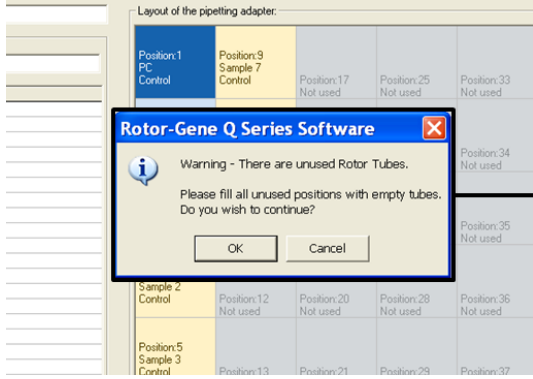
Şekil 4. Sample Name (Örnek Adı) diyalog alanına ilave örnek adları girme. *1 = Import Samples (Örnekleri Al) düğmesi, 2 = Sample Name (Örnek Adı) diyalog alanı ve Örnek Listesi, 3 = ek örnek adı içeren Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli.

18. Tüm örnek adları girildiğinde doğru olduklarını kontrol edin. Gerekliyse **Notes** (Notlar) alanına ilave bilgiler girin, ardından **Start Run** (Çalışmayı Başlat) düğmesine tıklayın (Şekil 5).

Not: Kullanılmayan bir rotor pozisyonu varsa bir uyarı mesajı belirir (Şekil 5 ve Şekil 6) ve kullanıcıya, rotordaki tüm kullanılmayan pozisyonların kapatılmış boş bir tüple doldurulması gerektiğini hatırlatır. Kullanılmayan tüm rotor pozisyonlarının kapatılmış boş bir tüple doldurulmuş olduğunu kontrol edin ve ilerlemek için **OK** (Tamam) seçeneğine tıklayın.

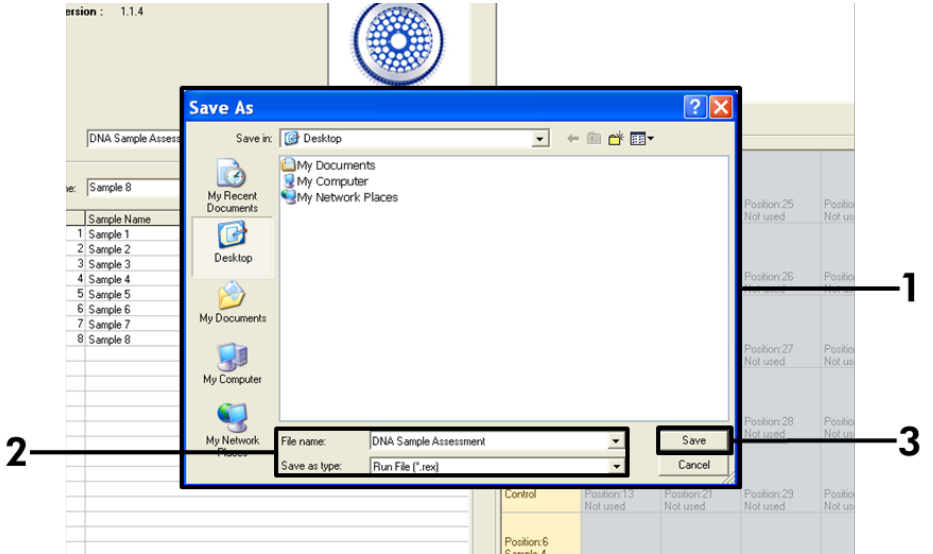


Şekil 5. Notes (Notlar) diyalog alanı, Start Run (Çalışmayı Başlat) ve kullanılmayan rotor pozisyonlarını bildiren Warning (Uyarı).



Şekil 6. 1 = kullanılmayan rotor pozisyonlarını bildiren Warning (Uyarı).

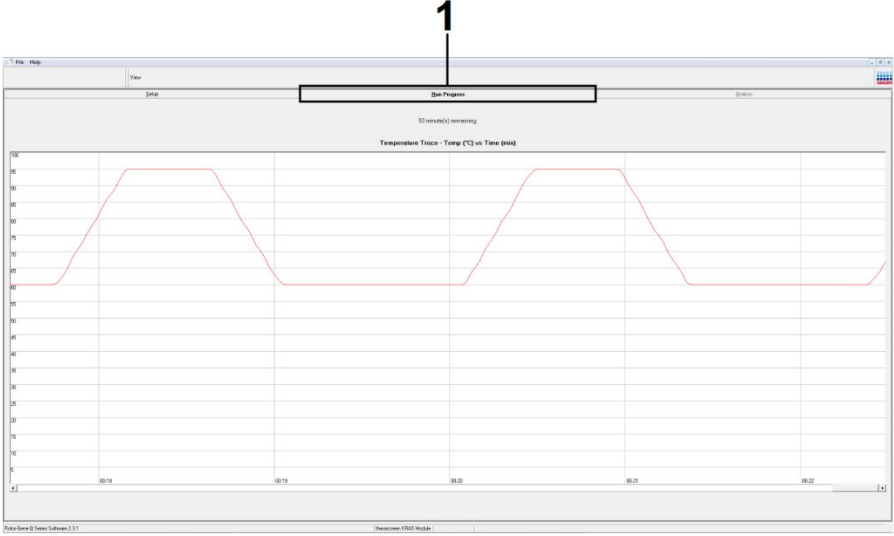
19. Bir Save As (Farklı Kaydet) iletişim kutusu belirir. Uygun dosya adını seçin ve PCR çalışmasını seçili konuma *.rex çalışma dosyası olarak kaydedin. **Save** (Kaydet) düğmesine tıklayın (Şekil 7).



Şekil 7. Çalışma dosyası kaydediliyor. 1 = Save As (Farklı Kaydet) penceresi, 2 = Dosya adı ve farklı kaydetme türü olarak *.rex dosyası, 3 = Save (Kaydet).

PCR çalışması başlar.

Not: Çalışma başladığında, Run Progress (Çalışma İlerlemesi) sekmesi otomatik olarak açılarak sıcaklık takibi ve kalan çalışma süresi konusunda bilgi verir (Şekil 8).



Şekil 8. Run Progress (Çalışma İlerlemesi) sekmesi.

Çalışma bittiğinde, Analysis (Analiz) sekmesi otomatik olarak açılır.

Not: Analysis (Analiz) sekmesi açılmazsa, bu sekmeye tıklamalısınız (Şekil 9).

Not: Hesaplama yönteminin bir açıklaması Sonuçların Yorumlanması başlığında sunulmuştur.

The screenshot shows a software window with a menu bar (File, Help) and a toolbar (View, Run Progress, Analysis, Report). The Analysis tab is active, and a 'Sample QC Result Table' is displayed. The table has four columns: Tube ID, Sample Name, Control Assay Ct, and Status. The Status column indicates whether the sample is 'Valid' or 'Invalid'.

Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	03771070B	28.39	-	Valid
4	03771071B	27.38	-	Valid
5	03771072B	30.07	-	Valid
6	03771073B	28.53	-	Valid
7	03771074B	29.55	-	Valid
8	03771075B	28.45	-	Valid
9	03771076B	29.95	-	Valid
10	03771077B	29.02	-	Valid
11	03771078B	31.42	-	Valid
12	03771079B	28.93	-	Valid
13	03771081B	29.68	-	Valid
14	03771082B	31.44	-	Valid
15	03771083B	31.02	-	Valid
16	03771094B	28.09	-	Valid
17	03771095B	29.91	-	Valid
18	03771097B	30.33	-	Valid
19	03771098B	30.22	-	Valid
20	03771099B	27.17	-	Valid
21	03771099B	29.67	-	Valid
22	03771091B	29.32	-	Valid
23	03771092B	29.22	-	Valid
24	03771093B	28.57	-	Valid
25	03771094B	28.80	-	Valid
26	03771095B	30.41	-	Valid

Şekil 9. Analysis (Analiz) sekmesi ve sonuçların raporlanması. 1 = Analysis (Analiz) sekmesi, 2 = Sample QC Result Table (Örnek QC Sonuç Tablosu).

Not: Kontrol sonuçları, Sample QC Result Table (Örnek QC Sonuç Tablosu) içinde aşağıdaki gibi raporlanır (Şekil 9'da 2).

- **Çalışma kontrolleri** (PC ve NTC, sırasıyla 1 ve 2 numaralı tüp pozisyonları): Sonuçlar kabul edilebilir aralıklar dahilindeyse Valid (Geçerli) ifadesi görüntülenir. Aksi halde Invalid (Geçersiz) sonucu görüntülenir.
- **Örnek kontrol reaksiyonu $C_T > 32,00$:** Invalid (Geçersiz) ifadesi görüntülenir. DNA miktarı mutasyon analizi için yeterli değildir. Örneği yeniden test edin. DNA miktarı halen yetersizse mümkünse daha fazla tümör dokusu alın (bkz. Sonuçların Yorumlanması (Manuel)).

Sonuçların Yorumlanması (Manuel)

Örneği değerlendirme çalışması veya mutasyon analizi çalışması tamamlandıktan sonra, verileri aşağıdaki prosedüre göre analiz edin.

Yazılım analiz ayarları

1. Rotor-Gene Q serisi yazılım 2.3'ü kullanarak uygun dosyayı açın.
2. Çalışmayı gerçekleştirmeden önce örneklerinizi adlandırmadıysanız, **Edit Samples** (Örnekleri Düzenle) ögesine tıklayın.
3. Name (Ad) sütununa örnek adlarınızı girin.
4. **Analysis** (Analiz) seçeneğine tıklayın. Analiz sayfasında, HEX kanalını görüntülemek için **Cycling A. Yellow** seçeneğine tıklayın.
5. **Named On** (Adlandırma Tarihi) ögesine tıklayın.
Not: Bu, analizin boş kuyuları içermemesini sağlar.
6. **Dynamic Tube** (Dinamik Tüp) ögesini seçin.
7. **Linear Scale** (Doğrusal Ölçek) ögesini seçin.
8. **Outlier Removal** (Aykırı Değer Çıkarma) seçeneğine tıklayın ve **NTC Threshold** (NTC Eşiği) alanına **10%** (%10) değerini girin.
9. Eşik değerini **0.05** (0,05) olarak ayarlayın ve HEX CT değerlerini kontrol edin.
10. Analiz sayfasında, FAM kanalını görüntülemek için **Cycling A. Green** seçeneğine tıklayın.
11. **Dynamic Tube** (Dinamik Tüp) seçeneğinin vurgulanmış olduğunu doğrulayın. **Linear Scale** (Doğrusal Ölçek) ögesine tıklayın.
12. **Outlier Removal** (Aykırı Değer Çıkarma) seçeneğine tıklayın ve **NTC Threshold** (NTC Eşiği) alanına **10%** (%10) değerini girin.
13. Eşik değerini **0.05** (0,05) olarak ayarlayın ve FAM CT değerlerini kontrol edin.

Örnek değerlendirme veri analizi

Çalışma kontrol analizi

Şekil 42'deki Çalışma kontrol analizi akış şemasına bakın.

- **Negatif kontrol:** Reaksiyon karışımı kontaminasyonu olmadığından emin olmak için, Şablonsuz Kontrol yeşil kanalda 40'ın altında bir C_T değeri oluşturmemelidir. Plakanın doğru olarak kurulduğundan emin olmak için NTC, sarı kanalda 31,91-35,16 arası amplifikasyon göstermelidir. Belirtilen değerler aralık dahilindedir ve bu değerleri içerir.
- **Pozitif kontrol:** KRAS Pozitif Kontrol (Positive Control, PC), yeşil kanalda 8 tahlilin her birinde 23,5-29,5 arası bir C_T değeri vermelidir. Belirtilen değerler aralık dahilindedir ve bu değerleri içerir. Bu aralığın dışındaki bir değer, tahlil kurulum sorunu ve bu nedenle oluşan bir çalışma hatası olduğunu gösterir.

Not: İki çalışma kontrolünden herhangi biri başarısız olmuşsa örnek verileri kullanılmamalıdır.

Her iki çalışma kontrolünün geçerli olması şartıyla, her bir örnek C_T değeri yeşil kanalda 21,92-32,00 aralığı içinde olmalıdır. Örnek bu aralığın dışındaysa, aşağıdaki talimatlar verilmiştir.

Örnek analizi — kontrol tahlili

- **Örnek kontrol tahlili C_T değeri <21,92:** Kontrol C_T değeri <21,92 olan örnekler seyreltilmelidir; çünkü bu durum doğrulanmış tahlil aralığının düşük değerini temsil etmektedir. Düşük seviyedeki her bir mutasyonu saptamak için yüksek konsantrasyonlu örnekler yarım ölçek seyreltildiğinde C_T 'nin 1 arttığı düşünülerek yukarıdaki aralığın içinde olacak şekilde seyreltilmelidir. Örnek 21,92 değerine yakınsa, örnek test (KRAS mutasyon tespiti) çalışmasından sonuç elde edilmesini sağlamak için dilüsyon önerilir. Örnekler kit içinde verilen su kullanılarak seyreltilmelidir (Dilüsyon Suyu [Dil.] için Nükleaz İçermeyen Su).

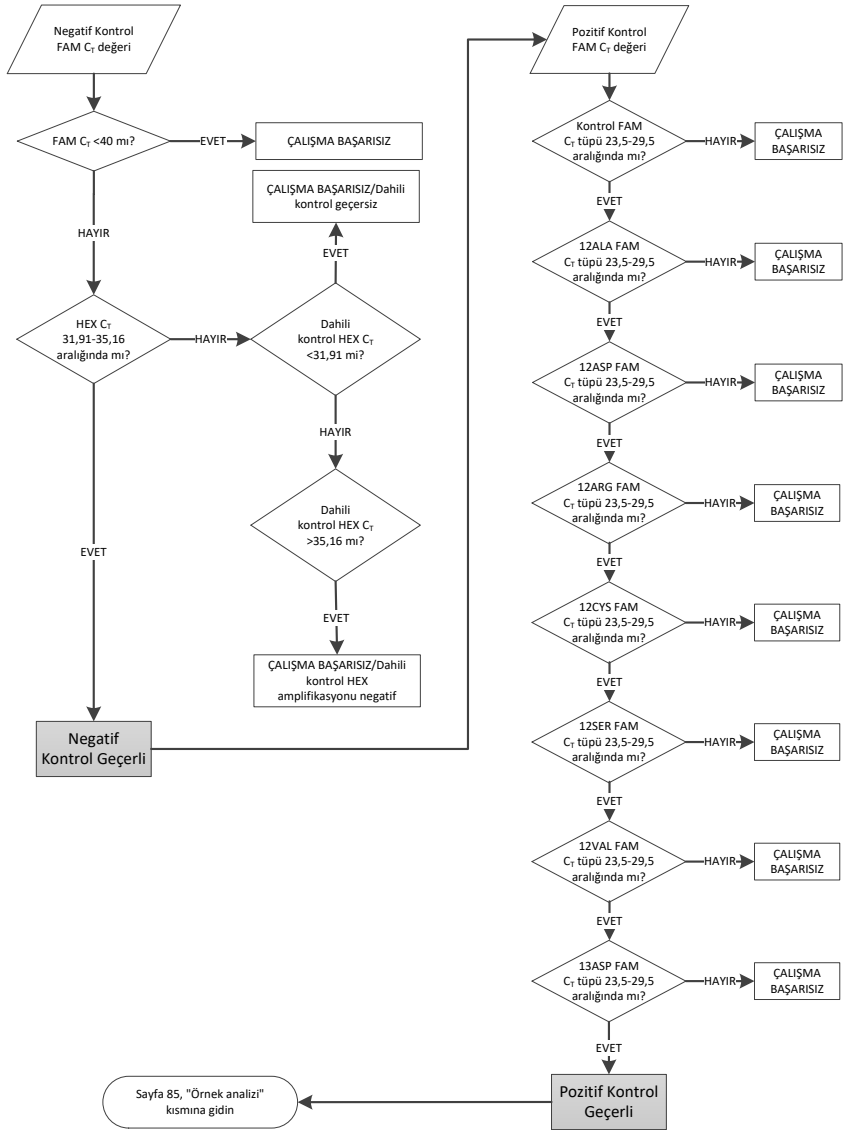
- **Örnek kontrol testi C_T değeri >32:** Tahlil için belirtilen eşik değerlerindeki tüm mutasyonları tespit etmek amacıyla başlangıç DNA şablonu yetersiz olacağı için örneğin yeniden alınması önerilir.

KRAS mutasyon tespiti analizi

Çalışma kontrol analizi

Çalışma kontrol analizi akış şemasına bakın (Şekil 10).

- **Negatif kontrol:** Reaksiyon karışımı kontaminasyonu olmadığından emin olmak için, Şablonsuz Kontrol yeşil kanalda 40'ın altında bir C_T değeri oluşturmamalıdır. Plakanın doğru olarak kurulduğundan emin olmak için NTC, sarı kanalda 31,91-35,16 arası amplifikasyon göstermelidir. Belirtilen değerler aralık dahilindedir ve bu değerleri içerir.
- **Pozitif kontrol:** KRAS Pozitif Kontrol (Positive Control, PC), yeşil kanalda 8 tahlilin her birinde 23,5-29,5 arası bir C_T değeri vermelidir. Belirtilen değerler aralık dahilindedir ve bu değerleri içerir. Bu aralığın dışındaki bir değer, tahlil kurulum sorunu ve bu nedenle oluşan bir çalışma hatası olduğunu gösterir.
- **Not:** 2 çalışma kontrolünden herhangi biri başarısız olmuşsa örnek verileri kullanılmamalıdır.



Şekil 10. Çalışma kontrol analizi akış şeması.

Örnek analizi

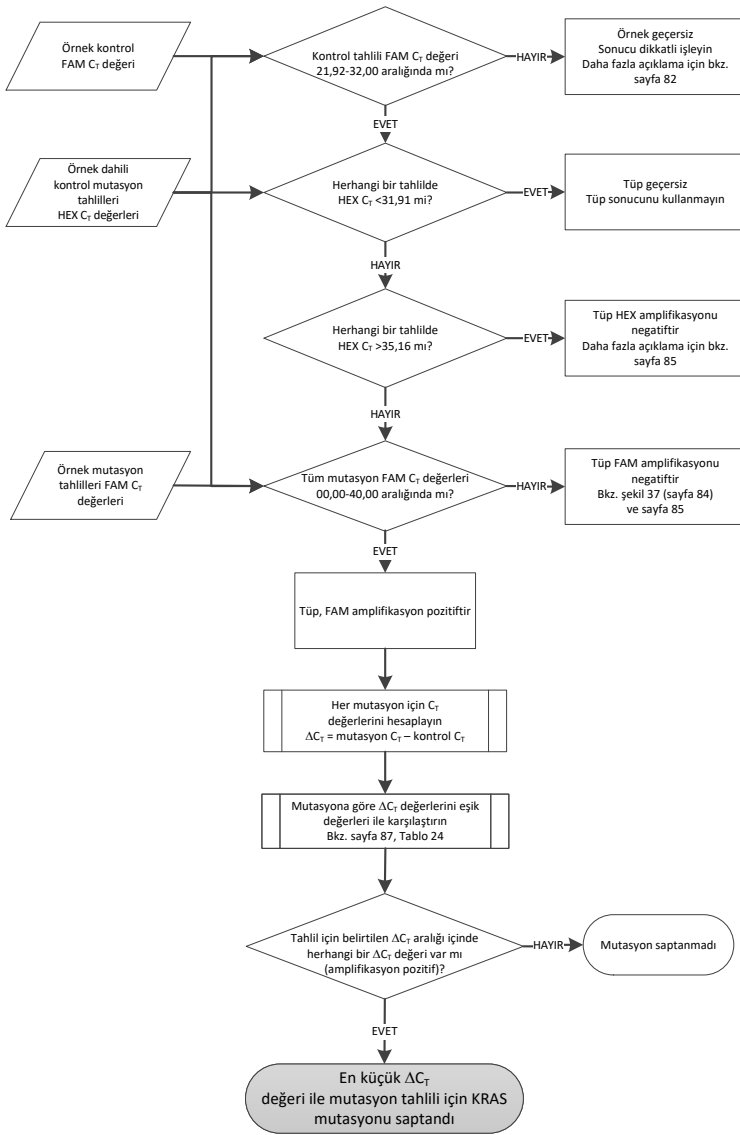
Şekil 11'deki Örnek analizi akış şemasına bakın.

Örnek kontrol FAM CT değeri

Kontrol tahlili için her iki çalışma kontrolünün de geçerli olması durumunda, her bir örnek C_T değeri yeşil kanalda 21,92-32,00 aralığı içinde olmalıdır.

Örnek bu aralığın dışındaysa, aşağıdaki talimatlar verilmiştir.

- **Örnek kontrol tahlili C_T değeri <21,92:** Kontrol C_T değeri <21,92 olan örnekler mutasyon tahlillerine aşırı yüklenmiştir ve seyreltilmelidir. Düşük seviyedeki her bir mutasyonu saptamak için yüksek konsantrasyonlu örnekler yarım ölçek seyreltildiğinde C_T'nin 1 arttığı düşünülerek yukarıdaki aralığın içinde olacak şekilde seyreltilmelidir. Örnekler kit içinde verilen su kullanılarak seyreltilmelidir (Dilüsyon Suyu [Dil.] için Nükleaz İçermeyen Su).
- **Örnek kontrol tahlili C_T değeri >32:** Çok düşük seviyeli mutasyonlar tespit edilemeyebilir bu yüzden dikkatli yorumlayın.



Şekil 11. Örnek analizi akış şeması.

Örnek dahili kontrol mutasyon tahlilleri HEX CT değeri

Şekil 11'deki Örnek analizi akış şemasına bakın.

Her bir örneğe ait tüm kuyular analiz edilmelidir. Her bir kuyunun dahili kontrolden bir HEX sinyali oluşturduğunu kontrol edin. Olası 3 sonuç söz konusudur.

- Dahili kontrol C_T değeri belirtilen aralığın (31,91-35,16) içindeyse, bu HEX amplifikasyonu pozitifdir.
- Dahili kontrol C_T değeri belirtilen aralığın (>35,16) üstündeyse, bu HEX amplifikasyonu negatifdir.
- Dahili kontrol C_T değeri belirtilen aralığın (<31,91) altındaysa, bu geçersizdir.
- Dahili kontrol hatası PCR inhibisyonuna bağlıysa, örneğin dilüsyonu inhibitörlerin etkisini azaltabilir fakat bunun hedef DNA'yı da seyrelteceği ayrıca dikkate alınmalıdır. Kite bir tüp Örnek Dilüsyon Suyu (Dil.) dahil edilmiştir.

Örnek mutasyon tahlilleri FAM CT değeri

7 reaksiyon karışımının tümü için FAM değerleri, Tablo 5'te listelenen değerlerle karşılaştırılmalıdır.

Tablo 5. Kabul edilebilir örnek mutasyon reaksiyon değerleri (FAM)*

Tahlil	Kabul edilebilir C_T aralığı	ΔC_T aralığı
12ALA	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12ASP	0,00-40,00	$\leq 6,60$
12ARG	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12CYS	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12SER	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12VAL	0,00-40,00	$\leq 7,50$
13ASP	0,00-40,00	$\leq 7,50$

* Kabul edilebilir değerler gösterilen değerlerin arasında ve kapsamındadır.

- FAM CT değeri belirtilen aralık içindeyse bu, FAM amplifikasyon pozitifdir.
- FAM CT değeri belirtilen aralığın üzerindeyse veya hiç amplifikasyon yoksa bu, FAM amplifikasyon negatiftir.
- Mutasyon ve kontrol CT değerlerinin aynı örnekten olduğundan emin olarak, FAM amplifikasyonu pozitif olan her mutasyon tüpü için DCT değerini aşağıdaki şekilde hesaplayın.

$$\Delta C_T = \text{mutasyon } C_T - \text{kontrol } C_T$$

Her bir tahlilde doğru kesim noktasının uygulandığından emin olarak söz konusu tahlil için kesim noktalı örneğe ait ΔC_T değerini karşılaştırın (Tablo 22).

Kesim noktası, üzerindeki noktalarda pozitif sinyalin potansiyel olarak yabancı tip DNA'daki ARMS primerinin arka plan sinyalinden kaynaklandığı noktadır. Örnek $C_{\Delta T}$ değeri eşik noktasından daha yüksekse, negatif olarak sınıflandırılır veya kitin tespit sınırlarının dışındadır.

Her örnek için, her bir mutasyon reaksiyonu aşağıdaki kriterler kullanılarak mutation detected (mutasyon saptandı), mutation not detected (mutasyon saptanmadı) veya invalid (geçersiz) durumunu belirtecektir:

Mutasyon saptandı:

- FAM amplifikasyonu pozitif ve DCT değerleri eşik değerinde veya eşik değerinin altındadır. Çoklu mutasyonlar saptanırsa, raporlanan mutasyon en küçük DCT değerine sahip mutasyon olmalıdır.

Mutasyon saptanmadı:

- FAM amplifikasyonu pozitif ve DCT değerleri eşik değerinin üzerindedir.
- FAM amplifikasyonu negatif ve HEX (dahili kontrol) amplifikasyonu pozitif.

Geçersiz:

- HEX (dahili kontrol) geçersizdir.
- FAM amplifikasyonu negatif ve HEX amplifikasyonu negatif.

Örnek bir tüpte HEX amplifikasyonu negatif ancak farklı bir tüpte FAM amplifikasyonu pozitifse, farklı tüpteki mutation detected (mutasyon saptandı) sonucu geçerli olarak değerlendirilebilir ancak tanımlanan özel mutasyon güvenilir olarak atanmış olmayabilir.

- Örnek HEX amplifikasyonu negatif ancak aynı tüpte FAM amplifikasyonu pozitifse, mutation detected (mutasyon saptandı) sonucu geçerli olarak değerlendirilmelidir.
- Tüp HEX (dahili kontrol) geçersizse, bu tüpün sonucu kullanılmamalıdır.

Örnek mutasyon durumu atama

Tüm mutasyon reaksiyon tüpleri değerlendirildikten sonra, örneğin mutasyon durumu aşağıdaki gibi belirlenir:

- Mutasyon saptandı: 7 mutasyon reaksiyonundan bir veya daha fazlası pozitifdir. Çoklu mutasyonlar saptanırsa, raporlanan mutasyon en küçük DCT değerine sahip mutasyon olmalıdır.
- Mutasyon saptanmadı: 7 mutasyon reaksiyonunun tümü negatiftir.
- Geçersiz: Hiçbir mutasyon reaksiyonu pozitif değildir ve bir veya daha fazla mutasyon reaksiyonu geçersizdir.

Not: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bir DNA örneğinde KRAS genindeki mutasyonları saptamak amacıyla tasarlanmıştır. Bir örnek, KRAS mutasyonu saptandı olarak adlandırıldığında, yalnızca bir spesifik mutasyon bildirilmelidir. Çoklu mutasyonlar saptanırsa, bildirilen mutasyon en küçük ΔC_T değerine sahip mutasyon olmalıdır.

Mutasyon reaksiyonları arasında bir miktar çapraz reaktivite meydana gelebilir. Örneğin, yüksek seviyeli bir 12ALA mutasyonu gözlenirse, diğer mutasyon reaksiyonlarının bazıları da pozitif bir sonuç verebilir. Bunun nedeni, benzer bir dizinin diğer mutasyonlarını birbirine göre saptayan ARMS primerleridir. İkinci bir mutasyon tahlili pozitif bir sonuç verirse, bu büyük olasılıkla çapraz reaktivitedir. Nadir olmasına rağmen iki mutant gözlenmiştir.

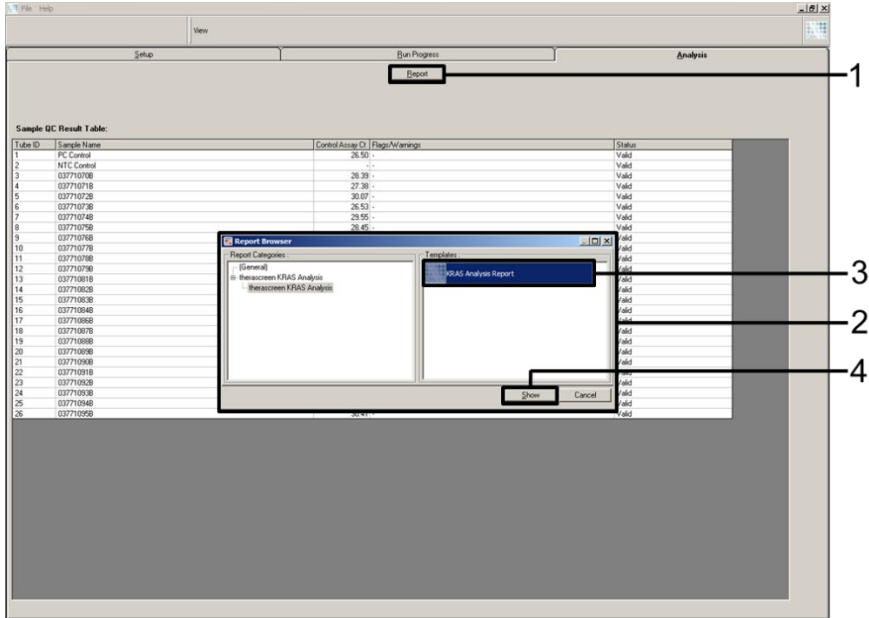
Bir veya daha fazla mutasyon reaksiyonu geçersiz ancak bir veya daha fazlası pozitifse, bir mutasyon mevcut olduğundan örnek yine KRAS mutasyonu saptandı olarak adlandırılabilir. Ancak, bildirilen spesifik mutasyon doğru olmayabilir ve bir çapraz reaktivitenin sonucu olabilir. Bu nedenle, örnek yalnızca KRAS mutasyonu saptandı olarak adlandırılmalıdır.

- **Örnek kontrol reaksiyonu $C_T < 21,92$:** Invalid (Geçersiz) ifadesi görüntülenir. DNA yoğunluğu mutasyon analizi için fazla yüksek. Dilüsyon Amaçlı Nükleaz İçermeyen Su (Dil.) ile seyreltin ve yeniden test edin. C_T değeri 21,92 ila 32,00 olacak şekilde seyreltme yapın. 1:1 oranında dilüsyon yapılması, C_T değerini yaklaşık 1,0 oranında artırır.
- **Örnek kontrol reaksiyonu C_T 21,92-32,00** ($21,92 \leq \text{Kontrol } C_T \leq 32,00$): Valid (Geçerli) ifadesi görüntülenir. DNA konsantrasyonu mutasyon analizi için uygundur.

Not: Yeniden ekstraksiyon veya dilüsyon gerekirse, DNA konsantrasyonunun kullanıma uygun olduğundan emin olmak için kontrol reaksiyonunu tekrarlayın.

14. Rapor dosyaları oluşturmak için **Report** (Rapor) seçeneğine tıklayın. Report Browser (Rapor Tarayıcısı) penceresi görüntülenir. Templates (Şablonlar) altından **KRAS Analysis Report** (KRAS Analiz Raporu) ögesini seçin ve **Show** (Göster) ögesine tıklayın (Şekil 12).

Not: Raporlar, Web Arşivleri formatında alternatif bir konuma kaydedilebilir. Bunun için, her raporun sol üst köşesindeki **Save As** (Farklı Kaydet) düğmesine tıklamanız gerekir.



Şekil 12. KRAS Analysis Report (KRAS Analiz Raporu) ögesinin seçilmesi. 1 = Report (Rapor), 2 = Report Browser (Rapor Tarayıcısı) penceresi, 3 = KRAS Analysis Report (KRAS Analiz Raporu) seçimi, 4 = Show (Göster).

Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti

Bu protokol KRAS mutasyonlarının tespiti içindir.

Başlamadan önce önemli noktalar

- Bir örnek, örnek incelemesinde başarılı olduğu zaman KRAS mutasyon tahlilleri kullanılarak test edilebilir.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in etkili kullanımı için örnekler 7'li gruplar halinde gruplandırılmalıdır (72 kuyulu rotoru doldurmak için). Daha küçük gruplar, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile daha az örneğin test edilebileceği anlamına gelir.
- Örnek, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile birlikte verilen tüm reaksiyon karışımları kullanılarak test edilmelidir.
- *Taq* DNA polimerazı (*Taq* tüpü) veya *Taq* DNA polimeraz içeren herhangi bir karışımı enzimi etkisiz hale getirebileceği için vorteksle karıştırmayın.
- Ucun fazla enzimle kaplanmasını engellemek için *Taq* DNA polimerazı, pipet ucunu sıvı yüzeyinin hemen altına dikkatlice yerleştirerek pipetle çekin.
- Kontrollere ve örneklerle ilişkin işaretleri en aza indirmek için, doğru reaktif karıştırma ile ilgili olarak *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Kullanım Talimatları belgesinde sunulan rehberliğe harfiyen uyulmalı ve tahlil kurulumu sırasında her karıştırma adımında talimatlara uyulduğundan emin olunmalıdır.
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının ilk kullanımından önce, Rotor-Gene Q yazılım sürümüne karşılık gelen doğru *therascreen* KRAS Assay Package yazılımının yüklendiğinden emin olun.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Her kullanımdan önce, tüm reaktiflerin oda sıcaklığında (15-25°C) en az 1 saat boyunca tam olarak çözdürülmesi, 10 kez ters yüz edilerek karıştırılması ve içeriği tüpün tabanında toplamak için kısa süreliğine santrifüjlenmesi gerekir.

- Her kullanımdan önce *Taq* DNA polimerazın (*Taq* tüpü) oda sıcaklığında (15-25°C) olduğundan emin olun. Enzimi tüpün tabanında toplamak için tüpü kısa süreliğine santrifüjleyin. Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.

Prosedür

1. Tüm reaksiyon karışımı tüplerini, şablonsuz kontrol (No Template Control, NTC) için nükleaz içermeyen su tüpünü ve KRAS Pozitif Kontrolünü (Positive Control, PC tüpü) oda sıcaklığında (15-25°C) en az 1 saat boyunca bekleterek tamamen çözdürün.

Reaktifleri çözdürme, PCR kurulumu ve çalışmayı başlatmadan önce saklama süreleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 6. Reaktifleri çözdürme süresi

Çözdürme süresi			
Minimum	Maksimum	PCR kurulumu sonrası saklama sıcaklığı	Maksimum PCR kurulumu ve saklama süresi
1 saat	4,5 saat	Oda sıcaklığı (15-25°C)	7 saat
1 saat	4,5 saat	2-8°C	18 saat

Not: PCR kurulumu oda sıcaklığında yapılmalıdır. "Saklama", PCR kurulumunun tamamlanması ile Rotor-Gene Q MDx cihazında PCR çalışmasının başlangıcı arasında geçen süreyi ifade eder.

Not: *Taq* DNA polimerazı (*Taq* tüpü) diğer reaktiflerle aynı anda oda sıcaklığına (15-25°C) getirin (bkz. Reaktif Saklama ve Kullanma). Enzimi tüpün tabanında toplamak için tüpü kısa süreliğine santrifüjleyin.

2. Reaktifler çözdürüldüğünde, bölgesel tuz yoğunlaşmalarını önlemek için her tüpü 10 kez ters yüz ederek reaktifleri karıştırın ve ardından içeriği tüpün tabanında toplamak için doğrudan santrifüjleyin.

Not: Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.

3. 8 adet mikrosantrifüj tüpünü (sağlanmamaktadır), aşağıdaki tabloda gösterilen her bir ilgili reaksiyon karışımına uygun olarak etiketleyin. Tablodaki hacimler uyarınca DNA örneklerine, bir KRAS Pozitif Kontrol (PC tüpü) reaksiyonuna ve bir şablonsuz kontrol (NTC tüpü) için nükleaz içermeyen su reaksiyonuna yönelik olarak yeterli miktarda master karışımlar (kontrol veya mutasyon reaksiyon karışımı [CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL veya 13ASP tüpü] artı *Taq* DNA polimeraz [*Taq*]) hazırlayın. PCR'ı kurmak için yeterli farkı sağlamak amacıyla reaktifleri 1 fazla örneğe göre ekleyin.

Not: Master karışımlar, örnek hariç PCR için gerekli bileşenlerin tümünü içerir.

Tablo 7. Master karışım ve karşılık gelen hacim

Tahlil ve reaksiyon karışımı tüpü	Reaksiyon karışımının hacmi	<i>Taq</i> DNA polimeraz hacmi
Kontrol (CTRL tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ALA (12ALA tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ASP (12ASP tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ARG (12ARG tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12CYS (12CYS tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12SER (12SER tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12VAL (12VAL tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
13ASP (13ASP tüpü)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)

* n = reaksiyon sayısı (örnekler artı kontroller).

PCR kurulumu için yeterli farkı sağlamak amacıyla fazladan 1 örnek (n + 1) için yeterli miktarda master karışım hazırlayın. n değeri 7'yi aşmamalıdır (kontroller hariç), çünkü bir çalışmada kullanılabilecek en fazla örnek sayısı 7'dir.

Not: Tahlil master karışımları hazırlanırken, öncelikle ilgili tüpe, gerekli hacimde kontrol veya mutasyon reaksiyon karışımı eklenir ve son olarak *Taq* DNA polimeraz (*Taq* tüpü) eklenir.

4. Uygun sayıda PCR 4 strip tüpü (her stripte 4 tüp vardır), Tablo 4'teki düzene uygun olarak yükleme bloğuna yerleştirin. DNA örneği değerlendirmesi için yükleme bloğundaki çalıştırma düzeni. Sayılar, yükleme bloğu içindeki pozisyonları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir. Tüplerin kapağını kapatmayın.

Not: Kapakları, gerekinceye kadar plastik kap içinde tutun.

5. Reaksiyon karışımının toplam hacminden daha az bir hacme bir pipet koyun ve 10 defa yukarı ve aşağı tamamen aspire ederek master karışımları iyice karıştırın.

Not: Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.

KRAS mutasyonlarının tespiti için, tahlil master karışımları her bir DNA örneği için 8 PC tüpüne, 8 NTC tüpüne ve 8 tüpe eklenmelidir.

6. Hemen 20 µl master karışımı her bir uygun PCR strip tüpüne ekleyin.

Not: Reaksiyon karışımlarını hazırlarken tüp düzeni için Tablo 8'e bakın. KRAS mutasyonlarının tespiti için, master karışımlar her bir DNA örneği için 8 PC tüpüne, 8 NTC tüpüne ve 8 tüpe eklenmelidir.

Tablo 8. KRAS mutasyonlarının tespit edilmesi için yükleme bloğundaki çalıştırma düzeni

Tahlil	Kontroller		Örnek numarası						
	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

* Sayılar, yükleme bloğu içindeki pozisyonları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

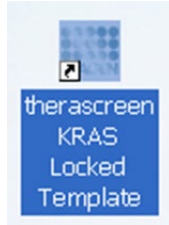
7. NTC tüplerine (tüp konumları 9-16) hemen 5 µl Şablonsuz Kontrol (No Template Control, NTC) için nükleaz içermeyen su ekleyin ve tüpleri kapatın.
8. Örnek tüplerine (tüp konumları 17-72) her bir DNA örneğinden 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın.
9. PC tüplerine (tüp konumları 1-8) KRAS Pozitif Kontrol (Positive Control, PC) 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın.
10. Her bir PCR 4 strip tüpü içindeki en düşük numaralı konumda bulunan ilk tüplerin kapaklarını kalıcı bir kalemle işaretleyerek (örn. 1, 5 ve 9 vb. konumları), tüplerin Rotor Gene Q MDx 5plex HRM cihazındaki 72 kuyulu rotor içine yükleneceği yönü belirtin.
11. Kapatılmış tüpleri 4 kere ters çevirerek örnek ve reaksiyon karışımını karıştırın.

Not: Tahlil kurulumu sırasında doğru reaktif karıştırma sağlanmalıdır.

12. Tüm PCR 4 strip tüpleri, yön işaretlerinden yararlanarak çalıştırma düzenine göre (Tablo 8) 72 kuyulu rotor içinde uygun pozisyonlara yerleştirin.

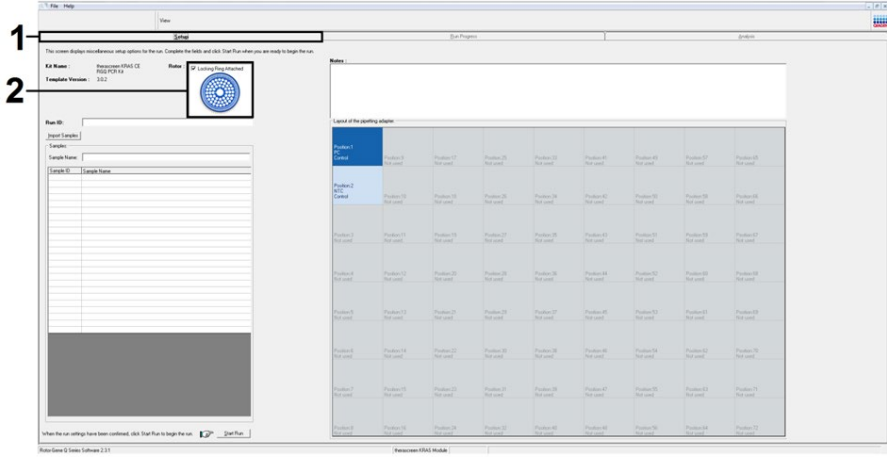
Not: Her PCR çalışmasında en fazla 7 örnek kullanılabilir. Rotor tamamen dolmamışsa, tüm kullanılmayan pozisyonlar kapatılmış boş bir tüple doldurulmalıdır. Böylece, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının termal verimliliği korunmuş olur.

13. 72 kuyulu rotoru Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına yerleştirin. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazıyla birlikte verilir) çalışma sırasında tüpleri sabitlemek için rotorun üstüne yerleştirdiğinden emin olun.
14. Rotor Gene Q MDx 5plex HRM yazılımını başlatmak için Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına bağlı dizüstü bilgisayarın masaüstünde bulunan **therascreen KRAS Locked Template** (therascreen KRAS Kilitli Şablon) simgesine çift tıklayın (Şekil 13).



Şekil 13. therascreen KRAS Locked Template (therascreen KRAS Kilitli Şablon) simgesi.

Varsayılan olarak Setup (Kurulum) sekmesi görünür (Şekil 14).



Şekil 14. 1 = Setup (Kurulum) sekmesi ve 2 = Locking Ring Attached (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu.

15. Kilitleme halkasının uygun şekilde takıldığını doğrulayın ve **Locking Ring Attached** (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının kapağını kapatın.
16. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre **Run ID** (Çalıştırma Kimliği) alanına çalıştırma kimliğini girin.
17. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre **Sample Name** (Örnek Adı) alanına örnek adını girin ve Return tuşuna basın.

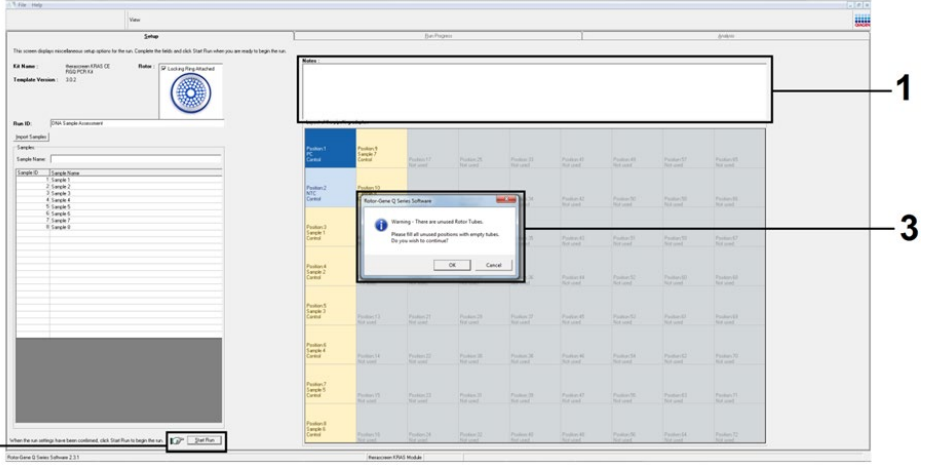
Böylece, örnek adı aşağıdaki örnek listesine eklenir ve örneğe bir Sample ID (Örnek Kimliği) (1, 2, 3 vb.) atanır. Ek olarak, sağ taraftaki Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli, örnek adını içerecek şekilde güncellenir (Şekil 15).

Not: Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) paneline örnek adının eklendiğinden ve bu adın renk değişimi ile vurgulandığından, ayrıca örnek döngüsü altındaki sütunda bulunan 8 tahlilin de vurgulandığından emin olun (Şekil 15).

Not: En fazla 7 örnek eklenebilir. Örnek kimliklerine (örnek döngülerinde), 1 ile 7 arasında bir sayı otomatik olarak atanır.

18. Tüm ilave örneklerin adını girmek için 14. adımı tekrarlayın (Şekil 16).

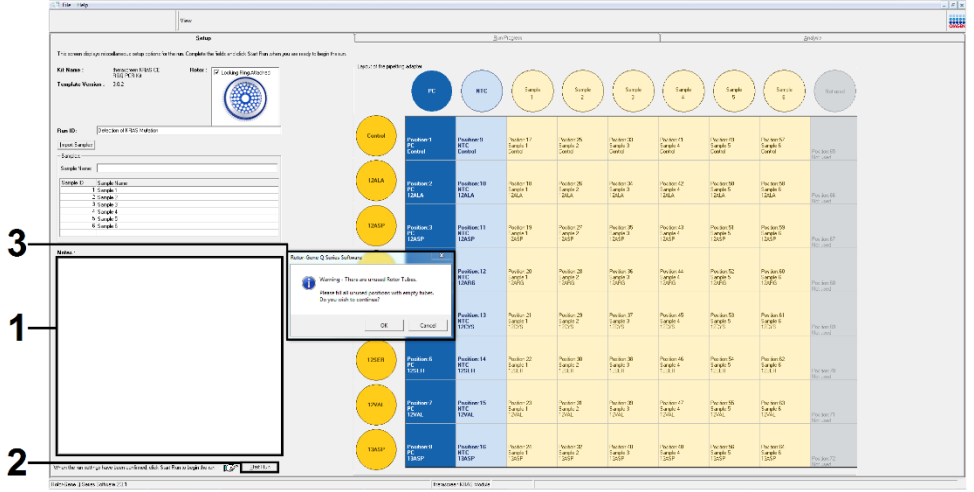
Not: Bir örnek adını düzenlemek için, örnek listesinden **Sample Name** (Örnek Adı) seçeneğine tıklayın; seçilen örnek yukarıdaki **Sample Name** (Örnek Adı) alanında görünür. Örnek adını, lokal isimlendirme mevzuatınıza göre düzenleyin ve adı güncellemek için **Return** tuşuna basın.



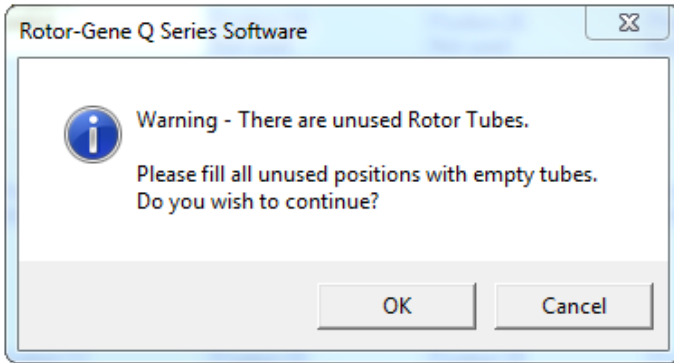
Şekil 16. Sample Name (Örnek Adı) diyalog alanına ilave örnek adları girme. 1 = Sample Name (Örnek Adı) diyalog alanı, 2 = Örnek Listesi, 3 = Ek örnek adları içeren Layout of the pipetting adapter (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli.

19. Tüm örnek adları girildiğinde doğru olduklarını kontrol edin. Gerekliyse **Notes** (Notlar) alanına ilave bilgiler girin, ardından **Start Run** (Çalışmayı Başlat) düğmesine tıklayın (Şekil 17).

Not: Kullanılmayan bir rotor pozisyonu varsa bir uyarı mesajı belirir (Şekil 17 ve Şekil 18) ve kullanıcıya, rotordaki tüm kullanılmayan pozisyonların kapatılmış boş bir tüple doldurulması gerektiğini hatırlatır. Kullanılmayan tüm rotor pozisyonlarının kapatılmış boş bir tüple doldurulmuş olduğunu kontrol edin ve ilerlemek için **OK** (Tamam) seçeneğine tıklayın.

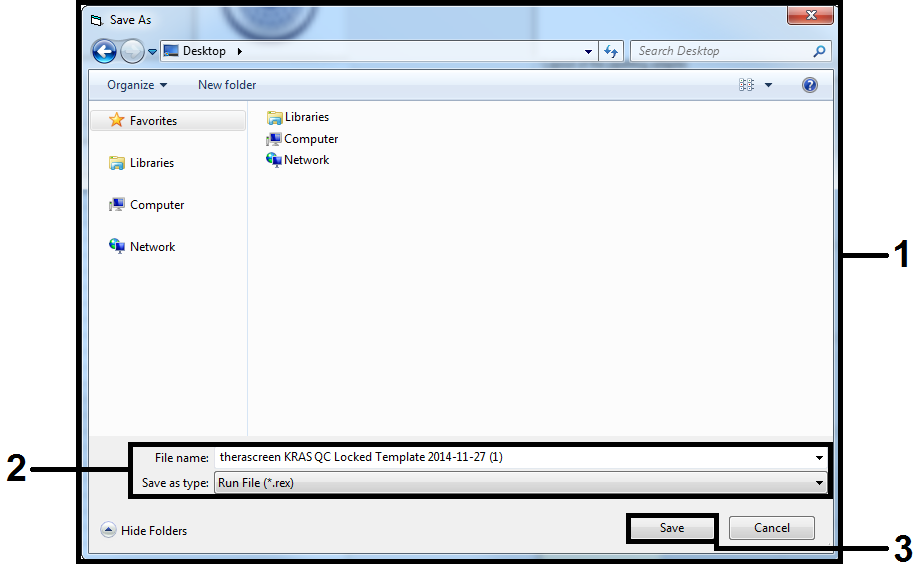


Şekil 17. 1 = Notes (Notlar) diyalog alanı, 2 = Start Run (Çalışmayı Başlat) ve 3 = kullanılmayan rotor pozisyonlarını bildiren Warning (Uyarı).



Şekil 18. Kullanılmayan rotor pozisyonlarını bildiren Warning (Uyarı).

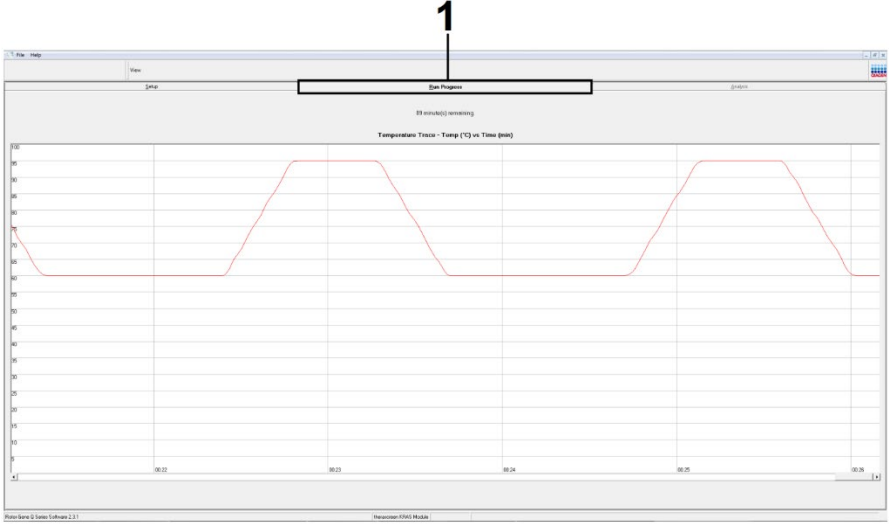
20. Save As (Farklı Kaydet) penceresinde, uygun dosya adını seçin ve PCR çalışmasını seçili konuma *.rex çalışma dosyası olarak kaydedin (Şekil 19).



Şekil 19. Çalışma dosyası kaydediliyor.

PCR çalışması başlar.

Not: Çalışma başladığında, Run Progress (Çalışma İlerlemesi) sekmesi otomatik olarak açılarak sıcaklık takibi ve kalan çalışma süresi konusunda bilgi verir (Şekil 20).



Şekil 20. Run Progress (Çalışma İlerlemesi) sekmesi.

Çalışma bittiğinde, Analysis (Analiz) sekmesi otomatik olarak açılır.

Not: Analysis (Analiz) sekmesi açılmazsa, bu sekmeye tıklamalısınız (Şekil 21).

Not: Hesaplama yönteminin bir açıklaması Sonuçların Yorumlanması bölümünde sunulmuştur.

1 = Analysis (Analiz) sekmesi, 2 = Run Controls, Positive Control (Çalışma Kontrolleri, Pozitif Kontrol) paneli, 3 = Run Controls, Negative Control (Çalışma Kontrolleri, Negatif Kontrol) paneli, 4 = Sample Result Table (Örnek Sonuç Tablosu), 5 = KRAS Mutation Status (KRAS Mutasyon Durumu) sütunu.

Rotor Position	Assay	Flags/Warnings	Positive Control Status
1	Control	-	Valid
2	12SUA	-	Valid
3	12ASP	-	Valid
4	12APG	-	Valid
5	12CYS	-	Valid
6	12SER	-	Valid
7	12VAL	-	Valid
8	12ASP	-	Valid

Rotor Position	Assay	NTC	Internal Control	Flags/Warnings	Negative Control Status
9	Control	Valid	Valid	-	Valid
10	12SUA	Valid	Valid	-	Valid
11	12ASP	Valid	Valid	-	Valid
12	12APG	Valid	Valid	-	Valid
13	12CYS	Valid	Valid	-	Valid
14	12SER	Valid	Valid	-	Valid
15	12VAL	Valid	Valid	-	Valid
16	12ASP	Valid	Valid	-	Valid

Sample ID	Sample Name	KRAS Status	Flags/Warnings	KRAS Mutation Status
1	03710708	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
2	03710718	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
3	03710728	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
4	03710738	Mutation Positive	-	12ASP Detected
5	03710748	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
6	03710758	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
7	03710768	Mutation Positive	-	12ASP Detected

Şekil 21. Analysis (Analiz) sekmesi ve sonuçların raporlanması. 1 = Analysis (Analiz) sekmesi, 2 = Run Controls, Positive Control (Çalışma Kontrolleri, Pozitif Kontrol) paneli, 3 = Run Controls, Negative Control (Çalışma Kontrolleri, Negatif Kontrol) paneli, 4 = Sample Result Table (Örnek Sonuç Tablosu), 5 = KRAS Mutation Status (KRAS Mutasyon Durumu) sütunu.

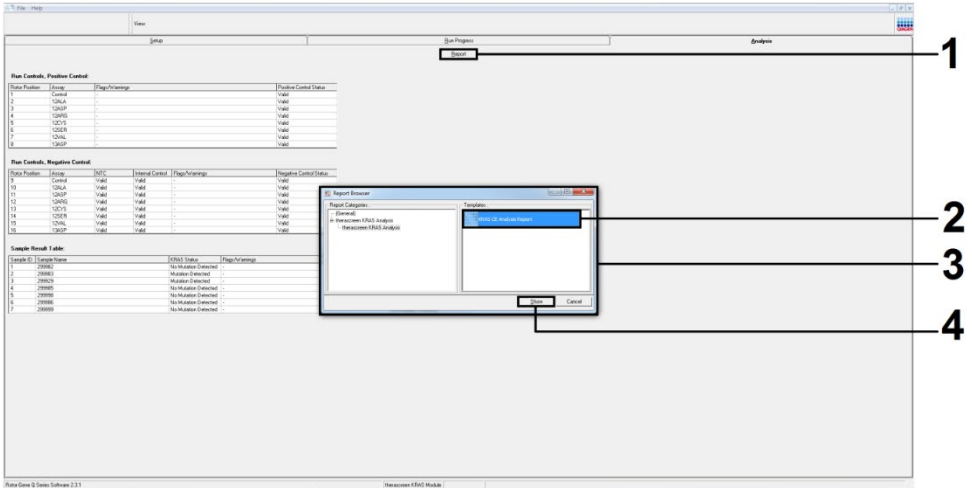
Tahsil sonuçları aşağıdaki gibi raporlanır (Şekil 21).

- **Run Controls, Positive Control (Çalışma Kontrolleri, Pozitif Kontrol) paneli:** Sonuçlar kabul edilebilir aralık dahilindeyse, Positive Control Status (Pozitif Kontrol Durumu) Valid (Geçerli) ifadesini gösterir; aksi halde Invalid (Geçersiz) ifadesi görülür.

- **Run Controls, Negative Control (Çalışma Kontrolleri, Negatif Kontrol) paneli:** Hem NTC hem de Internal Control (Dahili Kontrol) sonuçları kabul edilebilir aralıklar dahilindeyse, Negative Control Status (Negatif Kontrol Durumu) Valid (Geçerli) ifadesini gösterir; aksi halde Invalid (Geçersiz) ifadesi görülür.
- **Sample Result Table (Örnek Sonuç Tablosu) paneli:** Mutasyon Pozitif örnekler için spesifik mutasyonlar KRAS Mutation Status (KRAS Mutasyon Durumu) sütununda raporlanır.

21. Rapor dosyaları oluşturmak için **Report** (Rapor) seçeneğine tıklayın. Report Browser (Rapor Tarayıcısı) penceresi görüntülenir. Templates (Şablonlar) altından **KRAS Analysis Report** (KRAS Analiz Raporu) ögesini seçin ve **Show** (Göster) ögesine tıklayın (Şekil 22).

Not: Raporlar, Web Arşivleri formatında alternatif bir konuma kaydedilebilir. Bunun için, her raporun sol üst köşesindeki **Save As** (Farklı Kaydet) ögesine tıklamanız gerekir.



Şekil 22. KRAS Analysis Report (KRAS Analiz Raporu) ögesinin seçilmesi. 1 = Report (Rapor), 2 = Report Browser (Rapor Tarayıcısı) penceresi, 3 = KRAS Analysis Report (KRAS Analiz Raporu) seçimi, 4 = Show (Göster).

Yalnızca NSCLC örnekleri için not: Yanlış bir G12C (12CYS) mutasyon sonucu verilmesini önlemek için, aşağıda listelenen işaretlerin bulunduğu örnekler Invalid (Geçersiz) olarak yorumlanmalıdır.

- SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT
- SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID
- SAMPLE_INT_CTRL_FAIL
- MUTATION_EARLY_CT
- SAMPLE_INVALID_DATA

Sonuçların Yorumlanması

Analiz ve mutasyon sonuçları, çalışma tamamlandıktan sonra Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package tarafından otomatik olarak çıkarılır. Aşağıdaki bilgiler, Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package'ın analiz ve mutasyon sonuçlarını nasıl çıkardığını açıklamaktadır.

Analiz ve mutasyon sonuçları

Belirli bir reaksiyondan gelen floresansın bir eşik değeriyle kesiştiği PCR döngüsü, C_T değeri olarak tanımlanır. C_T değerleri, spesifik giren DNA miktarını ifade eder. Düşük C_T değerleri yüksek seviyede DNA girdisini, yüksek C_T değerleri ise düşük seviyede DNA girdisini belirtir. C_T değerine sahip reaksiyonlar, pozitif amplifikasyon olarak sınıflanır.

Rotor-Gene Q yazılımı, kaydedilen herhangi 2 değer arasına floresan sinyaller ekler. Bu nedenle C_T değerleri, 0 ile 40 arasında herhangi bir gerçek sayı olabilir (tam sayılarla sınırlı değildir).

therascreen KRAS RGQ PCR Kit için eşik değeri 0,05 bağıl floresans birimi olarak ayarlanır. Bu değer, hem Green hem Yellow floresan kanalları için *therascreen* KRAS Assay Package'da yapılandırılır. Eşik değeri, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in geliştirilmesi sırasında tanımlanmıştır.

Aşağıdaki denklemi kullanarak ΔC_T değerini belirlemek için bir hesaplama yapılır:

$$\Delta C_T = [\text{mutasyon tahlili } C_T \text{ değeri}] - [\text{kontrol tahlili } C_T \text{ değeri}]$$

Çalışma kontrolleri (pozitif kontrol, NTC ve dahili kontroller), kabul edilebilir C_T değerlerinin alınmasını ve reaksiyonların doğru gerçekleştirilmesini sağlamak üzere değerlendirilir.

Örnek ΔC_T değerleri aynı örnekten elde edilen mutasyon tahlili C_T değeri ve kontrol tahlili C_T değeri arasındaki fark olarak hesaplanır. Örnekler bu tahlile ait eşik ΔC_T değerine eşit veya bundan daha düşük ΔC_T değeri verirse mutasyon pozitif olarak sınıflandırılır. Bu değer üzerinde, örnek ya *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit tarafından tespit edilebilecek mutasyon yüzdesinden (tahlillerin limiti dışında) daha az içerir ya da mutasyon negatiftir ve bu ikinci durum No Mutation Detected (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak raporlanır.

Mutasyon reaksiyonlarında amplifikasyon görülmemesi, No Mutation Detected (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak kaydedilir. Arka plan amplifikasyonundan hesaplanan ΔC_T değerlerinin eşik ΔC_T değerlerinden daha yüksek olması beklenir ve örnek, No Mutation Detected (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak sınıflandırılır.

Tahlil sonuçları "[mutasyon adı] Detected" ([mutasyon adı] Tespit Edildi), No Mutation Detected (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi), Invalid (Geçersiz) veya çalışma kontrolü başarısız olursa Run Control Failed (Çalışma Kontrolü Başarısız) şeklinde görüntülenir. Mutasyon pozitif örnekler için spesifik mutasyonlar raporlanır.

Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package tarafından oluşturulan işaretlerin yorumlanması için bkz. *therascreen* KRAS Assay Package tarafından oluşturulan işaretler.

Not: Nadir de olsa, bir tümör birden fazla mutasyona sahip olabilir. Bu gibi durumlarda, en düşük ΔC_T değerini veren mutasyon saptanır.

Sınırlamalar

Test, KRAS geni içindeki 12 ve 13 kodonlarındaki 7 adet mutasyonu tespit etmek üzere tasarlanmıştır. Sonuçları No Mutation Detected (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak raporlanan örnekler, tahlil tarafından tespit edilemeyen KRAS mutasyonları barındırıyor olabilir (örn. 13CYS).

Mutasyonların tespit edilmesi, örneğin bütünlüğüne ve numune içindeki amplifiye edilebilir DNA miktarına bağlıdır. Örnek üzerinde yapılan ilk DNA incelemesi, mutasyon analizi için miktarın yetersiz veya çok fazla olduğuna işaret ediyorsa, prosedür tekrarlanmalıdır.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) prosedüründe kullanılır. Tüm PCR prosedürlerinde olduğu gibi, örnekler test ortamındaki harici DNA kaynakları ve pozitif kontrol içinde DNA tarafından kontamine edilebilir. Kontrol ve reaksiyon karışımı reaktiflerinin kontamine olmasını önlemek için çok dikkatli olun.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, hastalık teşhisi amacıyla kullanılmaz.

CRC örnekleri için, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit yalnızca yabani tip ve mutant örnek ayırımını yapmada kullanılabilir. Test, her bir mutant reaksiyonun, ölçülen spesifik mutasyon için en hassas olacağı şekilde tasarlanmıştır. Bununla birlikte, mutasyonun tespit edildiği örneklerde, diğer mutasyon reaksiyonlarıyla çapraz reaktivite görülebilir. Birden fazla mutant reaksiyon pozitifse, sonuç, en düşük ΔC_T sonucuna sahip olandır.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit yalnızca, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş kolorektal kanser dokusu ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokusu için doğrulanmıştır.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit yalnızca, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ile birlikte kullanım için doğrulanmıştır. Yalnızca Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile kullanım için doğrulanmıştır.

Performans Özellikleri

Analitik Performans

therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in spesifik performans özellikleri, CRC hastaları ve NSCLC hastalarından toplanan, FFPE doku örneklerini içeren araştırmalarla belirlenmiştir. NSCLC örnekleri için numune alma yöntemleri arasında kalın iğne biyopsisi (Core Needle Biopsy, CNB), ince iğne aspirasyonu (Fine Needle Aspirate, FNA) ve kazıma yer almaktadır. Her örnek türü için, 7 adedi bilinen, tahlil tarafından tespit edilmiş KRAS mutasyonları ve bir adedi KRAS yabancı tip (örn. kodon 12 ve 13'te mutasyon yok) olmak üzere 8 adet FFPE insan hücre hattı kullanılmıştır. Örneklerin mutasyon durumu, iki yönlü Sanger sekanslaması ile doğrulanmıştır.

Eşik Değer

Tahlilin eşik değerlerini belirlemek için, CLSI EP17-A (2004) (8) içindeki yönergelere uygun bir yöntem kullanılarak, 225 FFPE örneği test edilmiştir. Kontrol reaksiyonu C_T aralığı 21,92 ila 32,00 olarak saptanmıştır. C_T mutant reaksiyonlardan elde edilen, kontrol reaksiyonunun C_T değerine dayanan eşik değerleri (ΔC_T), Tablo 9'de gösterilmektedir.

Tablo 9. Her mutasyon tahlili için belirlenen eşik değerleri.

	Mutasyon tahlili						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Eşik değeri ($\leq DC_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Kör sınırı

Mutant pozitif şablon bulunmaması durumunda *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in performansını değerlendirmek ve boş bir örneğin düşük mutasyon konsantrasyonuna işaret edebilecek analitik bir sinyal oluşturmadığından emin olmak için, şablonsuz örnekler incelenmiştir. Sonuçlar, mutasyon veya kontrol reaksiyon tüplerinden hiçbirinde tespit edilebilir bir kontrol veya mutant C_T değeri göstermemiştir (dahili kontrol C_T değerlerinin tamamı geçerli olmak üzere).

Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma: CRC

İki yönlü sekanslamaya kıyasla *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile test edilen CRC örneklerinin mutasyon durumundaki uyumluluğunu ortaya koymak için iki araştırma yürütülmüştür. Toplam 137 FFPE örneği, hem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit hem de iki yönlü sekanslama için geçerli sonuçlar vermiştir.

Genel sonuçlar Tablo 10'da gösterilmektedir. Tablo 11'de, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ve iki yönlü sekanslama uyumluluk analizi gösterilmektedir.

Tablo 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile iki yönlü Sanger sekanslamasının karşılaştırılması

		İki yönlü sekanslamadaki mutasyon sonucu								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Toplam
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit sonucu	Negatif	80	-	-	1	-	-	-	1	82
	Pozitif 12ALA	-	3	-	-	-	-	-	-	3
	Pozitif 12ARG	-	-	-	1	-	-	-	-	1
	Pozitif 12ASP	-	-	-	20	-	-	-	-	20
	Pozitif 12CYS	-	-	-	-	3	-	-	-	3
	Pozitif 12SER	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	Pozitif 12VAL	2	-	-	-	-	-	14	-	16
	Pozitif 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	11	12
	Toplam	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tablo 11. Uyumluluk analizi

Uyumluluk ölçümü	Sıklık (%)	%95 Güven Aralığı (CI)
Genel uyumluluk	132/137 (96,35)	92,69-98,21
Pozitif uyumluluk oranı	52/54 (96,30)	89,41-98,77
Negatif uyumluluk oranı	80/83 (96,39)	91,30-98,55

İlk araştırmanın sonuçlarını desteklemek amacıyla tamamen farklı ikinci bir set örnek incelenmiştir. 271 CRC FFPE örneği alınmıştır; 250'si bilinmeyen mutasyon durumuna, 21'i nadir görülen mutasyonlar yoluyla araştırmayı zenginleştirmek için bilinen mutasyon durumuna sahip bu örnekler, yukarıda açıklandığı şekilde Sanger iki yönlü sekanslama ile karşılaştırılmıştır.

Uyumluluk analizi, hem iki yönlü sekanslamada hem de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile incelemede geçerli sonuçlar veren 247 örnek üzerinden yürütülmüştür. 9 adet uyumsuz örnek bulunmuştur. Genel anlamda uyumluluk oranı %96,4'tür. Veriler, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in hassas performansını doğrulamaktadır (Tablo 13 ve Tablo 14).

Tablo 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile iki yönlü Sanger sekanslamasının karşılaştırılması (ikinci araştırma)

	İki yönlü sekanslamadaki mutasyon sonucu									Toplam
	Neg.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit sonucu										
Negatif	26 1	-	-	-	-	-	-	-	1	262
Pozitif 12ALA	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
Pozitif 12ARG	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
Pozitif 12ASP	4	-	-	-	14	-	-	-	-	18
Pozitif 12CYS	6	-	-	-	-	35	-	-	-	41
Pozitif 12SER	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Pozitif 12VAL	5	-	-	-	-	-	1	17	-	23
Pozitif 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	4	5
Toplam	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

Tablo 13. Uyumluluk analizi (ikinci araştırma)

Uyumluluk ölçümü	Sıklık (%)	%95 Güven Aralığı (CI)
Genel uyumluluk	340/360 (94,44)	92,03-96,29
Pozitif uyumluluk oranı	79/80 (98,75)	94,21-99,94
Negatif uyumluluk oranı	261/280 (93,21)	90,20-95,51

Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma: NSCLC

İki yönlü Sanger sekanslama ile karşılaştırıldığında *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile test edilen NSCLC örneklerinin genel mutasyon durumundaki uyumluluğu ortaya koymak amacıyla kazıma, CNB veya FNA yoluyla alınan klinik FFPE NSCLC örnekleri bu çalışmada kullanılmıştır. Test öncesinde, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit kullanılarak her örnekten DNA ekstrakte edilmiştir. Bu testin sonuçları, iki yönlü Sanger sekanslamasından alınan sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Hem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit hem de iki yönlü Sanger sekanslaması için toplamda 360 örnek geçerli sonuç vermiştir, bu sonuçlardan 340'ı uyumludur.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit ile iki yönlü sekanslama arasındaki uyumluluk, Tablo 14'de gösterilmiştir. İki yönlü Sanger sekanslamada iki örnek çift mutasyon sonucu vermiştir. Bir mutasyon *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sonucu ile aynı olduğundan, bu örnekler genel uyumluluk, pozitif uyumluluk ve negatif uyumluluk analizi açısından uyumlu olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 15).

Tablo 14. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile iki yönlü Sanger sekanslamasının karşılaştırılması

		İki yönlü sekanslamadaki mutasyon sonucu								
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit sonucu	Neg.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12CYS_12VAL	12VAL	13ASP	Toplam
	Negatif	261	-	-	-	-	-	-	-	1
Pozitif 12ALA	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
Pozitif 12ARG	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
Pozitif 12ASP	4	-	-	-	14	-	-	-	-	18
Pozitif 12CYS	6	-	-	-	-	35	-	-	-	41
Pozitif 12SER	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Pozitif 12VAL	5	-	-	-	-	-	1	17	-	23
Pozitif 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	4	5
Toplam	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

Tablo 15. Uyumluluk analizi

Uyumluluk ölçümü	Sıklık (%)	%95 Güven Aralığı (CI)
Genel uyumluluk	340/360 (94,44)	92,03-96,29
Pozitif uyumluluk oranı	79/80 (98,75)	94,21-99,94
Negatif uyumluluk oranı	261/280 (93,21)	90,20-95,51

Tespit sınırı (Limit of detection, LOD)

therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in çalışma aralığı, numunede bulunan ve kontrol reaksiyonu C_T değeri ile belirlenen amplifiye edilebilir DNA miktarına bağlıdır. Belirtilen tahlil giriş aralığı, önceden belirlenen kontrol C_T aralığı olan 21,92-32,00 arasındır. Toplam çoğaltılabilir DNA belirlenen giriş aralığı dahilinde ve halen eşik ΔC_T değerinin altında iken LOD, yabancı tür arka planında tespit edilen minimum mutant DNA yüzdesidir.

CRC

therascreen KRAS RGQ PCR Kit içindeki 7 adet mutasyon spesifik reaksiyonun her biri için LOD belirlemek amacıyla bir araştırma yapılmıştır. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit için yabancı tip DNA arka planındaki mutant DNA'yı tespit sınırı, mutasyon pozitif her örnek için test kopyalarının %95'inin pozitif olduğu en düşük dilüsyon faktörü olarak belirlenir.

Düşük ve yüksek girişli DNA veri setleri için her bir tahlile ayrı ayrı lojistik regresyon modelleri uygulanmıştır. Bu modellerde tepki değişkeni, saptanan mutasyonun (tespit = 1) ve saptanmayan mutasyonun (tespit = 0) ikili çıktısıdır; devamlı açıklayıcı değişken ise mutasyon dilüsyonunun \log_2 yüzdesidir. LOD'ler, tahmini tespit olasılığı 0,95 olan mutasyon dilüsyon yüzdesi olarak hesaplanmıştır (Tablo 16).

Tablo 16. FFPE hücre hatları kullanan her mutasyon tahlili için LOD değerleri

Tahlil	LOD C_{95} (yabancı tip DNA içinde mutant DNA yüzdesi)
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 Kit ile yapılan tahliller için LOD, CRC dokusu kullanılarak belirlenmiş ve doğrulanmıştır. Bu LOD sonuçları NSCLC dokusu için tekrar doğrulanmıştır.

Araştırma 2 kısımdan oluşmuştur. 1. Kısımda, 7 mutant FFPE NSCLC hücre hattının her bir mutasyonu temsil eden 60 kopyası, ilgili tahlilin LOD'sine kadar seyreltilmiş ve test edilmiştir. Değerlendirilen her bir örnek için yapılan 60 adet geçerli FFPE hücre hattı kopyasının tümü, değerlendirilen LOD'de kendi ilgili mutasyon reaksiyonları için %100 tespit oranı sunmuştur.

2. Kısımda ise, klinik FFPE NSCLC örneklerinin 3 numune alma yöntemi (kazıma, CNB ve FNA) için her bir mutasyonu temsil eden 96 kopyası, ilgili tahlilin LOD'sine kadar dilüsyona tabi tutulmuş ve test edilmiştir.

96 adet geçerli 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL ve 13ASP kopyası %100 doğru sonuç vermiştir. 12CYS ve 12SER tahlilleri %95,8 LOD tespiti sunmuştur.

Bu da, NSCLC doku örneği ve klinik FFPE NSCLC/FFPE hücre hatları/hastayla eşleşen örnekler değerlendirilirken, önceden belirlenmiş LOD değerinin tüm mutasyon tahlilleri için doğrulandığını göstermektedir.

DNA girişi ve doğrusalılık

DNA giriş düzeyinin ΔC_T değerlerine etkisi

Farklı toplam DNA düzeylerine sahip örnekler aynı oranda mutant DNA içeriyorsa, ölçülen ΔC_T değerlerinin sabit kalması beklenir. Çalışmanın amacı, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit performansının, tahlilin toplam DNA girişi (kontrol CT) aralığı genelinde tutarlı olduğunu göstermektir. 8 adet FFPE hücre hattından ekstrakte edilen DNA kullanılarak, elde edilebilen en düşük kontrol reaksiyon C_T değerine sahip DNA havuzları oluşturulmuştur. Konsantr DNA stokları daha sonra, tüm çalışma aralığında DNA üretmek için seyreltilmiştir (ilk konsantr stok dahil toplamda 5 dilüsyon işlemi yapılmıştır).

Çalışma aralığı içindeki her nokta için, 6 test kopyası almaya yetecek materyal hazırlanmıştır. Her mutasyon reaksiyonu için dilüsyon aralığı ve sonuçlardan alınan ortalama ΔC_T değeri, Tablo 17 ve Tablo 18'de verilmektedir. Genel ΔC_T değerleri, tüm tahliller için *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in çalışma aralığı boyunca tutarlıdır, bu durum DNA düzeyinin örnek mutasyonu sonucunun doğruluğunu etkilemediğini gösterir.

Tablo 17. Giriş kontrol reaksiyon C_T aralığı boyunca DNA girişinin ΔC_T değerleri üzerindeki etkisi – CRC FFPE hücre hatları

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

* 12ASP için toplam kopya sayısı 27'dir.

Tablo 18. Giriş kontrol reaksiyon C_T aralığı boyunca DNA girişinin ΔC_T değerleri üzerindeki etkisi – NSCLC FFPE örnekleri

Tahlil	ΔC _T				
	Dilüsyon 1 ~20-21 C _T	Dilüsyon 2 ~23-24 C _T	Dilüsyon 3 ~26-27 C _T	Dilüsyon 4 ~29-30 C _T	Dilüsyon 5 ~32-33 C _T
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	-*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	-*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	-*

* Düşük DNA konsantrasyonu nedeniyle hiçbir mutasyon reaksiyonu C_T değeri alınamamış, bu nedenle hiçbir ΔC_T değeri hesaplanamamıştır.

DNA girişinin bir fonksiyonu olarak doğrusallık/amplifikasyon

Her bir mutasyon reaksiyonu için, kontrol reaksiyonuna kıyasla *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in çalışma aralığı boyunca PCR doğrusallığı ve amplifikasyon verimliliği gösterilmiştir. Amplifikasyon verimliliği, her mutasyon reaksiyonu ve kontrol reaksiyonu için $[10(-1/e^{\text{ğim}})] -1$ olarak hesaplanmıştır.

Kontrolün mutant reaksiyona kıyasla amplifikasyon verimliliği; ΔC_T değerinin, dolayısıyla da mutasyon sonucunun, tahlilin çalışma aralığı boyunca tutarlı olduğunu gösterir. Verilerin bir özeti Tablo 19 (CRC örnekleri) ve Tablo 20'de (NSCLC örnekleri) gösterilmektedir.

Tablo 19. Kontrol ve mutasyon reaksiyonlarında amplifikasyon verimliliği: CRC hücre hatları

Örnek		Kesişme noktası	Kesişme noktasındaki standart yanılma	Hesaplanan eğim	Standart yanılma (eğim)	2 taraflı %95 güven aralığı alt limiti (eğim)	2 taraflı %95 güven aralığı üst limiti (eğim)	Amplifikasyon verimliliği	Amplifikasyon verimliliklerinin farkı
12ALA	Kontrol C _T	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03
	12ALA C _T	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019	
12ARG	Kontrol C _T	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056
	12ARG C _T	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01	
12ASP	Kontrol C _T	20,385	0,13 0,065	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	12ASP C _T	21,347		-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	Kontrol C _T	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032
	12CYS C _T	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058	
12SER	Kontrol C _T	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105
	12SER C _T	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101	
12VAL	Kontrol C _T	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033
	12VAL C _T	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04	
13ASP	Kontrol C _T	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	12ASP C _T	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Tablo 20. Kontrol ve mutasyon reaksiyonlarında amplifikasyon verimliliği: NSCLC örnekleri

Örnek	Kesişme noktası	Kesişme noktasındaki standart yanılma	Hesaplanan eğim	Standart yanılma (eğim)	2 taraflı %95 güven aralığı alt limiti (eğim)	2 taraflı %95 güven aralığı üst limiti (eğim)	Amplifikasyon verimliliği	Amplifikasyon verimliliğinin farkı	
12ALA	Kontrol 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	Kontrol 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	Kontrol 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	Kontrol 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	Kontrol 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	Kontrol 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	Kontrol C _T	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066
	12ASP C _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01	

Mutasyon yüzdesinin bir fonksiyonu olarak doğrusallık/amplifikasyon

Bu araştırmanın amacı, seri olarak seyreltilmiş mutant pozitif örneğin, yaklaşık 22–23C_T girdi C_T düzeyinden itibaren *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in çalışma aralığı boyunca amplifikasyon verimliliğini ölçmektir.

CRC FFPE hücre hatları ve NSCLC örneklerinden alınan DNA numuneleri, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile PCR yapılmadan önce OD değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Daha sonra DNA stokları ile yaklaşık 23 C_T değerine karşılık gelecek şekilde Kontrol Reaksiyonu C_T hazırlanmıştır. Stoklar, şablon içindeki mutant DNA yüzdesini değiştirirken toplam yabancı tip DNA oranını sabit tutarak, her seferinde iki defa yabancı tip DNA kullanılarak seri olarak seyreltilmiştir.

Mutasyon başına 6 kopya almaya yetecek DNA havuzları hazırlanmıştır. Her dilüsyon noktasındaki her mutasyon için C_T ve ΔC_T verileri hesaplanmıştır. Mutasyon reaksiyonu C_T değerine karşılık \log_2 DNA girişi dilüsyonu ile doğrusal bir regresyon modeli oluşturulmuştur. Araştırma, tutarlı konsantrasyondaki yabancı tip DNA arka planındaki mutasyon dilüsyon işleminin, yukarıdaki doğrusallık araştırmasında belirlenen değerlerin önemli ölçüde dışına çıkmayan bir amplifikasyon verimliliği ortaya çıkardığını göstermiştir.

Olumsuz etkileyen maddeler

Bu araştırmanın amacı, potansiyel olarak olumsuz etkileyen maddelerin *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in performansı üzerine olan etkisini değerlendirmektir. Bu, deneylere çeşitli konsantrasyonlarda ekleme yapılması yoluyla her bir maddenin test örneklerinin ΔC_T değerleri ve mutasyon durumu üzerindeki etkisi analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Test edilen DNA ekstraksiyon işleminde potansiyel olarak olumsuz etkileyen maddeler Buffer AL, Buffer ATL, etanol, parafin mumu, Proteinaz K, Wash Buffer AW1, Wash Buffer AW2 ve ksilen olmuştur. Kitten gelen son elüsyon tamponu olan Buffer ATE de boş kontrol olarak teste sokulmuştur.

Normal kullanım esnasında karşılaşılabilecek beklenen konsantrasyonlarda, potansiyel olumsuz etkileyen maddelerin hiçbiri için, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in mutasyon pozitif örneklerle mutasyon negatif örnekleri ayırt etme kapasitesi üzerinde bir etki gözlenmemiştir.

Olumsuz etkileyen maddeler araştırmasına ek olarak, tümör örneklerinde bulunan yüksek düzeyde ölü hücrenin geçerli veri alma kapasitesi üzerindeki etkisini belirlemek adına, klinik örneklerdeki potansiyel doku ölümü etkisi de değerlendirilmiştir. Analitik Referans Yöntemiyle Karşılaştırma araştırmalarının bir parçası olarak değerlendirilen toplam 421 örnekten 29'u, patolojik incelemede belirlendiği şekilde > %50 doku ölümü sergilemiştir. Bu 29 örnekten 28'i ise iki yönlü Sanger sekanslamasıyla uyumlu, geçerli sonuçlar vermiştir. Yalnızca bir sonuç yetersiz DNA'dan dolayı geçersiz olmuştur.

Çapraz kontaminasyon

Bu çalışmanın amacı *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit kullanılarak DNA örnekleri arasında potansiyel yanlış pozitif sonuçlara yol açan çapraz kontaminasyon derecesini belirlemektir. Potansiyel çapraz kontaminasyon kaynakları aşağıdakileri içerir:

- Örnek alımı (örn. slaytların kazınması)
- Örneklerin pipetlenmesi
- Örnek tüplerinin kapağının kapatılması
- Kullanım esnasında kit reaktiflerinin kontamine olması
- Tahlil tüplerinin Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına yüklenmesi

Bu araştırma için FFPE standartları kullanılmıştır: yabani tip standardı ve 12ALA standardı (12ALA reaksiyonu kit içindeki en düşük LOD'ye sahip olduğu için).

Araştırmada, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihaz çalışmaları içindeki ve arasındaki kontaminasyon potansiyelini incelemek için 10 adet PCR çalışması yer almıştır. Bu test çalışmalarında, yabani tip DNA içeren tüpler, mutant DNA'dan kontaminasyon için test edilmiştir.

Bu araştırmanın sonucunda, çapraz kontaminasyon görülmesi beklenen yabani tip DNA numunelerinde saptanabilir bir kontaminasyona rastlanmamıştır.

Münhasırlık/çapraz reaktivite

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, KRAS geninde polimorf olmayan bir bölgeyi tespit eden tek bir kontrol reaksiyonu ve 7 adet mutasyon spesifik reaksiyon dahil olmak üzere 8 ayrı reaksiyondan oluşmaktadır. 12 veya 13 kodonlarındaki yabani tip KRAS sekansını özel olarak ölçen bir reaksiyon yoktur. 7 mutasyonun herhangi birinin pozitif mutasyon sonucu vermemesi durumunda KRAS'tan No Mutation Detected (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) sonucu alınır (yabani tip).

Dolayısıyla, yanlış pozitif sonuç alınmadığından emin olmak adına, spesifik olmayan amplifikasyon miktarını veya yüksek miktarda KRAS yabani tip DNA'da her reaksiyonda oluşan çapraz reaktivite durumunu ortaya koymak önemlidir. Benzer şekilde, tahlille saptanması gerekmeyen KRAS mutasyonları için spesifik olmayan amplifikasyon değerlendirilmiştir. Bu da, mutant reaksiyonlar arasındaki çapraz reaktivite miktarının, yüksek miktarda mutant DNA bulunması durumunda hatalı mutasyon sonuçları vermediğini göstermektedir. Bu tahlilde kullanılan DNA girişi kontrol C_T aralığına (21,92-32,00) bağlı olduğu için, en yüksek DNA girişi konsantrasyonu, kontrol C_T değerinin yaklaşık 22 olmasına dayanır.

Spesifik olmayan amplifikasyon/çapraz reaktivite: yabani tip KRAS DNA

Spesifik olmayan yabani tip DNA amplifikasyonu miktarının spesifik mutasyonları çoğaltmak için tasarlanmış reaksiyon karışımlarına oranı ele alınmıştır. Toplamda 60 adet yabani tip FFPE hücre hattı DNA kopyası ve 60 NSCLC örneği, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit kullanılarak en yüksek çoğaltılabilir DNA giriş düzeyi konsantrasyonunda incelenmiştir.

Kontrol C_T değerleri yaklaşık 22-23 olmuştur. Sonuçlar, ΔC_T değerlerinin belirlenen eşikleri aştığını göstermiştir ve yabani tip kopyaların en az %95'inin doğru sonucu verdiği görülmüştür.

Spesifik olmayan amplifikasyon/çapraz reaktivite/münhasırlık: mutasyon pozitif KRAS DNA

Yüksek konsantrasyonda giriş DNA'sına sahip mutant örnekler, tüm reaksiyon karışımlarına karşı test edilmiştir. Kontrol Reaksiyonu C_T değeri yaklaşık 23 olacak şekilde her bir CRC ve NSCLC FFPE hücre hattından DNA örnekleri alınarak hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan, mutasyon örneği başına 6 kopya değerlendirilmiştir. Örnekteki mutasyon oranını, hücre hattı DNA'sındaki mutant doku yüzdesi kontrol etmektedir.

Tablo 21 ve Tablo 22'de verilen ortalama ΔC_T değerleri, mutant reaksiyonlar arasında çapraz reaktivite olduğunu göstermektedir. Her durumda sonuçlar, eşleşen mutasyon reaksiyonu ile birlikte doğru mutasyon sonucunun alındığını göstermektedir (örn. en düşük ΔC_T değeri doğru mutasyon sonucudur). Diğer tüm test işlemleri, saptanmamış veya ΔC_T eşliğinin dışında sonuç vermiştir.

Tablo 21. Yüksek giriş aralığında CRC FFPE hücre hattı DNA'sı kullanan mutasyon reaksiyonları arasındaki çapraz reaktivite (ΔC_T)

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

Uygulanamaz Çapraz reaksiyon yok.

* Eşleşen reaksiyonlardan gelen ΔC_T değerleri.

† Eşik değeri altındaki çapraz reaktif reaksiyonlardan gelen ΔC_T .

Tablo 22. Yüksek giriş aralığında NSCLC FFPE hücre hattı DNA'sı kullanan mutasyon reaksiyonları arasındaki çapraz reaktivite (ΔC_T)

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

Uygulanamaz Çapraz reaksiyon yok.

* Eşleşen reaksiyonlardan gelen ΔC_T değerleri.

† Eşik değeri altındaki çapraz reaktif reaksiyonlardan gelen ΔC_T .

Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in kesinliği, CLSI EP12-A ve EP5-A2 (21, 22) maddelerinin kullanıldığı bir protokol yoluyla belirlenmiştir. Bu değerlendirmede klinik CRC örnekleri kullanılmıştır. Her bir mutasyon için bir adet yabancı tip ve bir adet örnek, tüm örnekleri ve kontrolleri *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in 3 lotunda test eden 3 sahadaki 2 operatör tarafından, 5 gün boyunca her gün, günde 2 çalışma olmak üzere, her çalışmada her bir örneğin 2 kopyası kullanılarak *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile test edilmiştir. Her örnekteki her bir reaksiyon için elde edilen C_T ve ΔC_T değerleri de değişim bileşeni analizi ile analiz edilmiştir.

Birçok lot, platform ve operatör genelinde tüm tahliller için, hem laboratuvar içi hem de laboratuvarlar arası deneylerde, en az 39/40 doğru mutasyon sonucu alınmış ve düşük düzey mutant (3xLOD) ve yabancı tip örnekler için *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in yeniden üretilebilirliği ortaya konmuştur. C50 ve 3xLOD örnekleri kullanılarak belirlenen değişim tahminleri (1x standart sapma), Tablo 23 ve Tablo 24'te verilmiştir.

Tablo 23. Tahlil değişim tahminleri

Tahlil	ΔC_T için %CV		Mutant C_T için %CV		Kontrol C_T için %CV		
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	WT
12ALA	13,14	8,32	1,87	2,02	0,97	1,12	1,12
12ARG	10,79	8,04	1,59	1,96	1,24	1,51	1,15
12ASP	12,86	5,87	1,11	1,00	0,90	0,90	1,04
12CYS	17,61	10,83	1,86	2,02	1,54	1,22	1,15
12SER	13,97	10,43	1,71	2,11	0,94	1,19	1,15
12VAL	9,66	15,47	1,52	1,65	1,11	3,74	1,26
13ASP	13,73	9,35	1,91	2,08	1,11	1,41	1,19

Tablo 24. Tekrarlanabilirlik kesinlik tahminleri

Tahlil	ΔC_T için %CV		Mutant C_T için %CV		Kontrol C_T için %CV		
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	WT
12ALA	10,71	7,51	1,69	1,76	0,77	0,90	0,79
12ARG	9,83	8,04	1,21	1,76	0,84	1,33	0,90
12ASP	10,16	4,08	0,93	0,89	0,80	0,76	0,76
12CYS	13,15	8,80	1,31	1,76	1,40	1,01	0,76
12SER	6,76	6,18	1,10	1,48	0,80	0,90	0,90
12VAL	9,21	15,32	1,40	1,42	0,91	3,49	0,94
13ASP	8,67	7,01	1,30	1,65	0,91	1,19	0,97

Mutant ve yabancı tip örnekler halinde test edilen 3xLOD örneklerin tahmini oranı, genel olarak ve sahaların her biri için raporlanmıştır. Tüm tahliller ve örnek kombinasyonları için, 80 kopyanın en az 79'u doğru mutasyon sonucunu vermiştir. Doğru sonuçların genel oranı, mutasyon pozitif (3xLOD) örnekler için %99,6 (1115/1120); %99,6 (558/560) ve mutasyon tespit edilmeyen (yabancı tip) örnekler için %99,5 (557/560) olmuştur (Tablo 25).

Tablo 25. Genel doğru sonuç oranı

Mutasyon	Doğru sonuçlar	
	3xLOD örnekler	Yabancı tip örnekler (düşük)
12ALA	79/80	80/80
12ARG	80/80	79/80
12ASP	80/80	80/80
12CYS	79/80	80/80
12SER	80/80	79/80
12VAL	80/80	79/80
13ASP	80/80	80/80

NSCLC

therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in laboratuvar içi kesinliği (tekrarlanabilirlik) değerendirilmiştir. Hem mutasyon sonuçlarının doğruluğu hem de ΔC_T değerlerinin kesinliği (Mutasyon Reaksiyonu ve Kontrol Reaksiyonu arasındaki C_T değerleri farkı) raporlanmıştır.

KRAS kiti tarafından tespit edilen 7 mutasyonun her biri için bir adet (LOD ve 2xLOD seviyelerinde) ve bir yabani tip (Wild Type, WT) panel üyesi olmak üzere toplamda 15 panel üyesi hazırlanmıştır. Mutant panel üyeleri, bulunurluk durumuna bağlı olarak bir FFPE hücre hattı veya bir klinik örnek ile temsil edilmiştir. Tüm örnekler, 27 değerinde bir kontrol C_T 'ye normalize edilmiş ve mutant örnekler, 1x LOD ve 2x LOD mutasyon seviyelerinde örnekler için yeterli materyal elde etmek üzere yabani tip DNA içinde seyreltilmiştir.

Doğru sonuçların oranı, her bir test paneli için Tablo 26'da sunulmuş ve kantitatif kesinlik değerleri Tablo 27'de sunulmuştur.

Tablo 26. Doğru mutasyon sonuçlarının oranı

Gruplandırma değişkenleri		Oran		İki taraflı %95 güven limiti	
Örnek seviyesi	Tahlil	Kesir	Yüzde	Alt	Üst
2xLOD	12ALA	28/28	%100,00	%87,66	%100,00
	12ARG*	28/28	%100,00	%87,66	%100,00
	12ASP	28/28	%100,00	%87,66	%100,00
	12CYS	28/28	%100,00	%87,66	%100,00
	12SER*	28/28	%100,00	%87,66	%100,00
	12VAL	28/28	%100,00	%87,66	%100,00
	13ASP*	28/28	%100,00	%87,66	%100,00
LOD	12ALA	39/40	%97,50	%86,84	%99,94
	12ARG	40/40	%100,00	%91,19	%100,00
	12ASP	40/40	%100,00	%91,19	%100,00
	12CYS	40/40	%100,00	%91,19	%100,00
	12SER*	40/40	%100,00	%91,19	%100,00
	12VAL	40/40	%100,00	%91,19	%100,00
	13ASP*	38/40	%95,00	%83,08	%99,39
WT	Hepsi	28/28	%100,00	%87,66	%100,00

* FFPE hücre hattı ile temsil edilir

Tablo 27. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – tekrarlanabilirlik

Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahil	Gözlem sayısı	Ortalama	Günlük Arası*	N Çalışma Arası*	Rgq Arası*	Kit İstilan Arası*	Operatörler Arası*	Rezidüel*	Toplam
Delta Cr	2xLOD	12ALA	28	5,54	(0,0000, %0,00)	(0,1221, %2,20)	(0,0443, %0,80)	(0,0385, %0,70)	(0,0000, %0,00)	(0,1335, %2,41)	(0,1843, %3,33)
		12ARG	28	4,80	(0,0000, %0,00)	(0,1891, %3,94)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,3244, %6,76)	(0,3737, %7,79)
		12ASP	28	4,72	(0,0860, %1,82)	(0,1446, %3,06)	(0,0000, %0,00)	(0,1463, %3,10)	(0,1374, %2,91)	(0,1751, %3,71)	(0,2797, %5,93)
		12CYS	28	5,66	(0,0563, %0,99)	(0,0000, %0,00)	(0,0995, %1,76)	(0,0000, %0,00)	(0,0390, %0,69)	(0,2306, %4,08)	(0,2498, %4,41)
		12SER	28	5,36	(0,1429, %2,67)	(0,0274, %0,51)	(0,0000, %0,00)	(0,0647, %1,21)	(0,0000, %0,00)	(0,1753, %3,27)	(0,2129, %3,97)
		12VAL	28	4,26	(0,0000, %0,00)	(0,1016, %2,39)	(0,0593, %1,39)	(0,1128, %2,65)	(0,0000, %0,00)	(0,2095, %4,92)	(0,2457, %5,77)
		13ASP	28	5,23	(0,0000, %0,00)	(0,2892, %5,53)	(0,0157, %0,30)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2171, %4,15)	(0,3575, %6,83)
LOD	LOD	12ALA	40	6,36	(0,0000, %0,00)	(0,1584, %2,49)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2346, %3,69)	(0,2819, %4,43)
		12ARG	40	5,45	(0,0036, %0,07)	(0,1639, %3,01)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0797, %1,46)	(0,1674, %3,07)	(0,2397, %4,40)
		12ASP	40	4,73	(0,0000, %0,00)	(0,2485, %5,25)	(0,1087, %2,30)	(0,0000, %0,00)	(0,0816, %1,72)	(0,1041, %2,20)	(0,2837, %6,00)
		12CYS	40	6,62	(0,1688, %2,55)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2056, %3,11)	(0,0000, %0,00)	(0,2909, %4,40)	(0,3652, %5,52)
		12SER	40	6,37	(0,1006, %1,58)	(0,3153, %4,95)	(0,0000, %0,00)	(0,0340, %0,53)	(0,0000, %0,00)	(0,2253, %3,54)	(0,3854, %6,05)
		12VAL	40	5,13	(0,2874, %5,60)	(0,0976, %1,90)	(0,0227, %0,44)	(0,0874, %1,71)	(0,0000, %0,00)	(0,1629, %3,18)	(0,2965, %5,78)
		13ASP	38	6,26	(0,3433, %5,48)	(0,1227, %1,96)	(0,0778, %1,24)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,3459, %5,52)	(0,4738, %7,57)

* SD, %CV

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 27. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – tekrarlanabilirlik (devamı)

Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahill	Gözlem sayısı	Ortalama	Günlük Arası*	N Çalışma Arası*	Rgq Arası*	Kiti lotları Arası*	Operatörler Arası*	Rezidüel*	Toplam
Yeşil Cr	2xLOD	12ALA	28	32,09	(0,0000, %0,00)	(0,1314, %0,41)	(0,0000, %0,00)	(0,0675, %0,21)	(0,1073, %0,33)	(0,1158, %0,36)	(0,1957, %0,61)
		12ARG	28	31,50	(0,0000, %0,00)	(0,2598, %0,82)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,3324, %1,06)	(0,4189, %1,33)
		12ASP	28	31,30	(0,0000, %0,00)	(0,1891, %0,60)	(0,0000, %0,00)	(0,0920, %0,29)	(0,0000, %0,00)	(0,1800, %0,58)	(0,2667, %0,85)
		12CYS	28	32,07	(0,0000, %0,00)	(0,2523, %0,79)	(0,0000, %0,00)	(0,1606, %0,50)	(0,2011, %0,63)	(0,1512, %0,47)	(0,3388, %1,06)
		12SER	28	32,06	(0,0000, %0,00)	(0,2049, %0,64)	(0,0000, %0,00)	(0,1250, %0,39)	(0,1177, %0,37)	(0,1263, %0,39)	(0,2648, %0,83)
		12VAL	28	30,65	(0,0000, %0,00)	(0,1772, %0,58)	(0,0000, %0,00)	(0,1198, %0,39)	(0,1063, %0,35)	(0,1656, %0,54)	(0,2639, %0,86)
		13ASP	28	31,98	(0,0000, %0,00)	(0,3773, %1,18)	(0,0497, %0,16)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1813, %0,57)	(0,4138, %1,29)
LOD	LOD	12ALA	40	32,86	(0,0000, %0,00)	(0,2332, %0,71)	(0,0516, %0,16)	(0,0840, %0,26)	(0,1319, %0,40)	(0,1780, %0,54)	(0,3144, %0,96)
		12ARG	40	31,90	(0,0000, %0,00)	(0,2186, %0,69)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2289, %0,72)	(0,1519, %0,48)	(0,3106, %0,97)
		12ASP	40	31,02	(0,0000, %0,00)	(0,1762, %0,57)	(0,1093, %0,35)	(0,1296, %0,42)	(0,2492, %0,80)	(0,1005, %0,32)	(0,2908, %0,94)
		12CYS	40	33,14	(0,1216, %0,37)	(0,0493, %0,15)	(0,0000, %0,00)	(0,3468, %1,05)	(0,0501, %0,15)	(0,3155, %0,95)	(0,4216, %1,27)
		12SER	40	33,08	(0,0832, %0,25)	(0,2591, %0,78)	(0,0000, %0,00)	(0,2424, %0,73)	(0,0000, %0,00)	(0,2258, %0,68)	(0,3864, %1,17)
		12VAL	40	31,62	(0,2858, %0,90)	(0,0951, %0,30)	(0,0000, %0,00)	(0,2244, %0,71)	(0,0344, %0,11)	(0,1763, %0,56)	(0,3432, %1,09)
		13ASP	38	33,09	(0,3237, %0,98)	(0,1009, %0,31)	(0,1409, %0,43)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2785, %0,84)	0,4133,

* SD, %CV

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 27. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – tekrarlanabilirlik (devamı)

Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahill	Gözlem sayısı	Ortalama	Günlük Arası*	N Çalışma Arası*	Rgq Arası*	Kiti lotları Arası*	Operatorler Arası*	Rezidüel*	Toplam
Sarı Cr	2xLOD	12ALA	28	33,20	(0,0000, %0,00)	(0,0515, %0,16)	(0,0330, %0,10)	(0,0000, %0,00)	(0,0607, %0,18)	(0,2117, %0,64)	(0,2235, %0,67)
		12ARG	28	33,05	(0,1397, %0,42)	(0,1321, %0,40)	(0,0000, %0,00)	(0,2393, %0,72)	(0,0000, %0,00)	(0,3792, %1,15)	(0,4559, %1,38)
		12ASP	28	33,00	(0,0597, %0,18)	(0,2131, %0,65)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1313, %0,40)	(0,1954, %0,59)	(0,3059, %0,93)
		12CYS	28	33,19	(0,0646, %0,19)	(0,0971, %0,29)	(0,0233, %0,07)	(0,0679, %0,20)	(0,0863, %0,26)	(0,1943, %0,59)	(0,2378, %0,72)
		12SER	28	32,85	(0,0525, %0,16)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0337, %0,10)	(0,0937, %0,29)	(0,1320, %0,40)	(0,1588, %0,48)
		12VAL	28	33,11	(0,0000, %0,00)	(0,1026, %0,31)	(0,0000, %0,00)	(0,1469, %0,44)	(0,1469, %0,44)	(0,2912, %0,88)	(0,3458, %1,04)
		13ASP	28	33,03	(0,0000, %0,00)	(0,1928, %0,58)	(0,1015, %0,31)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1450, %0,44)	(0,2493, %0,75)
LOD		12ALA	40	33,37	(0,0000, %0,00)	(0,2010, %0,60)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1942, %0,58)	(0,2177, %0,65)	(0,3257, %0,98)
		12ARG	40	33,14	(0,0000, %0,00)	(0,2168, %0,65)	(0,0000, %0,00)	(0,3061, %0,92)	(0,1637, %0,49)	(0,1748, %0,53)	(0,3717, %1,12)
		12ASP	40	32,98	(0,0000, %0,00)	(0,2599, %0,79)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1735, %0,53)	(0,2228, %0,68)	(0,3618, %1,10)
		12CYS	40	33,31	(0,0000, %0,00)	(0,2028, %0,61)	(0,0000, %0,00)	(0,1209, %0,36)	(0,0000, %0,00)	(0,2132, %0,64)	(0,3050, %0,92)
		12SER	40	33,08	(0,1254, %0,38)	(0,2847, %0,86)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1505, %0,46)	(0,3263, %0,99)
		12VAL	40	33,29	(0,3133, %0,94)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2621, %0,79)	(0,3574, %1,07)
		13ASP	40	33,13	(0,1101, %0,33)	(0,1326, %0,40)	(0,1666, %0,50)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1925, %0,58)	(0,2804, %0,85)

* SD, %CV

Tablonun devamı bir sonraki sayfada

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 27. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – tekrarlanabilirlik (devamı)

Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahill	Gözlem sayısı	Ortalama	Günlük Arası*	N Çalışma Arası*	RGQ Arası*	Kit lotları Arası*	Operatörler Arası*	Rezidüel*	Toplam
Sarı Cr	WT	12ALA	28	33,41	(0,1443, %0,43)	(0,1997, %0,60)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2269, %0,68)	(0,3248, %0,97)
		12ARG	28	33,30	(0,0875, %0,26)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,4098, %1,23)	(0,0904, %0,27)	(0,2368, %0,71)	(0,3983, %1,20)
		12ASP	28	33,12	(0,1591, %0,48)	(0,1748, %0,53)	(0,0477, %0,14)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2131, %0,64)	(0,3075, %0,93)
		12CYS	28	33,42	(0,0000, %0,00)	(0,2009, %0,60)	(0,0000, %0,00)	(0,1444, %0,43)	(0,0000, %0,00)	(0,2121, %0,63)	(0,3077, %0,92)
		12SER	28	33,22	(0,2485, %0,75)	(0,0000, %0,00)	(0,0633, %0,19)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1497, %0,45)	(0,2517, %0,76)
		12VAL	28	33,35	(0,0000, %0,00)	(0,2591, %0,78)	(0,0000, %0,00)	(0,1429, %0,43)	(0,0000, %0,00)	(0,2721, %0,82)	(0,3863, %1,16)
		13ASP	28	33,45	(0,0000, %0,00)	(0,1194, %0,36)	(0,0526, %0,16)	(0,0341, %0,10)	(0,0000, %0,00)	(0,1651, %0,49)	(0,2078, %0,62)

* SD, %CV

therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in laboratuvarlar arası kesinliği (yeniden üretilebilirlik) değerlendirilmiştir. Üç farklı laboratuvar (test sahası) kullanılmıştır. Bu çalışma için, tekrarlanabilirlik çalışmasında kullanılan test panelinin aynısı kullanılmıştır. Her sahada, laboratuvar koşulları RGQ cihazı, operatör, KRAS Kit lotu ve gün başına çalışma sayısı bakımından farklılık göstermiş ve ardışık olmayan 22 günde saha başına toplam 88 çalışma elde edilmiştir.

Doğru mutasyon sonuçlarının oranı Tablo 28'de belirtilmiştir. Kantitatif kesinlik değerleri Tablo 29'da sunulmuştur. KRAS kitinin toplam yeniden üretilebilirlik değeri, Tablo 29'un Toplam (SD, %CV) sütununda gösterilmiştir.

Tablo 28. Tüm sahalarda genelinde doğru mutasyon sonuçlarının oranı

Gruplandırma değişkenleri		Oran		İki taraflı %95 güven limiti	
Örnek seviyesi	Tahlil	Kesir	Yüzde	Alt	Üst
2xLOD	12ALA	84/84	%100,00	%95,70	%100,00
	12ARG*	84/84	%100,00	%95,70	%100,00
	12ASP	84/84	%100,00	%95,70	%100,00
	12CYS	84/84	%100,00	%95,70	%100,00
	12SER*	84/84	%100,00	%95,70	%100,00
	12VAL	84/84	%100,00	%95,70	%100,00
	13ASP*	84/84	%100,00	%95,70	%100,00
LOD	12ALA	118/120	%98,33	%94,11	%99,80
	12ARG	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	12ASP	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	12CYS	119/120	%99,17	%95,44	%99,98
	12SER*	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	12VAL	120/120	%100,00	%96,97	%100,00
	13ASP*	118/120	%98,33	%94,11	%99,80
WT	Hepsi	82/84	%97,62	%91,66	%99,71

* FFPE hücre hattı ile temsil edilir

Tablo 29. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – yeniden üretilebilirlik

Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahsil	Gözlem sayısı	Ortalama	Sahalar arası*	Günler arası saha içi*	N çalıştırma arası saha içi*	Rgn arası saha içi*	Kit lotları arası saha içi*	Operatörler arası saha içi*	Rezidüel*	Toplam
Delta Ct	2xLOD	12ALA	84	5.48	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1669, %3,05)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1287, %2,35)	(0,1679, %3,07)	(0,2640, %4,82)
		12ARG	84	4.81	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1172, %2,43)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2729, %5,67)	(0,2967, %6,16)
		12ASP	84	4.57	(0,0000, %0,00)	(0,0943, %2,06)	(0,1457, %3,19)	(0,0000, %0,00)	(0,0600, %1,31)	(0,1718, %3,76)	(0,1565, %3,43)	(0,2854, %6,25)
		12CYS	84	5.61	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2060, %3,67)	(0,0264, %0,47)	(0,0698, %1,24)	(0,0000, %0,00)	(0,1671, %2,98)	(0,2728, %4,87)
		12SER	84	5.34	(0,0000, %0,00)	(0,1362, %2,55)	(0,1669, %3,13)	(0,1527, %2,86)	(0,0000, %0,00)	(0,2020, %3,79)	(0,2382, %4,46)	(0,3902, %7,31)
		12VAL	84	4.13	(0,0874, %2,11)	(0,0000, %0,00)	(0,1677, %4,06)	(0,0000, %0,00)	(0,0869, %2,10)	(0,0000, %0,00)	(0,2711, %6,56)	(0,3359, %8,12)
		13ASP	84	5.22	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2161, %4,14)	(0,2712, %5,20)	(0,0000, %0,00)	(0,1930, %3,70)	(0,2275, %4,36)	(0,4279, %8,20)
LOD		12ALA	119	6.33	(0,0000, %0,00)	(0,0410, %0,65)	(0,1207, %1,91)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0247, %0,39)	(0,2640, %4,17)	(0,2936, %4,64)
		12ARG	120	5.42	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1797, %3,31)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1872, %3,45)	(0,2590, %4,78)
		12ASP	120	4.66	(0,1183, %2,54)	(0,0646, %1,38)	(0,2121, %4,55)	(0,0261, %0,56)	(0,0217, %0,46)	(0,0440, %0,94)	(0,1455, %3,12)	(0,2862, %6,14)
		12CYS	120	6.54	(0,0000, %0,00)	(0,0132, %0,20)	(0,1775, %2,72)	(0,0000, %0,00)	(0,1621, %2,48)	(0,1708, %2,61)	(0,4202, %6,43)	(0,4981, %7,62)
		12SER	120	6.28	(0,0000, %0,00)	(0,0824, %1,31)	(0,2271, %3,62)	(0,0775, %1,24)	(0,0000, %0,00)	(0,2383, %3,80)	(0,3164, %5,04)	(0,4570, %7,28)
		12VAL	120	5.05	(0,0315, %0,62)	(0,1648, %3,26)	(0,0955, %1,89)	(0,0703, %1,39)	(0,0320, %0,63)	(0,0795, %1,57)	(0,2120, %4,20)	(0,2965, %5,87)
		13ASP	118	6.17	(0,0000, %0,00)	(0,1673, %2,71)	(0,1987, %3,22)	(0,2332, %3,78)	(0,0000, %0,00)	(0,0843, %1,37)	(0,3075, %4,99)	(0,4488, %7,28)

** SD, %CV

Tablonun devamı bir sonraki sayfada

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 29. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – yeniden üretilebilirlik (devamı)

	Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahsil	Gözlem sayısı	Ortalama	Sahalar arası*	Günler arası saha içi*	N Çalışma arası saha içi*	Rgq arası saha içi*	Kit (lotları) arası saha içi*	Operatörler arası saha içi*	Rezidüel*	Toplam
Yeşil C:	2ALOD	12ALA	84	32,13	(0,1578, %0,49)	(0,0000, %0,00)	(0,2509, %0,78)	(0,0745, %0,23)	(0,0000, %0,00)	(0,1249, %0,39)	(0,1362, %0,42)	(0,3390, %1,06)	
		12ARG	84	31,61	(0,0882, %0,28)	(0,0000, %0,00)	(0,2430, %0,77)	(0,1339, %0,42)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2604, %0,82)	(0,3828, %1,21)	
		12ASP	84	31,24	(0,1655, %0,53)	(0,0391, %0,13)	(0,2178, %0,70)	(0,0600, %0,19)	(0,0000, %0,00)	(0,2052, %0,66)	(0,1426, %0,46)	(0,3542, %1,13)	
		12CYS	84	32,15	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2836, %0,88)	(0,0852, %0,26)	(0,0940, %0,29)	(0,1658, %0,52)	(0,1318, %0,41)	(0,3636, %1,13)	
		12SER	84	32,14	(0,1457, %0,45)	(0,0000, %0,00)	(0,2659, %0,83)	(0,1807, %0,56)	(0,0000, %0,00)	(0,2715, %0,84)	(0,1783, %0,55)	(0,4554, %1,42)	
		12VAL	84	30,69	(0,0646, %0,21)	(0,0480, %0,16)	(0,2124, %0,69)	(0,0000, %0,00)	(0,1031, %0,34)	(0,0000, %0,00)	(0,2000, %0,65)	(0,3143, %1,02)	
		13ASP	84	32,12	(0,2111, %0,66)	(0,0000, %0,00)	(0,3218, %1,00)	(0,2966, %0,92)	(0,0000, %0,00)	(0,1743, %0,54)	(0,1980, %0,62)	(0,5184, %1,61)	
	LOD	12ALA	119	32,93	(0,0000, %0,00)	(0,1524, %0,46)	(0,1821, %0,55)	(0,1048, %0,32)	(0,0757, %0,23)	(0,1007, %0,31)	(0,2526, %0,77)	(0,3721, %1,13)	
		12ARG	120	31,98	(0,0000, %0,00)	(0,0743, %0,23)	(0,1936, %0,61)	(0,1262, %0,39)	(0,0000, %0,00)	(0,1332, %0,42)	(0,1619, %0,51)	(0,3096, %0,97)	
		12ASP	120	31,06	(0,1880, %0,61)	(0,1184, %0,38)	(0,1681, %0,54)	(0,1033, %0,33)	(0,1171, %0,38)	(0,1481, %0,48)	(0,1333, %0,43)	(0,3511, %1,13)	
		12CYS	120	33,19	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2513, %0,76)	(0,0776, %0,23)	(0,2128, %0,64)	(0,1427, %0,43)	(0,2712, %0,82)	(0,4401, %1,33)	
		12SER	120	33,13	(0,2194, %0,66)	(0,0000, %0,00)	(0,2433, %0,73)	(0,1263, %0,38)	(0,1470, %0,44)	(0,1973, %0,60)	(0,2052, %0,62)	(0,4437, %1,34)	
		12VAL	120	31,65	(0,0000, %0,00)	(0,1254, %0,40)	(0,1645, %0,52)	(0,1307, %0,41)	(0,1271, %0,40)	(0,0976, %0,31)	(0,1792, %0,57)	(0,3159, %1,00)	
13ASP	118	33,08	(0,0000, %0,00)	(0,1789, %0,54)	(0,1661, %0,50)	(0,3569, %1,08)	(0,0649, %0,20)	(0,1565, %0,47)	(0,2588, %0,78)	(0,4894, %1,48)			

** SD, %CV

Tablonun devamı bir sonraki sayfadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 29. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – yeniden üretilebilirlik (devamı)

	Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahsil	Gözlem sayısı	Ortalama	Sahalar arası*	Günler arası saha içi*	N Çalışma arası saha içi*	Rgq arası saha içi*	Kit (lotları arası saha içi*	Operatörler arası saha içi*	Rezidüel*	Toplam
Sarı Cr	2ALOD	12ALA	84	33,25	(0,0706, %0,21)	(0,0399, %0,12)	(0,1314, %0,40)	(0,1303, %0,39)	(0,0000, %0,00)	(0,1124, %0,34)	(0,1913, %0,58)	(0,2883, %0,87)	
		12ARG	84	33,07	(0,0000, %0,00)	(0,1406, %0,43)	(0,1353, %0,41)	(0,0000, %0,00)	(0,2024, %0,61)	(0,1262, %0,38)	(0,2831, %0,86)	(0,4016, %1,21)	
		12ASP	84	32,98	(0,0000, %0,00)	(0,0480, %0,15)	(0,1706, %0,52)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0797, %0,24)	(0,1795, %0,54)	(0,2616, %0,79)	
		12CYS	84	33,20	(0,0000, %0,00)	(0,0976, %0,29)	(0,1781, %0,54)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1454, %0,44)	(0,1723, %0,52)	(0,2939, %0,89)	
		12SER	84	32,91	(0,0000, %0,00)	(0,1101, %0,33)	(0,0549, %0,17)	(0,0669, %0,20)	(0,0677, %0,21)	(0,1186, %0,36)	(0,2274, %0,69)	(0,2916, %0,89)	
		12VAL	84	33,17	(0,0688, %0,21)	(0,0000, %0,00)	(0,1896, %0,57)	(0,0937, %0,28)	(0,1140, %0,34)	(0,1311, %0,40)	(0,2605, %0,79)	(0,3768, %1,14)	
	13ASP	84	33,10	(0,0000, %0,00)	(0,0482, %0,15)	(0,2035, %0,61)	(0,0000, %0,00)	(0,0466, %0,14)	(0,1460, %0,44)	(0,1688, %0,51)	(0,3019, %0,91)		
	LOD	12ALA	119	33,33	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2108, %0,63)	(0,0820, %0,25)	(0,0000, %0,00)	(0,1443, %0,43)	(0,2253, %0,68)	(0,3411, %1,02)	
		12ARG	120	33,15	(0,1092, %0,33)	(0,0537, %0,16)	(0,1605, %0,48)	(0,0507, %0,15)	(0,2157, %0,65)	(0,1276, %0,39)	(0,2180, %0,66)	(0,3749, %1,13)	
		12ASP	120	32,96	(0,0000, %0,00)	(0,0832, %0,25)	(0,2022, %0,61)	(0,0864, %0,26)	(0,0000, %0,00)	(0,1117, %0,34)	(0,2223, %0,67)	(0,3343, %1,01)	
		12CYS	120	33,26	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2232, %0,67)	(0,1691, %0,51)	(0,0789, %0,24)	(0,0000, %0,00)	(0,2097, %0,63)	(0,3516, %1,06)	
		12SER	120	33,01	(0,1573, %0,48)	(0,0716, %0,22)	(0,2134, %0,65)	(0,0951, %0,29)	(0,0000, %0,00)	(0,0784, %0,24)	(0,1689, %0,51)	(0,3263, %0,99)	
		12VAL	120	33,25	(0,1519, %0,46)	(0,1960, %0,59)	(0,1272, %0,38)	(0,0000, %0,00)	(0,1298, %0,39)	(0,0553, %0,17)	(0,2162, %0,65)	(0,3487, %1,05)	
13ASP		118	33,16	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1768, %0,53)	(0,0998, %0,30)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1973, %0,59)	(0,2802, %0,84)		

** SD, %CV

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 29. SD ve %CV olarak varyans bileşenleri – yeniden üretilebilirlik (devamı)

Analiz değişkeni	Örnek seviyesi	Tahill	Gözlem sayısı	Ortalama	Sahalar arası*	Günler arası saha içi*	N Çalışma arası saha içi*	Rgq arası saha içi*	Kit lotları arası saha içi*	Operatörler arası saha içi*	Rezidüel*	Toplam
WT	12ALA	84	33,44	(0,1257, %0,38)	(0,0961, %0,29)	(0,1845, %0,55)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,2083, %0,62)	(0,3104, %0,93)	
	12ARG	84	33,37	(0,1191, %0,36)	(0,0000, %0,00)	(0,1869, %0,56)	(0,1321, %0,40)	(0,2529, %0,76)	(0,1205, %0,36)	(0,2132, %0,64)	(0,4217, %1,26)	
	12ASP	84	33,16	(0,0574, %0,17)	(0,0738, %0,22)	(0,2162, %0,65)	(0,0563, %0,17)	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1844, %0,56)	(0,2997, %0,90)	
	12CYS	84	33,42	(0,0000, %0,00)	(0,0000, %0,00)	(0,1964, %0,59)	(0,0720, %0,22)	(0,1311, %0,39)	(0,0262, %0,08)	(0,2258, %0,68)	(0,3287, %0,98)	
	12SER	84	33,20	(0,0812, %0,24)	(0,1331, %0,40)	(0,1734, %0,52)	(0,0329, %0,10)	(0,0000, %0,00)	(0,2009, %0,61)	(0,1923, %0,58)	(0,3535, %1,06)	
	12VAL	84	33,41	(0,0000, %0,00)	(0,0695, %0,21)	(0,2046, %0,61)	(0,0000, %0,00)	(0,1708, %0,51)	(0,1437, %0,43)	(0,2339, %0,70)	(0,3799, %1,14)	
	13ASP	84	33,46	(0,0000, %0,00)	(0,0613, %0,18)	(0,1802, %0,54)	(0,0744, %0,22)	(0,0073, %0,02)	(0,0969, %0,29)	(0,1790, %0,53)	(0,2816, %0,84)	

Örnek kullanım değişkenliği

Bu araştırmanın amacı, özellikle DNA numunesi almada örnek kullanım değişkenliğinin *therascreen KRAS RGQ PCR Kit*'in performansı üzerine olan etkisini değerlendirmektir. Bu araştırma, 3 sahada işlenen aynı klinik FFPE kesitlerinin ve FFPE hücre hattı kesitlerinin *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* ile incelenmesi sonucunda ortaya çıkacak örnek kullanım değişkenliği verilerini analiz ederek, tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik araştırmasını destekler.

CRC

10 adet FFPE CRC örneğinin her birinden (3 yabancı tip ve mutasyon başına 1) sıralı otuz adet 5 µm kesit alınmıştır. Kesitler, 3 test sahasından 1'ine rastgele olarak dağıtılmıştır, bu şekilde her saha her bir FFPE örneğinden 10 kesit almıştır (toplamda 100 kesit). Test edilen 300 DNA ekstraksiyonundan 298 örnek geçerli çıkmıştır. 3 test sahası arasındaki KRAS mutasyon sonuçları bağlamında %99,33 uyumluluk elde edilmiştir.

Ortalama DCT değerlerinin, mutant ve yabancı tip örnekler için saha bazında karşılaştırılması sonucunda, sonuçlarla çok yakın uyum ortaya koyulmuştur. Sonuçlar, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile bağlantılı olarak, DNA numunesi alma prosedürü ile örneklerin işlenmesi arasındaki uyumluluğu göstermektedir.

NSCLC

Bu araştırmada 13 adet klinik NSCLC örneği (3 x 12ASP, 3 x 12CYS, 4 x 12VAL ve 3 yabancı tip) ve 4 adet FFPE hücre hattı örneği (12ALA, 12ARG, 12SER ve 13ASP) kullanılmıştır. Örnekler farklı alma yöntemlerini temsil etmiştir: cerrahi kazıma, FNA ve CNB. Klinik NSCLC dokusunun bulunmadığı durumlarda nadir mutasyonları temsil etmek için hücre hatları kullanılmıştır.

Daha sonra, 20 adet FFPE kesitinden oluşan bu 3 parti, 3 sahaya rastgele olarak dağıtılmıştır. Bu 3 sahanın her birinde, 20 adet FFPE kesitinden (10 çift) oluşan bir partiden, mutasyon ve yabancı tip olmasına göre DNA numuneleri alınmıştır.

3 ayrı test sahasındaki örnekler *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile test edildiğinde, 7 adet mutasyon ve bir yabancı tip örnek doğru mutasyon sonucuyla saptanmıştır. 7 adet mutasyon ve bir yabancı tip örnek için alınan genel sonuçlar %100 oranında tutarlı olup, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit kullanılarak DNA numunesi alınımında ve mutasyon tespitinde sahalara tutarlılık bulunduğu işaret etmiştir.

Önceki çalışmada bu mutasyonları temsil eden hücre hattı örnekleri kullanıldığından, 12ALA, 12ARG, 12SER ve 13ASP mutasyonlarını temsil eden klinik FFPE NSCLC örnekleri kullanılarak ek bir Örnek İşleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu ek çalışmada, önceki çalışmayla aynı çalışma tasarımı izlenmiştir. Üç ayrı test sahası genelinde ekstrakte edilen 12ALA, 12ARG ve 13ASP mutant örnekleri için tüm örnek hazırlıkları, KRAS Kit ile test edildiğinde doğru bir mutasyon sonucu vermiştir. Bu örnekler için genel doğru sonuç oranı %100 olmuştur. 12SER mutasyonu için örnek hazırlıkları, üç ayrı test sahası genelinde 28/30 sıklıkta doğru mutasyon sonucu vermiştir (doğru sonuç yüzdesi %93,33'e eşittir). Sonuçlar, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile test yapmak için kullanılan DNA ekstraksiyon prosedürü ile örnek işleme iş akışının tutarlılığını göstermektedir.

Örnek alma yöntemlerinin eşdeğerliği (yalnızca NSCLC)

Bu araştırmanın amacı, NSCLC örnekleri için *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit kullanılarak alınan mutasyon sonuçlarının, örnek alma yöntemi tarafından etkilenip etkilenmediğini değerlendirmektir. Araştırmada 3 adet örnek alma yöntemi incelenmiştir: kazıma, FNA ve CNB.

Bu araştırma için, cerrahi kazıma ile alınmış örnekten "hastayla eşleştirilen" CNB ve FNA örnekleri alınarak, her 3 yöntemle de aynı tümörün elde edilebilmesi sağlanmak istenmiştir. Her bir örnek, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile ekstrakte edilmiş ve test edilmiştir.

Her bir örnek, KRAS Kontrol tahliliyle ekstrakte edilmiş ve test edilmiştir. Geçerli sonuç veren her bir örnek (169 kazıma, 169 CNB ve 164 FNA örneği) 8 adet KRAS tahliliyle test edilmiştir.

Birincil analiz, numune alma tipleri genelinde tespit edilen spesifik mutasyona dayalı olmuştur. Genel uyumluluk oranı, pozitif uyumluluk oranı ve negatif uyumluluk oranı ölçümleri, her ikili karşılaştırma için kesin iki taraflı %95 güven limiti ile birlikte hesaplanmıştır.

Tablo 30. Örnek Alma Yöntemleri Arasındaki Uyumluluk

Karşılaştırma	Uyumluluk	Sıklıklar	Yüzde (%)	İki taraflı güven aralığının alt limiti	İki taraflı %95 güven aralığının üst limiti
Referans olarak CNB ile CNB / FNA	Genel Uyumluluk Oranı	148/156	94,87	90,15	97,76
	Pozitif Uyumluluk Oranı	29/35	82,86	66,35	93,44
	Negatif Uyumluluk Oranı	119/121	98,35	94,16	99,80
Referans olarak CNB ile CNB / RES	Genel Uyumluluk Oranı	153/161	95,03	90,44	97,83
	Pozitif Uyumluluk Oranı	31/37	83,78	67,99	93,81
	Negatif Uyumluluk Oranı	122/124	98,39	94,30	99,80
Referans olarak FNA ile FNA / CNB	Genel Uyumluluk Oranı	148/156	94,87	90,15	97,76
	Pozitif Uyumluluk Oranı	29/32	90,63	74,98	98,02
	Negatif Uyumluluk Oranı	119/124	95,97	90,84	98,68
Referans olarak FNA ile FNA / RES	Genel Uyumluluk Oranı	152/156	97,44	93,57	99,30
	Pozitif Uyumluluk Oranı	30/32	93,75	79,19	99,23
	Negatif Uyumluluk Oranı	122/124	98,39	94,30	99,80

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 30. Örnek Alma Yöntemleri Arasındaki Uyumluluk (devamı)

Karşılaştırma	Uyumluluk	Sıklıklar	Yüzde (%)	İki taraflı güven aralığının alt limiti	İki taraflı %95 güven aralığının üst limiti
Referans olarak RES ile RES / CNB	Genel Uyumluluk Oranı	153/161	95,03	90,44	97,83
	Pozitif Uyumluluk Oranı	31/34	91,18	76,32	98,14
	Negatif Uyumluluk Oranı	122/127	96,06	91,05	98,71
Referans olarak RES ile RES / FNA	Genel Uyumluluk Oranı	152/156	97,44	93,57	99,30
	Pozitif Uyumluluk Oranı	30/32	93,75	79,19	99,23
	Negatif Uyumluluk Oranı	122/124	98,39	94,30	99,80

Ayrıca, farklı örnek alma yöntemleri arasında C_T ve ΔC_T değerlerini karşılaştırmak için Passing-Bablok ve Deming regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Regresyon analizi, RES, CNB ve FNA örnek tipleri arasında, C_T veya ΔC_T bakımından sabit veya orantılı bir fark bulunduğu dair hiçbir kanıt bulunmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca, nekrotik doku ve tümör dokusu yüzdesinin ilgili ΔC_T değerleri üzerindeki etkisini araştırmak için bir doğrusal regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Nekrotik ve yüzde tümör / ΔC_T için regresyon çizgisinin eğimi, nekrotik doku veya tümör dokusunun artan yüzde değerleriyle, ΔC_T değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunduğu dair hiçbir kanıt bulunmadığını belirtmektedir.

Klinik Performans

therascreen KRAS RGQ PCR Kit, spesifik olarak *KRAS* geninin 12 ve 13 kodonlarındaki 7 *KRAS* mutasyonunu tespit etmek için tasarlanmıştır. Spesifik olarak bu kodonlardaki yabancı tip sekansını tespit etmek üzere tasarlanmamıştır. Testin sonuçları, "[mutasyon adı] Detected" ([mutasyon adı] Tespit Edildi) ve "No Mutation Detected" (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak raporlanır. Aşağıda sunulan klinik çalışmalarda, *KRAS* mutasyonu pozitif sonuçlar, tümör dokusu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit tarafından tespit edilen 7 mutasyondan (G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D) biri veya daha fazlası bakımından pozitif olan hastalara aittir. *KRAS* mutasyonu negatif (yabancı tip) sonucu, tümör dokusu *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit tarafından tespit edilen 7 mutasyon bakımından negatif olan hastaları ifade eder (örnek aslında, *KRAS* geninde, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit tarafından tanımlanmayan mutasyonlar barındırıyor olabilir).

Erbix (setuksimab) ile kullanımı destekleyen klinik çalışma

therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in, Erbitux (setuksimab) ile tedaviye uygun hastaların seçilmesini sağlayan bir tanı aracı olarak klinik yararlılığını desteklemek üzere veri üretmek için bir klinik performans çalışması gerçekleştirilmiştir. Erbitux'un (setuksimab) güvenliği ve etkinliği CA225025 çalışmasında ortaya konmuştur. CA225025, EGFR ekspresyon eden, önceden tedavi edilmiş, nükseden metastatik CRC (mCRC) görülen 572 hasta ile gerçekleştirilen çok merkezli, açık etiketli ve randomize bir klinik çalışmadır. Hastalar ya Erbitux'e (setuksimab) ek olarak en iyi destekleyici bakım (Best Supportive Care, BSC) ya da tek başına BSC uygulanacak şekilde randomize edilmiştir (1:1). Erbitux (setuksimab), 400 mg/m² başlangıç dozuyla ve ardından, hastalık ilerlemesine veya kabul edilemez toksisite durumuna kadar haftada 250 mg/m² dozuyla uygulanmıştır.

Randomize edilen 572 hastanın, medyan yaşı 63'tür, %64'ü erkektir, %89'u beyazdır ve %77'sinin başlangıç ECOG performans durumu 0-1 arasındadır. Demografik özellikler ve başlangıç karakteristikleri, çalışma kolları arasında benzerlik göstermiştir. Tüm hastalar,

irinotekan içeren bir rejim ve oksaliptatin içeren bir rejim dahil olmak üzere önceden tedavi almış ve bu tedavide ilerleme göstermiş olmalıdır.

572 hastanın 453'ünde (%79) *KRAS* mutasyon durumu elde edilmiştir: *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* ile değerlendirildiğinde, 245 hasta (%54) *KRAS* mutasyonu negatif tümörlere ve 208 hasta (%46) *KRAS* mutasyonu pozitif tümörlere sahiptir.

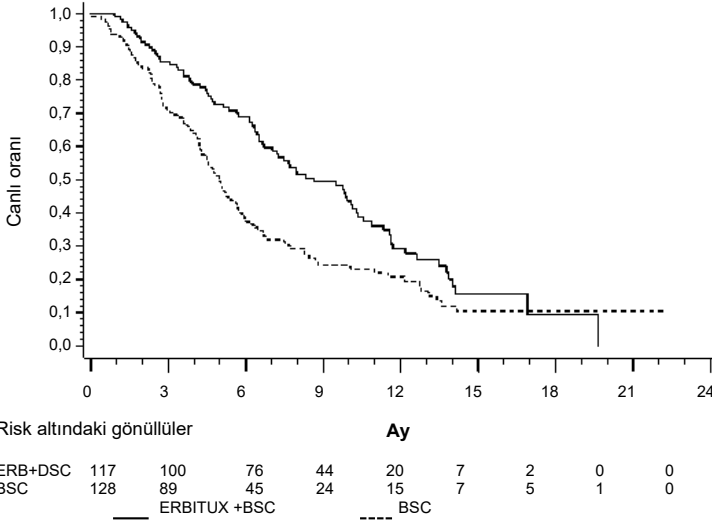
Çalışmanın ana sonuç ölçütü toplam sağkalım (overall survival, OS) olmuştur. *KRAS* mutasyonu negatif (yabani tip) popülasyon için medyan sağkalım süresi (%95 CI), Erbitux (setuksimab)+BSC grubunda 8,6 (7,0, 10,3) ay ve BSC grubunda 5,0 (4,3, 5,7) ay olmuştur. Erbitux (setuksimab)+BSC / BSC OS tehlike oranı 0,63 olmuştur. %95 güven aralığı (Confidence Interval, CI) (0,47, 0,84) olmuştur.

KRAS mutasyonu pozitif popülasyon için medyan sağkalım süresi, Erbitux (setuksimab)+BSC grubunda 4,8 (3,9, 5,6) ay ve BSC grubunda 4,6 (3,6, 4,9) ay olmuştur. Tehlike oranı, %95 CI (0,67, 1,24) ile 0,91 olmuştur. Sonuçlar Tablo 31 ve Şekil 23'te sunulmuştur.

Tablo 31. Önceden tedavi edilmiş EGFR eksprese eden metastatik kolorektal kanserde toplam sağkalım (tümü randomize ve *KRAS* durumu)

	Tümü randomize		Yabani tip <i>KRAS</i> mutasyonu negatif		<i>KRAS</i> mutasyonu pozitif	
	Erbitux+BSC N=287	BSC N=285	Erbitux+BSC N=117	BSC N=128	Erbitux+BSC N=108	BSC N=100
Medyan (ay) (%95 CI)	6,1 (5,4, 6,7)	4,6 (4,2, 4,9)	8,6 (7,0, 10,3)	5,0 (4,3, 5,7)	4,8 (3,9, 5,6)	4,6 (3,6, 4,9)
Tehlike oranı (%95 CI)	0,77 (0,64, 0,92)		0,63 (0,47, 0,84)		0,91 (0,67, 1,24)	
p değeri*	0,0046		–		–	

* Katmanlı log-sıra testine dayalı.



Şekil 23. KRAS mutasyonu negatif (yabani tip) metastatik kolorektal kanser görülen hastalarda toplam sağkalım için Kaplan-Meier eğrisi.

6. ve 12. aylarda Kaplan-Meier tahminlerine dayalı toplam sağkalım oranları, *KRAS* yabani tip alt grubu için, Erbitux (setuksimab)+BSC grubunda, BSC grubuna göre daha yüksek olmuştur. Bu avantaj, *KRAS* mutant alt grubunda gözlemlenmemiştir.

Vectibix (panitumumab) ile kullanımı destekleyen klinik çalışma

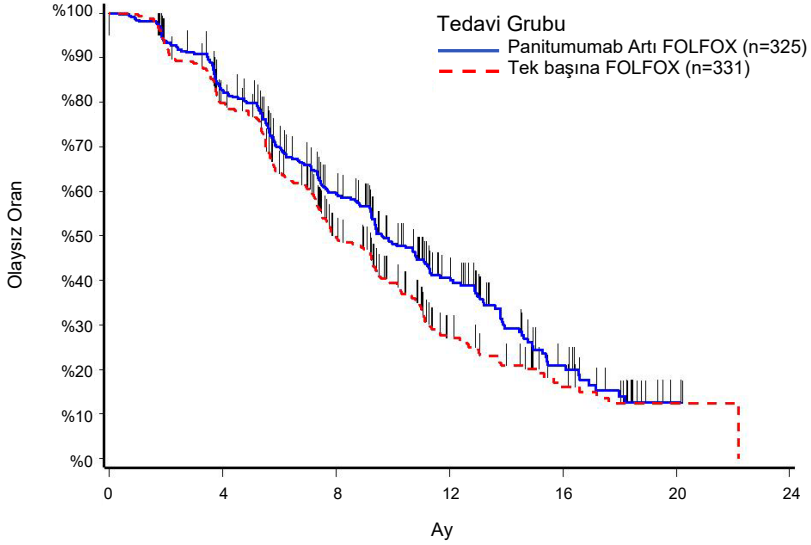
therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in, Vectibix (panitumumab) ile tedaviye uygun hastaların belirlenmesine yardımcı olan bir tanı aracı olarak klinik yararlılığını desteklemek üzere veri üretmek için bir klinik performans çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın amacı, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile belirlendiği şekilde *KRAS* mutasyon durumunun, Vectibix (panitumumab) tedavisinden fayda görecektir mCRC hastalarının seçiminde kullanılıp kullanılmayacağını değerlendirmektir. 20050203 klinik çalışması, önceden tedavi edilmemiş, nükseden mCRC görülen hastalarda, tek başına FOLFOX kullanımına kıyasla, oksaliptin, 5-floroürasil (5-FU) ve lökovorin (FOLFOX) ile birlikte panitumumab kullanımının etkinliğini değerlendirme amaçlı, çok merkezli, prospektif, açık etiketli, randomize bir faz 3 çalışmasıdır.

20050203 çalışmasında yer alan hastalardan alınan kümelenmiş tümör örnekleri, iki alt grubu tanımlamak adına *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile test edilmiştir: *KRAS* geninde ekson 2'nin 12 ve 13 kodonlarında 7 *KRAS* mutasyonundan en az birinin tespit edilmesine veya hiçbirinin tespit edilmemesine göre, *KRAS* mutasyonu pozitif (mutant *KRAS*) ve *KRAS* mutasyonu negatif (yabani tip *KRAS*). Retrospektif analizlerde, 20050203 çalışmasından elde edilen etkinlik verileri *KRAS* alt grubuna göre sınıflandırılmıştır. *KRAS* analizinin birincil amacı, tek başına FOLFOX kullanımına kıyasla, Vectibix'e (panitumumab) ek olarak FOLFOX kullanımı durumunda PFS'deki genel iyileşmenin, *KRAS* mutant tümörleri bulunan gönüllülere kıyasla *KRAS* yabani tip tümörleri görülen gönüllülerde önemli ölçüde daha yüksek olup olmadığını değerlendirmektir.

Önceden belirtilen birincil etkinlik sonlanım noktası, kör bağımsız bir merkezi görüntüleme incelemesi ile değerlendirildiği şekilde yabani tip *KRAS* mCRC görülen hasta grubunda (n = 656) ilerlemesiz sağkalım (Progression-Free Survival, PFS) olmuştur. Diğer temel etkinlik sonlanım noktaları arasında OS ve ORR yer almaktadır. Yabani tip *KRAS* mCRC görülen hastalarda etkinlik sonuçları Tablo 32 ve Şekil 24'te sunulmuştur.

Tablo 32. Yabani tip *KRAS* mCRC görülen hastalarda etkinlik sonuçları

	Yabani tip <i>KRAS</i> popülasyonu	PFS			
		Medyan (ay) (%95 CI)	Tehlike oranı (%95 CI)	p değeri	ORR (%95 CI)
Panitumumab artı FOLFOX	N=325	9,6 (9,2, 11,1)	0,80 (0,66, 0,97)	0,02	%54 (%48, %59)
Tek başına FOLFOX	N=331	8,0 (7,5, 9,3)			%47 (%41, %52)



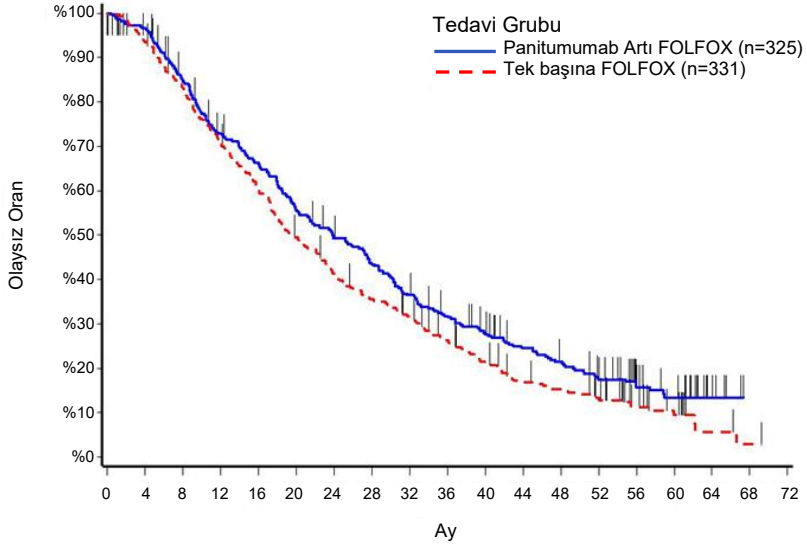
Risk altındaki gönüllüler

Panitumumab Artı FOLFOX	325	254	156	73	22	1	0
Tek başına FOLFOX	331	242	127	41	16	2	0

Şekil 24. Yabani tip KRAS mCRC görülen hastalarda Kaplan-Meier ilerlemesiz sağkalım (progression-free survival, PFS) grafiği.

KRAS mutant tümörleri bulunan hastalarda, Vectibix (panitumumab) artı FOLFOX alan 221 hastada medyan PFS 7,3 ay (%95 CI: 6,3, 8,0) olmuştur. Medyan PFS, tek başına FOLFOX alan 219 hastada 8,8 ay (%95 CI: 7,7, 9,4) olmuştur (HR = 1,29, %95 CI: 1,04, 1,62). Vectibix (panitumumab) artı FOLFOX alan hastalarda medyan OS 15,5 ay (%95 CI: 13,1, 17,6) olmuştur. Medyan OS, tek başına FOLFOX alan hastalarda 19,3 ay (%95 CI: 16,5, 21,8) olmuştur (HR = 1,24, %95 CI: 0,98, 1,57).

Yabani tip KRAS mCRC görülen hastaların %82'sindeki olaylara dayalı olarak güncellenmiş bilgilerle birlikte araştırma amaçlı bir OS analizinde, tek başına FOLFOX kullanımına kıyasla Vectibix (panitumumab) artı FOLFOX kullanımının tedavi etkisi tahmin edilmiştir. Yabani tip KRAS mCRC görülen hastalarda, Vectibix (panitumumab) artı FOLFOX alan 325 hastada medyan OS 23,8 ay (%95 CI: 20,0, 27,7) olmuştur. Bu değer, tek başına FOLFOX alan 331 hastada 19,4 ay (%95 CI: 17,4, 22,6) olmuştur (HR = 0,83, %95 CI: 0,70, 0,98). Sonuçlar Şekil 25'te gösterilmektedir.



Risk altındaki gönüllüler

Panitumumab Artı FOLFOX	325	310	266	227	205	172	151	132	111	94	78	63	54	42	25	17	6	0	0
Tek başına FOLFOX	331	304	267	226	191	157	129	111	96	77	61	45	40	32	17	10	3	1	0

Şekil 25. Yabani tip KRAS mCRC görülen hastalarda Kaplan-Meier toplam sağkalım (Overall Survival, OS) grafiği.

LUMYKRAS® (sotorasib) kullanımını destekleyen klinik çalışma

therascreen KRAS RGQ PCR Kit'in, LUMYKRAS (sotorasib) ile tedaviye uygun KRAS G12C pozitif NSCLC hastalarının belirlenmesine yardımcı olan bir tanı aracı olarak klinik geçerliliğini göstermek için bir klinik performans çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın amacı, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ile belirlendiği şekilde G12C mutasyon durumunun, LUMYKRAS (sotorasib) tedavisinden fayda görecektir ileri NSCLC hastalarının seçiminde kullanılıp kullanılmayacağını değerlendirmektir. 20170543 klinik çalışması, KRAS G12C mutasyonunu barındıran ileri solid tümörleri bulunan yetişkin gönüllülerde LUMYKRAS (sotorasib) tedavisinin etkinliği ve güvenliğini değerlendirmek üzere tasarlanan, açık etiketli, çok merkezli bir faz 1/2 çalışmasıdır.

Bu çalışmanın NSCLC faz 2 kısmının birincil analizinden elde edilen veriler, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in bir tanı aracı olarak klinik geçerliliğini desteklemek üzere kullanılmıştır.

Çalışmaya katılım, yerel laboratuvar sonucuyula değerlendirildiği ve *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit kullanılarak merkezi testlerle doğrulandığı şekilde, KRAS G12C mutasyonlu NSCLC görülen gönüllülerle sınırlandırılmıştır. Bu çalışmanın NSCLC faz 2 kısmının birincil sonlanım noktası, Solid Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST) versiyon 1.1, KRAS G12C mutasyonlu ileri tümörler görülen gönüllülerde monoterapi olarak LUMYKRAS (sotorasib) kriterleri ile değerlendirildiği şekilde, tümör objektif yanıt oranının (Objective Response Rate, ORR) değerlendirilmesi olmuştur.

NSCLC görülen toplam 126 gönüllüden 124 gönüllü, tam analiz grubuna dahil edilmiştir. Kör bağımsız merkezi incelemeye (Blinded Independent Centralized Review, BICR) göre ≥ 1 ölçülebilir lezyonu bulunmadığı için iki gönüllü hariç tutulmuştur.

KRAS G12C mutasyonlu NSCLC görülen gönüllüler için, bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme ile ölçülen ve BICR laboratuvarı tarafından RECIST 1.1 uyarınca değerlendirilen birincil ORR sonlanım noktası (tam yanıt + kısmi yanıt), %37,1 olmuştur (124 gönüllüden 46'sı; %95 CI: %28,6-46,2); üç (3) gönüllüde (%2,4) tam yanıt ve 43 gönüllüde (%34,7) kısmi yanıt* elde edilmiştir.

* 1 Aralık 2020 verilerine dayalı olarak.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Teknik yardım ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezimize gidin (iletişim bilgileri için www.qiagen.com adresini ziyaret edin).

Yorumlar ve öneriler

Geçersiz sonuçlar

- | | |
|---|---|
| a) Bir veya daha fazla bileşenin saklama koşulları, Numune Alma, Analize Hazırlama ve Saklama başlığında (sayfa 16) verilen talimatlara uygun değildir. | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. etiket) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |
| b) <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit'in süresi dolmuştur. | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit kullanın. |

NTC örnekleri FAM kanalında pozitif sonuç veriyor.

- | | |
|--|--|
| PCR hazırlığı esnasında kontaminasyon gerçekleşmiştir. | PCR'ı replikatlar halinde yeni reaktiflerle tekrarlayın.
Mümkünse PCR tüplerini test edilecek örneğin eklenmesinden hemen sonra kapatın.
Çalışma alanı ve cihazların düzenli aralıklarla dekontamine edildiğinden emin olun. |
|--|--|

therascreen KRAS Assay Package tarafından oluşturulan işaretler

Tablo 33'da *therascreen* KRAS Assay Package tarafından oluşturulabilecek olası işaretler, anlamları ve yapılması gereken eylemler verilmiştir. İşaretler hem NSCLC hem de CRC ile ilgilidir.

Tablo 33. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package işaretlerinin anlamları ve önerilen eylemler

İşaret	Anlamı	Eylem
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR çalışması geçersiz — Kontrol reaksiyonunda FAM C _T pozitif kontrol için aralık dışında	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR çalışması geçersiz — Pozitif kontrol (mutasyon reaksiyon karışımı) içindeki floresans verileri yorumlanamıyor	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR çalışması geçersiz — Dahili kontrol, negatif kontrol için aralığın üstünde	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR çalışması geçersiz — Dahili kontrol, negatif kontrol için aralığın altında	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
NTC_INVALID_CT	PCR çalışması geçersiz — FAM (limitten küçük), negatif kontrol için geçersiz	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
NTC_INVALID_DATA	PCR çalışması geçersiz — Negatif kontrol içindeki floresans verileri yorumlanamıyor	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Örnek geçersiz — Örnek kontrolü içindeki floresans verileri yorumlanamıyor	İlgili örneği/örnekleri tekrar işlemek için yeni PCR kurun.

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 33. Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package işaretlerinin anlamları ve önerilen eylemler

İşaret	Anlamı	Eylem
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Örnek Geçersiz — Örnek kontrolündeki FAM C _T çok düşük	C _T değerini artırmak için örneği seyreltin. Bu dilüsyon işlemi, kit içinde verilen suyla 1:1 oranında seyreltme yapmanın C _T değerini 1,0 kadar yükselteceği varsayımına göre hesaplanmalıdır. Örnek seyreltildiğinde, örneği tekrar işlemek için yeni PCR kurun.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Örnek geçersiz — Örnek kontrol reaksiyonundaki FAM C _T çok yüksek	Örneği tekrar işlemek için yeni PCR çalışması kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın (≥4 kesit). Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.

NSCLC'ye özgü işaretler

Tablo 34'te NSCLC örnekleri için Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package tarafından oluşturulabilecek olası işaretler, işaretlerin anlamları ve gerçekleştirilmesi gereken eylemler verilmiştir.

Tablo 34. NSCLC örnekleri için Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package işaretlerinin anlamları ve önerilen eylemler

İşaret	Anlamı	Eylem
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Dahili kontrol (HEX) için C _T çok yüksek (veya C _T yok), FAM kanalı mutasyon negatif	Örneği tekrar işlemek için yeni PCR çalışması kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutasyon tüpü geçersiz – C _T HEX örnek (dahili kontrol) için çok düşük	Örneği tekrar işlemek için yeni PCR çalışması kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 34. NSCLC örnekleri için Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package işaretlerinin anlamları ve önerilen eylemler

İşaret	Anlamı	Eylem
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutasyon tüpü geçersiz – Dahili kontrol içindeki floresans verileri yorumlanamıyor	Örneği tekrar işlemek için yeni PCR çalışması kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.
MUTATION_EARLY_CT	Mutasyon tüpü geçersiz – C _T FAM örnek için çok düşük.	Örneği tekrar işlemek için yeni PCR çalışması kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Bir örnek için bir veya daha fazla mutasyon geçerli ve pozitif, aynı zamanda aynı örnek için bir veya daha fazla mutasyon geçersiz (uyarıdır, hata değildir)	Örneği tekrar işlemek için yeni PCR çalışması kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.

CRC'ye özgü işaretler

Aşağıdaki tabloda CRC örnekleri için Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package tarafından oluşturulabilecek olası işaretler, işaretlerin anlamları ve gerçekleştirilmesi gereken eylemler verilmiştir.

Tablo 35. CRC örnekleri için Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package işaretlerinin anlamları ve önerilen eylemler

İşaret	Anlamı	Eylem
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Dahili kontrol (HEX) için C _T çok yüksek (veya C _T yok), FAM kanalı mutasyon negatif	Örnek geçerli durumda ise – Eylem yok. Örnek geçersiz durumda ise, örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınır, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutasyon tüpü geçersiz – C _T HEX örnek (dahili kontrol) için çok düşük	Örnek geçerli durumda ise – Eylem yok. Örnek geçersiz durumda ise, örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınır, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.

Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır

Tablo bir önceki sayfadan devam ediyor

Tablo 35. CRC örnekleri için Rotor-Gene Q thetascreen KRAS Assay Package işaretlerinin anlamları ve önerilen eylemler (devamı)

İşaret	Anlamı	Eylem
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutasyon tüpü geçersiz – Dahili kontrol içindeki floresans verileri yorumlanamıyor	Örnek geçerli durumda ise – Eylem yok. Örnek geçersiz durumda ise, örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınır, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.
MUTATION_EARLY_CT	Mutasyon tüpü geçersiz – C _T FAM örnek için çok düşük.	Örnek geçerli durumda ise – Eylem yok. Örnek geçersiz durumda ise, örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınır, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Bir örnek için bir veya daha fazla mutasyon geçerli ve pozitif, aynı zamanda aynı örnek için bir veya daha fazla mutasyon geçersiz (uyarıdır, hata değildir)	Yok.

Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit'in her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir.

Referanslar

Alıntılanan referanslar

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).

Faydalı referanslar

- 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).

Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:



Avrupa topluluğu için işaret



<N>

<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Son kullanma tarihi



İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



İçerik



Numara

Rn

R harfi El Kitabı revizyonunu, n harfi ise revizyon numarasını temsil eder



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanma talimatlarına bakın



Dikkat

İletişim Bilgileri

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

Ek 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokolü

Bu bölüm, *therascreen* KRAS RQG PCR Kit'i açık modda RGQ yazılım sürümü 2.3 ile kullanma talimatlarını içerir (KRAS Assay Package'ı kullanmadan).

Genel bilgiler

- Gereken malzemeler için, bkz. Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Materyaller.
- Örnek hazırlama ve örnek düzeni ile ilgili tüm talimatlar için bkz. Protokol: DNA örneğinin değerlendirilmesi ve Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti.

Protokol: Sıcaklık profili oluşturma

Başlamadan önce, KRAS analizi için bir sıcaklık profili oluşturun. Döngü parametreleri, Örnek Değerlendirme ve Mutasyon Değerlendirme için aynıdır.

Prosedür

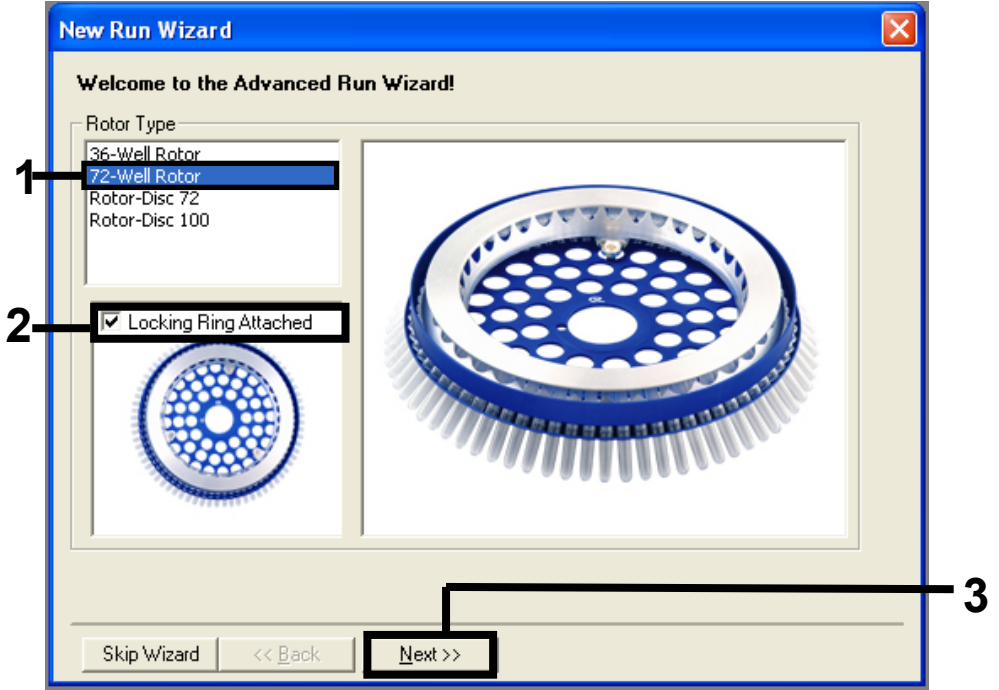
Döngü parametreleri Tablo 36'te gösterilmiştir.

Tablo 36. Döngü parametreleri

Döngü	Sıcaklık	Süre	Veri edinimi
1	95°C	15 dakika	Yok
40	95°C	30 saniye	Yok
	60°C	60 saniye	Green ve Yellow

1. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazına bağlı olan dizüstü bilgisayarın masaüstündeki Rotor-Gene Q Series Software 2.3 yazılımı simgesine çift tıklayın. Görüntülenen New Run (Yeni Çalışma) penceresinde Advanced (Gelişmiş) sekmesini seçin.

2. Yeni şablon oluşturmak için **Empty Run** (Boş Çalışma) seçimini yapın, ardından New Run Wizard'a (Yeni Çalışma Sihirbazı) girmek için **New** (Yeni) seçeneğine tıklayın.
3. Rotor tipi olarak 72-Well Rotor (72 Kuyulu Rotor) seçimini yapın. Kilitleme halkasının takıldığını doğrulayın ve **Locking Ring Attached** (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. **Next** (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 26).



Şekil 26. New Run Wizard (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu. 1 = Rotor tipi, 2 = Locking Ring Attached (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu, 3 = Next (İleri).

4. Operatörün adını girin. Herhangi bir not ekleyin ve reaksiyon hacmini **25** olarak girin. **Sample Layout** (Örnek Düzeni) alanının **1, 2, 3...** değerini içerdiğinden emin olun. **Next** (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 27).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. The title bar is blue with the text 'New Run Wizard' and a close button. The main area is light beige. At the top, there is a paragraph: 'This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.' Below this are four input fields: 'Operator' with a text box containing 'NAME', 'Notes' with a large empty text area, 'Reaction Volume (µL)' with a spinner box set to '25', and 'Sample Layout' with a dropdown menu showing '1, 2, 3...'. At the bottom are three buttons: 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'. On the right side, there is a yellow help box 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.' Four black arrows with numbers 1, 2, 3, and 4 point to the Operator, Notes, Reaction Volume, and Sample Layout fields respectively.

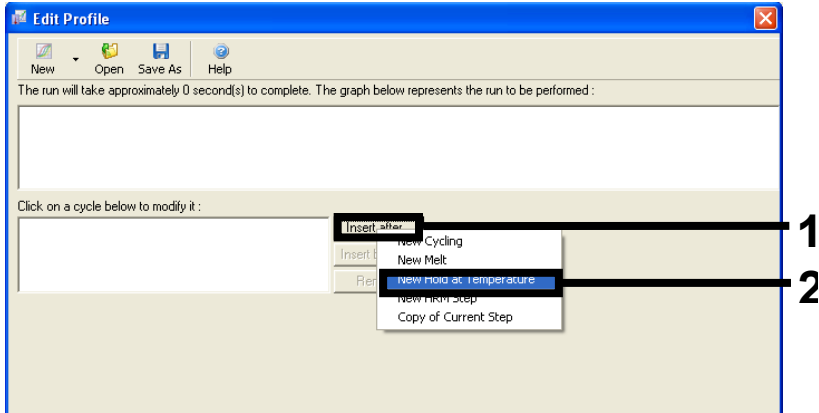
Şekil 27. Operatör adı ve reaksiyon hacimlerini girme. 1 = Operator (Operatör) diyalog alanı, 2 = Notes (Notlar) diyalog alanı, 3 = Reaction Volume (Reaksiyon Hacmi) alanı, 4 = Sample Layout (Örnek Düzeni), 5 = Next (İleri).

5. New Run Wizard (Yeni Çalışma Sihirbazı) penceresindeki **Edit Profile** (Profili Düzenle) düğmesine tıklayın (Şekil 28) ve sıcaklık profilini aşağıdaki adımda yer alan bilgilere göre programlayın.



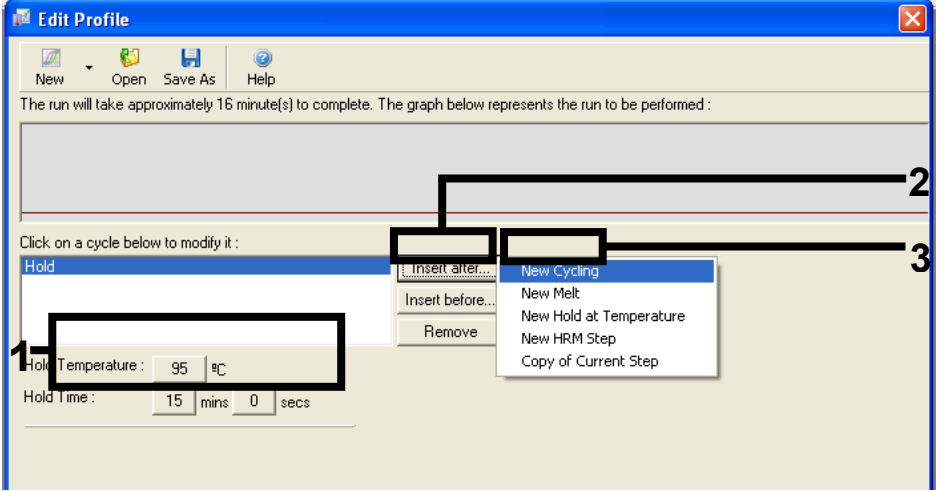
Şekil 28. Profilin düzenlenmesi.

6. **Insert after** (Sonra ekle) düğmesine tıklayın ve **New Hold at Temperature** (Yeni Sıcaklıkta Tutma) seçimini yapın (Şekil 29).



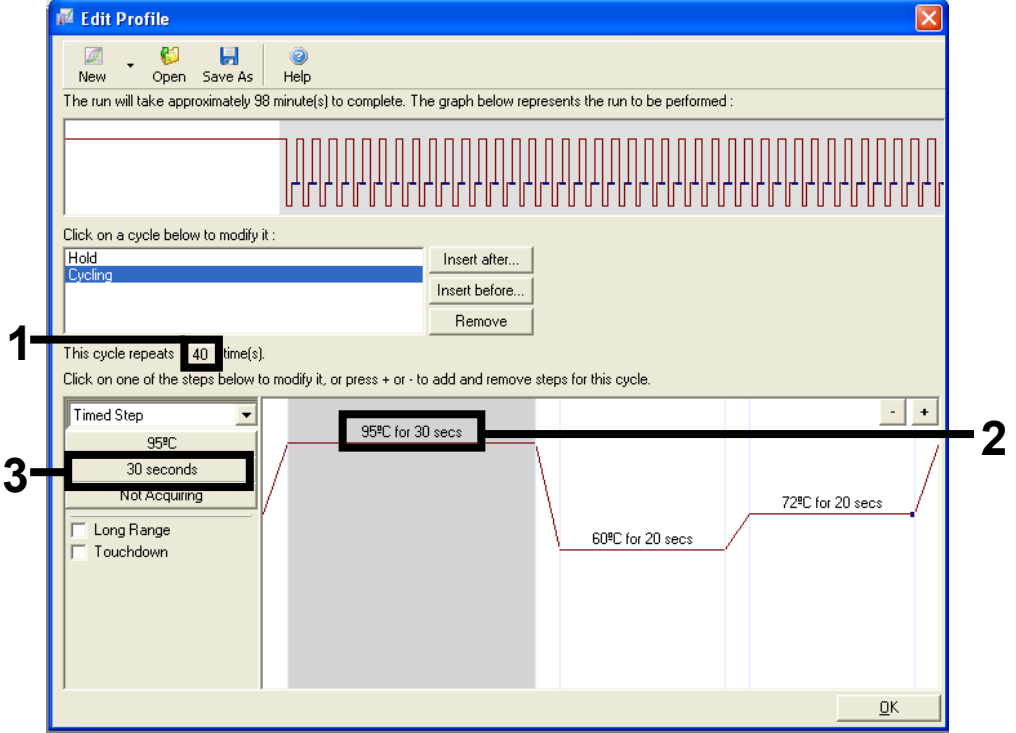
Şekil 29. Başlangıç inkübasyon adımı ekleme. 1 = Insert after (Sonra ekle), 2 = New Hold at Temperature (Yeni Sıcaklıkta Tutma).

7. **Hold Temperature** (Tutma Sıcaklığı) alanındaki değeri **95°C**, **Hold Time** (Tutma Süresi) alanındaki değeri ise **15 mins 0 secs** (15 dak. 0 sn.) olarak ayarlayın. **Insert After** (Sonra Ekle) düğmesine tıklayın, ardından **New Cycling** (Yeni Döngü) seçimini yapın (Şekil 30).



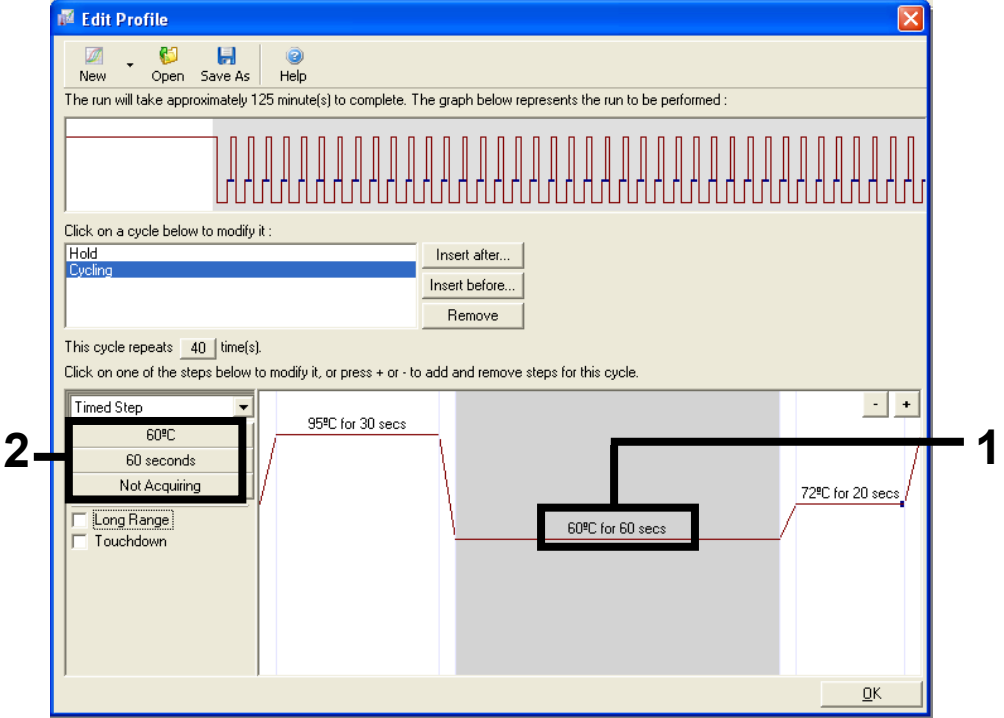
Şekil 30. 95°C'de başlangıç inkübasyon adımı. 1 = Hold Temperature (Tutma Sıcaklığı) ve Hold Time (Tutma Süresi), 2 = Insert after (Sonra ekle), 3 = New Cycling (Yeni Döngü).

8. Döngü tekrarları sayısını **40** olarak ayarlayın. İlk adımı seçin ve **95°C for 30 secs** (30 sn. süreyle 95°C) olarak ayarlayın (Şekil 31).



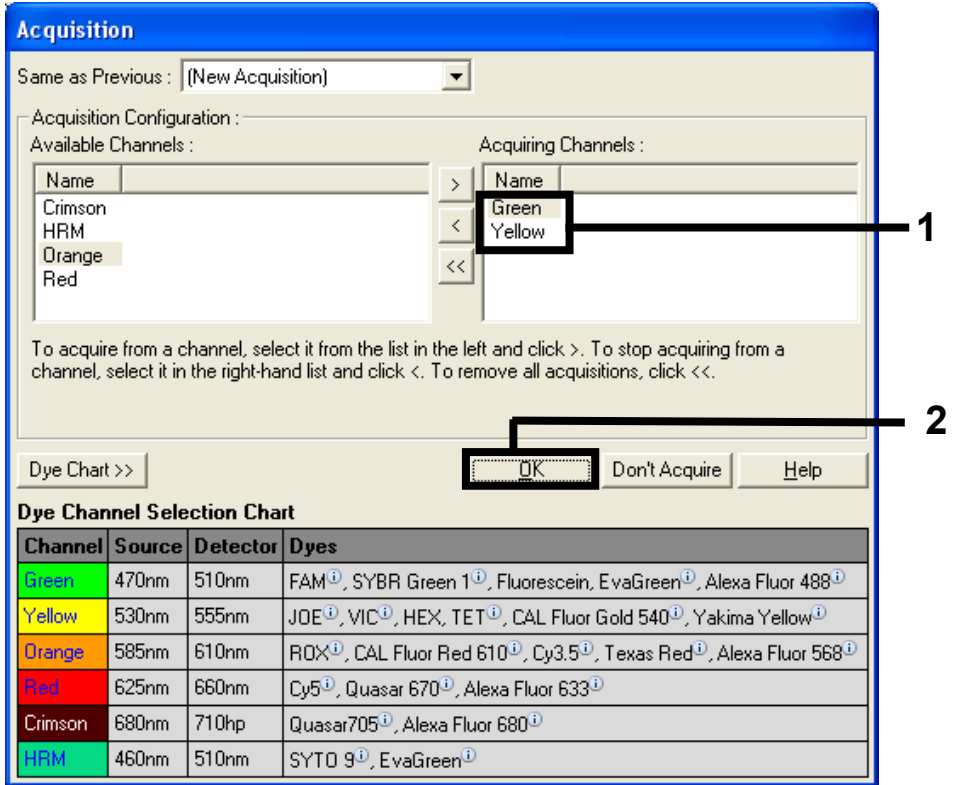
Şekil 31. 95°C'de döngü adımı. 1 = Cycle repeats (Döngü tekrarları) kutusu, 2 = Adım bir: sıcaklık ayarı, 3 = Adım bir: süre ayarı.

9. İkinci adımı vurgulayın ve **60°C for 60 secs** (60 sn. süreyle 60°C) olarak ayarlayın. Bu adımda veri edinme etkinleştirmek için **Not Acquiring** (Alınmıyor) öğesini seçin (Şekil 32).



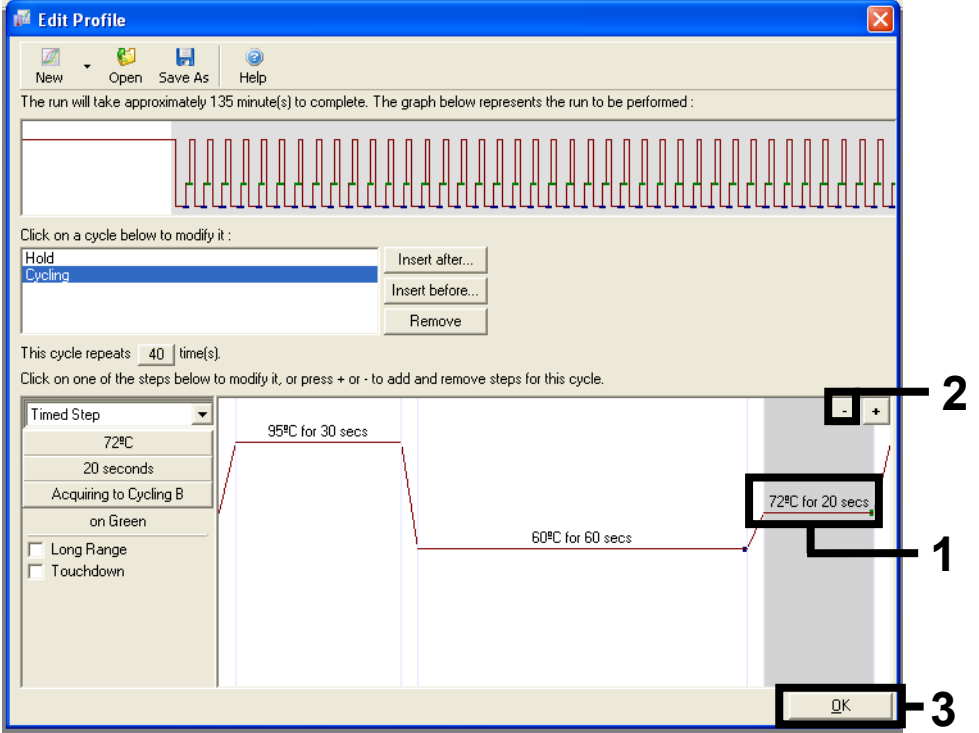
Şekil 32. 60°C'de döngü adımı. 1 = Adım iki: sıcaklık ve süre ayarı, 2 = Not Acquiring (Alınmıyor).

10. Available Channels (Kullanılabilir Kanallar) listesinde **Green** ve **Yellow**'u seçin, ardından bunları Acquiring Channels (Alan Kanallar) listesine taşımak için > ögesine tıklayın. **OK** (Tamam) ögesine tıklayın (Şekil 33).



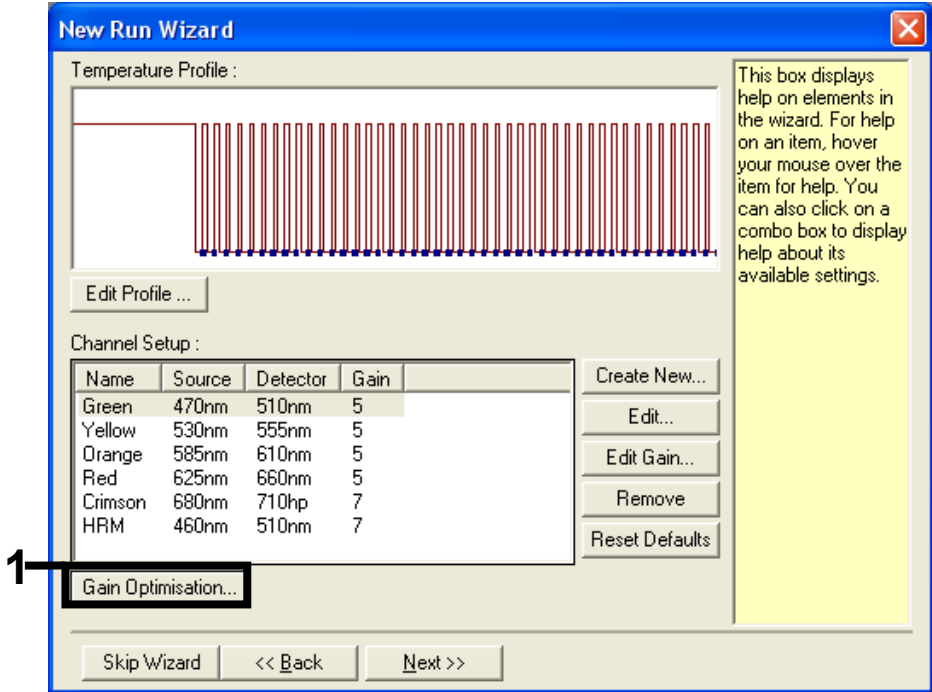
Şekil 33. 60°C döngü adımındaki tarama.

11. Üçüncü adımı vurgulayın ve silmek için – ögesine tıklayın. **OK** (Tamam) ögesine tıklayın (Şekil 34).



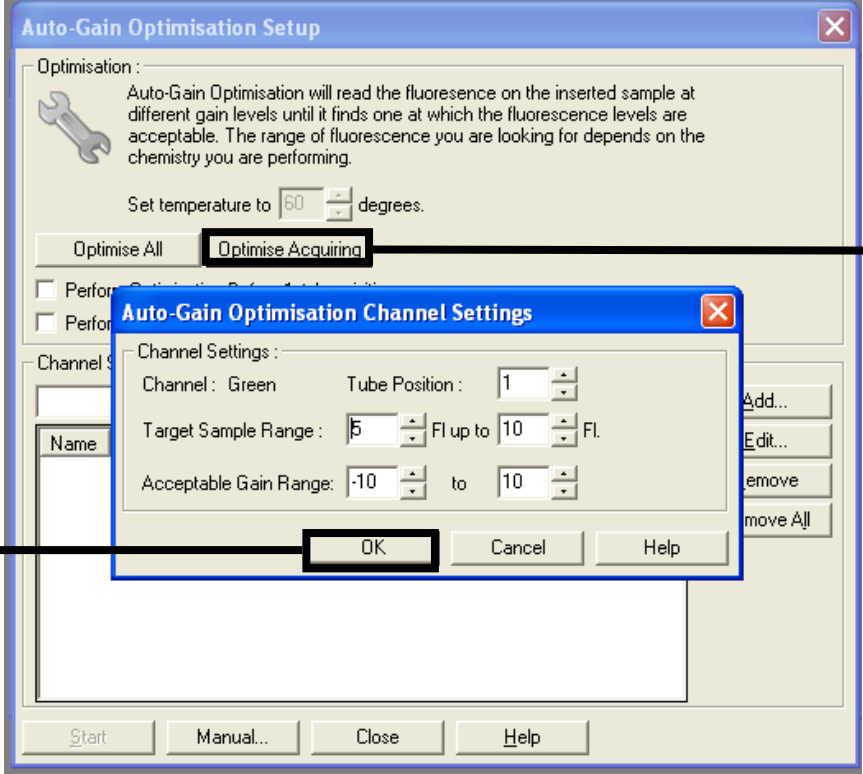
Şekil 34. Uzama adımının kaldırılması.

12. Bir sonraki pencerede, **Gain Optimization** (Kazanım Optimizasyonu) seçeneğine tıklayın (Şekil 35).



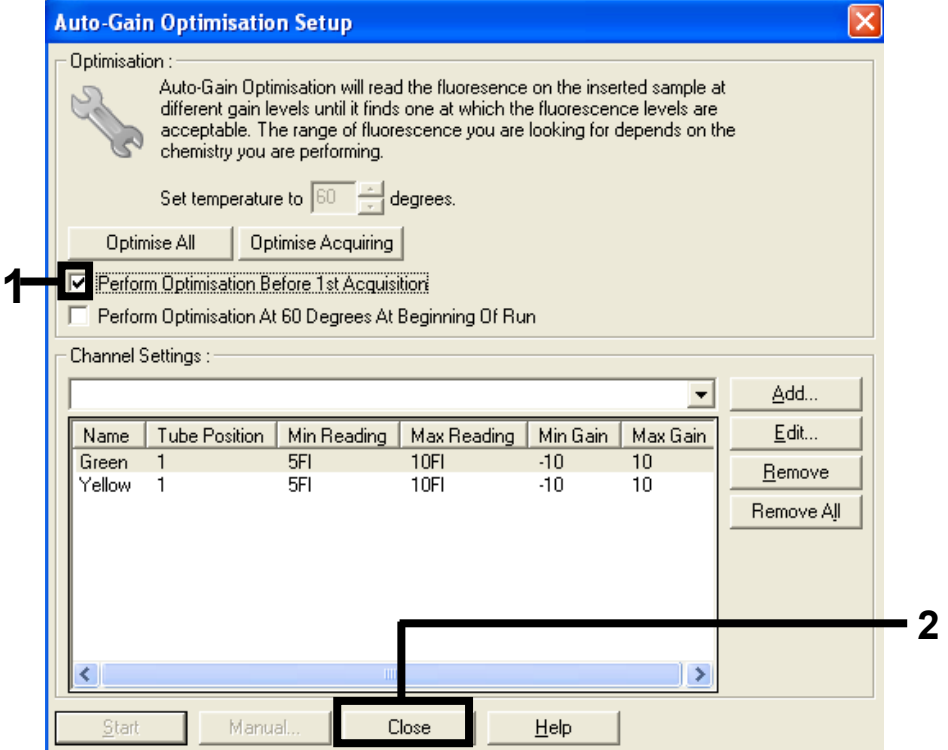
Şekil 35. Gain Optimization (Kazanım Optimizasyonu).

13. **Optimize Acquiring** (Taramayı Optimize Et) ögesine tıklayın. Her bir kanal için kanal ayarları görüntülenir. Bu varsayılan değerleri kabul etmek için **OK** (Tamam) ögesine tıklayın. (Şekil 36).



Şekil 36. Yeşil kanal için otomatik kazanç optimizasyonu.

14. **Perform Optimization before 1st Acquisition** (Optimizasyonu İlk Taramadan Önce Gerçekleştir) kutusunu işaretleyin, ardından sihirbaza dönmek için **Close** (Kapat) ögesine tıklayın (Şekil 37).



Şekil 37. Yeşil ve sarı kanalların seçimi.

15. **Next** (Sonraki) ögesine tıklayın. Ardından şablonu uygun bir konuma kaydetmek için **Save** (Kaydet) ögesine tıklayın.

Protokol: Örnek değerlendirme (manuel)

Bu protokol, örneklerdeki toplam çoğaltılabilir DNA'yı değerlendirmek için kullanılır ve KRAS mutasyon analizinden önce gerçekleştirilmelidir.

- Örnekleri, Protokol: DNA örneğinin değerlendirilmesi bölümünde açıklandığı şekilde hazırlayın.
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazındaki PCR çalışmasını, Protokol: *therascreen* KRAS PCR RGQ kurulumu kısmında açıklandığı şekilde düzenleyin.
- Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri Örnek değerlendirme veri analizi kısmındaki talimatlara göre analiz edin.

Protokol: KRAS mutasyon tespiti (manuel)

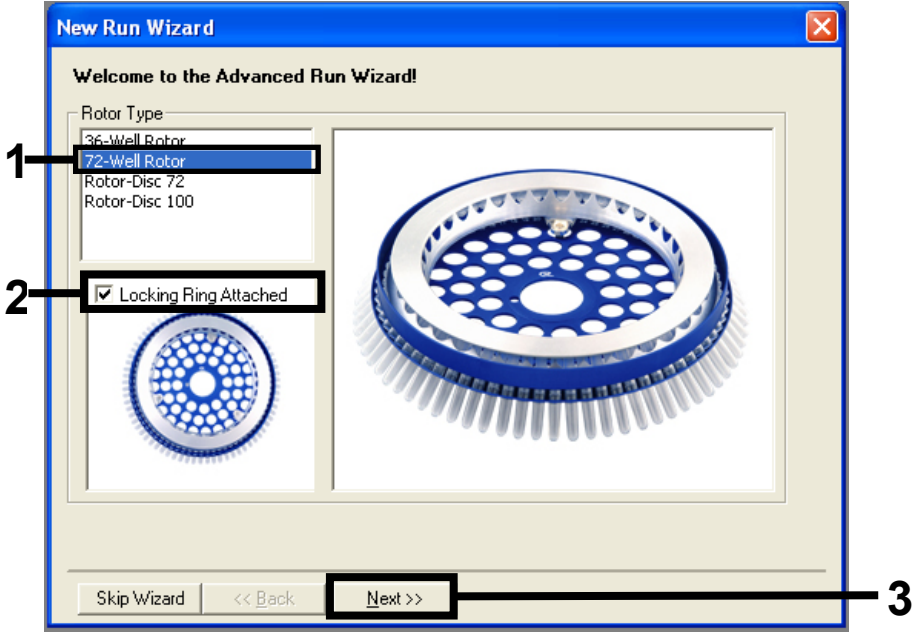
Örnek, örnek değerlendirmesini geçtikten sonra KRAS mutasyonlarının tespiti için test edilebilir.

- Örnekleri, Protokol: DNA örneğinin değerlendirilmesi bölümünde açıklandığı şekilde hazırlayın.
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazındaki PCR çalışmasını, Protokol: *therascreen* KRAS PCR RGQ kurulumu kısmında açıklandığı şekilde düzenleyin.
- Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri Örnek değerlendirme veri analizi kısmındaki talimatlara göre analiz edin.

Protokol: *therascreen* KRAS PCR RGQ kurulumu

1. Rotor-Gene Q serisi yazılımı 2.3'ü ve oluşturulan uygun sıcaklık profilini açın.
2. Sıcaklık profilini Protokol: Sıcaklık profili oluşturma bölümüne uygun şekilde oluşturun.

Doğru rotorun seçildiğinden emin olun ve **Locking Ring Attached** (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. **Next** (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 38).



Şekil 38. New Run Wizard (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu ve hoş geldiniz ekranı. 1 = Rotor tipi, 2 = Locking Ring Attached (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu, 3 = Next (İleri).

3. Operatörün adını girin. Notlar ekleyin, **Reaction Volume** (Reaksiyon Hacmi) alanının **25'e** ayarlandığını ve **Sample Layout** (Örnek Düzeni) alan kutusunun **1, 2, 3...** değerlerini içerdiğini teyit edin. **Next** (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 39).

New Run Wizard

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

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

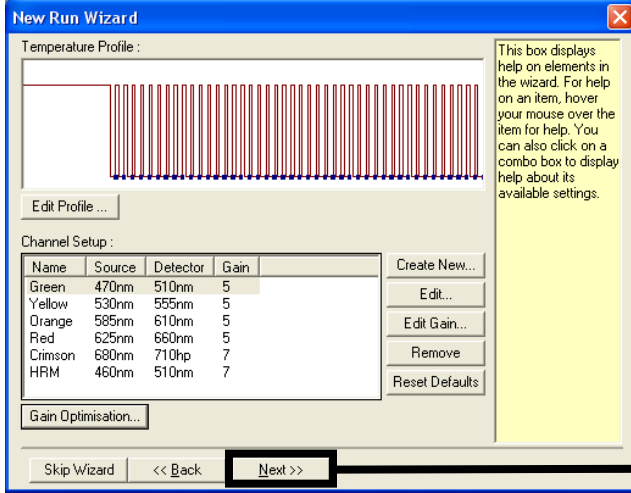
Sample Layout : 1, 2, 3...

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.

Skip Wizard << Back Next >>

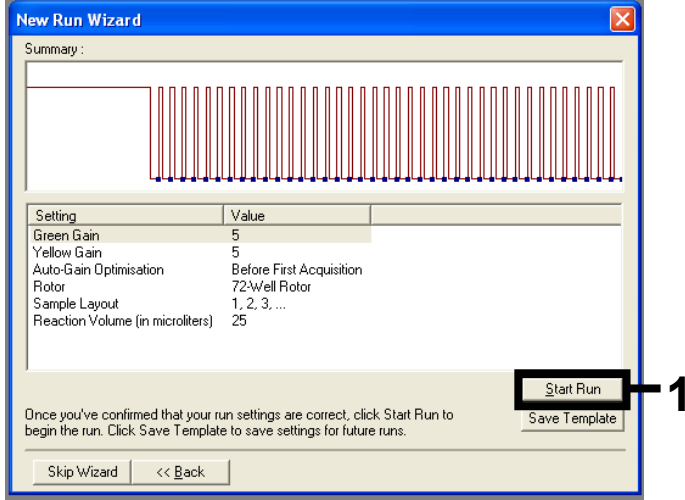
Şekil 39. New Run Wizard (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu. 1 = Operator (Operatör) ve Notes (Notlar) alanları, 2 = Reaction Volume (Reaksiyon Hacmi) ve Sample Layout (Örnek Düzeni) alanları, 3 = Next (İleri).

4. Bir sonraki pencerede tüm değerleri oldukları gibi bırakın. Sıcaklık profili Protokol: Sıcaklık profili oluşturma bölümündeki talimatlara uygun oluşturulduğundan düzenlemeye gerek yoktur. **Next** (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 40).



Şekil 40. New Run Wizard (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu ve sıcaklık düzenleme ekranı. 1 = Next (İleri).

5. Özeti inceleyin ve çalışma dosyasını kaydederek çalışmayı başlatmak için **Start Run** (Çalışmayı Başlat) öğesine tıklayın (Şekil 41).



Şekil 41. New Run Wizard (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu. 1 = Start Run (Çalışmayı Başlat).

Not: Çalışma başladıktan sonra, örnek adlarını o anda girebilirsiniz ya da çalışma sırasında veya çalışma tamamlandığında **Finish** (Bitir) öğesine tıklayıp **Sample** (Örnek) öğesini seçerek sonradan da girebilirsiniz.

Finish and Lock Samples (Bitir ve Örnekleri Kilitle) öğesine tıklarsanız artık örnek adlarını düzenleyemezsiniz. Doğru örnek test ve analizini sağlamak için örnek adlarını girerken özellikle dikkat etmeniz gerekir.

Not: Örnekleri adlandırırken, boş kuyuların Name (Ad) sütunu boş bırakılmalıdır.

6. Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri uygun şekilde, Örnek değerlendirme veri analizi veya KRAS mutasyon tespiti analizi bölümlerine göre analiz edin.
7. Miktar belirleme raporları gerekirse, Rotor-Gene Q çalışma dosyasındaki araç çubuğunda yer alan **Reports** (Raporlar) simgesine tıklayın.

Ek 2: theascreen KRAS Assay Package'in kurulumu

theascreen KRAS RGQ PCR Kit, 72 kuyulu rotora sahip Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır. *theascreen* KRAS Assay Package, CD halinde (kat. no. 9023675) ayrıca satılır.

theascreen KRAS Assay Package, www.qiagen.com web sitesindeki ilgili *theascreen* KRAS RGQ PCR Kit ürünü web sayfasında indirilmek için bulunabilir. İndirme bilgileri Supplementary Protocols (Ek Protokoller) sekmesi altındaki Product Resources (Ürün Kaynakları) bölümünde bulunabilir. Ayrıca, Tahlil Paketleri bir CD'de de sipariş edilebilir.

Pakette, *theascreen* KRAS CE QC Locked Template (*theascreen* KRAS CE QC Kilitli Şablon) ve *theascreen* KRAS CE Locked Template (*theascreen* KRAS CE Kilitli Şablon) yer almaktadır.

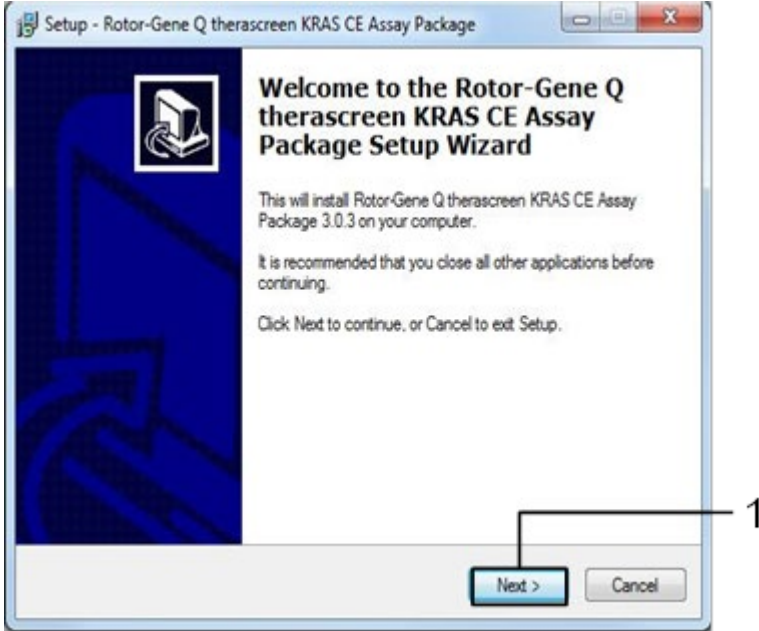
Not: *theascreen* KRAS Assay Package, yalnızca *theascreen* KRAS Assay Package sürüm 3.0.3'e (QIAGEN, kat. no. 9023675) sahip ilgili Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.3 ile çalışır. *theascreen* KRAS Assay Package kurulumuna devam etmeden önce, Rotor-Gene Q yazılımının doğru sürümünü yüklediğinizden emin olun.

Prosedür (indirme)

1. **www.qiagen.com** web sitesindeki ilgili *theascreen* KRAS RGQ PCR Kit ürünü web sayfasında bulunan *theascreen* KRAS RGQ Assay Package'ı indirin.
2. Dosyaya çift tıklayın ve dosyayı arşivin içine çıkarın.
3. Kurulumu başlatmak için **theascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe** üzerine çift tıklayın.

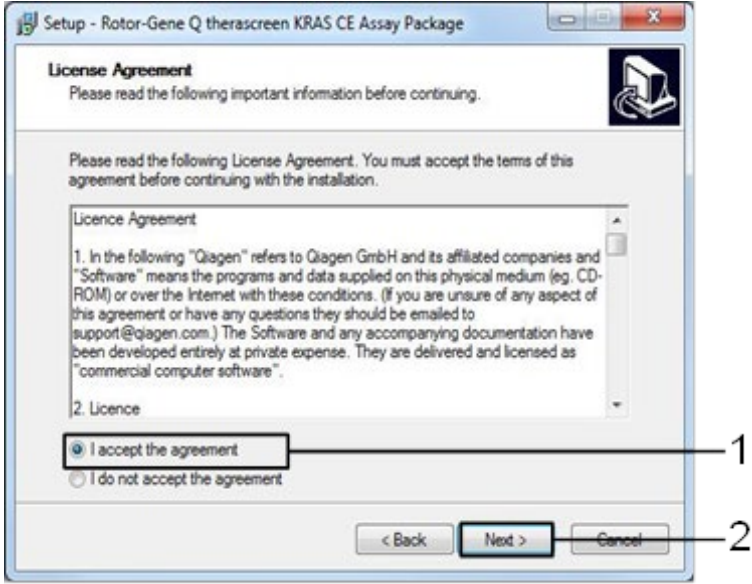
Prosedür (CD)

1. QIAGEN'den ayrı olarak alınabilen, yüklü Rotor-Gene Q Yazılımı (yukarıya bakın) ile uyumlu *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE CD'yi sipariş edin.
Sürüm 3.0.3. Kat. no. 9023675.
2. CD'yi, Rotor Gene Q MDx 5plex HRM cihazına bağlı dizüstü bilgisayara takın.
3. Kurulumu başlatmak için **therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe** veya **therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe** üzerine çift tıklayın
Kurulum sihirbazı açılır.
4. İlerlemek için **Next** (İleri) seçeneğine tıklayın (Şekil 42).



Şekil 42. Setup (Kurulum) iletişim kutusu. 1 = Next (İleri).

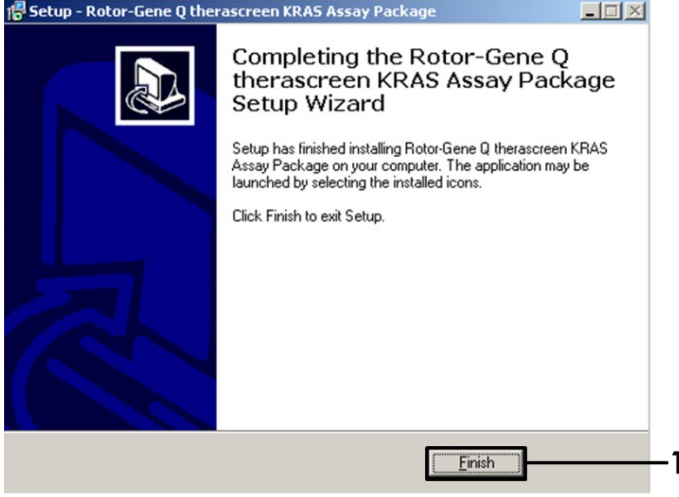
5. License Agreement (Lisans Sözleşmesi) iletişim kutusundan Lisans Sözleşmesini okuyun ve **I accept the agreement** (Sözleşmeyi kabul ediyorum) kutusunu işaretleyin. İlerlemek için **Next** (İleri) seçeneğine tıklayın (Şekil 43).



Şekil 43. License Agreement (Lisans Sözleşmesi) iletişim kutusu. 1 = I accept the agreement (Sözleşmeyi kabul ediyorum) beyanı, 2 = Next (İleri).

Şablon kurulumu otomatik olarak başlar.

6. Son Kurulum penceresinde kurulum sihirbazından çıkmak için **Finish** (Bitir) ögesine tıklayın. (Şekil 44).



Şekil 44. Sihirbazı tamamlama.

7. Bilgisayarı yeniden başlatın. Hem thetascreen KRAS QC Locked Template (thetascreen KRAS QC Kilitli Şablon) hem de *thetascreen* KRAS Locked Template (thetascreen KRAS Kilitli Şablon) için birer kısayol otomatik olarak oluşturulur ve masaüstünde görüntülenir.

Sipariş Bilgileri

Ürün	İçerik	Kat. no.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: 1 Kontrol Tahlili, 7 Mutasyon Tahlili, Pozitif Kontrol, Su, Taq DNA Polimeraz	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (sürüm 3.0.3)	<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit ve 72 kuyulu rotora sahip QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ile kullanım için yazılım protokol paketi	9023675
Rotor-Gene Q ve aksesuarları		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) ve HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, koyu kırmızı) ve HRM kanallı real-time PCR döngüleyici ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipetle manuel reaksiyon ayarı için alüminyum blok	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 250 strip	981103

Ürün	İçerik	Kat. no.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüp ve kapaklı 10 x 250 strip	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit - genomik DNA'nın parafine gömülü dokulardan saflaştırılması için		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNA işlemi için: QIAamp MinElute® Sütunları, Proteinaz K, Tamponlar ve Collection Tubes (2 ml)	56404

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

Belge Revizyon Geçmişi

Tarih	Değişiklikler
R4, Ocak 2019	Yetkili Temsilci eklemesi (ön kapak) Semboller bölümü güncellenmiştir Şablon güncellenmiştir
R5, Kasım 2019	Yasal üretici değişikliği (kapak sayfası) Kapak sayfasından ve Semboller bölümünden EC + REP sembolü kaldırılmıştır Cihaz adının cihaz etiketindeki adla uyum sağlamak üzere Rotor-Gene Q MDx yerine Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM olarak uyarlanması KRAS mutasyonlarının tespiti protokolü master karışımların hazırlığına ek adım dahil edilecek şekilde güncellenmiştir Tablo 10'da yer alan Sıklık ve %95 Güven Aralığı sütunlarındaki değerler düzeltilmiştir. CRC genel uyumluluk oranı %96,4 yerine %96,82 olarak güncellenmiştir Tablo 15'te yer alan LOD C ₉₅ sütunundaki değerler düzeltilmiştir
R6, Kasım 2020	therascreen KRAS Assay Package sürümü 3.0.3 olarak düzeltildi Bu belge, tahlil paketinin şu adresten indirilebilmesi ile ilgili olarak tamamen güncellendi: www.qiagen.com Kitin doğru çalışmasını sağlamak adına güncellenen NSCLC göstergesi işaretlerine ilişkin eylemlerle ilgili olarak belge geneline bir not eklendi Bu belgedeki doğru reaktif karıştırma ile ilgili prosedürlere bir not eklendi Genel önlemler bölümü güncellendi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazının doğru yerleşimi hakkında bir not eklendi Kuru neşter kullanımı hakkında bir not eklendi Protokol güncellendi: Başlamadan önce ilave önemli noktalar eklemek için DNA örnek değerlendirmesi Başlamadan önce ilave önemli noktalar ve NSCLC örnekleri için çeşitli işaretlerin Invalid (Geçersiz) olarak yorumlanmasına ilişkin bir not eklenerek Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti bölümü güncellendi RGQ işaretlerini, bunların anlamlarını ve önerilen eylemleri gösteren tablolar eklenerek, Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package işaretleri bölümü güncellendi Sonuçların Yorumlanması bölümünde işaretlerle ilgili eylemlere ilişkin güncellemeler yapıldı. RGQ işaretlerini, bunların anlamlarını ve önerilen eylemleri gösteren tablolar eklenerek Sorun Giderme Kılavuzu bölümü güncellendi NSCLC örnekleri hakkında bilgiler eklenerek Sınırlamalar bölümü güncellendi

Tarih	Değişiklikler
	<p data-bbox="337 245 978 261">Tablolardaki veriler güncellenerek Performans Özellikleri bölümü revize edildi</p> <p data-bbox="337 277 710 293">DNA girişi ve doğrusalılık bölümü güncellendi</p> <p data-bbox="337 309 841 325">Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik bölümü güncellendi</p> <p data-bbox="337 341 734 357">Örnek kullanım değişkenliği bölümü güncellendi</p> <p data-bbox="337 373 617 389">Klinik Performans bölümü eklendi</p> <p data-bbox="337 405 967 437">Örnek kontrol tahlili >32 C_T değeri için önerilen çözüm revize edilerek Örnek değerlendirme veri analizi bölümü güncellendi</p> <p data-bbox="337 453 824 469">Semboller bölümüne Avrupa uyumluluğu için işaret eklendi</p> <p data-bbox="337 485 990 517">Sonuçların Yorumlanması (Manuel) bölümünde işaretlerle ilgili eylemlere ilişkin güncellemeler yapıldı.</p> <p data-bbox="337 533 978 564">Master karışım hazırlama adımları eklenerek Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti bölümü güncellendi</p>

Bu sayfa özellikle boş bırakılmıştır

therascreen® KRAS RGQ PCR Kit için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

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

1. Ürün yalnızca ürüne ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenler dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde test edilmiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN üçüncü tarafların haklarını ihlal etmediğini garanti etmez ve beyan etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri tek kullanım için lisanslanmıştır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Kitin satın alıcısı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan herhangi bir eyleme neden olabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı veya başkasının atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans şartları için bkz. www.qiagen.com.

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

Bu belgede geçen tescilli adlar, ticari markalar vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarda korunmaktadır.

Dışkı örnekleriyle kullanmayın.

İdrar örnekleriyle kullanmayın.

Kan örneğinden alınan hücre dışı nükleik asitle kullanmayın.

Hücre dışı kemik iliği örnekleriyle kullanmayın.

Tükürük örnekleriyle kullanmayın.

BU ÜRÜNÜN ALINMASI, BELİRLİ ROCHE PATENTLERİ KAPSAMINDA, SATIN ALAN TARAFAYA YALNIZCA İNSAN IN VITRO TANILAMA HİZMETLERİNDE KULLANMASI İÇİN BAZI HAKLAR TANIR. ALIMDAN KAZANILAN BU ÖZEL KULLANIM HAKKI DIŞINDA GENEL PATENT VEYA HiÇ BİR TÜRDE BAŞKA LİSANS BURADA VERİLMEKTEDİR.

1127513 HB-1861-006 04-2022 © 2022 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

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