

therascreen[®] KRAS RGQ PCR-Kit – Gebrauchsanweisung (Handbuch)



24

Version 1

IVD

Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik

Zur Verwendung mit dem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-GerätZur Verwendung mit dem QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit**CE****REF**

874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R7

MAT

1134665EN

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	4
Vorgesehene Anwender	5
Zusammenfassung und Erläuterung	6
Verfahrensprinzip	7
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	12
Kit-Inhalt	12
Zusätzlich benötigtes Material	14
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	16
Sicherheitshinweise	16
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	16
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	19
Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Spezimen	20
Vorbereitung von Gewebeproben für die DNA-Extraktion aus CRC-Gewebe	20
Vorbereitung von Gewebeproben für die DNA-Extraktion aus NSCLC-Gewebe	21
Lagerung der Spezimen	22
Protokoll: DNA-Extraktion	24
DNA-Extraktion aus CRC-Proben	24
DNA-Extraktion aus NSCLC-Proben	25
Protokoll: Bewertung von DNA-Proben	27
Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen	42
Interpretation der Ergebnisse (manuell)	58
Einstellungen für die Analyse in der Software	58
Analyse der Daten aus der Probenbestimmung	60
KRAS-Mutationsnachweisanalyse	61
Probenanalyse	62

Interpretation der Ergebnisse	69
Analyse und Mutationsbestimmungen	69
Markierungen des Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package	71
Spezifische Markierungen sowohl für NSCLC als auch für CRC	72
Für NSCLC spezifische Markierungen	73
CRC-spezifische Markierungen	77
Anwendungseinschränkungen	82
Leistungsmerkmale	84
Analytische Leistung	84
Hilfe zur Fehlerbehebung	140
Qualitätskontrolle	141
Literaturangaben	142
Literaturverweise	142
Weiterführende Literaturverweise	142
Symbole	146
Kontakt	148
Anhang 1: theascreen KRAS RGQ PCR Kit – Handbuch zum Protokoll	149
Protokoll: Erstellung eines Temperaturprofils	149
Protokoll: Probenbewertung (manuell)	161
Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen (manuell)	162
Protokoll: Einrichtung des theascreen KRAS PCR RGQ	162
Bestellinformationen	168
Revisionsverlauf des Dokuments	170

Verwendungszweck

Das *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit ist ein qualitativer Real-time PCR-Assay zum Nachweis von 7 somatischen Mutationen in den Codonen 12 und 13 des menschlichen *KRAS*-Onkogens unter Verwendung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts. Das Kit ist für die Verwendung mit DNA vorgesehen, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben von kolorektalem Karzinom (CRC) oder nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) gewonnen wurde, die durch Resektion (RES), Nadelbiopsie (CNB) oder Feinnadelaspiration (FNA) entnommen wurden.

Somatische Mutationen im *KRAS*-Gen sind potenzielle prädiktive Biomarker für eine Resistenz gegenüber Therapien, die auf den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) abzielen, wie beispielsweise Panitumumab und Cetuximab zur Behandlung von kolorektalem Karzinom (CRC). Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit soll zudem dabei helfen, Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) für eine Behandlung mit Sotorasib (LUMYKRAS[®]) zu identifizieren, und zwar auf der Grundlage eines nachgewiesenen *KRAS*-G12C-Mutationsbefunds.

Somatische Mutationen im *KRAS*-Gen könnten zudem als potenzieller prädiktiver Biomarker dienen, um Behandlungsentscheidungen für andere Therapien bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) zu treffen.

Der Mutationsstatus des Patienten wird zusammen mit anderen Krankheitsfaktoren von einem Arzt beurteilt, damit eine Therapieentscheidung getroffen werden kann. Keine Behandlungsentscheidung für Krebspatienten sollte allein auf dem *KRAS*-Mutationsstatus basieren.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist nicht zur Diagnose von CRC, NSCLC oder einer anderen Erkrankung bestimmt.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist ein diagnostisches In-vitro-Medizinprodukt.

Vorgesehene Anwender

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist für den Einsatz durch geschultes Personal in einer professionellen Laborumgebung vorgesehen.

Zusammenfassung und Erläuterung

Mutationen im *KRAS*-Onkogen treten bei Krebserkrankungen des Menschen häufig auf (1–4). Mithilfe der ARMS®- (Allele Refractory Mutation System) und Scorpions®-Technologien (5, 6) ermöglicht das *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit den Nachweis von 7 Mutationen in den Codonen 12 und 13 des *KRAS*-Onkogens vor dem Hintergrund von Wildtyp-Genom-DNA (Tabelle 1). Basierend auf Daten aus der COSMIC-Datenbank (2015, Version 72) machen die 7 vom *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit nachgewiesenen Mutationen > 95 % aller gemeldeten *KRAS*-Mutationen bei CRC-Patienten und > 88 % aller gemeldeten Mutationen bei NSCLC-Patienten aus (7).

Tabelle 1. Liste der Mutationen und COSMIC-Identitäten*

Mutation	Basenaustausch	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

* Die COSMIC-IDs stammen aus dem „Catalog of Somatic Mutations in Cancer“ (7)

(www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)

Der Test zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus und ermöglicht den Nachweis eines geringen Anteils an mutierter DNA vor dem Hintergrund von Wildtyp-DNA. Sofern ausreichend DNA-Kopien vorhanden sind, ist der Nachweis von 0,8 % mutierter DNA vor dem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA möglich.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wird im Rahmen eines Polymerase-Kettenreaktionsverfahrens (PCR) eingesetzt. Dieses Kit zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für die Zielsequenz sowie durch außergewöhnliche Schnelligkeit und Effizienz aus und ermöglicht eine Bestimmung unter Ausschluss jeglicher Subjektivität.

Verfahrensprinzip

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nutzt 2 Technologien – ARMS und Scorpions – zum Nachweis von Mutationen mittels Real-time PCR.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ermöglicht acht separate PCR-Amplifikationsreaktionen: sieben mutationsspezifische Reaktionen in den Codons 12 und 13 von Exon 2 des *KRAS*-Onkogens sowie eine Wildtyp-Kontrolle in Exon 4. Die Hauptkomponenten des Kits sind im Folgenden beschrieben.

Mutationsreaktionsgemische

Bei jedem Reaktionsgemisch wird zunächst ein mutationsspezifischer ARMS-Primer verwendet, um die mutierte DNA selektiv zu amplifizieren, und anschließend ein Scorpions-Primer, um das Produkt der Amplifikation nachzuweisen.

ARMS

Die allelspezifische Amplifikation wird mittels ARMS erreicht, wobei die Fähigkeit der *Taq*-DNA-Polymerase genutzt wird, zwischen einer passenden und einer nicht passenden Base am 3'-Ende eines PCR-Primers zu unterscheiden. Wenn der Primer vollständig übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation mit voller Effizienz. Wenn die 3'-Base nicht übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation ggf. nur im Hintergrund auf niedrigem Niveau. Eine mutierte Sequenz wird daher selbst in Proben, bei denen die DNA mehrheitlich nicht die Mutation trägt, selektiv amplifiziert.

Scorpions

Der Nachweis der Amplifikation wird mithilfe der Scorpions-Technologie durchgeführt. Scorpions sind bifunktionale Moleküle, die sich aus einem PCR-Primer und einer kovalent daran gebundenen Sonde zusammensetzen. Die Sonde umfasst das Fluorophor Carboxyfluorescein (FAM™) und einen Quencher. Letzterer hat die Aufgabe, die Fluoreszenz des Fluorophors zu unterdrücken. Wenn sich die Sonde während der PCR an das ARMS-Amplikon bindet, werden das Fluorophor und der Quencher voneinander getrennt, was zu einem nachweisbaren Anstieg der Fluoreszenz führt.

Kit-Zusammenstellung

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthält 8 Assays:

- 1 Kontrollassay (Kontrollreaktionsgemisch [Control Reaction Mix, CTRL])
- 7 Mutationsassays (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 13ASP)

Die Reaktionsgemische sind Duplex-Gemische, die FAM-markierte Reagenzien zum Nachweis der Zielmoleküle sowie HEX™-markierte Reagenzien zum Nachweis der internen Kontrollen enthalten. Die Reaktionsgemische und Positivkontrollreagenzien enthalten Tris-EDTA-Puffer und die Positivkontrolle enthält Poly-A-Carrier-RNA.

Assays

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit umfasst ein 2-stufiges Verfahren. Im ersten Schritt wird der Kontrollassay durchgeführt, um die gesamte amplifizierbare KRAS-DNA in einer Probe zu bestimmen. Im zweiten Schritt werden sowohl der Mutations- als auch der Kontrollassay durchgeführt, um zu bestimmen, ob mutierte DNA vorliegt.

Kontrollreaktion

Das CTRL-Verfahren nutzt einen Scorpions-Primer und einen unbeschrifteten Primer, um eine kurze Sequenz aus Exon 4 des KRAS-Gens zu amplifizieren. Anhand der Kontrollreaktion wird bestimmt, ob in der Probe eine ausreichende Konzentration an amplifizierbarer DNA vorhanden ist. Außerdem stellt sie einen Faktor in den analytischen Berechnungen zur Bestimmung des Mutationsstatus dar.

Kontrollassay

Der mit FAM markierte Kontrollassay dient zur Bestimmung der gesamten amplifizierbaren KRAS-DNA in einer Probe. Der Kontrollassay amplifiziert einen Bereich des Exons 4 des KRAS-Gens. Die Primer und die Scorpion-Sonde sind so konzipiert, dass sie unabhängig von bekannten KRAS-Polymorphismen amplifizieren.

Mutationsassays

Jeder Mutationsassay enthält eine FAM-markierte Scorpion-Sonde und einen ARMS-Primer zur Unterscheidung zwischen Wildtyp-DNA und einer spezifischen Mutanten-DNA.

Kontrollen

Hinweis: Alle Versuchsdurchläufe müssen Positiv- und Negativkontrollen enthalten.

Interne Kontrolle

Jedes Reaktionsgemisch enthält neben der Zielreaktion eine interne Kontrolle. Eine fehlgeschlagene Kontrollreaktion zeigt an, dass entweder Inhibitoren vorhanden sind, die zu falschen Ergebnissen führen können, oder dass dem Bediener bei der Vorbereitung dieses Röhrchens ein Fehler unterlaufen ist. Wenn das Fehlschlagen der internen Kontrollreaktion auf eine PCR-Inhibition zurückzuführen ist, kann der Effekt der Inhibitoren u. U. durch Verdünnen der Probe verringert werden. Es ist jedoch zu beachten, dass dadurch auch die Ziel-DNA

verdünnt wird. Im Kit ist ein Röhrchen mit Wasser zur Verdünnung der Probe (Dil.) enthalten. Probenverdünnungen müssen mit dem Wasser zur Probenverdünnung (Dil.) durchgeführt werden.

Positivkontrolle

Jeder Lauf muss in den Röhrchen 1–5 eine Positivkontrolle enthalten. Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthält eine KRAS- Positivkontrolle (PC), die als Matrize für die Positivkontrollreaktion verwendet wird. Mit den Ergebnissen der Positivkontrolle wird sichergestellt, dass das Kit die angegebenen Akzeptanzkriterien erfüllt.

Negativkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 9–13 eine Negativkontrolle (Kontrolle ohne Template) enthalten sein. Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthält Wasser für NTC (NTC), das als Vorlage für die Kontrolle ohne Vorlage dienen soll. Die Kontrolle ohne Template dient zum Nachweis von möglicherweise bei der Laufkonfiguration aufgetretenen Kontaminationen und zur Bestimmung der Leistung der internen Kontrollreaktion.

Probenbestimmung

Die im Lieferumfang des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthaltene Kontrollreaktionsmischung (CTRL) dient zur Bestimmung der gesamten amplifizierbaren KRAS-DNA in einer Probe. Der Kontrollassay amplifiziert einen Bereich des Exons 4 des KRAS-Gens. Es sollten Proben ausschließlich mit dem Kontrollassay bestimmt werden, wobei die KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC) als Positivkontrolle und Wasser für NTC als Kontrolle ohne Template zu verwenden sind.

Plattform und Software

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde speziell für den Einsatz mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät entwickelt. Die Rotor-Gene Q-Software und das *therascreen* KRAS Assay Package stehen im Internet unter www.qiagen.com zum Download bereit oder sind separat auf CD erhältlich.

- Informationen zu kompatiblen RGQ-Softwareversionen und Rotor-Gene AssayManager-Versionen finden Sie unter „Zusätzlich benötigtes Material“ auf Seite 14.
- Weitere Informationen zum Gerät finden Sie im Benutzerhandbuch des Geräts.
- Um Fehlermeldungen bei den Kontrollen und Proben auf ein Minimum zu reduzieren, sollten die Anweisungen in der *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit *Gebrauchsanweisung* strikt befolgt werden, insbesondere hinsichtlich der Aufstellung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts gemäß den Installationsanweisungen und den Anforderungen vor Ort.
- Anweisungen zur Installation des Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package finden Sie in Appendix 2 B: Installation of the Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package,.

Das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -Gerät muss gemäß den Vorgaben in der Bedienungsanleitung gewartet werden. Informationen zum Gerät finden Sie in der Bedienungsanleitung.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

therascreen KRAS RGQ PCR Kit				(24)
Katalognummer				874011
Anzahl Präparationen				24
Farbe	Bezeichnung	Röhrchenkennzeichnung		Volumen
Rot	Control Reaction Mix (Kontrollreaktionsgemisch)	1	CTRL	2 x 600 µl
Lila	12ALA Reaction Mix (12ALA Reaktionsgemisch)	2	12ALA	600 µl
Orange	12ASP Reaction Mix (12ASP Reaktionsgemisch)	3	12ASP	600 µl
Rosa	12ARG Reaction Mix (12ARG Reaktionsgemisch)	4	12ARG	600 µl
Grün	12CYS Reaction Mix (12CYS Reaktionsgemisch)	5	12CYS	600 µl
Gelb	12SER Reaction Mix (12SER Reaktionsgemisch)	6	12SER	600 µl
Grau	12VAL Reaction Mix (12VAL Reaktionsgemisch)	7	12VAL	600 µl
Blau	13ASP Reaction Mix (13ASP Reaktionsgemisch)	8	13ASP	600 µl

therascreen KRAS RGQ PCR Kit**(24)****Katalognummer****874011****Anzahl Präparationen****24**

Farbe	Bezeichnung	Röhrchenkennzeichnung		Volumen
Beige	KRAS Positive Control (KRAS-Positivkontrolle)	9	PC	250 µl
Mintgrün	Taq DNA Polymerase (Taq-DNA-Polymerase)		Taq	80 µl
Weiß	Water for NTC (Wasser für NTC)		NTC	1,9 ml
Weiß	Water for Sample Dilution (Wasser zur Verdünnung der Probe)		Dil.	1,9 ml

*therascreen KRAS RGQ PCR Kit – Gebrauchsanweisung (Deutsch)***1**

Zusätzlich benötigtes Material

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDB) zu entnehmen. Diese sind online als praktisches und kompaktes PDF unter www.qiagen.com/safety verfügbar, wo Sie die Sicherheitsdatenblätter für jedes QIAGEN-Kit und jede Kit-Komponente finden, einsehen und ausdrucken können.

Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Herstellerempfehlungen geprüft und kalibriert wurden.

- 0,1 ml Strip Tubes and Caps, zur Verwendung mit einem 72-Well Rotor (QIAGEN, Kat.-Nr. 981103 oder 981106)
- Ein neues Skalpell, eine Rasierklinge oder ein ähnliches Instrument mit scharfer Klinge
- Nukleasefreie Mikrozentrifugenröhrchen zum Ansetzen von Master-Mixen
- Sterile Pipettenspitzen mit Aerosolschutz
- Permanentmarker
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät mit Fluoreszenzkanälen für Cycling Green und Cycling Yellow (zum Nachweis von FAM bzw. HEX)
- Rotor-Gene Q-Software, Version 2.3.5 oder höher, mit installiertem KRAS Assay Package Version 3.0.3 zur automatisierten Mutationserkennung

Hinweis: Die Rotor-Gene Q-Software kann ohne das KRAS Assay Package zur manuellen Mutationserkennung verwendet werden. Siehe „Anhang 1: theascreen KRAS RGQ PCR Kit – Handbuch zum Protokoll“ auf Seite 149.

- Ladeblock für 72 x 0,1- ml- Röhrchen, Aluminiumblock für die manuelle Reaktionsvorbereitung (QIAGEN, Kat.-Nr. 9018901)

- Spezielle Pipetten (einstellbar) für die Probenvorbereitung
- Spezielle Pipetten (einstellbar) für die Vorbereitung des PCR-Master-Mix
- Spezielle Pipetten (einstellbar) zur Dosierung von Template-DNA
- Thermomixer, beheizter Orbitalschüttelinkubator, Heizblock oder Wasserbad, das eine Inkubation bei 56 °C, 70 °C und 90 °C ermöglicht
- Tischzentrifuge mit Rotor für 1,5-ml-Röhrchen
- Tisch-Vortexer
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. Nr. 60404; siehe „DNA-Extraktion aus CRC-Proben“ auf Seite 24 und „DNA-Extraktion aus NSCLC-Proben“ auf Seite 25.
 - Xylen
 - Ethanol (96–100 %)*

*Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methylethylketon enthält.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Gerät

Zur Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDB) zu entnehmen. Diese sind online als praktisches und kompaktes PDF unter www.qiagen.com/safety verfügbar, wo Sie die Sicherheitsdatenblätter für jedes QIAGEN-Kit und jede Kit-Komponente finden, einsehen und ausdrucken können.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Bei der Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sollten Sie stets Folgendes beachten:

- Der Test ist für formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben vorgesehen.
- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Die Proben sind potenziell infektiös und müssen als biologische Gefahrstoffe behandelt werden.
- Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

- Die Reagenzien für das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sind bereits optimal verdünnt. Die Reagenzien dürfen nicht weiter verdünnt werden, da dies die Leistung beeinträchtigen könnte. Verwenden Sie keine Reaktionsvolumina (Reaktionsgemisch plus Probe) von weniger als 25 µl.
- Alle Reagenzien im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sind speziell für die Verwendung mit den im Kit enthaltenen Tests formuliert.
- Alle im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich zur Verwendung mit den anderen im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien vorgesehen. Ersetzen Sie die Reagenzien im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nicht durch andere, da dies die Leistungsfähigkeit beeinträchtigen könnte.
- Verwenden Sie ausschließlich die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-Röhrchen), die im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Kit enthalten ist. Ersetzen Sie diese nicht durch *Taq*-DNA-Polymerase aus anderen Kits desselben oder eines anderen Typs oder durch *Taq*-DNA-Polymerase eines anderen Anbieters.
- Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Um Markierungsergebnisse bei den Kontrollen und Proben zu minimieren, sollten die Anweisungen in der *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit *Gebrauchsanweisung* strikt befolgt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf:
 - Ein korrektes Mischen der Reagenzien ist erforderlich und muss während der Assayeinrichtung bei jedem Mischschritt sichergestellt werden.
 - Die Positionierung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments hat gemäß den Installationsverfahren und Standortanforderungen zu erfolgen.

Hinweis: Gehen Sie mit äußerster Vorsicht vor, um eine Kontamination der Reagenzien für die Kontroll- und Reaktionsmischung mit den im Positivkontrollreagenz enthaltenen synthetischen Stoffen zu vermeiden.

Hinweis: Verwenden Sie für die Vorbereitung der Reaktionsgemische und die Zugabe der Positivkontrollreagenzien jeweils eigene, speziell dafür vorgesehene Pipetten.

Hinweis: Führen Sie die Vorbereitung und die Dosierung der Reaktionsgemische in einem Bereich durch, der von dem für die Zugabe der Positivkontrolle verwendeten Bereich getrennt ist.

Hinweis: Öffnen Sie das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät erst, wenn der Lauf beendet ist.

Hinweis: Öffnen Sie die Rotor-Gene Q-Röhrchen nach Beendigung des Laufs nicht.

Hinweis: Es ist Vorsicht geboten, um eine korrekte Untersuchung der Proben zu gewährleisten, wobei besonders auf falsche Angaben zu den Proben, Fehler beim Einlegen der Proben und Fehler beim Pipettieren zu achten ist.

Für die Komponenten des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Taq-DNA-Polymerase

Enthält: ethoxyliertes Nonylphenol. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. Inhalt/Behälter bei einem zugelassenen Abfallentsorgungsdienst entsorgen.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versandt und muss bei Erhalt gefroren sein. Sollte eine Komponente des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bei Erhalt nicht gefroren sein, sollte die Außenverpackung während des Transports geöffnet worden sein, sollte die Sendung keinen Lieferschein oder die Reagenzien enthalten oder sollten Sie ein gedrucktes Handbuch benötigen, wenden Sie sich bitte an eine der technischen Kundendienstabteilungen von QIAGEN oder an einen lokalen Vertriebspartner (siehe Rückseite oder besuchen Sie www.qiagen.com).

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach Erhalt bei -30 bis -15 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert und vor Licht geschützt werden. Wie bei allen fluoreszenzmarkierten Molekülen müssen auch die Scorpions vor Licht geschützt werden, um eine Photobleichung und einen Leistungsverlust zu vermeiden.

Bei Lagerung unter den empfohlenen Lagerbedingungen in der Originalverpackung ist das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. 6 Einfrier-/Auftauzyklen dürfen nicht überschritten werden.

Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Spezimen

Hinweis: Alle Proben sind als potenziell infektiöses Material zu behandeln.

Das Probenmaterial muss humane genomische DNA sein, die aus FFPE-Gewebe extrahiert wurde. Zur Sicherstellung der Spezimenqualität müssen die Spezimen gemäß Pathologie-Standardverfahren transportiert werden.

Tumorproben sind heterogen und die Daten einer einzelnen Tumorprobe stimmen möglicherweise nicht mit denen anderer Schnitte desselben Tumors überein. Tumorproben können zudem Nicht-Tumorgewebe enthalten. Es ist nicht zu erwarten, dass die DNA aus Nicht-Tumorgewebe Mutationen enthält, die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachgewiesen werden können.

Vorbereitung von Gewebeproben für die DNA-Extraktion aus CRC-Gewebe

- Fixieren Sie die Gewebeproben unter Verwendung von Standardmaterialien und -methoden in 10 % neutralgepuffertem Formalin (Neutral Buffered Formalin, NBF) und betten Sie die Gewebeproben in Paraffin ein. Schneiden Sie mit einem Mikrotom 5-µm-Serienschnitte von einem Paraffinblock ab und ziehen Sie diese auf einen Objektträger aus Glas auf.
- Eine qualifizierte Fachkraft (z. B. ein Pathologe) muss einen mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Schnitt hinsichtlich des Tumoranteils und zur Bestimmung der Fläche beurteilen. Kennzeichnen Sie den gefärbten Objektträger, um Tumorgewebe von normalem Gewebe zu unterscheiden. Verwenden Sie für die DNA-Extraktion Serienschnitte.

- Verwenden Sie Schnitte mit einem Tumoranteil von mehr als 20 % der Fläche für die Verarbeitung ohne Makrodissektion.
- Bei Schnitten, bei denen der Tumoranteil flächenmäßig $\leq 20\%$ beträgt, führen Sie eine Makrodissektion an einem oder mehreren Schnitten durch. Entfernen Sie das nicht-tumoröse Gewebe.
- Bei Schnitten mit einer Fläche von weniger als 4 mm^2 sollten Sie 2 oder mehr Schnitte untersuchen, um die gesamte Tumorrofläche auf mindestens 4 mm^2 zu erhöhen (gilt sowohl für Proben mit als auch ohne Makrodissektion). Falls eine Makrodissektion durchgeführt wurde, entsorgen Sie das nicht-tumoröse Gewebe.
- Entfernen Sie überschüssiges Paraffin mit einem neuen Skalpell, einer Rasierklinge oder einem ähnlichen Instrument mit scharfer Klinge vom Gewebe.

Hinweis: Falls eine Makrodissektion durchgeführt wurde, verwenden Sie ein trockenes Skalpell, eine Rasierklinge oder ein ähnliches Instrument mit scharfer Klinge. Dieser Schritt darf nicht in einer Sicherheitswerkbank oder einem Abzug durchgeführt werden.

- Kratzen Sie das Tumorgewebe von den Schnitten in beschriftete Mikrozentrifugenröhrchen ab, wobei Sie für jede Probe ein neues Skalpell, eine neue Rasierklinge oder ein ähnliches Instrument mit scharfer Klinge verwenden.
- Kennzeichnen, handhaben und lagern Sie Tumorproben, Blöcke, Objektträger, Proben und Mikrozentrifugenröhrchen auf kontrollierte Weise, sodass sie für die Extraktion bereit sind.

Vorbereitung von Gewebeproben für die DNA-Extraktion aus NSCLC-Gewebe

- Fixieren Sie die Gewebespezimen unter Verwendung von Standardmaterialien und -methoden in 10 % neutral gepuffertem Formalin und betten Sie die Gewebespezimen in Paraffin ein. Schneiden Sie mit einem Mikrotom 5- μm -Serienschnitte von einem

Paraffinblock ab und ziehen Sie diese auf einen Objektträger aus Glas auf.

- Beauftragen Sie eine qualifizierte Fachkraft (z. B. einen Pathologen) mit der Beurteilung eines mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbten Schnitts zur Bestimmung des Tumoranteils und der Tumorrofläche. Kennzeichnen Sie den gefärbten Objektträger, um Tumorgewebe von normalem Gewebe zu unterscheiden. Verwenden Sie für die DNA-Extraktion Serienschnitte.
- Entfernen Sie überschüssiges Paraffin mit einem neuen Skalpell, einer Rasierklinge oder einem ähnlichen Instrument mit scharfer Klinge vom Gewebe.

Hinweis: Verwenden Sie ein trockenes Skalpell, eine Rasierklinge oder ein ähnliches Instrument mit scharfer Klinge. Dieser Schritt darf nicht in einer Sicherheitswerkbank oder einem Abzug durchgeführt werden.

- Kratzen Sie das Tumorgewebe von den Schnitten in beschriftete Mikrozentrifugenröhrchen ab, wobei Sie für jede Probe ein neues Skalpell, eine neue Rasierklinge oder ein ähnliches Instrument mit scharfer Klinge verwenden.
- Kennzeichnen, handhaben und lagern Sie Tumorproben, Blöcke, Objektträger, Proben und Mikrozentrifugenröhrchen auf kontrollierte Weise, sodass sie für die Extraktion bereit sind.

Lagerung der Spezimen

Lagern Sie CRC-FFPE-Blöcke und Objektträger bei Raumtemperatur. Objektträger können vor der DNA-Extraktion bis zu 4 Wochen lang bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert werden.

Lagern Sie NSCLC-FFPE-Blöcke und -Objektträger im Dunkeln bei Raumtemperatur. Objektträger mit Gewebeproben aus NSCLC-Resektionen und Nadelbiopsien können vor der DNA-Extraktion bis zu 70 Wochen lang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Objektträger mit Feinnadelpunktaten von NSCLC können vor der DNA-Extraktion bis zu 56 Wochen lang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Genom-DNA kann nach der Extraktion 1 Woche lang bei 2–8 °C gelagert werden; anschließend kann sie bis zu 8 Wochen vor der Verwendung bei –25 bis –15 °C gelagert werden.

Protokoll: DNA-Extraktion

DNA-Extraktion aus CRC-Proben

Verwenden Sie das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Kat.- Nr. 60404) unter Berücksichtigung der nachstehend beschriebenen Anpassungen des Protokolls zur Aufreinigung genomischer DNA aus Proben, die aus FFPE-Proben von Kolorektalkarzinomen gewonnen wurden.

Hinweis: Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde unter Verwendung von DNA validiert, die mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit extrahiert wurde. Verwenden Sie keine anderen Produkte zur DNA-Extraktion. Verwenden Sie kein anderes Produkt zur DNA-Extraktion.

Führen Sie die DNA-Extraktion gemäß den Anweisungen im *Handbuch zum QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* durch und beachten Sie dabei Folgendes:

- Informationen zur Vorbereitung der Proben vor der DNA-Extraktion finden Sie im *Handbuch zum QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.
- Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit darf ausschließlich manuell verwendet werden.
- Verwenden Sie zur Entparaffinierung ausschließlich das Xylol/Ethanol-Verfahren, wie es im *Handbuch zum QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* beschrieben ist.
- Verwenden Sie für alle erforderlichen Schritte Ethanol in Molekularbiologie-Qualität.*
- Verwenden Sie pro Extraktion 1 Schnitt von 5 µm (es sei denn, der Schnitt weist einen Tumoranteil von ≤ 20 % auf oder hat eine Fläche von < 4 mm²; siehe „Vorbereitung von

*Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methylethylketon enthält.

Gewebeproben für die DNA-Extraktion aus CRC-Gewebe“ auf Seite 20 für weitere Einzelheiten).

- Die Proteinase-K-Verdauung (wie im *Handbuch zum QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* beschrieben) muss 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Die Proben müssen mit 200 µl Elutionspuffer (Puffer ATE) aus dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit eluiert werden.

Hinweis: Lagern Sie die genomische DNA nach der Extraktion eine Woche lang bei 2–8 °C und anschließend bis zu acht Wochen lang bei –25 bis –15 °C, bevor Sie sie verwenden.

DNA-Extraktion aus NSCLC-Proben

Verwenden Sie das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Kat.- Nr. 60404) unter Berücksichtigung der nachstehend beschriebenen Anpassungen des Protokolls zur Aufreinigung genomischer DNA aus Proben, die aus FFPE-NSCLC-Proben gewonnen wurden.

Hinweis: Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde unter Verwendung von DNA validiert, die mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit extrahiert wurde. Verwenden Sie keine anderen Produkte zur DNA-Extraktion. Verwenden Sie kein anderes Produkt zur DNA-Extraktion.

Führen Sie die DNA-Extraktion gemäß den Anweisungen im *Handbuch zum QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* durch und beachten Sie dabei Folgendes:

- Verwenden Sie zur Entparaffinierung ausschließlich das Xylol/Ethanol-Verfahren, wie im *Handbuch zum QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* beschrieben.
- Verwenden Sie für alle erforderlichen Schritte Ethanol in Molekularbiologie-Qualität.*
- Verwenden Sie pro Extraktion einen Schnitt von 2 × 5 µm.

- Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit darf ausschließlich manuell verwendet werden.
- Die Proteinase-K-Verdauung (wie im Handbuch zum *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit beschrieben*) muss 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Geben Sie 60 µl Elutionspuffer (ATE) aus dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit hinzu und lassen Sie die Probe 2,5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zentrifugieren Sie die Proben anschließend 1 Minute bei voller Drehzahl.
- Geben Sie weitere 60 µl Elutionspuffer (ATE) aus dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit hinzu und lassen Sie die Mischung 2,5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zentrifugieren Sie die Proben anschließend 1 Minute bei voller Drehzahl.

Hinweis: Lagern Sie die genomische DNA nach der Extraktion eine Woche lang bei 2–8 °C und anschließend bis zu acht Wochen lang bei –25 bis –15 °C, bevor Sie sie verwenden.

Protokoll: Bewertung von DNA-Proben

Dieses Protokoll dient zur Bestimmung der gesamten amplifizierbaren DNA in Proben unter Verwendung des *therascreen* KRAS QC Locked Template (KRAS Assay Package) für die automatisierte Probenauswertung.

Hinweis: Informationen zur manuellen Probenbewertung finden Sie unter „Anhang 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit – Handbuch zum Protokoll“ auf Seite 149.

Wichtige Hinweise vor Beginn

Hinweis: Die Auswertung von DNA-Proben dient nicht zum Nachweis von PCR-Inhibitoren, da im Rahmen der Kontrollreaktion lediglich die gesamte amplifizierbare DNA in einer Probe ausgewertet wird.

Hinweis : Es ist wichtig, für diese Untersuchung das unten beschriebene Kontrollreaktionsgemisch zu verwenden und nicht die Spektralphotometrie oder andere alternative Methoden. Stark zersetzte DNA kann u. U. nicht amplifiziert werden, obwohl die Primer kurze DNA-Fragmente erzeugen.

- Mit dem bereitgestellten Kontrollreaktionsgemisch (Röhrchen CTRL) können bis zu 24 Proben ausgewertet werden.
- Verwenden Sie das CTRL, um die DNA vor der Untersuchung mit dem Assay zur Erkennung von Mutationen zu bewerten.
- Um die Reagenzien des *therascreen* *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit effizient zu nutzen, sollten Sie die DNA-Proben nach Möglichkeit bündeln, um vollständige Testdurchläufe zu erzielen. Die Untersuchung einzelner Proben oder kleinerer Probenmengen verbraucht mehr Reagenzien und verringert die Gesamtzahl der Proben, die mit einem einzigen *therascreen* *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untersucht werden können.

- Die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-Röhrchen) sowie alle Mischungen, die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten, dürfen nicht mit einem Vortex-Mischer vermischt werden, da dies zur Inaktivierung des Enzyms führen kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*-DNA-Polymerase, indem Sie die Pipettenspitze vorsichtig direkt unter die Flüssigkeitsoberfläche halten, um zu vermeiden, dass die Spitze mit überschüssigem Enzym benetzt wird.
- Um Fehlermeldungen bei den Kontrollen zu minimieren, ist die strikte Einhaltung der *therascreen KRAS RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung* hinsichtlich der korrekten Mischung der Reagenzien erforderlich; dies muss bei jedem Mischschritt während der Vorbereitung der Assays sichergestellt werden.

Vorbereitende Schritte

- Stellen Sie sicher, dass die Software des Rotor-Gene Q *therascreen KRAS Assay Package*, die der jeweiligen Rotor-Gene-Softwareversion entspricht, vor der erstmaligen Verwendung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts installiert ist (siehe Appendix 2 B: Installation of the Rotor-Gene Q *therascreen KRAS Assay Package*).
- Vor jeder Verwendung müssen alle Reagenzien mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig aufgetaut, durch 10-maliges Umdrehen gemischt und kurz zentrifugiert werden, um den Inhalt am Boden des Röhrchens zu sammeln. Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.
- Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Verwendung vollständig aufgetaut sind.
- Stellen Sie sicher, dass die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-Röhrchen) vor jedem Gebrauch Raumtemperatur (15–25 °C) erreicht hat. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

- 1. Lassen Sie das Kontrollreaktionsgemisch (Röhrchen CTRL), das nukleasefreie Wasser für die No-Template-Kontrolle (NTC) und die KRAS-Positivkontrolle (PC) mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig auftauen.

Die Zeiten für das Auftauen der Reagenzien, die Vorbereitung der PCR und die Lagerung vor Beginn des Laufs sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2. Zeiten für Auftauen und PCR-Konfiguration sowie Lagertemperaturen

Auftauzeit		Lagerungstemperatur* nach der PCR-Vorbereitung	Maximale PCR-Vorbereitungs- und Lagerzeit
Minimum	Maximum		
1 Stunde	4,5 Stunden	Raumtemperatur 15–25 °C	7 Stunden
1 Stunde	4,5 Stunden	2–8 °C	18 Stunden

* Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum vom Abschluss der PCR-Konfiguration bis zum Start des PCR-Laufs auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument.

Hinweis: Die PCR-Vorbereitung ist bei Raumtemperatur durchzuführen.

Hinweis: Bringen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-Röhrchen) gleichzeitig mit den anderen Reagenzien auf Raumtemperatur (15–25 °C) (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 19). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

- 2. Mischen Sie die aufgetauten Reagenzien durch 10-maliges Umdrehen jedes Röhrchens, um lokale Salzkonzentrationen zu vermeiden, und zentrifugieren Sie anschließend kurz, um den Inhalt am Boden des Röhrchens zu sammeln. Die Proben sollten zudem durch 10-maliges Umdrehen gemischt und anschließend kurz zentrifugiert werden, um den Inhalt am Boden des Probenröhrchens zu sammeln.

Hinweis: Die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) oder Mischungen, die *Taq* enthalten, dürfen nicht mit einem Vortex-Mischer vermischt werden, da dies zur Inaktivierung des Enzyms führen kann.

Hinweis: Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.

3. Bereiten Sie ausreichende Mengen an Master-Mixes (Kontrollreaktionsgemisch [CTRL] plus *Taq*-DNA-Polymerase [*Taq*]) gemäß den unten angegebenen Volumina in für Tabelle 3 Folgendes vor:
- alle DNA-Proben
 - 1 Reaktion mit KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC)
 - 1 Reaktion mit nukleasefreiem Wasser als Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC)
 - 1 zusätzliche Probe, um einen ausreichenden Überschuss für die PCR-Vorbereitung zu gewährleisten

Der Kontrollassay-Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 3. Vorbereitung des Master-Mix für den Kontroll-Assay

Komponente	Volumen
Kontrollreaktionsgemisch (Control Reaction Mix, CTRL)	19,76 µl x (n + 1)*
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (<i>Taq</i>)	0,24 µl x (n + 1)*

Komponente	Volumen
Gesamtvolumen	20 µl/Reaktion

* n = Anzahl der Reaktionen (Proben und Kontrollen).

Setzen Sie ausreichend Master-Mix für eine zusätzliche Probe (n+1) an, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material zur Verfügung steht. Der Wert n darf 24 (plus Kontrollen) nicht überschreiten, da 24 die maximale Anzahl von Proben ist, die in einem Lauf verarbeitet werden kann.

Hinweis: Bei der Vorbereitung des Master-Mix wird zunächst das erforderliche Volumen des Kontrollreaktionsgemischs (CTRL) in das entsprechende Röhrchen gegeben, und die Taq-DNA-Polymerase (Taq) wird zuletzt hinzugefügt.

Hinweis: Pipettieren Sie die Taq-DNA-Polymerase, indem Sie die Pipettenspitze vorsichtig direkt unter die Flüssigkeitsoberfläche halten, um zu vermeiden, dass die Spitze mit überschüssigem Enzym benetzt wird.

4. Platzieren Sie die entsprechende Anzahl an PCR-4-Streifen-Röhrchen (jeder Streifen enthält 4 Röhrchen) gemäß der Anordnung in Tabelle 4 in den Ladeblock. Verschließen Sie die Röhrchen nicht.

Hinweis: Lassen Sie die Verschlusskappen bis zur Verwendung im Plastikbehälter.

Tabelle 4. Laufanordnung im Ladeblock für die DNA-Probenbestimmung

Assay

Kontrolle	1 (PC)	9	17	25	–	–	–	–	–
Kontrolle	2 (NTC)	10	18	26	–	–	–	–	–
Kontrolle	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Kontrolle	4	12	20	–	–	–	–	–	–

Assay

Kontrolle	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Kontrolle	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Kontrolle	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Kontrolle	8	16	24	–	–	–	–	–	–

* Die Zahlen stehen für die Position im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an.

5. Stellen Sie eine Pipette auf ein Volumen ein, das kleiner ist als das Gesamtvolumen des Reaktions-Master-Mix, und mischen Sie den Master-Mix gründlich durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren.

Hinweis: Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.

6. Geben Sie unverzüglich 20 µl Master-Mix in jedes PCR-Streifenröhrchen.

Hinweis: Siehe Tabelle 4 für die Röhrchenanordnung. Zur Auswertung der DNA-Proben sollte der Kontroll-Assay-Master-Mix in ein PC-Röhrchen, ein NTC-Röhrchen sowie jeweils ein Röhrchen für jede DNA-Probe gegeben werden.

7. Geben Sie unverzüglich 5 µl nukleasefreies Wasser für die No-Template-Kontrolle (NTC) in das NTC-Röhrchen (Röhrchenposition 2) und verschließen Sie das Röhrchen.
8. Geben Sie jeweils 5 µl jeder DNA-Probe in die Probenröhrchen (Röhrchenpositionen 3–26) und verschließen Sie die Röhrchen.
9. Geben Sie 5 µl der KRAS-Positivkontrolle (PC) in das PC-Röhrchen (Röhrchenposition 1) und verschließen Sie das Röhrchen.

Hinweis: Jedes Röhrchen sollte ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl enthalten (20 µl des in Tabelle 3 hergestellten Master-Mixes sowie 5 µl NTC/Probe/PC).

10. Markieren Sie mit einem Permanentmarker die Deckel der ersten Röhrcchen an den Positionen mit den niedrigsten Nummern in jedem PCR-4er-Streifen (z. B. Positionen 1, 5 und 9 usw.), um die Ausrichtung für das Einsetzen der Röhrcchen in den 72-Well Rotor des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts zu kennzeichnen.
11. Schwenken Sie die verschlossenen Röhrcchen 4 Mal um, um Probe und Reaktionsgemisch zu mischen.

Hinweis: Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.

12. Setzen Sie alle PCR-4-Streifenröhrcchen entsprechend dem Lauflayout (Tabelle 4) unter Verwendung der Markierungen zur Ausrichtung in die entsprechenden Positionen des 72-Well Rotors ein.

Hinweis: Ist der Rotor nicht vollständig belegt, müssen alle ungenutzten Positionen auf dem Rotor mit einem verschlossenen, leeren Röhrcchen aufgefüllt werden. Dadurch wird sichergestellt, dass der thermische Wirkungsgrad des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts erhalten bleibt.

13. Setzen Sie den 72-Well Rotor in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (im Lieferumfang des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts enthalten) auf den Rotor aufgesetzt wird, um die Röhrcchen während des Laufs zu sichern.
14. Doppelklicken Sie auf das Symbol **therascreen KRAS Locked Template** auf dem Desktop des Laptops, der an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät angeschlossen ist (Abbildung 1), um die Rotor-Gene Q-Software zu starten.

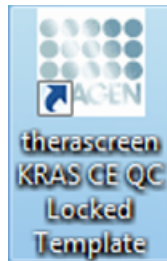


Abbildung 1. Das Symbol „*therascreen* KRAS QC Locked Template“.

15. Standardmäßig wird die Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) angezeigt (Abbildung 2). Stellen Sie sicher, dass der Schließring ordnungsgemäß angebracht ist, und setzen Sie ein Häkchen im Kontrollkästchen **Locking Ring Attached** (Schließring angebracht). Schließen Sie den Deckel des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Geräts.

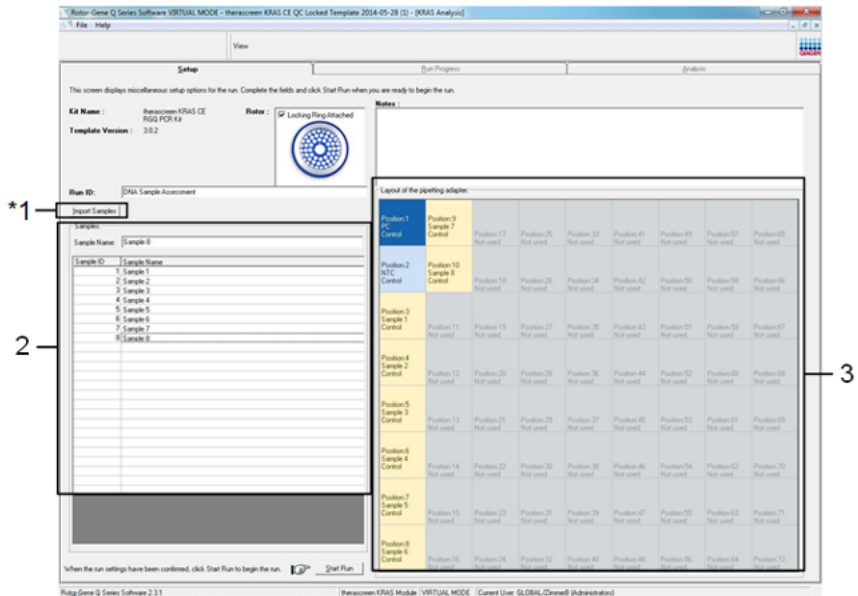


Abbildung 2. Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) mit dem Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht). 1 = Registerkarte „Setup“ (Konfiguration), 2 = Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht).

16. Geben Sie die Lauf-ID gemäß Ihrer lokalen Namenskonvention in das Feld **Run ID** (Lauf-ID) ein.
17. Geben Sie den Probennamen gemäß Ihrer lokalen Namenskonvention in das Feld **Sample Name** (Probenname) ein und drücken Sie die **Return** (Eingabetaste).

Dadurch wird der Probenname zur Probenliste darunter hinzugefügt und der Probe eine **Sample ID** (Proben-ID) (1, 2, 3 usw.) zugewiesen. Zudem wird das Feld **Layout of the pipetting adapter** (Layout des Pipettieradapters) auf der rechten Seite aktualisiert und enthält nun den Probennamen (Abbildung 3).

Alternativ können Probenamen, die im *.smp-Format (Rotor-Gene Q-Probandatei) oder im *.csv-Format (durch Kommas getrennte Werte) gespeichert sind, über die Schaltfläche **Import Samples** (Proben importieren) importiert werden. Dabei werden die Probenamen automatisch eingetragen.

Hinweis: Überprüfen Sie im Feld **Layout of the pipetting adapter**, ob der hinzugefügte Probenname durch eine Farbänderung hervorgehoben wurde und ob sich der Probenname an der Probenposition (Abbildung 3) befindet.

Hinweis: Probenamen mit mehr als 8 Zeichen werden im Feld **Layout of the pipetting adapter** möglicherweise nicht vollständig angezeigt.

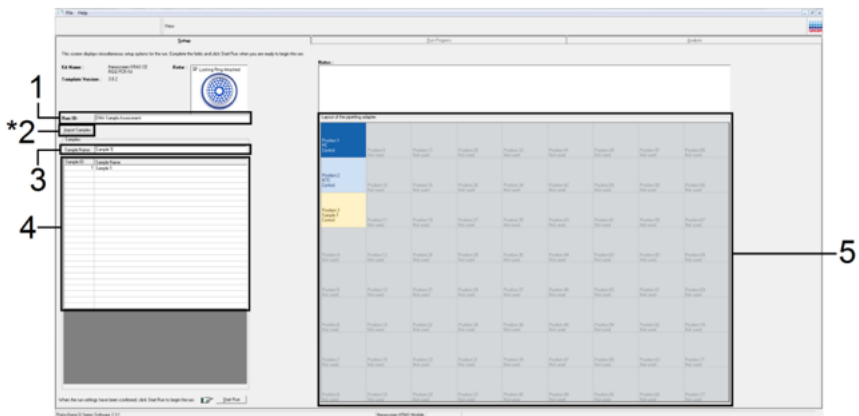


Abbildung 3. Eingabe von „Run ID“ (Lauf-ID) und „Sample Name“ (Probenname). 1 = Dialogfeld „Run ID“, 2 = Schaltfläche „Import Sample“, 3 = Dialogfeld „Sample Name“, 4 = Sample List, 5 = Feld „Layout of the pipetting adapter“.

18. Wiederholen Sie Schritt 16, um die Namen aller weiteren Proben einzugeben (Abbildung 4).

Hinweis: Um einen Probennamen zu bearbeiten, klicken Sie in der Probenliste auf **Sample Name**; die ausgewählte Probe wird dann im Feld **Sample Name** angezeigt. Bearbeiten

Sie den Probenamen entsprechend Ihrer lokalen Namenskonvention und drücken Sie die **Return**, um den Namen zu aktualisieren.

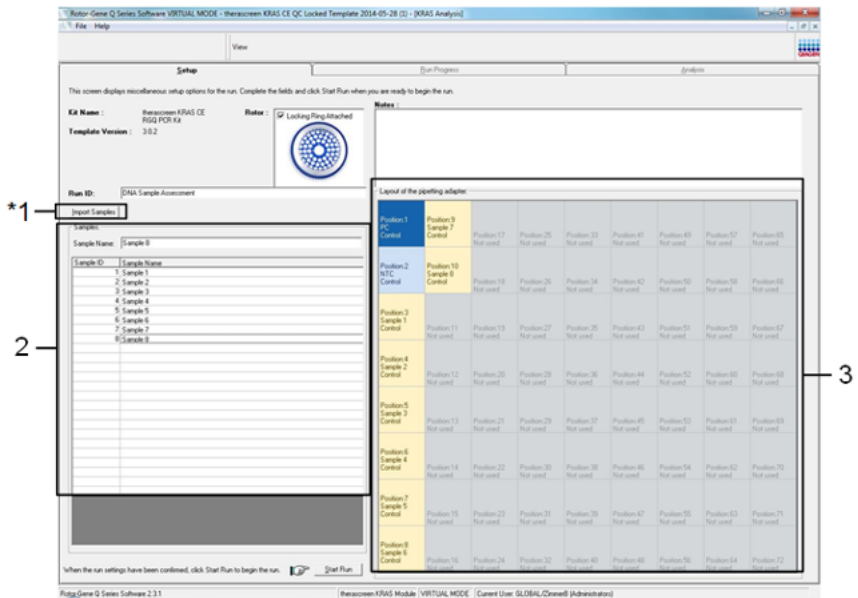


Abbildung 4. Eingabe weiterer Probenamen in das Feld „Sample Name“. * 1 = Schaltfläche „Import Sample“, 2 = Dialogfeld „Sample Name“ und Probenliste, 3 = Feld „Layout of the pipetting adapter“ mit zusätzlichem Probenamen.

19. Nachdem alle Probenamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, dass diese korrekt sind. Geben Sie bei Bedarf weitere Informationen in das Feld **Notes** (Anmerkungen) ein und klicken Sie anschließend auf **Start Run** (Lauf starten) (Abbildung 5).

Hinweis: Sollte eine Rotorposition ungenutzt sein, erscheint eine Warnmeldung (Abbildung 5 und Abbildung 6), um den Benutzer daran zu erinnern, dass alle ungenutzten Positionen auf dem Rotor mit einem verschlossenen, leeren Röhrchen besetzt

werden müssen. Stellen Sie sicher, dass alle nicht verwendeten Rotorpositionen mit einem verschlossenen, leeren Röhrchen belegt sind, und klicken Sie auf **OK**, um fortzufahren.

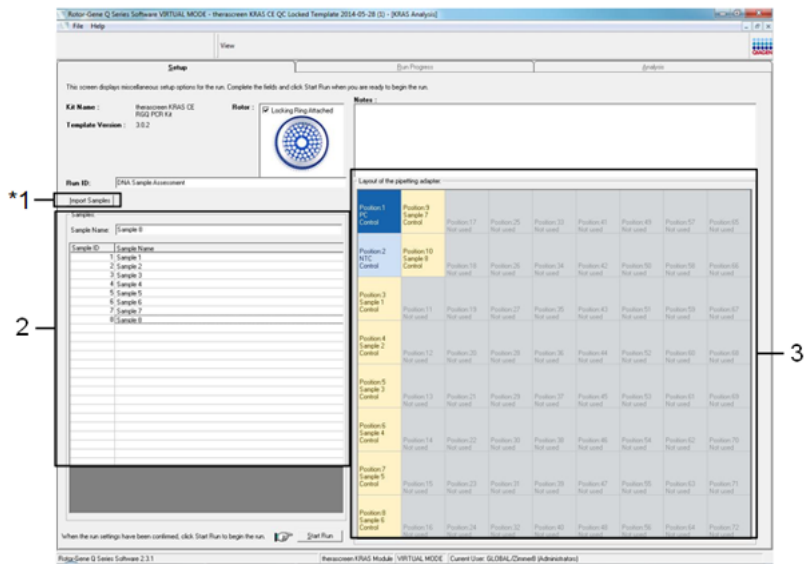


Abbildung 5. Feld „Notes“, „Start Run“ und Warnung vor ungenutzten Rotorpositionen.

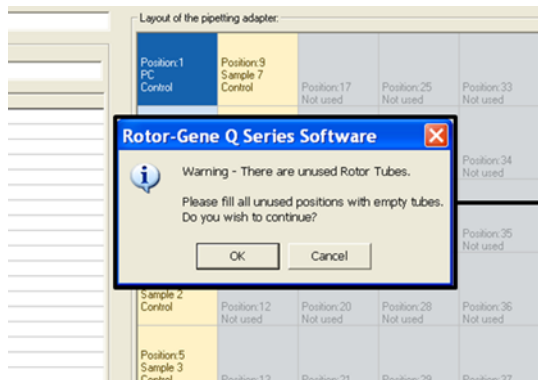


Abbildung 6. Warnung über unbesetzte Rotorpositionen.

20. Es erscheint ein Dialogfenster „Save As“ (Speichern unter). Wählen Sie einen geeigneten Dateinamen aus, und speichern Sie den PCR-Lauf als *.rex-Laufdatei am ausgewählten Speicherort. Klicken Sie auf **Save** (Speichern) (Abbildung 7).

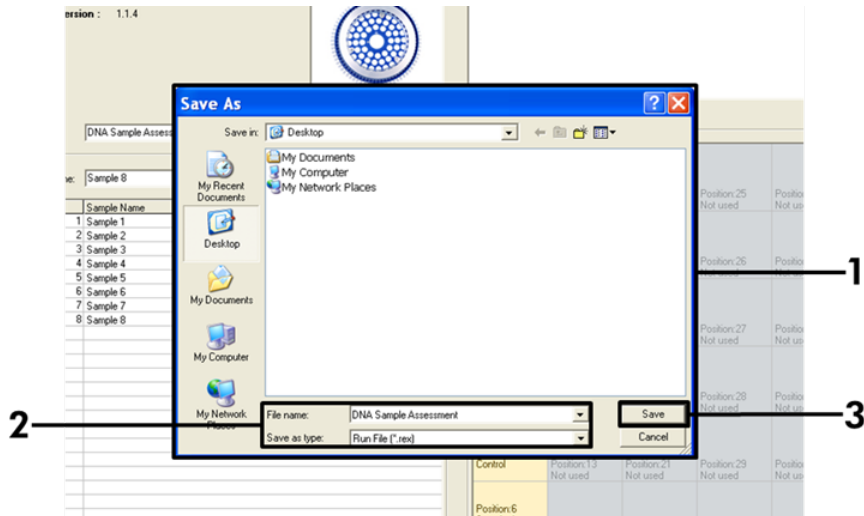


Abbildung 7. Speichern der Laufdatei. 1 = Fenster „Save As“, 2 = Dateiname und Dateityp *.rex, 3 = „Save“.

Der PCR-Lauf wird gestartet.

Hinweis: Sobald der Lauf beginnt, öffnet sich automatisch die Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt) und zeigt den Temperaturverlauf sowie die verbleibende Laufzeit an (Abbildung 8).

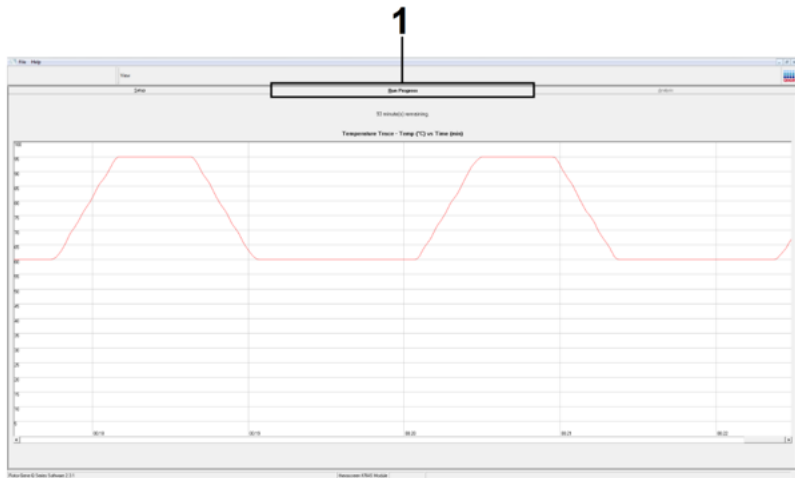


Abbildung 8. Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt).

Nach Abschluss des Laufs wird automatisch die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) geöffnet.

Hinweis: Sollte sich die Registerkarte **Analysis** (Analyse) nicht öffnen lassen, klicken Sie auf die Registerkarte „Analysis“ (Abbildung 9).

Hinweis: Eine Erläuterung der Berechnungsmethode finden Sie in „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 69.

1

2

Table ID	Sample Name	Control Assay ID	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50		Valid
2	NTC Control	-		Valid
3	037710708	28.28		Valid
4	037710719	27.38		Valid
5	037710728	30.07		Valid
6	037710738	26.53		Valid
7	037710748	29.95		Valid
8	037710758	28.45		Valid
9	037710768	29.95		Valid
10	037710778	29.02		Valid
11	037710788	31.42		Valid
12	037710798	28.93		Valid
13	037710818	29.60		Valid
14	037710828	31.44		Valid
15	037710838	31.02		Valid
16	037710848	28.08		Valid
17	037710868	29.91		Valid
18	037710878	30.33		Valid
19	037710888	30.22		Valid
20	037710898	27.17		Valid
21	037710908	29.87		Valid
22	037710918	29.32		Valid
23	037710928	28.22		Valid
24	037710938	26.57		Valid
25	037710948	29.80		Valid
26	037710958	30.41		Valid

Abbildung 9. Registerkarte „Analysis“ und Darstellung der Ergebnisse. 1 = Registerkarte „Analysis“, 2 = Tabelle mit Qualitätskontrollergebnissen für Proben.

Hinweis : Die Kontrollergebnisse werden in der Tabelle „Sample QC Result“ (Qualitätskontrollergebnisse der Proben) (2 in Abbildung 9) wie folgt ausgewiesen.

- **Run controls** (Laufkontrollen) (PC und NTC, Röhrchenpositionen 1 bzw. 2): Ein gültiges Ergebnis wird angezeigt, wenn die Ergebnisse innerhalb der zulässigen Bereiche liegen. Andernfalls wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt.
- **Sample Control reaction $C_T > 32.00$** (Probenkontrollreaktion $C_T > 32,00$): Es wird ein ungültiges Ergebnis angezeigt. Die Menge an DNA ist nicht ausreichend für die Mutationsanalyse. Wiederholen Sie den Test der Probe. Sollte die DNA-Menge weiterhin unzureichend sein, extrahieren Sie weiteres Tumorgewebe, sofern verfügbar (siehe „Interpretation der Ergebnisse (manuell)“ auf Seite 58).

Protokoll: Nachweis von *KRAS*-Mutationen

Dieses Protokoll dient dem Nachweis von *KRAS*-Mutationen.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Eine Probe kann mithilfe der *KRAS*-Mutations-Assays untersucht werden, sobald sie die Probenbewertung bestanden hat.
- Um das *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit effizient nutzen zu können, müssen die Proben in Chargen zu je 7 Proben zusammengefasst werden (um den 72-Well Rotor zu füllen). Bei kleineren Chargengrößen können mit dem *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit weniger Proben untersucht werden.
- Die Probe muss unter Verwendung aller im *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit enthaltenen Reaktionsgemische untersucht werden.
- Die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-Röhrchen) sowie alle Mischungen, die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten, dürfen nicht mit einem Vortex-Mischer vermischt werden, da dies zur Inaktivierung des Enzyms führen kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*-DNA-Polymerase, indem Sie die Pipettenspitze vorsichtig direkt unter die Flüssigkeitsoberfläche halten, um zu vermeiden, dass die Spitze mit überschüssigem Enzym benetzt wird.
- Um mögliche Fehler bei den Kontrollen und Proben auf ein Minimum zu beschränken, ist die strikte Einhaltung der Anweisungen in der *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit *Gebrauchsanweisung* hinsichtlich der korrekten Mischung der Reagenzien erforderlich; dies muss bei jedem Mischschritt während der Vorbereitung der Assays sichergestellt werden.
- Stellen Sie sicher, dass vor dem ersten Gebrauch des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-

Geräts die richtige Software für das *therascreen* KRAS Assay Package installiert ist, die der Softwareversion des Rotor-Gene Q entspricht.

Vorbereitende Schritte

- Vor jeder Verwendung müssen alle Reagenzien mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig aufgetaut, durch 10-maliges Umdrehen gemischt und kurz zentrifugiert werden, um den Inhalt am Boden des Röhrchens zu sammeln.
- Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Verwendung vollständig aufgetaut sind.
- Stellen Sie sicher, dass die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-Röhrchen) vor jedem Gebrauch Raumtemperatur (15–25 °C) hat. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt. Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.

Verfahren

1. Lassen Sie alle Reaktionsmischungsröhrchen, das nukleasefreie Wasser für die No-Template-Kontrolle (NTC) sowie die KRAS-Positivkontrolle (PC) mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig auftauen.

Die Zeiten für das Auftauen der Reagenzien, die Vorbereitung der PCR und die Lagerung vor Beginn des Laufs sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5. Zeiten für Auftauen und PCR-Konfiguration sowie Lagertemperaturen

Auftauzeit		Lagerungstemperatur* nach der PCR-Vor- bereitung	Maximale PCR-Vor- bereitungs- und Lagerzeit
Minimum	Maximum		
1 Stunde	4,5 Stunden	Raumtemperatur 15–25 °C	7 Stunden
1 Stunde	4,5 Stunden	2–8 °C	18 Stunden

* Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum vom Abschluss der PCR-Konfiguration bis zum Start des PCR-Laufs auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument.

Hinweis: Die PCR-Vorbereitung ist bei Raumtemperatur durchzuführen. Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum zwischen dem Abschluss der PCR-Vorbereitung und dem Start des PCR-Laufs auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät.

Hinweis: Bringen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*-Röhrchen) gleichzeitig mit den anderen Reagenzien auf Raumtemperatur (15–25 °C) (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 19). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

- 2. Sobald die Reagenzien aufgetaut sind, mischen Sie diese, indem Sie jedes Röhrchen zehnmal umdrehen, um lokale Salzkonzentrationen zu vermeiden, und zentrifugieren Sie anschließend kurz, um den Inhalt am Boden des Röhrchens zu sammeln. Die Proben sollten zudem durch 10-maliges Umdrehen gemischt und anschließend kurz zentrifugiert werden, um den Inhalt am Boden des Probenröhrchens zu sammeln.

Hinweis: Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.

3. Beschriften Sie 8 nukleasefreie Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) entsprechend den jeweiligen Reaktionsgemischen, die in der nachstehenden Tabelle aufgeführt sind. Bereiten Sie für die DNA-Proben ausreichend Master-Mix vor (Kontroll- bzw. Mutationsreaktionsmix [Röhrchen CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL oder 13ASP] sowie *Taq*-DNA-Polymerase [*Taq*] für die DNA-Proben, eine KRAS-Positivkontrolle (Röhrchen PC) und eine Nuklease-freies Wasser für die No-Template-Kontrolle (Röhrchen NTC) gemäß den in der Tabelle angegebenen Volumina vor. Planen Sie Reagenzien für 1 zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Einrichtung ausreichend Material vorhanden ist.

Hinweis: Der Master-Mix enthält alle für die PCR erforderlichen Komponenten mit Ausnahme der Probe.

Tabelle 6. Master-Mix und entsprechendes Volumen*

Assay und Reaktionsgemischröhrchen	Volumen des Reaktionsgemisches	Volumen der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase
Kontrolle (Röhrchen CTRL)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ALA (Röhrchen 12ALA)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ASP (Röhrchen 12ASP)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ARG (Röhrchen 12ARG)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12CYS (Röhrchen 12CYS)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12SER (Röhrchen 12SER)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12VAL (Röhrchen 12VAL)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
13ASP (Röhrchen 13ASP)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
* n = Anzahl der Reaktionen (Proben plus Kontrollen).		

Setzen Sie ausreichend Master-Mix für 1 zusätzliche Probe ($n + 1$) an, damit bei der PCR-Einrichtung ausreichend Material zur Verfügung steht. Der Wert n sollte 7 (zuzüglich der Kontrollen) nicht überschreiten, da 7 die maximale Anzahl an Proben ist, die in einen Lauf aufgenommen werden können.

Hinweis: Bei der Herstellung der Master-Mixe für Assays wird zunächst das erforderliche Volumen des Kontroll- oder Mutationsreaktionsmixes in das entsprechende Röhrchen gegeben, und die Taq-DNA-Polymerase (Röhrchen Taq) wird zuletzt hinzugefügt.

4. Platzieren Sie die entsprechende Anzahl an PCR-4-Streifen-Röhrchen (jeder Streifen enthält 4 Röhrchen) gemäß der Anordnung in Tabelle 7 in den Ladeblock. Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an. Verschließen Sie die Röhrchen nicht.

Hinweis: Lassen Sie die Verschlusskappen bis zur Verwendung im Plastikbehälter.

5. Stellen Sie die Pipette auf ein Volumen ein, das geringer ist als das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches, und mischen Sie die Master-Mixe gründlich, indem Sie die Pipette zehnmal vollständig an- und absaugen.

Hinweis: Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.

Zum Nachweis von KRAS-Mutationen sollten die Master-Mixe für die Assays in jeweils 8 PC-Röhrchen, 8 NTC-Röhrchen und 8 Röhrchen für jede DNA-Probe gegeben werden.

6. Geben Sie unverzüglich 20 μ l Master-Mix in jedes entsprechende PCR-Streifenröhrchen.

Hinweis: Informationen zur Anordnung der Röhrchen beim Vorbereiten der Reaktionsgemische finden Sie unter Tabelle 7. Zum Nachweis von KRAS-Mutationen sollten die Master-Mixe in jeweils 8 PC-Röhrchen, 8 NTC-Röhrchen und 8 Röhrchen für jede DNA-Probe gegeben werden.

Tabelle 7. Laufanordnung im Ladeblock für den Nachweis von KRAS-Mutationen

Assay	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

* Die Zahlen stehen für die Position im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an.

- 7. Geben Sie unverzüglich 5 µl nukleasefreies Wasser für die No-Template-Kontrolle (NTC) in die NTC-Röhrchen (Röhrchenpositionen 9–16) und verschließen Sie die Röhrchen.
- 8. Geben Sie jeweils 5 µl jeder DNA-Probe in die Probenröhrchen (Röhrchenpositionen 17–72) und verschließen Sie die Röhrchen.
- 9. Geben Sie 5 µl der KRAS-Positivkontrolle (PC) in die PC-Röhrchen (Röhrchenpositionen 1–8) und verschließen Sie die Röhrchen.
- 10. Markieren Sie mit einem Permanentmarker die Deckel der ersten Röhrchen an den Positionen mit den niedrigsten Nummern in jedem PCR-4er-Streifen (z. B. Positionen 1, 5 und 9), um die Ausrichtung für das Einsetzen der Röhrchen in den 72-Well Rotor des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts zu kennzeichnen.

11. Schwenken Sie die verschlossenen Röhrchen 4 Mal um, um Probe und Reaktionsgemisch zu mischen.

Hinweis: Bei der Vorbereitung der Assays muss auf die korrekte Mischung der Reagenzien geachtet werden.

12. Setzen Sie alle PCR-4-Streifen-Röhrchen entsprechend dem Lauflayout (Tabelle 7) unter Verwendung der Markierungen zur Ausrichtung in die entsprechenden Positionen des 72-Well Rotors ein.

Hinweis: In jedem PCR-Lauf können maximal 7 Proben untersucht werden. Wenn nicht alle Positionen des Rotors belegt sind, müssen alle unbesetzten Positionen im Rotor mit jeweils einem verschlossenen, leeren Röhrchen bestückt werden. Dadurch wird sichergestellt, dass der thermische Wirkungsgrad des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts erhalten bleibt.

13. Setzen Sie den 72-Well Rotor in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (im Lieferumfang des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Geräts enthalten) auf den Rotor aufgesetzt wird, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.
14. Doppelklicken Sie auf das Symbol **therascreen KRAS Locked Template** auf dem Desktop des Laptops, der an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät angeschlossen ist (Abbildung 10), um die Rotor-Gene Q-Software zu starten.

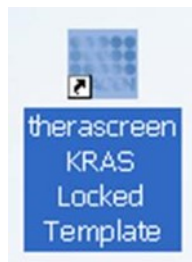


Abbildung 10. Das *therascreen* KRAS Locked Template-Symbol.

Dadurch wird der Probenname zur Probenliste darunter hinzugefügt und der Probe eine **Sample ID** (Proben-ID) (1, 2, 3 usw.) zugewiesen. Zudem wird das Feld **Layout of the pipetting adapter** (Layout des Pipettieradapters) auf der rechten Seite aktualisiert und enthält nun den Probennamen (Abbildung 12).

Alternativ können Probennamen, die im *.smp-Format (Rotor-Gene Q-Probendatei) oder im *.csv-Format (durch Kommas getrennte Werte) gespeichert sind, über die Schaltfläche **Import Samples** (Proben importieren) importiert werden. Dabei werden die Probennamen automatisch eingetragen.

Hinweis: Überprüfen Sie im Feld **Layout of the pipetting adapter**, ob der hinzugefügte Probenname durch eine Farbänderung hervorgehoben wurde und ob sich der Probenname an der Probenposition (Abbildung 12) befindet.

Hinweis: Probennamen mit mehr als 8 Zeichen werden im Feld **Layout of the pipetting adapter** möglicherweise nicht vollständig angezeigt.

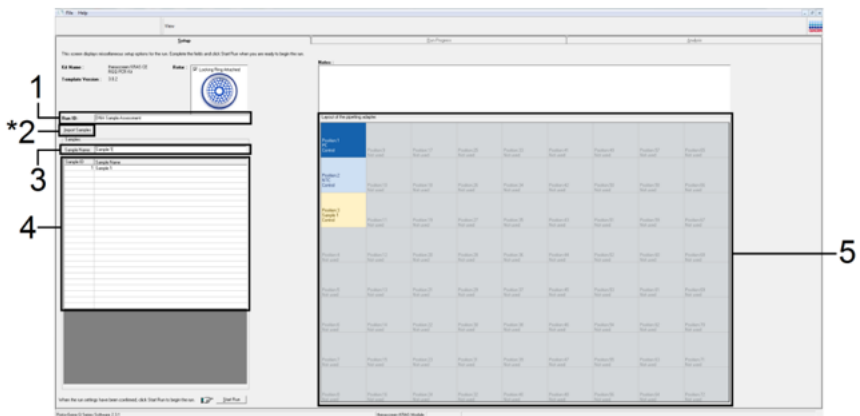


Abbildung 12. Eingabe von „Run ID“ (Lauf-ID) und „Sample Name“ (Probenname). 1 = Dialogfeld „Run ID“, 2 = Schaltfläche „Import Sample“, 3 = Dialogfeld „Sample Name“, 4 = Sample List, 5 = Feld „Layout of the pipetting adapter“.

18. Wiederholen Sie Schritt 16, um die Namen aller weiteren Proben einzugeben (Abbildung 13).

Hinweis: Um einen Probenamen zu bearbeiten, klicken Sie in der Probenliste auf **Sample Name**; die ausgewählte Probe wird dann im Feld **Sample Name** angezeigt. Bearbeiten Sie den Probenamen entsprechend Ihrer lokalen Namenskonvention und drücken Sie die **Return**, um den Namen zu aktualisieren.

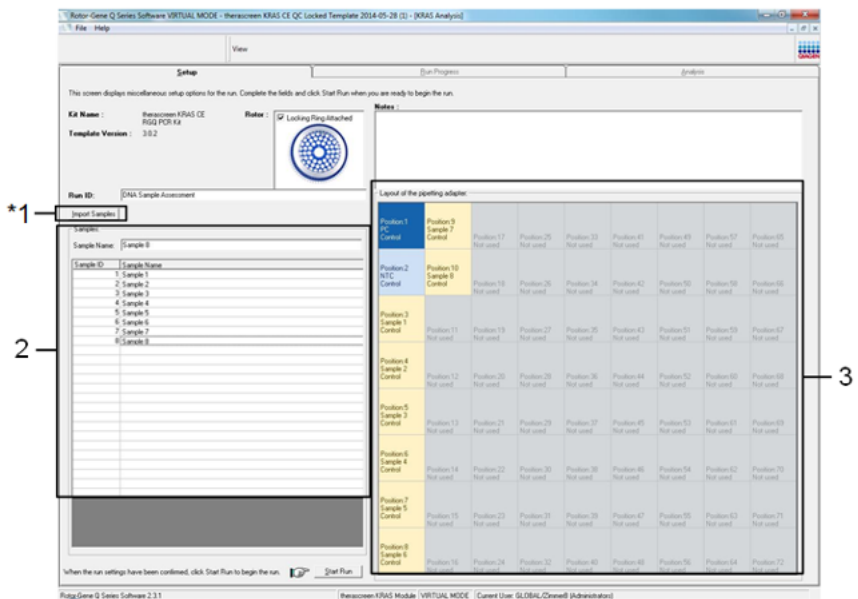


Abbildung 13. Eingabe weiterer Probenamen in das Feld „Sample Name“. *1 = Schaltfläche „Import Sample“, 2 = Dialogfeld „Sample Name“ und Probenliste, 3 = Feld „Layout of the pipetting adapter“ mit zusätzlichem Probennamen.

19. Nachdem alle Probenamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, dass diese korrekt sind. Geben Sie bei Bedarf weitere Informationen in das Feld **Notes** (Anmerkungen) ein

und klicken Sie anschließend auf **Start Run** (Lauf starten) (Abbildung 14).

Hinweis: Sollte eine Rotorposition ungenutzt sein, erscheint eine Warnmeldung (Abbildung 14 und Abbildung 15), um den Benutzer daran zu erinnern, dass alle ungenutzten Positionen auf dem Rotor mit einem verschlossenen, leeren Röhrchen besetzt werden müssen. Stellen Sie sicher, dass alle nicht verwendeten Rotorpositionen mit einem verschlossenen, leeren Röhrchen belegt sind, und klicken Sie auf **OK**, um fortzufahren.

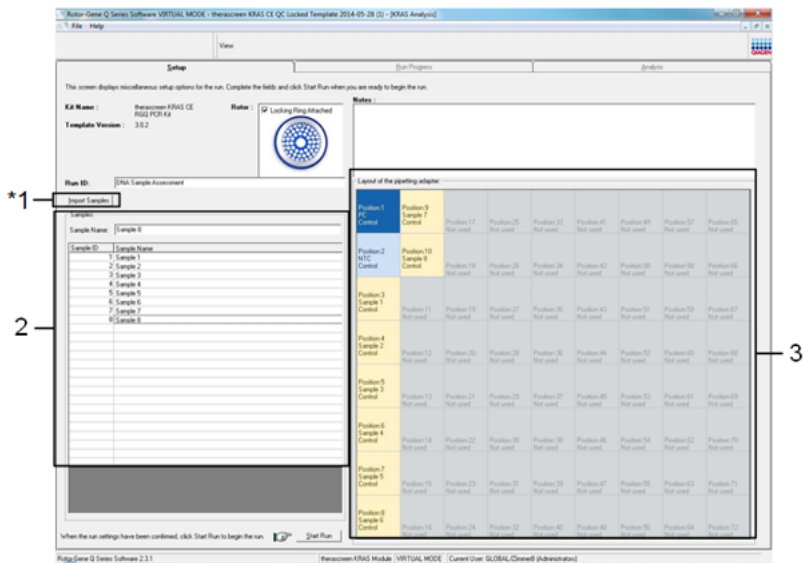


Abbildung 14. Feld „Notes“, „Start Run“ und Warnung vor ungenutzten Rotorpositionen.

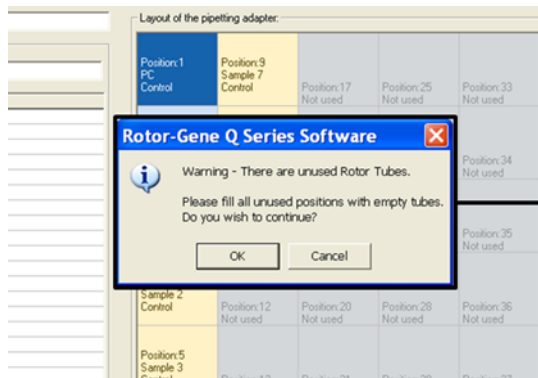


Abbildung 15. Warnung über unbesetzte Rotorpositionen.

20. Es erscheint ein Dialogfenster „Save As“ (Speichern unter). Wählen Sie einen geeigneten Dateinamen aus, und speichern Sie den PCR-Lauf als *.rex-Laufdatei am ausgewählten Speicherort. Klicken Sie auf **Save** (Speichern) (Abbildung 16).

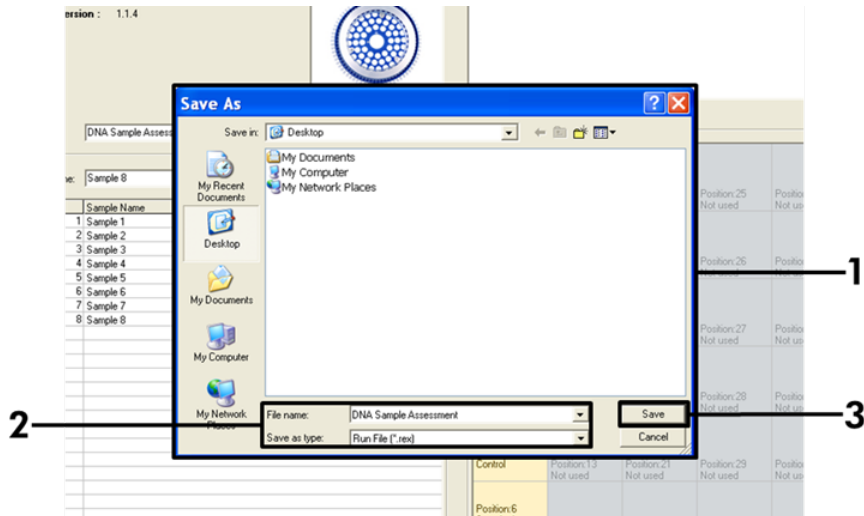


Abbildung 16. Speichern der Laufdatei. 1 = Fenster „Save As“, 2 = Dateiname und Dateityp *.rex, 3 = „Save“.

Der PCR-Lauf wird gestartet.

Hinweis: Sobald der Lauf beginnt, öffnet sich automatisch die Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt) und zeigt den Temperaturverlauf sowie die verbleibende Laufzeit an (Abbildung 17).

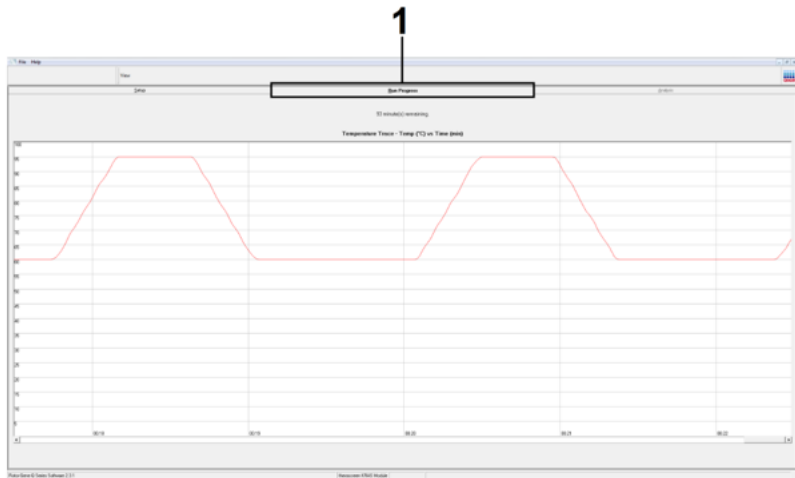


Abbildung 17. Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt).

Nach Abschluss des Laufs wird automatisch die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) geöffnet.

Hinweis: Sollte sich die Registerkarte **Analysis** (Analyse) nicht öffnen lassen, klicken Sie auf die Registerkarte „Analysis“ (Abbildung 18).

Hinweis: Eine Erläuterung der Berechnungsmethode finden Sie in „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 69.

Run Controls, Positive Control

Plate Position	Control	Flags/Settings	Positive Control Status
2	12ALa	-	Valid
3	12ALP	-	Valid
4	12APG	-	Valid
5	12CVS	-	Valid
6	12DER	-	Valid
7	12NHL	-	Valid
8	12OSP	-	Valid

Run Controls, Negative Control

Plate Position	Control	NTC	Internal Control	Flags/Settings	Negative Control Status
9	Control	Valid	Valid	-	Valid
10	12ALa	Valid	Valid	-	Valid
11	12ALP	Valid	Valid	-	Valid
12	12APG	Valid	Valid	-	Valid
13	12CVS	Valid	Valid	-	Valid
14	12DER	Valid	Valid	-	Valid
15	12NHL	Valid	Valid	-	Valid
16	12OSP	Valid	Valid	-	Valid

Sample Result Table

Sample ID	Sample Name	KRAS Status	Flags/Settings	KRAS Mutation Status
1	037710708	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
2	037710718	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
3	037710728	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
4	037710738	Mutation Positive	-	12ALP Detected
5	037710748	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
6	037710758	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
7	037710768	Mutation Positive	-	12OSP Detected

Abbildung 18. Registerkarte „Analysis“ und Darstellung der Ergebnisse. 1 = Registerkarte „Analysis“, 2 = Bereich „Run Controls“, Feld „Positive Control“, 3 = Bereich „Run Controls“, Feld „Negative Control“, 4 = Tabelle mit den Ergebnissen der Proben, 5 = Spalte „KRAS Mutation Status“.

Die Ergebnisse der Assays werden wie folgt angegeben (Abbildung 18).

- Feld **Run Controls, Positive Control** (Laufkontrollen, Positivkontrolle): Liegen die Ergebnisse innerhalb des zulässigen Bereichs, wird als Status der Positivkontrolle „Valid“ angezeigt; andernfalls erscheint das Ergebnis „Invalid“.
- Feld **Run Controls, Negative Control** (Laufkontrollen, Negativkontrolle): Liegen sowohl der NTC-Wert als auch die Ergebnisse innerhalb der zulässigen Bereiche, wird als Status der Negativkontrolle „Valid“ angezeigt; andernfalls erscheint das Ergebnis „Invalid“.
- Feld **Sample Result Table** (Tabelle mit Probenergebnissen): Für die mutationspositiven Proben werden in der Spalte „KRAS Mutation Status“ (KRAS-Mutationsstatus) die jeweiligen Mutationen angegeben.

21. Um Berichtsdateien zu erstellen, klicken Sie auf **Report** (Bericht). Es wird das Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser) angezeigt. Wählen Sie unter „Templates“ (Vorlagen) den Eintrag **KRAS Analysis Report** (KRAS-Analysebericht) aus und klicken Sie anschließend auf **Show** (Anzeigen) (Abbildung 19).

Hinweis: Berichte können im Web-Archiv-Format an einem anderen Speicherort gespeichert werden, indem Sie oben links in jedem Bericht auf **Save As** (Speichern unter) klicken.

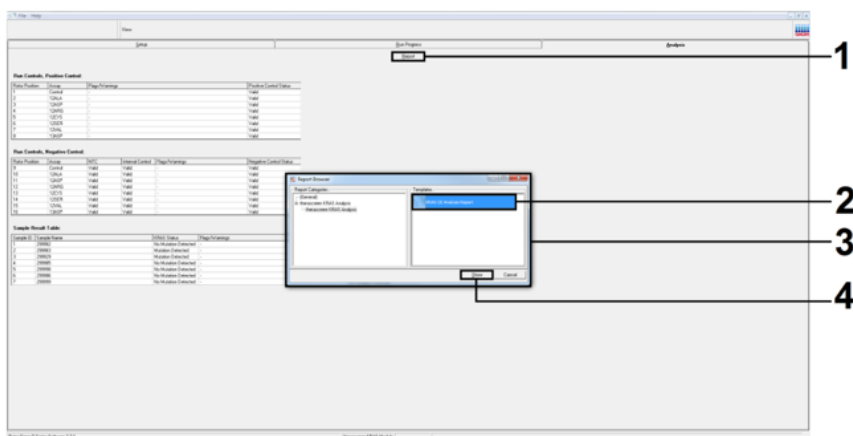


Abbildung 19. Auswählen des „KRAS Analysis Report“. 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = Auswahl „KRAS Analysis Report“ (KRAS-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Note for NSCLC samples only (Hinweis ausschließlich für NSCLC-Proben): Um die Erkennung einer falschen G12C-Mutation (12CYS) zu vermeiden, müssen Proben mit den unten aufgeführten Kennzeichnungen als ungültig gewertet werden. Weitere Informationen zur Interpretation von Fehlern finden Sie in den Empfehlungen zur Fehlerinterpretation unter Tabelle 9, Tabelle 10, und Tabelle 11.

- SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT
- SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID
- SAMPLE_INT_CTRL_FAIL
- MUTATION__EARLY_CT
- SAMPLE_INVALID_DATA

Interpretation der Ergebnisse (manuell)

Analysieren Sie die Daten nach Abschluss der Probenbestimmung oder der Mutationsanalyse gemäß dem folgenden Verfahren.

Einstellungen für die Analyse in der Software

1. Öffnen Sie die entsprechende Datei mit der Rotor-Gene Q-Software, Version 2.3.5 oder einer neueren Version.
2. Falls Sie Ihre Proben vor der Ausführung des Laufs noch nicht benannt haben, klicken Sie auf **Edit Samples** (Proben bearbeiten).
3. Geben Sie die Namen der Proben in die Spalte „Name“ ein.
4. Klicken Sie auf **Analysis**. Klicken Sie auf der Analyseseite auf **Cycling A. Yellow** (Zyklus A. Gelb), um den HEX-Kanal anzuzeigen.
5. Klicken Sie auf **Named On** (Mit Benennung).
Hinweis: So wird sichergestellt, dass leere Wells in der Analyse nicht berücksichtigt werden.
6. Wählen Sie **Dynamic Tube** (Dynamisches Röhrchen) aus.
7. Wählen Sie **Linear Scale** (Lineare Skalierung) aus.
8. Klicken Sie auf **Outlier Removal** (Ausreißer entfernen) und geben Sie **10 %** in das Feld **NTC Threshold** (NTC-Schwellenwert) ein.
9. Stellen Sie den Schwellenwert auf **0,05** ein und überprüfen Sie die HEX-Ct-Werte.
10. Klicken Sie auf der Analyseseite auf **Cycling A. Green** (Zyklus A. Grün), um den FAM-Kanal anzuzeigen.
11. Vergewissern Sie sich, dass **Dynamic Tube** markiert ist. Klicken Sie auf **Linear Scale**.

12. Klicken Sie auf **Outlier Removal** (Ausreißer entfernen) und geben Sie **10 %** in das Feld **NTC Threshold** ein.
13. Stellen Sie den Schwellenwert auf **0,05** ein und überprüfen Sie die FAM-CT-Werte.
14. Um Berichtsdateien zu erstellen, klicken Sie auf **Report**. Es wird das Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser) angezeigt. Wählen Sie unter „Templates“ (Vorlagen) den Eintrag **KRAS Analysis Report** aus und klicken Sie anschließend auf **Show** (Abbildung 20).

Hinweis: Berichte können im Web-Archiv-Format an einem anderen Speicherort gespeichert werden, indem Sie oben links in jedem Bericht auf **Save As** klicken.

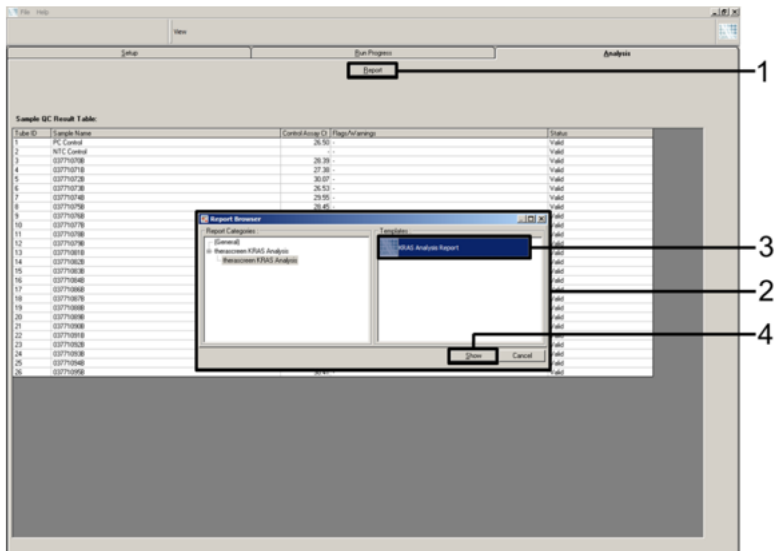


Abbildung 20. Auswählen des „KRAS Analysis Report“ (KRAS-Analyseberichts). 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = Auswahl „KRAS Analysis Report“ (KRAS-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Analyse der Daten aus der Probenbestimmung

Analyse der Laufkontrollen

Beachten Sie das Flussdiagramm zum Ausführen der Kontrollanalyse in Abbildung 21.

- **Negative control** (Negativkontrolle): Um sicherzustellen, dass keine Kontamination des Reaktionsgemisches vorliegt, darf die „No Template“-Kontrolle im grünen Kanal keinen C_T -Wert unter 40 aufweisen. Um sicherzustellen, dass die Platte korrekt eingerichtet wurde, muss der NTC im gelben Kanal eine Amplifikation von C_T 31,91–35,16 anzeigen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs gehören noch zu den zulässigen Werten.
- **Positive control** (Positivkontrolle): Die KRAS-Positivkontrolle (PC) muss in jedem der 8 Assays im grünen Kanal einen C_T -Wert von 23,5 bis 29,5 aufweisen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs gehören noch zu den zulässigen Werten. Ein Wert außerhalb dieses Bereichs zeigt einen Fehler bei der Assaykonfiguration an; der Lauf wird daher als fehlgeschlagen gewertet.

Hinweis: Die Probandaten dürfen nicht verwendet werden, wenn eine dieser beiden Laufkontrollen fehlgeschlagen ist.

Sofern beide Laufkontrollen gültig sind, muss jeder C_T -Wert der Probe im grünen Kanal im Bereich von 21,92 bis 32,00 liegen. Liegt die Probe außerhalb dieses Bereichs, gelten die folgenden Hinweise.

Probenanalyse – Kontrollassay

- **Sample control assay $C_T < 21,92$** (Probenkontroll-Assay $C_T < 21,92$): Proben mit einem Kontroll- C_T von $< 21,92$ müssen verdünnt werden, da dies die Untergrenze des validierten Assays darstellt. Um jede Mutation bereits bei geringer Konzentration nachweisen zu können, müssen überkonzentrierte Proben so verdünnt werden, dass sie in den oben genannten Bereich fallen, da eine Verdünnung um die Hälfte den C_T -Wert um 1 erhöht.

Liegt der Wert der Probe nahe bei 21,92, wird eine Verdünnung empfohlen, um sicherzustellen, dass bei der Probeuntersuchung (Nachweis einer KRAS-Mutation) ein Ergebnis erzielt wird. Die Proben sollten mit dem im Testkit enthaltenen Wasser (nukleasefreies Wasser zur Verdünnung [Dil.]) verdünnt werden.

- **Sample control assay $C_T > 32$** (Probenkontroll-Assay $C_T > 32$): Eine erneute Extraktion der Probe wird empfohlen, da nicht genügend Ausgangs-DNA-Matrize vorhanden ist, um alle Mutationen bei den angegebenen Cutoff-Werten des Assays nachzuweisen.

KRAS-Mutationsnachweisanalyse

Analyse der Laufkontrollen

Beachten Sie das Flussdiagramm zum Ausführen der Kontrollanalyse in Abbildung 21.

- **Negative control** (Negativkontrolle): Um sicherzustellen, dass keine Kontamination des Reaktionsgemisches vorliegt, darf die „No Template“-Kontrolle im grünen Kanal keinen C_T -Wert unter 40 aufweisen. Um sicherzustellen, dass die Platte korrekt eingerichtet wurde, muss der NTC im gelben Kanal eine Amplifikation von C_T 31,91–35,16 anzeigen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs gehören noch zu den zulässigen Werten.
- **Positive control** (Positivkontrolle): Die KRAS-Positivkontrolle (PC) muss in jedem der 8 Assays im grünen Kanal einen C_T -Wert von 23,5 bis 29,5 aufweisen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs gehören noch zu den zulässigen Werten. Ein Wert außerhalb dieses Bereichs zeigt einen Fehler bei der Assaykonfiguration an; der Lauf wird daher als fehlgeschlagen gewertet.

Hinweis: Die Probandaten dürfen nicht verwendet werden, wenn eine dieser beiden Laufkontrollen fehlgeschlagen ist.

Abbildung 21. Flussdiagramm zur Analyse der Laufkontrollen.

Probenanalyse

Siehe Flussdiagramm zur Probenanalyse (Abbildung 22).

FAM- C_T -Wert der Probenkontrolle

Sofern beide Laufkontrollen für den Kontrollassay gültig sind, muss der C_T -Wert jeder Probe im grünen Kanal im Bereich von 21,92 bis 32,00 liegen.

Liegt die Probe außerhalb dieses Bereichs, gelten die folgenden Hinweise.

- **Sample control assay $C_T < 21,92$:** Proben mit einem Kontroll- C_T von $< 21,92$ führen zu einer Überlastung der Assays für Mutationen und müssen verdünnt werden. Um jede Mutation bereits bei geringer Konzentration nachweisen zu können, müssen überkonzentrierte Proben so verdünnt werden, dass sie in den oben genannten Bereich fallen, da eine Verdünnung um die Hälfte den C_T -Wert um 1 erhöht. Die Proben sollten mit dem im Testkit enthaltenen Wasser (nukleasefreies Wasser zur Verdünnung [Dil.]) verdünnt werden.
- **Sample control assay $C_T > 32$:** Bei der Interpretation ist Vorsicht geboten, da Mutationen mit sehr geringer Ausprägung möglicherweise nicht nachgewiesen werden.

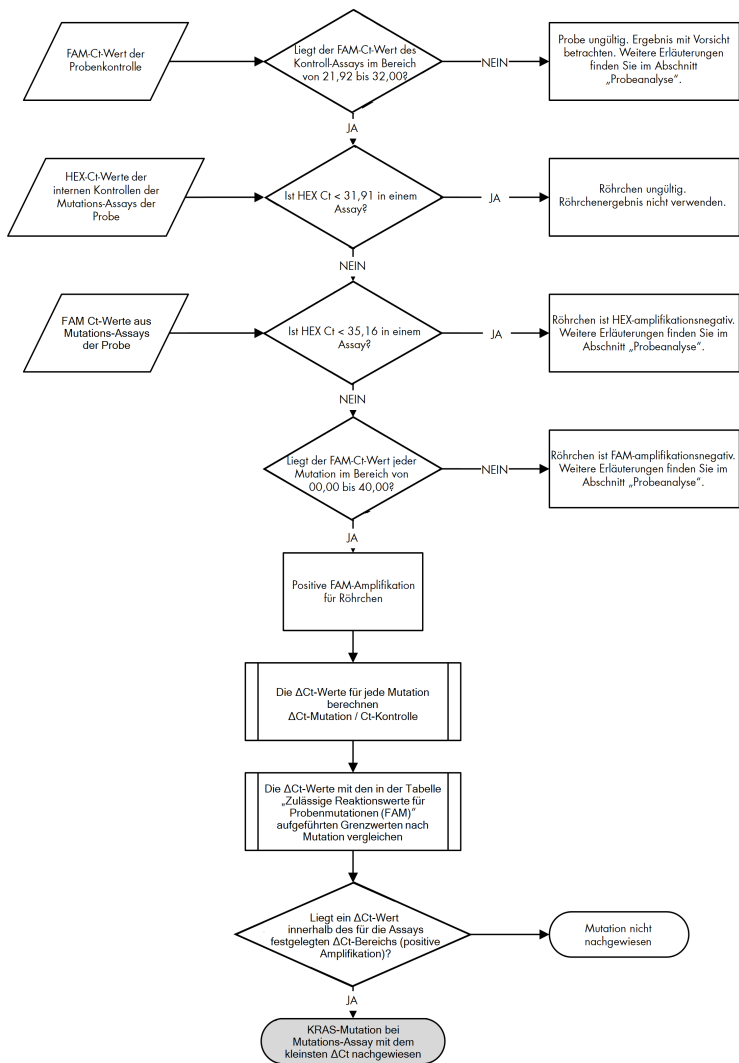


Abbildung 22. Flussdiagramm der Probenanalyse.

HEX C_T-Wert der internen Kontrollmutationsassays der Probe

Siehe Flussdiagramm zur Probenanalyse (Abbildung 22).

Alle Wells jeder Probe müssen analysiert werden. Stellen Sie sicher, dass für jedes Well ein HEX-Signal von der internen Kontrolle vorliegt. Es gibt 3 verschiedene Möglichkeiten.

- Liegt der C_T-Wert der internen Kontrolle innerhalb des festgelegten Bereichs (31,91–35,16), gilt die HEX-Amplifikation als positiv.
- Liegt der C_T-Wert der internen Kontrolle über dem festgelegten Bereich (> 35,16), ist die HEX-Amplifikation negativ.
- Liegt der C_T-Wert der internen Kontrolle unterhalb des vorgegebenen Bereichs (< 31,91), ist er ungültig.
- Sollte das Versagen der internen Kontrolle auf eine PCR-Hemmung zurückzuführen sein, kann eine Verdünnung der Probe die Wirkung der Hemmstoffe verringern; es ist jedoch zu beachten, dass dadurch auch die Ziel-DNA verdünnt würde. Ein Röhrchen mit Wasser zur Probenverdünnung (Dil.) ist im Kit enthalten.

FAM-C_T-Wert des Probenmutationsassay

Die FAM-Werte für alle 7 Reaktionsgemische sollten mit den in Tabelle 8 aufgeführten Werten abgeglichen werden.

Tabelle 8. Zulässige Werte für Probenmutationsreaktionen (FAM)*

Assay	Zulässiger C _T -Bereich	ΔC _T -Bereich
12ALA	0,00–40,00	≤ 8,00
12ASP	0,00–40,00	≤ 6,60
12ARG	0,00–40,00	≤ 8,00
12CYS	0,00–40,00	≤ 8,00
12SER	0,00–40,00	≤ 8,00
12VAL	0,00–40,00	≤ 7,50
13ASP	0,00–40,00	≤ 7,50

*Zulässige Werte liegen innerhalb der angegebenen Werte, einschließlich dieser Werte.

- Liegt der FAM-C_T-Wert innerhalb des angegebenen Bereichs, gilt die FAM-Amplifikation als positiv.
- Liegt der FAM-C_T-Wert über dem angegebenen Bereich oder liegt keine Amplifikation vor, gilt das Ergebnis als FAM-Amplifikations-negativ.
- Berechnen Sie den ΔC_T-Wert für jedes Röhrchen mit Mutation, das eine positive FAM-Amplifikation aufweist, wie folgt, wobei Sie sicherstellen müssen, dass die C_T-Werte für die Mutation und die Kontrolle aus derselben Probe stammen.

$$\Delta C_T = C_T\text{-Wert der Mutation} - C_T\text{-Wert der Kontrolle}$$

Vergleichen Sie den ΔC_T -Wert der Probe mit dem Cutoff-Wert für den jeweiligen Assay (Tabelle 8), wobei Sie darauf achten müssen, dass für jeden Assay der richtige Cutoff-Wert herangezogen wird.

Der Schwellenwert ist der Wert, ab dem ein positives Signal möglicherweise auf das Hintergrundsignal des ARMS-Primers auf Wildtyp-DNA zurückzuführen sein könnte. Liegt der ΔC_T -Wert der Probe über dem Schwellenwert, wird sie als negativ eingestuft oder als außerhalb der Nachweisgrenzen des Kits liegend.

Alle Mutationsreaktionen werden für jede Probe nach den folgenden Kriterien mit dem Status „Mutation detected“ (Mutation nachgewiesen), „Mutation not detected“ (Mutation nicht nachgewiesen) oder „Invalid“ (Ungültig) bewertet:

Mutation detected (Mutation nachgewiesen):

- Die FAM-Amplifikation ist positiv, und die ΔC_T -Werte liegen am oder unterhalb des Grenzwerts. Werden mehrere Mutationen nachgewiesen, sollte diejenige Mutation angegeben werden, die den kleinsten ΔC_T -Wert aufweist.

Mutation not detected (Mutation nicht nachgewiesen):

- Die FAM-Amplifikation ist positiv, und die ΔC_T -Werte liegen über dem Grenzwert.
- Die FAM-Amplifikation war negativ und die HEX-Amplifikation (interne Kontrolle) positiv.

Invalid (Ungültig):

- HEX (interne Kontrolle) ist ungültig.
- Die FAM-Amplifikation ist negativ und die HEX-Amplifikation ist negativ.

Wenn die HEX-Amplifikation einer Probe in einem Röhrchen negativ, die FAM-Amplifikation in einem anderen Röhrchen aber positiv ist, kann das Ergebnis „Mutation detected“ (Mutation

nachgewiesen) in dem anderen Röhrchen zwar als gültig betrachtet werden, die jeweils erkannte Mutation kann jedoch u. U. nicht auf zuverlässige Weise zugeordnet werden.

- Wenn eine Probe im selben Röhrchen bei der HEX-Amplifikation negativ und bei der FAM-Amplifikation positiv ausfällt, ist das Ergebnis der Mutationsnachweis als gültig anzusehen.
- Wenn das HEX-Ergebnis (interne Kontrolle) eines Röhrchens ungültig ist, darf das Ergebnis dieses Röhrchens nicht verwendet werden.

Mutationsstatus der Probe zuweisen

Nach der Auswertung aller Mutationsreaktionsröhrchen wird der Mutationsstatus der Probe wie folgt bestimmt:

- Mutationsnachweis: Eine oder mehrere der 7 Mutationsreaktionen sind positiv. Werden mehrere Mutationen nachgewiesen, sollte diejenige Mutation angegeben werden, die den kleinsten ΔC_T -Wert aufweist.
- Mutation nicht nachgewiesen: Alle 7 Mutationsreaktionen sind negativ.
- Ungültig: Keine der Mutationsreaktionen ist positiv, und eine oder mehrere Mutationsreaktionen sind ungültig.

Hinweis: Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dient dem Nachweis von Mutationen im KRAS-Gen in einer DNA-Probe. Wenn bei einer Probe eine KRAS-Mutation festgestellt wird, sollte nur eine bestimmte Mutation angegeben werden. Werden mehrere Mutationen nachgewiesen, sollte diejenige Mutation angegeben werden, die den kleinsten ΔC_T -Wert aufweist.

Zwischen Mutationsreaktionen kann eine gewisse Kreuzreaktivität auftreten. Wenn beispielsweise eine starke 12ALA-Mutation festgestellt wird, liefern u. U. auch einige der anderen Mutationsreaktionen ein positives Ergebnis. Dies ist auf die ARMS- Primer zurückzuführen, die bei ähnlichen Sequenzen teils auch andere Mutationen erkennen. Wenn

bei einem zweiten Mutationsassay ein positives Ergebnis auftritt, handelt es sich dabei wahrscheinlich um eine Kreuzreaktivität. In seltenen Fällen wurden auch Doppelmutanten festgestellt.

Sollten eine oder mehrere der Mutationsreaktionen ungültig sein, eine oder mehrere jedoch positiv ausfallen, kann für die Probe dennoch eine *KRAS*-Mutation festgestellt werden, da eine Mutation vorliegt. Die angegebene spezifische Mutation ist jedoch möglicherweise nicht korrekt und könnte auf eine Kreuzreaktivität zurückzuführen sein. Daher sollte für die Probe lediglich angegeben werden, dass eine *KRAS*-Mutation nachgewiesen wurde.

- **Sample control reaction $C_T < 21,92$:** „Invalid“ wird angezeigt. Die DNA-Konzentration ist zu hoch für die Mutationsanalyse. Verdünnen Sie mit nukleasefreiem Wasser zur Verdünnung (Dil.) und wiederholen Sie den Test. Auf einen C_T -Wert von 21,92–32,00 verdünnen. Eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 erhöht den C_T -Wert um etwa 1,0.
- **Sample control reaction $C_T 21,92$ –32,00:** „Valid“ wird angezeigt; die DNA-Konzentration ist für die Mutationsanalyse geeignet.

Hinweis: Falls eine erneute Extraktion oder Verdünnung erforderlich ist, wiederholen Sie bitte die Kontrollreaktion, um sicherzustellen, dass die DNA-Konzentration für die Verwendung geeignet ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Analyse und die Mutationsbestimmung erfolgen automatisch durch das Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package, sobald ein Lauf abgeschlossen ist. Die folgenden Informationen erläutern, wie das Rotor Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package die Analyse und die Bestimmung der Mutationen durchführt.

Analyse und Mutationsbestimmungen

Der PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz einer bestimmten Reaktion einen Schwellenwert überschreitet, wird als C_T -Wert definiert. C_T -Werte geben die Menge der spezifischen Ausgangs-DNA an. Niedrige C_T -Werte weisen auf höhere Ausgangs-DNA-Konzentrationen hin, während hohe C_T -Werte auf niedrigere Ausgangs-DNA-Konzentrationen hindeuten. Reaktionen mit einem C_T -Wert werden als positive Amplifikation eingestuft.

In der Rotor-Gene Q Software werden die Fluoreszenzsignale zwischen 2 Messwerten interpoliert. Die C_T -Werte können daher beliebige reelle Zahlen (nicht auf ganze Zahlen beschränkt) im Bereich von 0 bis 40 sein.

Für das *therascreen* *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist der Schwellenwert auf 0,05 relative Fluoreszenzeinheiten festgelegt. Dieser Wert wird im *therascreen* KRAS Assay Package sowohl für den grünen als auch für den gelben Fluoreszenzkanal konfiguriert. Der Schwellenwert wurde im Rahmen der Entwicklung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit festgelegt.

Zur Ermittlung des ΔC_T -Werts wird eine Berechnung anhand der folgenden Gleichung durchgeführt:

$$\Delta C_T = [C_T\text{-Wert des Mutationsassays}] - [C_T\text{-Wert des Kontrollassays}]$$

Die Laufkontrollen (Positivkontrolle, NTC und interne Kontrollen) werden ausgewertet, um sicherzustellen, dass akzeptable C_T -Werte erreicht werden und die Reaktionen ordnungsgemäß ablaufen.

Die ΔC_T -Werte der Proben werden als Differenz zwischen dem C_T -Wert des Mutationsassay und dem C_T -Wert des Kontrollassay derselben Probe berechnet. Proben werden als mutationspositiv eingestuft, wenn ihr ΔC_T -Wert kleiner oder gleich dem für diesen Assay festgelegten ΔC_T -Grenzwert ist. Liegt dieser Wert über dem angegebenen Grenzwert, enthält die Probe entweder einen Anteil an Mutationen, der unterhalb der vom *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachweisbaren Grenze liegt (jenseits der Nachweisgrenze der Assays), oder die Probe ist mutationsfrei, was als „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgewiesen würde.

Wird bei Mutationsreaktionen keine Amplifikation festgestellt, wird dies als „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) gewertet. Es ist zu erwarten, dass die aus der Hintergrund-Amplifikation berechneten ΔC_T -Werte größer sind als die ΔC_T -Grenzwerte, und die Probe wird als „No Mutation Detected“ (keine Mutation festgestellt) eingestuft.

Die Testergebnisse werden wie folgt angezeigt: „[Name der Mutation] Detected“ (nachgewiesen), „No Mutation Detected“ (keine Mutation nachgewiesen), „Invalid“ (Ungültig) oder, falls eine Laufkontrolle fehlschlägt, „Run Control Failed“ (Laufkontrolle fehlgeschlagen). Für mutationspositive Proben werden die jeweiligen Mutationen angegeben.

Informationen zur Interpretation der vom Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package generierten Markierungen finden Sie weiter unten unter „Markierungen des Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package“ auf der gegenüberliegenden Seite.

Hinweis: In seltenen Fällen kann ein Tumor mehr als eine Mutation aufweisen. In solchen Fällen wird die Mutation ermittelt, die den niedrigsten ΔC_T -Wert ergibt.

Markierungen des Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package

Je nach dem spezifischen Verwendungszweck für CRC- und NSCLC-Proben sind bestimmte Maßnahmen mit bestimmten Markierungen verbunden. Die Maßnahmen für die Markierungen der einzelnen Indikationen werden in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

Tabelle 9. Bedeutung der Markierungen und empfohlene Maßnahmen des Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-Lauf ungültig – FAM-CT-Wert außerhalb des zulässigen Bereichs für die Positivkontrolle in der Kontrollreaktion	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR-Lauf ungültig – der FAM-CT-Wert liegt bei einer oder mehreren Reaktionen auf Mutationen außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR-Lauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Positivkontrolle (Control Reaction Mix) können nicht ausgewertet werden.	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR-Lauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Positivkontrolle (Mutationsreaktionsgemisch) können nicht ausgewertet werden	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR-Lauf ungültig – Interne Kontrolle liegt außerhalb des Bereichs für die Negativkontrolle	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.

Tabelle 9. Bedeutung der Markierungen und empfohlene Maßnahmen des Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR-Lauf ungültig – Interne Kontrolle liegt unterhalb des Bereichs für die Negativkontrolle	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
NTC_INVALID_CT	PCR-Lauf ungültig – FAM ungültig (unterhalb des Grenzwerts) für die Negativkontrolle	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
NTC_INVALID_DATA	PCR-Lauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Negativkontrolle können nicht ausgewertet werden	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	PCR-Lauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Negativkontrolle können nicht ausgewertet werden	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die entsprechende(n) Probe(n) zu wiederholen.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Probe ungültig – FAM- C_T -Wert in der Kontrollprobe zu niedrig	Verdünnen Sie die Probe, um den C_T -Wert der Kontrolle zu erhöhen. Diese Verdünnung sollte unter der Annahme berechnet werden, dass eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 mit dem im Kit enthaltenen Wasser den C_T -Wert um 1,0 erhöht; sobald die Probe verdünnt ist, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen.

Spezifische Markierungen sowohl für NSCLC als auch für CRC

In Tabelle 10 sind die möglichen Markierungen aufgeführt, die vom Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package generiert werden können, sowie die Bedeutung der

Markierungen und die zu ergreifenden Maßnahmen.

Für NSCLC spezifische Markierungen

Tabelle 10 listet die möglichen Markierungen auf, die vom Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package generiert werden können, erläutert deren Bedeutung und gibt an, welche Maßnahmen bei NSCLC-Proben zu ergreifen sind.

Tabelle 10. Das Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package enthält markiert Bedeutsamkeiten und empfohlene Maßnahmen für NSCLC-Proben

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T -Wert zu hoch (oder kein C _T -Wert) für die interne Kontrolle (HEX), FAM-Kanal-Mutation negativ	Um die Erkennung einer falschen G12C-Mutation (12CYS) zu vermeiden, muss das Ergebnis als „Invalid“ (Ungültig) gewertet werden. Verdünnen Sie die verbleibende Probe im Verhältnis 1:8 mit Wasser aus dem mit „DIL“ gekennzeichneten Röhrchen, wobei das Endvolumen größer als 40 µl sein muss (z. B. 10 µl DNA und 70 µl Wasser aus dem mit „DIL“ gekennzeichneten Röhrchen), und richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis beim wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, extrahieren Sie die Probe aus frischen FFPE-Schnitten. Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die frisch extrahierte Probe zu testen. Sollte die Probe ungültig sein, verdünnen Sie die verbleibende Probe im Verhältnis 1:8 mit Wasser aus dem mit „DIL“ gekennzeichneten Röhrchen, wobei das Endvolumen größer als 40 µl sein muss; führen Sie anschließend die Untersuchung dieser Verdünnung durch. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

Tabelle 10. Das Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package enthält markiert Bedeutsamkeiten und empfohlene Maßnahmen für NSCLC-Proben (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INT_CTRL_ EARLY_CT	Mutationröhrchen ungültig – C _T -HEX-Wert für Probe zu niedrig (interne Kontrolle)	Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, extrahieren Sie die Probe aus frischen FFPE-Schnitten (2 Schnitte). Neuen PCR-Lauf einrichten, um die frische Extraktion zu testen. Sollte das Ergebnis ungültig sein, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die erneut extrahierte Probe erneut zu untersuchen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.
SAMPLE_INVALID_ DATA	Mutationsröhrchen ungültig – Fluoreszenzdaten der internen Kontrolle können nicht ausgewertet werden	Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, extrahieren Sie die Probe aus frischen FFPE-Schnitten (2 Schnitte). Neuen PCR-Lauf einrichten, um die frische Extraktion zu testen. Sollte das Ergebnis ungültig sein, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die erneut extrahierte Probe erneut zu untersuchen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

Tabelle 10. Das Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package enthält markiert Bedeutsamkeiten und empfohlene Maßnahmen für NSCLC-Proben (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
MUTATION_EARLY_CT	Mutationröhrchen ungültig – C _T -FAM-Wert für die Probe zu niedrig.	Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, extrahieren Sie die Probe aus frischen FFPE-Schnitten (2 Schnitte). Neuen PCR-Lauf einrichten, um die frische Extraktion zu testen. Sollte das Ergebnis ungültig sein, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die erneut extrahierte Probe erneut zu untersuchen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.
SAMPLE_POSITIVE_ AND_ INVALID	Eine oder mehrere Mutationen einer Probe sind gültig und positiv; gleichzeitig sind eine oder mehrere Mutationen derselben Probe ungültig.	Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, extrahieren Sie die Probe aus frischen FFPE-Schnitten (2 Schnitte). Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die frisch extrahierte Probe zu testen. Sollte das Ergebnis ungültig sein, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die erneut extrahierte Probe erneut zu testen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

Tabelle 10. Das Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package enthält markiert Bedeutsamkeiten und empfohlene Maßnahmen für NSCLC-Proben (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_CTRL_FAIL	Probe ungültig – FAM-CT in der Probenkontrollreaktion zu hoch	Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, extrahieren Sie die Probe aus frischen FFPE-Schnitten (2 Schnitte). Neuen PCR-Lauf einrichten, um die frische Extraktion zu testen. Sollte das Ergebnis ungültig sein, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die erneut extrahierte Probe erneut zu untersuchen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

CRC-spezifische Markierungen

Tabelle 11 listet die möglichen Markierungen auf, die vom Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package generiert werden können, sowie deren Bedeutung und die für CRC-Proben zu ergreifenden Maßnahmen.

Tabelle 11. Das Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package enthält Erläuterungen zu den Markierungen sowie Empfehlungen zum weiteren Vorgehen bei CRC-Proben

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_CTRL_FAIL	Probe ungültig – FAM-CT in der Probenkontrollreaktion zu hoch	Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, wiederholen Sie die Extraktion (≥ 1 Schnitt) unter Berücksichtigung der Vorgabe, dass die gesamte Tumorfäche mindestens 4 mm² betragen muss, und verwenden Sie für die Extraktion Schnitte mit einem Tumoranteil von > 20 % der Fläche (ohne Makrodissektion). Bei Schnitten mit einem Tumoranteil von ≤ 20 % der Fläche sind ein oder mehrere Schnitte makroskopisch zu präparieren, um eine Gesamtumorfäche von mindestens 4 mm² zu gewährleisten. Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die frische Extraktion zu testen; wenn die Probe ungültig ist, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die neu extrahierte Probe erneut zu testen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

Tabelle 11. Das Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package enthält Erläuterungen zu den Markierungen sowie Empfehlungen zum weiteren Vorgehen bei CRC-Proben (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T -Wert zu hoch (oder kein C _T -Wert) für die interne Kontrolle (HEX), FAM-Kanal-Mutation negativ	Wenn die Probe den Status „Valid“ (Gültig) erhält – keine Maßnahme. Sollte die Probe als ungültig eingestuft werden, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probenanalyse zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, wiederholen Sie die Extraktion (≥ 1 Schnitt) unter Berücksichtigung der Vorgabe, dass die gesamte Tumorfläche mindestens 4 mm² betragen muss, und verwenden Sie für die Extraktion Schnitte mit einem Tumoranteil von > 20 % der Fläche (ohne Makrodissektion). Bei Schnitten mit einem Tumoranteil von ≤ 20 % der Fläche sind ein oder mehrere Schnitte makroskopisch zu präparieren, um eine Gesamtumorfläche von mindestens 4 mm² sicherzustellen. Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die frische Extraktion zu testen; wenn die Probe ungültig ist, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die neu extrahierte Probe erneut zu testen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

Tabelle 11. Das Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package enthält Erläuterungen zu den Markierungen sowie Empfehlungen zum weiteren Vorgehen bei CRC-Proben (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INT_CTRL_	Mutationröhrchen	Wenn die Probe den Status „Valid“ (Gültig) erhält – keine Maßnahme.
EARLY_CT	ungültig – C _T -HEX-Wert für Probe zu niedrig (interne Kontrolle)	Sollte die Probe als ungültig eingestuft werden, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probenanalyse zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, wiederholen Sie die Extraktion (≥ 1 Schnitt) unter Berücksichtigung der Vorgabe, dass die gesamte Tumorfäche mindestens 4 mm² betragen muss, und verwenden Sie für die Extraktion Schnitte mit einem Tumoranteil von > 20 % der Fläche (ohne Makrodissektion). Bei Schnitten mit einem Tumoranteil von ≤ 20 % der Fläche sind ein oder mehrere Schnitte makroskopisch zu präparieren, um eine Gesamtumorfäche von mindestens 4 mm² zu gewährleisten. Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die frische Extraktion zu testen; wenn die Probe ungültig ist, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die neu extrahierte Probe erneut zu testen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

Tabelle 11. Das Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package enthält Erläuterungen zu den Markierungen sowie Empfehlungen zum weiteren Vorgehen bei CRC-Proben (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsröhrchen ungültig – Fluoreszenzdaten der internen Kontrolle können nicht ausgewertet werden	Wenn die Probe den Status „Valid“ (Gültig) erhält – keine Maßnahme. Sollte die Probe als ungültig eingestuft werden, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die Probenanalyse zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei einem wiederholten PCR-Lauf ungültig sein, wiederholen Sie die Extraktion (≥ 1 Schnitt) unter Berücksichtigung der Vorgabe, dass die gesamte Tumorfläche mindestens 4 mm² betragen muss, und verwenden Sie für die Extraktion Schnitte mit einem Tumoranteil von > 20 % der Fläche (ohne Makrodissektion). Bei Schnitten mit einem Tumoranteil von ≤ 20 % der Fläche sind ein oder mehrere Schnitte makroskopisch zu präparieren, um eine Gesamt-tumorfläche von mindestens 4 mm² zu gewährleisten. Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die frische Extraktion zu testen; wenn die Probe ungültig ist, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die neu extrahierte Probe erneut zu testen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.

Tabelle 11. Das Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package enthält Erläuterungen zu den Markierungen sowie Empfehlungen zum weiteren Vorgehen bei CRC-Proben (Fortsetzung)

Kennzeichnung	Bedeutung	Maßnahme
MUTATION_EARLY_CT	Mutationröhrchen ungültig – C _T -FAM-Wert für die Probe zu niedrig.	Wenn die Probe den Status „Valid“ (Gültig) erhält – keine Maßnahme. Wenn die Probe den Status „Ungültig“ erhält, einen neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Sollte das Ergebnis bei eines wiederholten PCR-Laufs ungültig sein, wiederholen Sie die Extraktion (≥ 1 Schnitt) unter Berücksichtigung der Vorgabe, dass die gesamte Tumorfäche mindestens 4 mm ² betragen muss, und verwenden Sie für die Extraktion Schnitte mit einem Tumoranteil von > 20 % der Fläche (ohne Makrodissektion). Bei Schnitten mit einem Tumoranteil von ≤ 20 % der Fläche sind ein oder mehrere Schnitte makroskopisch zu präparieren, um eine Gesamtumorfäche von mindestens 4 mm ² zu gewährleisten. Richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die frische Extraktion zu testen; wenn die Probe ungültig ist, richten Sie einen neuen PCR-Lauf ein, um die neu extrahierte Probe erneut zu testen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es sollten keine weiteren Tests mehr durchgeführt werden.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Eine oder mehrere Mutationen einer Probe sind gültig und positiv; gleichzeitig sind eine oder mehrere Mutationen derselben Probe ungültig	Keine

Anwendungseinschränkungen

- Der Test dient dem Nachweis von 7 Mutationen in den Codons 12 und 13 des KRAS-Gens. Proben, deren Ergebnis mit „No Mutation Detected“ (Keine Mutation festgestellt) angegeben wurde, können KRAS-Mutationen aufweisen, die durch die Assays nicht erkannt wurden (z. B. 13CYS).
- Ob Mutationen nachgewiesen werden, hängt von der Qualität der Proben und der Menge an amplifizierbarer DNA in der Probe ab. Wenn bei der anfänglichen Bestimmung der DNA in der Probe festgestellt wird, dass die Menge entweder nicht ausreicht oder für die Mutationsanalyse zu hoch ist, sollte das Verfahren wiederholt werden.
- Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wird im Rahmen eines PCR-Verfahrens verwendet. Wie bei allen PCR-Verfahren können Proben durch externe DNA-Quellen in der Testumgebung und DNA aus der Positivkontrolle kontaminiert werden. Beachten Sie daher bei der Arbeit alle Vorsichtsmaßnahmen, um eine Kontamination der Proben und Reaktionsgemisch-Reagenzien zu vermeiden.
- Seltene (Prävalenz < 0,001 %) genetische Mutationen innerhalb der Zielregionen der Assays können mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit kreuzreagieren und die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen.
- Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit darf nicht zur Diagnose von Krankheiten verwendet werden.
- Bei CRC-Proben ist das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ausschließlich zur Unterscheidung zwischen Wildtyp- und Mutantenproben vorgesehen.
- Der Test ist so ausgelegt, dass jede Mutationsreaktion für die jeweils zu messende Mutation die optimale Sensitivität aufweist. Bei Proben, in denen eine Mutation nachgewiesen wird, kann jedoch eine Kreuzreaktivität mit anderen Mutationsreaktionen auftreten. Sollten mehrere Mutationsreaktionen positiv ausfallen, gilt das Ergebnis mit dem niedrigsten ΔCt -Wert als das Ergebnis.

- Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist ausschließlich für FFPE-Proben aus CRC- und NSCLC-Gewebe validiert.
- Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist ausschließlich für die Verwendung mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit validiert. Für die Verwendung mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde ausschließlich das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät validiert.

Leistungsmerkmale

Analytische Leistung

Die spezifischen Leistungsmerkmale des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurden anhand von Studien ermittelt, bei denen FFPE-Proben von Patienten mit CRC und NSCLC verwendet wurden. Die Entnahmemethoden für die NSCLC-Proben umfassten die Nadelbiopsie (CNB), die Feinnadelaspiration (FNA) und die Resektion (RES). Für jeden Probenotyp wurden 8 FFPE-Zelllinien menschlichen Ursprungs verwendet, von denen 7 bekannte *KRAS*-Mutationen aufwiesen, die durch die Assays nachgewiesen wurden, und eine *KRAS*-Wildtyp-Zelllinie (d. h. keine Mutationen an den Codons 12 und 13). Der Mutationsstatus der Proben wurde durch bidirektionale Sanger-Sequenzierung bestätigt.

Cut-off-Wert

Unter Anwendung einer Methode gemäß den Leitlinien in CLSI EP17-A (2004) (8) wurden 220 FFPE-Proben untersucht, um die Grenzwerte für die Assays festzulegen. Der Ct-Bereich der Kontrollreaktion wurde auf 21,92 bis 32,00 festgelegt. Die Schwellenwerte, die auf dem Ct-Wert der Kontrollreaktion abzüglich des Ct-Werts der Mutantenreaktionen (ΔC_t) basieren, sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12. Cut-off-Werte, die für die verschiedenen Mutationsassays bestimmt wurden

Mutationsassay	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Cut-off ($\leq \Delta C_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Leerwertgrenze

Um die Leistungsfähigkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit in Abwesenheit einer mutierten positiven Matrize zu bewerten und sicherzustellen, dass eine Blindprobe kein analytisches Signal erzeugt, das auf eine geringe Konzentration der Mutation hindeuten könnte, wurden Proben ohne Matrize untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in keinem der Reaktionsröhrchen mit Mutation oder als Kontrolle nachweisbare Ct-Werte vorlagen (die Ct-Werte der internen Kontrolle waren alle gültig).

Vergleich mit der analytischen Referenzmethode: CRC

Es wurden zwei Studien durchgeführt, um die Übereinstimmung des Status der Mutationen von CRC-Proben nachzuweisen, die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit im Vergleich zur bidirektionalen Sequenzierung untersucht wurden. Insgesamt lieferten 137 der FFPE-Proben sowohl mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit als auch bei der bidirektionalen Sequenzierung gültige Ergebnisse.

Die Gesamtergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt. Tabelle 14 zeigt die Analyse der Übereinstimmung zwischen dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit und der bidirektionalen Sequenzierung.

Tabelle 13. *therascreen* KRAS RGQ PCR-Kit im Vergleich zur bidirektionalen Sanger-Sequenzierung

Mutationsbestimmung gem. bidirektionaler Sequenzierung										
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	In
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit – Bestimmung	Negativ	80	–	–	1	–	–	–	1	82
	Positiv 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
	Positiv 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
	Positiv 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
	Positiv 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
	Positiv 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
	Positiv 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	16
	Positiv 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
	In	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tabelle 14. Analyse der Übereinstimmung

Übereinstimmungsparameter	Häufigkeit (%)	95 %-Konfidenzintervall (KI)
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	132/137 (96,35)	92,69–98,21
Prozentuale positive Übereinstimmung	52/54 (96,30)	89,41–98,77
Prozentuale negative Übereinstimmung	80/83 (96,39)	91,30–98,55

Zur Ergänzung der Daten aus der ersten Studie wurde eine zweiter Satz Proben untersucht. Dazu wurden 271 CRC-FFPE-Proben (250 mit unbekanntem Mutationsstatus und 21 Proben mit bekanntem Mutationsstatus, um auch seltene Mutationen einzubeziehen) wie oben beschrieben mit bidirektionaler Sanger-Sequenzierung verglichen.

Eine Konkordanzanalyse wurde an 247 Proben durchgeführt, für die sowohl gültige bidirektionale Ergebnisse als auch Ergebnisse des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vorlagen. Es gab 9 diskordante Proben. Die Gesamtübereinstimmung betrug 96,4 %. Die Daten belegen die genaue Leistungsfähigkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 15. *therascreen* KRAS RGQ PCR-Kit im Vergleich zur bidirektionalen Sanger-Sequenzierung (zweite Studie)

Mutationsbestimmung gem. bidirektionaler Sequenzierung										
		Negativ	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	In
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit – Bestimmung	Negativ	132	–	–	–	–	1	–	–	133
	Positiv 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
	Positiv 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	–	10
	Positiv 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	–	31
	Positiv 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
	Positiv 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
	Positiv 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
	Positiv 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
In		140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabelle 16. Analyse der Übereinstimmung (zweite Studie)

Übereinstimmungsparameter	Häufigkeit (%)	95 %-Konfidenzintervall (KI)
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Prozentuale positive Übereinstimmung	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Prozentuale negative Übereinstimmung	132/140 (94,29)	89,93–97,13

Vergleich mit der analytischen Referenzmethode: NSCLC

Um die Übereinstimmung des Gesamtstatus der Mutationen von NSCLC-Proben, die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untersucht wurden, im Vergleich zur bidirektionalen Sanger-Sequenzierung nachzuweisen, wurden im Rahmen dieser Studie klinische FFPE-NSCLC-Proben verwendet, die mittels RES, CNB oder FNA gewonnen wurden. Aus jeder Probe wurde vor der Untersuchung mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit DNA extrahiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden mit denen verglichen, die mittels bidirektionaler Sanger-Sequenzierung erzielt wurden.

Insgesamt lieferten 360 Proben sowohl mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit als auch bei der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung ein gültiges Ergebnis, wobei bei 340 Proben übereinstimmende Ergebnisse vorlagen.

Die Übereinstimmung zwischen dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit und der bidirektionalen Sequenzierung ist in Tabelle 17 dargestellt. Bei zwei Proben wurden mittels bidirektionaler Sanger-Sequenzierung doppelte Mutationen festgestellt. Da eine der Mutationen mit dem Ergebnis des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit übereinstimmte, wurden diese Proben für die Analyse der Gesamtübereinstimmung, der positiven Übereinstimmung und der negativen Übereinstimmung als übereinstimmend eingestuft (Tabelle 18).

Tabelle 17. *therascreen* KRAS RGQ PCR-Kit im Vergleich zur bidirektionalen Sanger-Sequenzierung

Mutationsbestimmung gem. bidirektionaler Sequenzierung											
		Neg.	12ALA	12ALA_ 12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12CYS_ 12VAL	12VAL	13ASP	In
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit – Bestimmung	Negativ	261	–	–	–	–	–	–	–	1	262
	Positiv 12ALA	1	4	1	–	–	–	–	–	–	6
	Positiv 12ARG	–	–	–	3	–	–	–	–	–	3
	Positiv 12ASP	4	–	–	–	14	–	–	–	–	18
	Positiv 12CYS	6	–	–	–	–	35	–	–	–	41
	Positiv 12SER	2	–	–	–	–	–	–	–	–	2
	Positiv 12VAL	5	–	–	–	–	–	1	17	–	23
	Positiv 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	–	4	5
In		280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

Tabelle 18. Analyse der Übereinstimmung

Maß für die Übereinstimmung	Häufigkeit (%)	95 %-Konfidenzintervall (KI)
Prozentuale Gesamtübereinstimmung	340/360 (94,44)	92,03–96,29
Prozentuale positive Übereinstimmung	79/80 (98,75)	94,21–99,94
Prozentuale negative Übereinstimmung	261/280 (93,21)	90,20–95,51

Nachweisgrenze (LoD)

Der Arbeitsbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit basiert auf der Menge an amplifizierbarer DNA in der Probe, die anhand des CT-Werts der Kontrollreaktion bestimmt wird. Der angegebene Inputbereich für die Assays wird durch den vorab festgelegten Kontroll-Ct-Bereich von 21,92 bis 32,00 definiert. Die LoD ist der Mindestprozentsatz an mutierter DNA, der vor dem Hintergrund der Wildtyp-DNA nachgewiesen werden kann, wenn die gesamte amplifizierbare DNA innerhalb des angegebenen Eingabebereichs liegt und dennoch unter dem Schwellenwert ΔC_t bleibt.

CRC

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die LoD jeder der 7 mutationsspezifischen Reaktionen zu bestimmen, die im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthalten sind. Für das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist die Nachweisgrenze für mutierte DNA vor dem Hintergrund von Wildtyp-DNA definiert als der niedrigste Verdünnungsfaktor, bei dem 95 % der Testreplikate für jede mutationspositive Probe als positiv bewertet wurden.

Die LoD-Angaben unter Verwendung von FFPE-Zelllinien, bei denen der Eingangs-Ct-Wert zwischen etwa 22 und 27 Ct liegt, sind in Tabelle 19 aufgeführt. Am unteren Ende des Ct-Inputbereichs nimmt die Sensitivität des Assays ab. Die Menge der eingesetzten DNA enthält möglicherweise nicht genügend Kopien, um die gleichen prozentualen Verhältnisse von Wildtyp- zu mutierter DNA zu gewährleisten, wie sie im oberen und mittleren Bereich des Arbeitsbereichs beobachtet werden.

Tabelle 19. LoD-Werte für jeden Mutationsassay unter Verwendung von FFPE-Zelllinien

Assay	LoD C ₉₅ (Anteil der mutierten DNA an der Wildtyp-DNA)
12ALA	0,8
12ASP	6,4

Tabelle 19. LoD-Werte für jeden Mutationsassay unter Verwendung von FFPE-Zelllinien (Fortsetzung)

Assay	LoD C ₉₅ (Anteil der mutierten DNA an der Wildtyp-DNA)
12ARG	2,6
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

NSCLC

Die LoD für die Assays des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde anhand von CRC-Gewebe bestimmt und verifiziert. Diese LoD-Ergebnisse wurden für NSCLC-Gewebe sowohl anhand von FFPE-Zelllinien als auch anhand klinischer FFPE-NSCLC-Proben erneut verifiziert.

Die Untersuchung bestand aus 2 Teilen. In Teil 1 wurden 60 Replikate von 7 mutierten FFPE-NSCLC-Zelllinien, die jeweils eine Mutation repräsentierten, auf die LoD des jeweiligen Assays verdünnt und getestet. Alle 60 gültigen FFPE-Zelllinien-Replikate für jede untersuchte Probe zeigten bei der bewerteten LoD eine 100-prozentige Nachweisrate für ihre jeweilige Mutationsreaktion.

In Teil 2 wurden 96 Replikate klinischer FFPE-NSCLC-Proben, die jeweils eine Mutation repräsentierten und aus 3 Entnahmemethoden (RES, CNB und FNA) stammten, nach Verdünnung auf die Nachweisgrenze des jeweiligen Assays getestet.

Die 96 gültigen Replikate von 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL und 13ASP wurden zu 100 % korrekt bestimmt. Die Assays für 12CYS und 12SER zeigten bei der LoD eine Nachweisrate von 95,8 %.

Dies belegt, dass der zuvor ermittelte LoD-Wert für alle Assays zur Erkennung von Mutationen bei der Untersuchung von NSCLC-Gewebe sowie klinischen FFPE-NSCLC-Proben, FFPE-Zelllinien und patientenspezifischen Proben bestätigt wurde.

DNA-Input und Linearität

Einfluss der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_t -Werte

Wenn Proben mit unterschiedlichen Gesamt-DNA-Gehalten denselben Anteil an mutierter DNA enthalten, ist zu erwarten, dass die gemessenen ΔC_t -Werte konsistent bleiben. Ziel der Studie war es, nachzuweisen, dass die Leistungsfähigkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit über den gesamten Bereich der DNA-Eingabemenge (Kontroll- C_T) des Assays hinweg konsistent ist. Aus 8 FFPE-Zelllinien extrahierte DNA wurde zur Herstellung von DNA-Pools mit dem niedrigstmöglichen Kontroll- Reaktions- C_T verwendet. Die konzentrierten DNA-Stammlösungen wurden anschließend auf DNA-Konzentrationen verdünnt, die den gesamten Messbereich abdeckten (insgesamt 5 Verdünnungen, einschließlich der konzentrierten Ausgangs-Stammlösung).

Für jeden Punkt innerhalb des Arbeitsbereichs wurde ausreichend Material vorbereitet, um 6 Wiederholungstests durchzuführen. Der Verdünnungsbereich für jede Mutationsreaktion und der aus den Ergebnissen ermittelte mittlere ΔC_t -Wert sind in Tabelle 20 dargestellt. Die ΔC_t -Werte sind über den gesamten Arbeitsbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit hinweg für alle Assays konsistent, was belegt, dass die DNA-Konzentration keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Bestimmung der Mutationen in den Proben hat.

Tabelle 20. Einfluss der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_t -Werte über den gesamten Ct-Bereich der Ausgangskontrollreaktion – CRC-FFPE-Zelllinien

ΔC_t					
Assay	Verdünnung 1 ~20–21 Ct	Verdünnung 2 ~23–24 Ct	Verdünnung 3 ~26–27 Ct	Verdünnung 4 ~29–30 Ct	Verdünnung 5 ~32–33 Ct
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

* Die Gesamtzahl der Wiederholungen für 12ASP betrug 27.

Tabelle 21. Einfluss der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_t -Werte über den gesamten Ct-Bereich der Kontrollreaktion hinweg – klinische FFPE-Proben von NSCLC-Patienten und Zelllinienproben

ΔC_t					
Assay	Verdünnung 1 ~20–21 Ct	Verdünnung 2 ~23–24 Ct	Verdünnung 3 ~26–27 Ct	Verdünnung 4 ~29–30 Ct	Verdünnung 5 ~32–33 Ct
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31

Tabelle 21. Einfluss der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_t -Werte über den gesamten C_t -Bereich der Kontrollreaktion hinweg – klinische FFPE-Proben von NSCLC-Patienten und Zelllinienproben (Fortsetzung)

ΔC_t					
Assay	Verdünnung 1 ~20–21 C_t	Verdünnung 2 ~23–24 C_t	Verdünnung 3 ~26–27 C_t	Verdünnung 4 ~29–30 C_t	Verdünnung 5 ~32–33 C_t
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12CYS	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
12VAL	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

* Aufgrund der geringen DNA-Konzentration wurde kein C_t -Wert für die Reaktion bei Mutationen zurückgegeben, weshalb kein ΔC_t berechnet wurde.

Linearität/Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der DNA-Ausgangsmenge

Die Linearität und die Amplifikationseffizienz der PCR für jede Mutation, bezogen auf die Kontrollreaktion, wurden über den gesamten Arbeitsbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachgewiesen. Die Amplifikationseffizienz für NSCLC wurde für jede der Mutationen und die Kontrollreaktion als $[10(-1/\text{Steigung})] - 1$ berechnet. Die Amplifikationseffizienz für CRC wurde für jede der Mutationsreaktionen und die Kontrollreaktion als $[2(-1/\text{Steigung})] - 1$ berechnet.

Die Amplifikationseffizienz der Kontrollreaktion im Vergleich zur Mutationsreaktion zeigt, dass der ΔC_t -Wert und damit die Mutationsbestimmung über den gesamten Arbeitsbereich der Assays hinweg konsistent ist. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 22 (CRC-Proben) und Tabelle 24 (NSCLC-Proben) dargestellt.

Tabelle 22. Amplifikationseffizienz bei Kontroll- und Mutationsreaktionen: CRC-Zelllinien

Proben-		Achsensabs.		Berechn. Steigung	Standardfehler (Steigung)	Untere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)		Obere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)		Amplifikationseffizienz	Unterschied der Amplifikationseffizienzen
		Achsensabs.	Achsensabs. Standardfehler								
12ALA	Kontroll-Ct	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03		
	12ALA-Ct	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019			
12ASP	Kontroll-Ct	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056		
	12ASP Ct	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01			
12ARG	Kontroll-Ct	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003		
	12ARG Ct	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979			
12CYS	Kontroll-Ct	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032		
	12CYS Ct	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058			
12SER	Kontroll-Ct	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105		
	12SER Ct	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101			
12VAL	Kontroll-Ct	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033		
	12VAL Ct	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04			
13ASP	Kontroll-Ct	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145		
	12ASP Ct	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144			

Tabelle 23. Amplifikationseffizienz bei Kontroll- und Mutationsreaktionen: klinische FFPE-Proben von NSCLC-Patienten und FFPE-Proben von Zelllinien

Proben-	Amplifikationseffizienz
12ALA	1,008
12ASP	1,036
12ARG	0,962
12CYS	0,996
12SER	1,092
12VAL	0,909
13ASP	1,008

Tabelle 24. Amplifikationseffizienz bei Kontroll- und Mutationsreaktionen: NSCLC-Proben

Proben-		Achsenabs.	Achsenabs. Standardfehler	Berechn. Steigung	Standardfehler (Steigung)	Untere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)	Obere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)
12ALA	Kontroll-C _T	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11
	12ALA C _T	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93
12ASP	Kontroll-C _T	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05
	12ASP C _T	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,99	-0,96
12ARG	Kontroll-C _T	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08
	12ARG C _T	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95
12CYS	Kontroll-C _T	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08
	12CYS C _T	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99
12SER	Kontroll-C _T	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02
	12SER C _T	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94

Tabelle 24. Amplifikationseffizienz bei Kontroll- und Mutationsreaktionen: NSCLC-Proben (Fortsetzung)

Proben-		Achsenabs.	Achsenabs. Standardfehler	Berechn. Steigung	Standardfehler (Steigung)	Untere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)	Obere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)
12VAL	Kontroll-C _T	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01
	12VAL C _T	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88
13ASP	Kontroll-C _T	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04
	12ASP C _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88

Linearität/Amplifikationseffizienz als Funktion des prozentualen Mutationsanteils

NSCLC

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss einer seriell verdünnten, mutierten positiven Probe auf die Amplifikationseffizienz über den gesamten Arbeitsbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit hinweg zu bewerten, beginnend mit Ausgangswerten von etwa 22–23 Ct.

In dieser Studie wurde DNA aus neun FFPE-NSCLC-Proben (4 Zelllinien und 5 klinische Proben) verwendet. Die Studie war darauf ausgelegt, den Einfluss der seriellen Verdünnung einer mutierten positiven Probe auf die Amplifikationseffizienz zu bewerten, indem Proben mit unterschiedlichem Mutationsanteil bei einem hohen DNA-Ausgangswert (Kontrollreaktion von ca. 23 C_T) getestet wurden. Die DNA aus klinischen FFPE-NSCLC- und FFPE-Zelllinien-Probenpools wurde auf optische Dichten verdünnt, die den C_T-Werten der Kontrollreaktion von ca. 22–23 C_T entsprachen. Die mutierte DNA wurde 2-fach in normalisierte Wildtyp-DNA seriell verdünnt, um eine Reihe von 5 Verdünnungen pro mutierter DNA-Probe zu erzeugen, die sich in ihrem Mutationsanteil unterschieden (angestrebt wurden 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 % Mutationsanteil).

Die Amplifikationseffizienzen der Wildtyp-DNA im Vergleich zur in einer Probe vorhandenen mutierten DNA hatten keinen Einfluss auf die ΔC_T -Werte, sodass die Bestimmung der Mutation davon unberührt blieb.

CRC

DNA-Extrakte aus CRC FFPE-Zelllinien wurden zunächst anhand der LoD-Werte bewertet, bevor die PCR mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit durchgeführt wurde. Anschließend wurden DNA-Stammlösungen so hergestellt, dass deren C_T -Wert in der Kontrollreaktion in etwa dem C_T -Wert entsprach. Die Stammlösungen wurden zweimal jeweils mit Wildtyp-DNA seriell verdünnt, um bei Variation des prozentualen Anteils mutierter DNA die Gesamtmenge an Wildtyp-DNA im Template konstant zu halten.

Es wurden DNA-Pools angesetzt, die ausreichend Material für 6 Replikate pro Mutation enthielten. Die C_T - und ΔC_T -Werte für jede Mutation an jedem Verdünnungspunkt wurden berechnet. Ein lineares Regressionsmodell wurde anhand des C_T -Werts der Mutationsreaktion im Verhältnis zur $\log_2$ -Verdünnung der DNA-Ausgangsmenge angepasst. Die Untersuchung zeigte, dass die Verdünnung von Mutationen vor dem Hintergrund einer konstanten Konzentration an Wildtyp-DNA zu Amplifikationseffizienzen führte, die nicht signifikant von den in der oben genannten Linearitätsstudie ermittelten Werten abwichen.

Störsubstanzen

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss potenziell störender Substanzen auf die Leistungsfähigkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit zu bewerten. Dies erfolgte durch die Analyse des Einflusses jeder Substanz auf die ΔC_T -Werte und den Status der Mutationen der Proben mittels Spiking-Experimenten bei verschiedenen Konzentrationen. Potenzielle Störsubstanzen, die im DNA-Extraktionsprozess auftreten können, waren Buffer AL, Buffer ATL, Ethanol, Paraffin, Proteinase K, Wash Buffer AW1, Wash Buffer AW2 und Xylen. Der letzte Elutionspuffer aus dem Kit, Buffer ATE, wurde außerdem als Leerwertkontrolle getestet.

Bei den Konzentrationen, die bei normalem Gebrauch zu erwarten sind, beeinträchtigte keine der untersuchten potenziell störenden Substanzen die Fähigkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, zwischen mutationspositiven und mutationsnegativen Proben zu unterscheiden.

Zusätzlich zur Untersuchung der Störsubstanzen wurde der potenzielle Einfluss von Nekrosen in klinischen Proben von CRC untersucht, um festzustellen, ob ein hoher Anteil an nekrotischem Gewebe in Tumorproben die Fähigkeit zur Gewinnung valider Daten beeinträchtigt. Von den insgesamt 421 Proben, die im Rahmen des Vergleichs mit der analytischen Referenzmethode beurteilt wurden, wiesen 29 Proben Nekrose mit > 50 % auf, wie eine pathologische Prüfung ergab. Von diesen 29 Proben lieferten 28 valide Ergebnisse, die mit der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung übereinstimmten. Ein einzelnes Ergebnis war ungültig, weil nicht genügend DNA vorlag.

Der potenzielle Einfluss von Nekrose wurde ebenfalls anhand klinischer Proben von NSCLC untersucht, um festzustellen, ob ein hoher Anteil an nekrotischem Gewebe in Tumorproben die Fähigkeit zur Gewinnung valider Daten beeinträchtigt. Diese Studie zeigte, dass der prozentuale Anteil an Tumorgewebe oder Nekrose in der Probe keinen Einfluss auf den C_T -Wert oder den ΔC_T -Wert zwischen den verschiedenen Entnahmemethoden (CNB, RES oder FNA) hat.

Es wurde eine zusätzliche Studie durchgeführt, um den Einfluss von Hämoglobin (Hb) auf das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit zu untersuchen. In dieser Studie wurden klinische Resektionsproben von NSCLC herangezogen, die für die Mutationen 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS und 13ASP entnommen worden waren. Eine klinische Probe mit der 12SER-Mutation wurde aufgrund der Seltenheit dieser Mutation nicht untersucht. Eine klinische KRAS-Wildtyp-FFPE-Probe wurde in den Probenpool der Studie aufgenommen, um mögliche Interferenzen bei Proben mit negativem Status bei Mutationen zu bewerten. Die Testproben wurden mit Hb in 2 verschiedenen Konzentrationen versetzt: der Hälfte des höchsten erwarteten Carry-over-Werts (0,5x) und dem höchsten erwarteten Carry-over-Wert (1x). Die empfohlene Testkonzentration (1x) wurde gemäß CLSI EP07-A2 mit 2 µg/µl festgelegt. Diese

Studie zeigte, dass der Nachweis der Mutationen 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS und 13ASP mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nicht durch das potenzielle Störsubstanz Hämoglobin beeinträchtigt wird. Der Nachweis der 12ALA-Mutationen mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wird jedoch bei einer Hb-Konzentration von 0,50 µg/µl oder höher beeinträchtigt.

Kreuzkontamination

Ziel dieser Studie war es, das Ausmaß der Kreuzkontamination zwischen DNA-Proben unter Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit zu ermitteln, die möglicherweise zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Zu den potenziellen Quellen von Kreuzkontaminationen gehören:

- Probenextraktion (z. B. Abschaben von Objektträgern)
- Pipettieren von Proben
- Verschließen von Probenröhrchen
- Kontamination von Kit-Reagenzien während des Gebrauchs
- Laden von Assay-Röhrchen in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument

Für diese Studie wurden FFPE-Standards verwendet: der Wildtyp-Standard und der 12ALA-Standard (da die 12ALA-Reaktion die Reaktion mit der niedrigsten LoD im Kit ist).

Im Rahmen der Studie wurden 10 PCR-Läufe durchgeführt, mit denen das Kontaminationspotenzial sowohl innerhalb von als auch zwischen den Läufen auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument bestimmt werden sollte. Bei diesen Testläufen wurden Röhrchen mit Wildtyp-DNA verwendet, um auf eine Kontamination durch mutierte DNA zu prüfen.

In dieser Studie wurden in keiner der Wildtyp-DNA-Extrakte, die zum Nachweis von Kreuzkontaminationen verwendet wurden, nachweisbare Kontaminationen gefunden.

Exklusivität/Kreuzreaktivität

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit besteht aus 8 separaten Reaktionen, darunter eine einzelne Kontrollreaktion, die einen nicht-polymorphen Bereich des *KRAS*-Gens nachweist, sowie 7 Mutations-spezifische Reaktionen. Es gibt keine Reaktion, die speziell die Wildtyp-*KRAS*-Sequenz an den Codons 12 oder 13 misst. Das *KRAS*-Ergebnis „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen, d. h. Wildtyp) wird ausgegeben, wenn für keine der 7 Mutationen ein positives Mutationsergebnis erhalten wird.

Daher ist es erforderlich, das Ausmaß der unspezifischen Amplifikation bzw. der Kreuzreaktivität zu ermitteln, die in jeder Reaktion bei überschüssigen Mengen an *KRAS*-Wildtyp-DNA auftritt, um sicherzustellen, dass keine falsch-positiven Ergebnisse auftreten. Ebenso wird die unspezifische Amplifikation für *KRAS*-Mutationen bewertet, die von den Assays nicht nachgewiesen werden sollen. Dies belegt, dass das Ausmaß der Kreuzreaktivität zwischen mutierten Reaktionen bei Vorhandensein überschüssiger Mengen an mutierter DNA nicht zu fehlerhaften Beurteilungen der Mutationen führt. Da die DNA-Eingabemenge für diesen Assay auf dem Kontroll-Ct-Bereich (21,92–32,00) basiert, richtet sich die höchste Konzentration der DNA-Eingabemenge nach einem Kontroll-Ct-Wert von etwa 22.

Unspezifische Amplifikation/Kreuzreaktivität: Wildtyp-KRAS-DNA

Bestimmt wurde das Ausmaß an nicht spezifischer Amplifikation von Wildtyp-DNA nach jeweils für die Amplifikation spezifischer Mutationen vorgesehenen Reaktionsgemischen. Insgesamt wurden 60 Replikate von Wildtyp-DNA aus einer FFPE-Zelllinie sowie 60 NSCLC-Proben bei der höchsten Konzentration an amplifizierbarer DNA unter Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ausgewertet.

Die Ct-Werte der Kontrollen lagen bei etwa 22–23. Die Ergebnisse zeigten, dass die Δ Ct-Werte die festgelegten Cutoff-Werte überschritten und mindestens 95 % der Wildtyp-Replikate korrekt identifiziert wurden.

Unspezifische Amplifikation/Kreuzreaktivität/Exklusivität: mutationspositives KRAS-DNA

Es wurden Mutationsproben mit einer hohen DNA-Ausgangskonzentration gegen alle Reaktionsgemische getestet. Aus jeder der FFPE-Zelllinien für CRC und NSCLC wurden DNA-Proben aufbereitet, sodass der Ct-Wert der Kontrollreaktion etwa 23 entsprach. Aus diesen Verdünnungen wurden 6 Replikate je Mutationsprobe getestet. Der prozentuale Mutationsanteil in der Probe wird durch den prozentualen Anteil der Mutationen in der Zelllinien-DNA bestimmt.

Die in Tabelle 25 und Tabelle 26 dargestellten mittleren ΔCt-Werte zeigen, dass eine Kreuzreaktivität zwischen den Mutantenreaktionen besteht. In allen Fällen zeigen die Ergebnisse, dass die richtige Mutation anhand der entsprechenden Mutationsreaktion identifiziert wurde (d. h., der kleinste ΔCt- Wert entsprach der korrekten Mutationsbestimmung). Alle übrigen Testfälle wurden entweder nicht nachgewiesen oder lagen außerhalb des ΔCt-Schwellenwerts.

Tabelle 25. Kreuzreaktivität zwischen Mutationsreaktionen unter Verwendung von CRC-FFPE-Zelllinien-DNA im hohen Input-Bereich

Mutierte DNA	Assay ΔCt						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	1,42*	12,66	N. u.	5,81†	2,78†	6,31†	13,21
12ASP	12,56	2,42*	N. u.	N. u.	13,44	11,21	13,55
12ARG	13,12	11,56	1,12*	11,42	N. u.	13,43	12,66
12CYS	14,2	12,48	9,23	0,98*	N. u.	7,96 †	12,88
12SER	N. u.	13,39	13,31	N. u.	3,02*	12,99	13,97
12VAL	6,83†	N. u.	N. u.	N. u.	13,38	0,28*	13,74

Tabelle 25. Kreuzreaktivität zwischen Mutationsreaktionen unter Verwendung von CRC-FFPE-Zelllinien-DNA im hohen Input-Bereich (Fortsetzung)

Mutierte DNA	Assay ΔC_t						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
13ASP	N. u.	13,29	13,89	N. u.	N. u.	14,36	4,5*

N. u.: Keine Kreuzreaktion

* ΔC_t -Werte aus passenden Reaktionen.

† ΔC_t -Werte aus kreuzreaktiven Reaktionen unterhalb des Cut-offs.

Tabelle 26. Kreuzreaktivität zwischen Mutationsreaktionen unter Verwendung von DNA aus NSCLC-FFPE-Zelllinien im hohen Input-Bereich

Mutierte DNA	Assay ΔC_t						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	1,31*	12,8	N. u.	5,01†	2,26†	5,57†	12,65
12ASP	12,61	1,66*	N. u.	N. u.	N. u.	10,3	12,69
12ARG	12,98	11,08	0,81*	11,24	N. u.	12,66	12,62
12CYS	N. u.	12,22	7,84†	0,56*	N. u.	13,06	11,84
12SER	N. u.	12,87	13,21	N. u.	1,93*	13,25	12,93
12VAL	5,93†	14,29	N. u.	N. u.	13,14	0,45*	12,39
13ASP	N. u.	N. u.	N. u.	N. u.	N. u.	N. u.	2,02*

N. u.: Keine Kreuzreaktion

* ΔC_t -Werte aus vergleichbaren Reaktionen.

† ΔC_t aus kreuzreaktiven Reaktionen unterhalb des Cutoff-Wertes.

Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde anhand eines Protokolls bestimmt, das Aspekte der CLSI-Richtlinien EP12-A und EP5-A2 (21, 22) berücksichtigte. Für diese Bestimmung wurden klinische CRC-Proben verwendet. Je eine Wildtyp-Probe und eine Probe für jede Mutation wurden mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untersucht. Dabei wurden an jeweils 3 Standorten von 2 Laboranten alle Proben und Kontrollen an 3 Chargen des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit getestet – täglich über einen Zeitraum von 5 Tagen, mit 2 Läufen pro Tag und jeweils 2 Wiederholungen jeder Probe pro Lauf. Die für jede Reaktion in jeder Probe ermittelten Ct- und Δ Ct- Werte wurden ebenfalls mittels Varianzkomponentenanalyse ausgewertet.

Die Reproduzierbarkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde für Proben mit geringem Mutationsgehalt (3xLoD) und Wildtyp-Proben nachgewiesen, wobei bei allen Assays über mehrere Chargen, Plattformen und Laboranten hinweg mindestens 39 von 40 korrekten Mutationsbestimmungen erzielt wurden, sowohl bei laborinternen als auch bei laborübergreifenden Versuchen. Die unter Verwendung von C50- und 3xLoD-Proben ermittelten Varianzschätzungen (1-fache Standardabweichung) sind in Tabelle 27 und Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 27. Schätzungen der Assay-Varianz

Assay	% VK für ΔCT		% VK für mutierten Ct-Wert		% VK für Kontroll-Ct-Wert		
	3x LoD	C50	3x LoD	C50	3x LoD	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	9,6	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

Tabelle 28. Schätzungen der Wiederholgenauigkeit

Assay	% VK für ΔCT		% VK für mutierten Ct-Wert		% VK für Kontroll-Ct-Wert		
	3x LoD	C50	3x LoD	C50	3x LoD	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

Tabelle 28. Schätzungen der Wiederholgenauigkeit (Fortsetzung)

Assay	% VK für ΔCT		% VK für mutierten Ct-Wert		% VK für Kontroll-Ct-Wert		
	3x LoD	C50	3x LoD	C50	3x LoD	C50	WT
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

Der geschätzte Anteil der Proben mit einem Wert von 3xLoD, bei denen Mutanten- und Wildtyp-Proben nachgewiesen wurden, wurde sowohl insgesamt als auch für jeden einzelnen Standort angegeben. Bei allen Assays und Probenkombinationen ergaben mindestens 79 von 80 Wiederholungen die korrekte Bestimmung der Mutation. Der Gesamtanteil korrekter Ergebnisse betrug 99,6 % (1115/1120); 99,6 % (558/560) bei Proben mit nachgewiesener Mutation (3xLoD) und 99,5 % (557/560) bei Proben, bei denen keine Mutation nachgewiesen wurde (Wildtyp) (Tabelle 29).

Tabelle 29. Korrekte Bestimmungen insgesamt

Mutation	Korrekte Bestimmungen	
	Proben bei 3x LOD	Wildtyp-Proben (niedrig)
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

Die Präzision des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit im Rahmen von Labor-Eigenversuchen (Wiederholbarkeit) wurde bewertet. Es werden sowohl die Richtigkeit der Mutationsergebnisse als auch die Genauigkeit der ΔC_T -Werte (die Differenz der C_T -Werte zwischen einer Mutationsreaktion und der Kontrollreaktion) angegeben.

Insgesamt wurden 15 Panel-Mitglieder vorbereitet: jeweils eines für jede der 7 vom KRAS-Kit nachgewiesenen Mutationen (bei LOD und 2x LoD) sowie ein Wildtyp-Panel-Mitglied (WT). Die mutierten Panelmitglieder wurden je nach Verfügbarkeit entweder durch eine FFPE-Zelllinie oder eine klinische Probe repräsentiert. Alle Proben wurden auf einen Kontroll-CT-Wert von 27 normiert, und die Mutantenproben wurden mit Wildtyp-DNA verdünnt, um ausreichend Material für Proben mit Mutationskonzentrationen von 1x LoD und 2x LoD zu gewinnen.

Der Anteil der korrekten Zuordnungen ist für jedes Testpanel in Tabelle 30 aufgeführt, und die Werte für die quantitative Präzision sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 30. Anteil korrekter Mutationsbestimmungen

Gruppierungsvariablen		Anteil		Zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall	
Probenkonzentration	Assay	Anteil	Prozentsatz (%)	Unterer Wert (%)	Oberer Wert (%)
2x LoD	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

Gruppierungsvariablen		Anteil		Zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall	
Probenkonzentration	Assay	Anteil	Prozentsatz (%)	Unterer Wert (%)	Oberer Wert (%)
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	Alle	28/28	100,00	87,66	100,00

* Repräsentiert durch FFPE-Zelllinie

Tabelle 31. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Wiederholbarkeit

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rgt*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bedienern*	Resi*	In
Δ Ct	2x LoD	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 %]

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zw. Tagen*	Zw. Lufen N*	Zw. Rgq*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bedienern*	Rest*	In
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 %]

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rgq*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bediennern*	Rest*	In
Green Ct	2x LoD	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 %]
	LoD	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 %]
	LoD	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 %]
	LoD	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 %]
		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 %]
	LoD	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 %]
	LoD	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 %]

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rgq*	Zw. Kit- Chargen*	Zw. Bedienerr*	Rest*	In
		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, 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

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rgq*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bedienern*	Rest*	In
Yellow Ct	2x LoD	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 %]
	LoD	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 %]
		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, 1,120 %]

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rgq*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bedienern*	Rest*	In
Yellow Ct	WT	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 %]
		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 %]

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rgq*	Zw. Kit- Chargen*	Zw. Bedienern*	Rest*	In
		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, % VK

Die Präzision des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit zwischen verschiedenen Laboren (Reproduzierbarkeit) wurde untersucht. Es wurde mit drei verschiedenen Laboren (Teststandorten) gearbeitet. Für diese Studie wurde das gleiche Testpanel verwendet wie für die Wiederholbarkeitsstudie. An jedem Standort wurden die Laborbedingungen durch das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät, den Bediener, die Charge des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit und die Anzahl der Durchläufe pro Tag variiert, sodass sich insgesamt 88 Durchläufe pro Standort über 22 nicht aufeinanderfolgende Tage ergaben.

Der Anteil korrekter Bestimmungen für Mutationen ist in Tabelle 32 aufgeführt. Die Werte zur quantitativen Präzision sind in Tabelle 33 dargestellt. Die Gesamtreproduzierbarkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist in der Spalte „#Gesamt (SD, CV%)“ von Tabelle 33 angegeben.

Tabelle 32. Anteil korrekter Mutationsbestimmungen über Standorte hinweg

Gruppierungsvariablen		Anteil		Zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall	
Probenkonzentration	Assay	Anteil	Prozentsatz (%)	Unterer Wert (%)	Oberer Wert (%)
2x LoD	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	99,88
	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	Alle	82/84	97,62	91,66	99,71

* Dargestellt anhand einer FFPE-Zelllinie.

Tabelle 33. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Reproduzierbarkeit

Analyse- variable	Proben- konzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zwischen Läufen N am gleichen Standort*	Zwischen Rqg am gleichen Standort*	Zw. Kri- Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest*	In
Δ Ct	2x LoD	12ALA	84	5,48	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[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 %]	[0,1669, 3,05 %]	[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 %]

Analyse- variable	Proben- konzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zwischen Läufen N am gleichen Standort*	Rgq am gleichen Standort*	Zw. Kit- Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest* In
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 %]	[0,2936, 4,17 %]
		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 %]	[0,2590, 3,45 %]
		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 %]	[0,2862, 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 %]	[0,4981, 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 %]	[0,4570, 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 %]	[0,2965, 4,20 %]
		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 %]	[0,4488, 7,28 %]

Analyse- variable	Proben- konzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am Standort*	Zwischen Läufen N am Standort*	Zwischen Rgq am Standort*	Zw. Kit- Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest* In
Green Ct	2x LoD	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 %]
		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 %]

LoD

Analyse- variable	Proben- konzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zwischen Läufen N am gleichen Standort*	Zw. Kit- Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest* In
12SER		12CYS	120	33,19	[0,0000, 0,00 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2513, 0,76 %]	[0,0776, 0,23 %]	[0,1427, 0,43 %]	[0,2712, 0,82 %]
12VAL		12SER	120	33,13	[0,2194, 0,66 %]	[0,0000, 0,00 %]	[0,2433, 0,73 %]	[0,1263, 0,38 %]	[0,1973, 0,60 %]	[0,2052, 0,62 %]
13ASP		12VAL	120	31,65	[0,0000, 0,00 %]	[0,1254, 0,40 %]	[0,1645, 0,52 %]	[0,1307, 0,41 %]	[0,0976, 0,31 %]	[0,1792, 0,57 %]
13ASP		13ASP	118	33,08	[0,0000, 0,00 %]	[0,1789, 0,54 %]	[0,1661, 0,50 %]	[0,3569, 1,08 %]	[0,1565, 0,47 %]	[0,2588, 0,78 %]

Analyse- variable	Proben- konzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zwischen Läufen N am gleichen Standort*	Zwischen Rgq am gleichen Standort*	Zw. Kit- Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest* In
Yellow Ct	2x LoD	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 %]
		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 %]
		LoD									

Analyse- variable	Proben- konzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zwischen Läufen N am gleichen Standort*	Zwischen Rgq am gleichen Standort*	Zw. Kit- Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest* In
		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 %]

Analyse- variable	Proben- konzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	MW	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am Standort*	Zwischen Läufen N am Standort*	Zwischen Rgq am gleichen Standort*	Zw. Kit- Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest* In
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 %]

* SD, % VK

Variabilität der Probenhandhabung

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Schwankungen bei der Probenhandhabung – insbesondere bei der DNA-Extraktion – auf das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit zu untersuchen. Diese Studie ergänzt die Studie zur Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit, indem sie die Schwankungen bei der Probenhandhabung analysiert, die auftraten, als dieselben klinischen FFPE-Schnitte und FFPE-Zelllinien-Schnitte an 3 Standorten verarbeitet und anschließend mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untersucht wurden.

CRC

Aus jeder der 10 FFPE-CRC-Proben von Darmkrebs (3 Wildtyp-Proben und je 1 Probe pro Mutation) wurden 30 aufeinanderfolgende 5-µm-Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden nach dem Zufallsprinzip auf 1 von 3 Teststellen verteilt, sodass jede Stelle 10 Schnitte pro FFPE-Probe erhielt (insgesamt 100 Schnitte). Von den 300 getesteten DNA-Extraktionen waren 298 Proben gültig. Hinsichtlich der *KRAS*-Mutation-Befundung bestand zwischen den 3 Standorten eine Übereinstimmung von 99,33 %.

Ein Vergleich der mittleren ΔC_t -Werte für mutierte und Wildtyp-Proben nach Standort ergab eine sehr enge Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Ergebnisse belegen die Übereinstimmung des DNA-Extraktionsverfahrens und der Probenverarbeitung in Verbindung mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

NSCLC

In dieser Studie wurden 13 klinische NSCLC-Proben (3 x 12ASP, 3 x 12CYS, 4 x 12VAL und 3 Wildtyp-Proben) sowie 4 FFPE-Zelllinienproben (12ALA, 12ARG, 12SER und 13ASP) verwendet. Die Proben stammten aus den verschiedenen Entnahmemethoden: RES, FNA und CNB. Zelllinien wurden verwendet, um seltene Mutationen darzustellen, für die kein klinisches NSCLC-Gewebe verfügbar war.

Die 3 Chargen mit je 20 FFPE-Schnitten wurden dann zufällig auf die 3 Standorte verteilt. An jedem der 3 Standorte wurde die DNA-Extraktion an einer Charge von 20 FFPE-Schnitten (10 Paare) pro Mutation und Wildtyp durchgeführt.

Als alle Probenvorbereitungen an 3 verschiedenen Teststandorten mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untersucht wurden, wurden alle 7 Mutationen sowie die Wildtyp-Proben mit der korrekten Mutationsbezeichnung identifiziert. Die Gesamtgenauigkeit bei der Bestimmung der Mutationen für jede der 7 Mutationen sowie für die Wildtyp-Proben betrug 100 %, was die standortübergreifende Konsistenz bei der DNA-Extraktion und dem Mutationsnachweis unter Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit belegt.

Eine zusätzliche Studie zur Probenhandhabung wurde unter Verwendung klinischer FFPE-Proben von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) durchgeführt, die für die Mutationen 12ALA, 12ARG, 12SER und 13ASP repräsentativ waren, da in der vorherigen Studie Zelllinienproben verwendet worden waren, die für diese Mutationen repräsentativ waren. Diese zusätzliche Studie erfolgte nach dem gleichen Studiendesign wie die vorherige Studie. Diese zusätzliche Studie folgte dem gleichen Studiendesign wie die vorherige Studie. Alle Probenvorbereitungen für Proben mit den Mutationen 12ALA, 12ARG und 13ASP, die an allen 3 einzelnen Teststandorten extrahiert wurden, lieferten bei der Untersuchung mit dem KRAS-Kit eine korrekte Mutationsbestimmung. Insgesamt wurden für 100 % dieser Proben korrekte Ergebnisse erhalten. Bei den Probenvorbereitungen für die 12SER-Mutation lag die Häufigkeit korrekter Mutationsbestimmungen bei 28 von 30 (Prozentsatz korrekter Bestimmungen: 93,33 %) über alle 3 einzelnen Teststandorte hinweg. Die Ergebnisse belegen die Konsistenz des DNA- Extraktionsverfahrens und des Arbeitsablaufs bei der Probenverarbeitung, die zur Durchführung der Tests mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit verwendet wurden.

Gleichwertigkeit der Methoden zur Entnahme von Proben (ausschließlich NSCLC)

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ermittelte Mutationsbestimmung bei NSCLC-Proben durch die Art der Probenentnahme beeinflusst wurde. Die 3 in dieser Studie untersuchten Probenentnahmemethoden waren RES, FNA und CNB.

Für diese Studie wurden „patientenbezogene“ CNB- und FNA-Proben aus chirurgisch resezierten Tumorproben gewonnen, um sicherzustellen, dass derselbe Tumor mit den 3 Entnahmemethoden entnommen wurde. Jede Probe wurde extrahiert und mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untersucht.

Jede Probe wurde extrahiert und mit dem *KRAS*-Kontrollassay untersucht. Jede Probe, die ein gültiges Ergebnis lieferte (169 Resektionen, 169 CNB und 164 FNA), wurde mit allen 8 *KRAS*-Assays untersucht.

Die primäre Analyse basierte auf der spezifischen Mutation, die über alle Probengewinnungsarten hinweg nachgewiesen wurde. Für jeden paarweisen Vergleich wurden die Kennzahlen für die prozentuale Gesamtübereinstimmung, die prozentuale positive Übereinstimmung und die prozentuale negative Übereinstimmung berechnet, zusammen mit dem exakten zweiseitigen 95-Prozent-Konfidenzintervall.

Tabelle 34. Übereinstimmung zwischen Probengewinnungsmethoden

Vergleich	Übereinstimmung	Häufigkeiten	Prozentsatz (%)	Untere zweiseitige Konfidenzgrenze (%)	Obere zweiseitige 95%-Konfidenzgrenzen (%)
CNB im Vergleich zu FNA, wobei CNB als Referenz dient	Prozentuale Gesamtübereinstimmung	148/156	94,87	90,15	97,76
	Prozentuale positive Übereinstimmung (%)	29/35	82,86	66,35	93,44
	Prozentuale negative Übereinstimmung (%)	119/121	98,35	94,16	99,80
CNB im Vergleich zu RES, wobei CNB als Referenz dient	Prozentuale Gesamtübereinstimmung	153/161	95,03	90,44	97,83
	Prozentuale positive Übereinstimmung (%)	31/37	83,78	67,99	93,81
	Prozentuale negative Übereinstimmung (%)	122/124	98,39	94,30	99,80
FNA im Vergleich zu CNB, wobei FNA als Referenz dient	Prozentuale Gesamtübereinstimmung	148/156	94,87	90,15	97,76
	Prozentuale positive Übereinstimmung (%)	29/32	90,63	74,98	98,02
	Prozentuale negative Übereinstimmung (%)	119/124	95,97	90,84	98,68
FNA im Vergleich zu RES, wobei FNA als Referenz dient	Prozentuale Gesamtübereinstimmung	152/156	97,44	93,57	99,30
	Prozentuale positive Übereinstimmung (%)	30/32	93,75	79,19	99,23
	Prozentuale negative Übereinstimmung (%)	122/124	98,39	94,30	99,80

Vergleich	Übereinstimmung	Häufigkeiten	Prozentsatz (%)	Untere zweiseitige Konfidenzgrenze (%)	Obere zweiseitige 95%-Konfidenzgrenzen (%)
RES im Vergleich zu CNB, wobei RES als Referenz dient	Prozentuale Gesamtübereinstimmung	153/161	95,03	90,44	97,83
	Prozentuale positive Übereinstimmung (%)	31/34	91,18	76,32	98,14
	Prozentuale negative Übereinstimmung (%)	122/127	96,06	91,05	98,71
RES im Vergleich zu FNA, wobei RES als Referenz dient	Prozentuale Gesamtübereinstimmung	152/156	97,44	93,57	99,30
	Prozentuale positive Übereinstimmung (%)	30/32	93,75	79,19	99,23
	Prozentuale negative Übereinstimmung (%)	122/124	98,39	94,30	99,80

Darüber hinaus wurde eine Regressionsanalyse nach Passing-Bablok und Deming durchgeführt, um die Ct- und ΔCt-Werte zwischen verschiedenen Probenentnahmemethoden zu vergleichen. Die Regressionsanalyse ergab, dass es keine Hinweise darauf gibt, dass zwischen den Probenarten RES, CNB und FNA hinsichtlich der Ct- oder ΔCt-Werte ein konstanter oder proportionaler Unterschied besteht. Zudem wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um den Einfluss sowohl des Anteils an nekrotischem als auch an Tumorgewebe auf die entsprechenden ΔCt-Werte zu untersuchen. Die Steigung der Regressionsgeraden sowohl für den Anteil an nekrotischem Gewebe als auch für den Anteil an Tumorgewebe im Verhältnis zu ΔCt deutet darauf hin, dass es keine Hinweise darauf gibt,

dass sich die ΔC_t -Werte mit steigenden Anteilen an nekrotischem oder Tumorgewebe nennenswert unterscheiden.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit dient dem spezifischen Nachweis von 7 *KRAS*-Mutationen in den Codons 12 und 13 des *KRAS*-Gens. Es ist nicht für den spezifischen Nachweis der Wildtyp-Sequenz in diesen Codons vorgesehen. Die Testergebnisse werden als „[Name der Mutation] Detected“ ([Name der Mutation] nachgewiesen) und „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgegeben.

Klinische Studie zur Untermauerung der Anwendung in Kombination mit Erbitux (Cetuximab)

Es wurde eine klinische Leistungsstudie durchgeführt, um Daten zur Untermauerung des klinischen Nutzens des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit als diagnostisches Instrument zur Auswahl von Patienten für eine Behandlung mit Erbitux (Cetuximab) zu gewinnen. Die Sicherheit und Wirksamkeit von Erbitux (Cetuximab) wurde in der CA225025-Studie nachgewiesen. CA225025 war eine multizentrische, offene, randomisierte klinische Studie, die an 572 Patienten mit EGFR-exprimierendem, zuvor behandeltem, rezidivierendem metastasiertem CRC (mCRC) durchgeführt wurde. Die Patienten wurden randomisiert (1:1) und erhielten entweder Erbitux (Cetuximab) plus die beste unterstützende Behandlung (best supportive care, BSC) oder ausschließlich die BSC. Erbitux (Cetuximab) wurde in einer Anfangsdosis von 400 mg/m² verabreicht, gefolgt von wöchentlichen Dosen von 250 mg/m², bis es zu einem Fortschreiten der Erkrankung oder zu inakzeptablen Nebenwirkungen kam.

Von den 572 randomisierten Patienten betrug das Medianalter 63 Jahre; 64 % waren männlich, 89 % waren kaukasischer Abstammung und 77 % wiesen zu Studienbeginn einen ECOG-Leistungsstatus von 0–1 auf. Die demographischen und Baseline-Merkmale waren in den beiden Studienarmen ähnlich. Alle Patienten sollten zuvor eine Therapie erhalten haben, bei der eine Progression der Erkrankung eingetreten war, einschließlich einer irinotecanhaltigen und einer oxaliplatinhaltigen Therapie.

Für 453 von 572 (79 %) Patienten lag der Status der *KRAS*-Mutation vor: 245 (54 %) Patienten wiesen *KRAS*-mutationsnegative Tumoren auf, und 208 (46 %) Patienten wiesen

KRAS-mutationspositive Tumoren auf, wie anhand des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit festgestellt wurde.

Das wichtigste Ergebnismaß der Studie war das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS). Bei der KRAS-mutationsnegativen (Wildtyp-)Population betrug die mediane Überlebenszeit (95%-KI) 8,6 (7,0; 10,3) Monate in der Erbitux (Cetuximab) + BSC-Gruppe und 5,0 (4,3; 5,7) Monate in der BSC-Gruppe. Die Hazard-Ratio für das OS von Erbitux (Cetuximab) + BSC gegenüber BSC lag bei 0,63. Das 95%-Konfidenzintervall (KI) betrug (0,47; 0,84).

Bei der KRAS-mutationspositiven Population betrug die mediane Überlebenszeit 4,8 (3,9; 5,6) Monate in der Erbitux (Cetuximab)+BSC-Gruppe und 4,6 (3,6; 4,9) Monate in der BSC-Gruppe. Die Hazard-Ratio lag bei 0,91 mit 95%-KI (0,67, 1,24). Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 und Abbildung 23 dargestellt.

Tabelle 35. Gesamtüberleben bei zuvor behandelten Patienten mit EGFR-positivem metastasiertem Kolorektalkarzinom (alle randomisiert und KRAS-Status)

	Alle randomisiert		KRAS-mutationsnegativ bei Wildtyp		KRAS-mutationspositiv	
	Erbitux + BSC N = 287	BSC N = 285	Erbitux + BSC N = 117	BSC N = 128	Erbitux + BSC N = 108	BSC N = 100
Median (Monate) (95%-KI)	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)
Hazard-Ratio (95%-KI)	0,77 (0,64, 0,92)		0,63 (0,47; 0,84)		0,91 (0,67; 1,24)	
p-Wert*	0,0046		–		–	

* Basierend auf dem stratifizierten Log-Rank-Test.

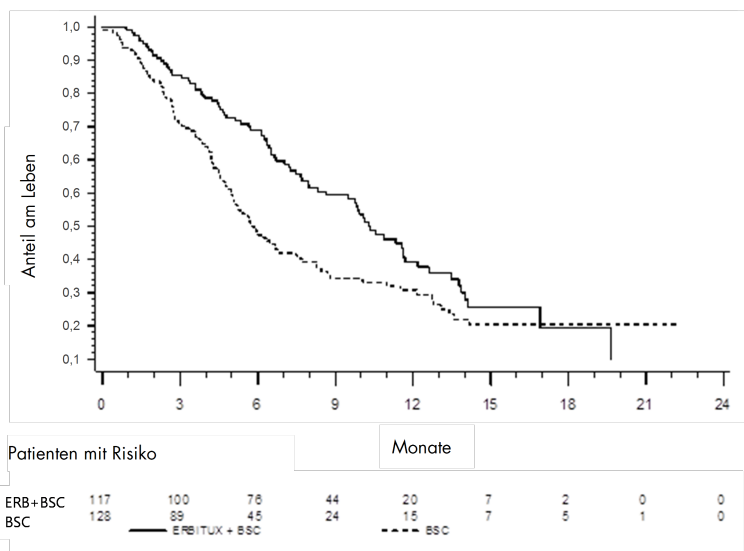


Abbildung 23. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben bei Patienten mit *KRAS*-mutationsnegativem (Wildtyp) metastasiertem Kolorektalkarzinom.

Die Gesamtüberlebensraten, basierend auf Kaplan-Meier-Schätzungen nach 6 und 12 Monaten, waren in der Erbitux (Cetuximab)+BSC-Gruppe bei der *KRAS*-Wildtyp-Untergruppe höher als in der BSC-Gruppe. Dieser Effekt wurde in der Untergruppe mit *KRAS*-Mutationen nicht beobachtet.

Klinische Studie, die die Verwendung von Vectibix (Panitumumab) stützt

Es wurde eine klinische Leistungsstudie durchgeführt, um Daten zu erheben, die den klinischen Nutzen des *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* als diagnostisches Instrument zur Identifizierung von Patienten für eine Behandlung mit Vectibix (Panitumumab) belegen. Ziel der Studie war es, zu beurteilen, ob der mittels des *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* ermittelte Status der *KRAS*-Mutation zur Auswahl von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom (mCRC)

herangezogen werden kann, die von einer Behandlung mit Vectibix (Panitumumab) profitieren werden. Die klinische Studie 20050203 war eine multizentrische, prospektive, offene, randomisierte Phase-3-Studie zur Bewertung der Wirksamkeit von Panitumumab in Kombination mit Oxaliplatin, 5-Fluorouracil (5-FU) und Leucovorin (FOLFOX) im Vergleich zu FOLFOX allein bei Patienten mit zuvor unbehandeltem, rezidivierendem mCRC.

Die in der Studie 20050203 entnommenen und eingelagerten Tumorproben wurden mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit untersucht, um 2 Untergruppen zu identifizieren: KRAS-mutationenspositiv (mutiertes KRAS) und KRAS-mutationensnegativ (Wildtyp-KRAS), je nachdem, ob mindestens 1 oder keine der 7 KRAS-Mutationen in den Codons 12 und 13 von Exon 2 des KRAS-Gens nachgewiesen wurde. In retrospektiven Analysen wurden die Wirksamkeitsdaten aus der Studie 20050203 nach KRAS-Untergruppen stratifiziert. Das primäre Ziel der KRAS-Analyse bestand darin, zu beurteilen, ob eine allgemeine Verbesserung des PFS unter Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX im Vergleich zu FOLFOX allein bei Probanden mit KRAS-Wildtyp-Tumoren signifikant größer war als bei Probanden mit KRAS-Mutanten-Tumoren.

Der vorab festgelegte primäre Wirksamkeitsendpunkt war das progressionsfreie Überleben (PFS) in der Patientengruppe (n = 656) mit KRAS-Wildtyp-metastasiertem Kolorektalkarzinom (mCRC), bewertet durch eine verblindete, unabhängige zentrale Auswertung der Bildgebungsdaten. Zu den weiteren wichtigen Wirksamkeitsendpunkten zählten das Gesamtüberleben (OS) und die Gesamtansprechrate (ORR). Die Wirksamkeitsergebnisse bei Patienten mit KRAS-Wildtyp-mCRC sind in Tabelle 36 und Abbildung 24 dargestellt.

Tabelle 36. Wirksamkeitsergebnisse bei Patienten mit mCRC mit Wildtyp-KRAS

Progressionsfreies Überleben					
	KRAS-Wildtyp-Population	Median (Monate) (95%-KI)	Hazard-Ratio (95%-KI)	p-Wert	ORR (95%-KI)
Panitumumab plus FOLFOX	n = 325	9,6 (9,2; 11,1)	0,80 (0,66; 0,97)	0,02	54 % (48 %, 59 %)
Nur FOLFOX	N = 331	8,0 (7,5; 9,3)			47 % (41 %, 52 %)

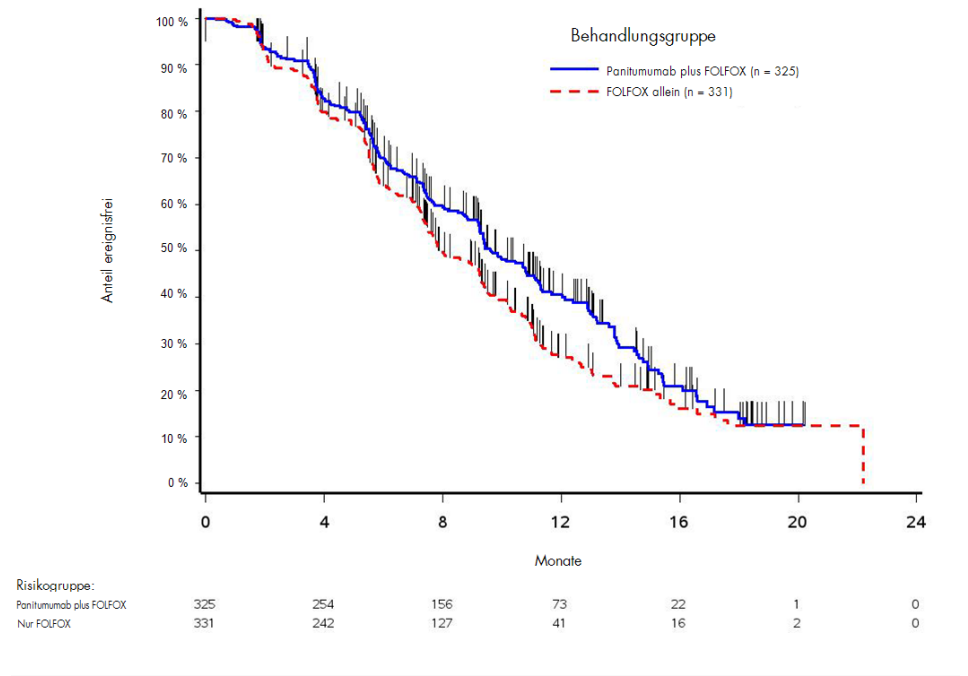


Abbildung 24. Kaplan-Meier-Kurve zum progressionsfreien Überleben (PFS) bei Patienten mit mCRC mit KRAS-Wildtyp.

Bei Patienten mit *KRAS*-mutierten Tumoren betrug das mediane PFS 7,3 Monate (95 % CI: 6,3, 8,0) bei den 221 Patientinnen, die Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX erhielten, im Vergleich zu einem medianen PFS von 8,8 Monaten (95%-KI: 7,7; 9,4) bei den 219 Patientinnen, die FOLFOX allein erhielten (HR = 1,29; 95%-KI: 1,04; 1,62). Das mediane Gesamtüberleben (OS) betrug 15,5 Monate (95 % CI: 13,1, 17,6) bei Patienten, die Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX erhielten, im Vergleich zur medianen Gesamtüberlebenszeit (OS) von 19,3 Monaten (95%-KI: 16,5, 21,8) bei Patienten, die FOLFOX allein erhielten (HR = 1,24, 95%-KI: 0,98, 1,57).

Im Rahmen einer explorativen Analyse des Gesamtüberlebens (OS) mit aktualisierten Daten, die auf den Ereignissen bei 82 % der Patienten mit *KRAS*-Wildtyp-metastasiertem Kolorektalkarzinom (mCRC) basierten, wurde der Behandlungseffekt von Vectibix (Panitumumab) in Kombination mit FOLFOX im Vergleich zu FOLFOX allein geschätzt. Das mediane Gesamtüberleben (OS) bei 325 Patienten mit *KRAS*-Wildtyp-mCRC, die Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX erhielten, betrug 23,8 Monate (95%-KI: 20,0, 27,7) gegenüber 19,4 Monaten (95%-KI: 17,4, 22,6) bei den 331 Patienten, die FOLFOX allein erhielten (HR = 0,83, 95%-KI: 0,70, 0,98). Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

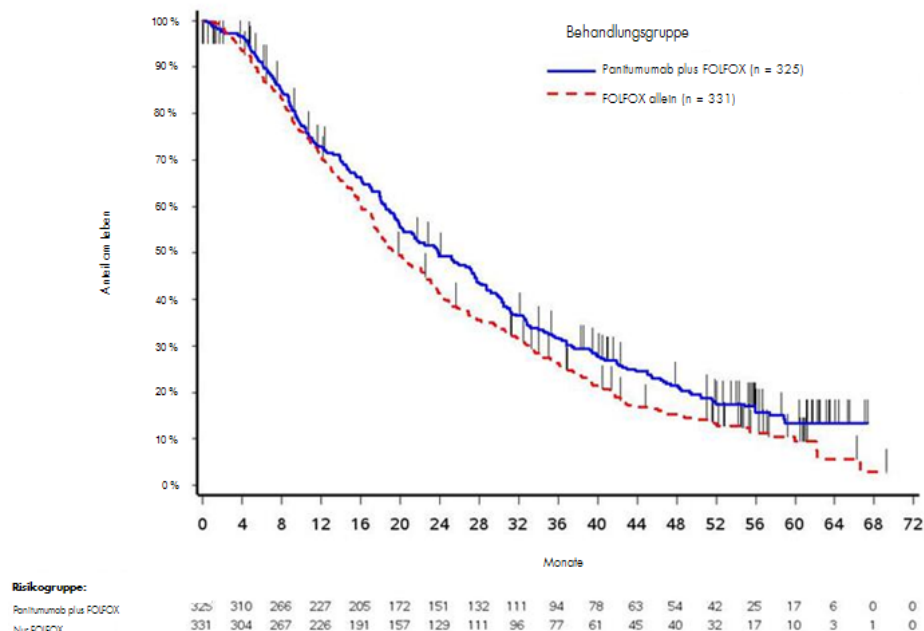


Abbildung 25. Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben (OS) bei Patienten mit mCRC mit KRAS-Wildtyp.

Klinische Studie zur Untermauerung der Anwendung von LUMYKRAS (Sotorasib)

Es wurde eine klinische Leistungsstudie durchgeführt, um die klinische Validität des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit als diagnostisches Hilfsmittel zur Identifizierung von KRAS-G12C-positiven NSCLC-Patienten für eine Behandlung mit LUMYKRAS (Sotorasib) nachzuweisen. Ziel der Studie war es, zu beurteilen, ob der mittels des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ermittelte Status der G12C-Mutation zur Auswahl von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC herangezogen werden kann, die von einer Behandlung mit LUMYKRAS (Sotorasib) profitieren. Die klinische Studie 20170543 war eine offene,

multizentrische Phase-1/2-Studie zur Bewertung der Wirksamkeit und Sicherheit von LUMYKRAS (Sotorasib) bei erwachsenen Probanden mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, die die KRAS-G12C-Mutation aufweisen.

Die Daten aus der Primäranalyse des NSCLC-Phase-2-Teils dieser Studie wurden herangezogen, um die klinische Validität des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit als diagnostisches Instrument zu untermauern.

Die Aufnahme in die Studie war auf Probanden mit KRAS-G12C-Mutation im NSCLC beschränkt, was anhand eines lokalen Laborbefunds festgestellt und durch eine zentrale Untersuchung unter Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bestätigt wurde.

Der primäre Endpunkt des NSCLC-Phase-2-Teils dieser Studie bestand darin, die objektive Ansprechrates (ORR) der Tumoren zu bewerten, die anhand der Kriterien der „Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“ (RECIST), Version 1.1, für LUMYKRAS (Sotorasib) als Monotherapie bei Probanden mit KRAS-G12C-Mutationen in ihren fortgeschrittenen Tumoren ermittelt wurde.

Von den insgesamt 126 Patienten mit NSCLC wurden 124 in die komplette Analyse aufgenommen. Zwei (2) Probanden wurden ausgeschlossen, da sie gemäß der verblindeten, unabhängigen, zentralisierten Begutachtung (BICR) nicht über mindestens 1 messbare Läsion verfügten. Der primäre Endpunkt ORR (Komplettremission + Teilremission), gemessen mittels Computertomographie oder Magnetresonanztomographie und gemäß RECIST 1.1 durch das BICR-Labor bei Probanden mit KRAS-G12C-mutiertem NSCLC bewertet, betrug 37,1 % (46 von 124 Probanden; 95%-KI: 28,6–46,2 %); drei (3) Probanden (2,4 %) erreichten ein vollständiges Ansprechen und 43 Probanden (34,7 %) ein partielles Ansprechen.*

*Basierend auf den Daten zum Stichtag 1. Dezember 2020.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In der vorliegenden Hilfe zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ in unserem Technik-Support-Center unter www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx (Kontaktdaten finden Sie unter www.qiagen.com). Die Wissenschaftler des Technischen Service von QIAGEN stehen Ihnen jederzeit gerne zur Verfügung, um Ihre Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch sowie zu Proben- und Assay-Technologien zu beantworten (Kontaktdaten finden Sie unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Ungültige Ergebnisse

- | | |
|---|--|
| a. Die Lagerbedingungen für eine oder mehrere Komponenten entsprachen nicht den Anweisungen in „Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Spezimen“ auf Seite 20. | Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett) und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit. |
| b. Das <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit ist abgelaufen. | Prüfen Sie die Lagerbedingungen und das Verfallsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie gegebenenfalls ein neues <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit. |

NTC-Proben zeigen positive Ergebnisse im FAM-Kanal

- | | |
|---|---|
| Kontamination bei Vorbereitung der PCR. | Wiederholen Sie die PCR in Replikaten mit noch unbenutzten Reagenzien.

Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils direkt nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.

Achten Sie darauf, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. |
|---|---|

Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von QIAGEN wird jede Charge von *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit anhand vorgegebener Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

Literaturangaben

Literaturverweise

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. Katalog somatischer Mutationen bei Krebserkrankungen: 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).

Weiterführende Literaturverweise

- 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 (Mai 20 suppl; abstr 4000).
- Chaff, 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-Dokument 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. Präsentiert am 27. Juni 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.
- Lièvre, 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, (20. Mai, 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, (20. Mai, Suppl.; Abstr. 2).

Symbole

Die folgenden Symbole werden in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet:

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Enthält Reagenzien, die für 24 Reaktionen ausreichen.
	Verfallsdatum
	CE-Kennzeichnung für Europa
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargenbezeichnung
	Materialnummer (d. h. Kennzeichnung von Komponenten)
	Internationale Artikelnummer
	Enthält

Symbol

Bedeutung des Symbols



Komponenten



Nummer

Rn

R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Gebrauchsanweisung beachten



Vor Sonneneinstrahlung schützen



Vorsicht, Begleitdokumente beachten



Warnung/Vorsicht

Kontakt

Technische Unterstützung und weitere Informationen finden Sie in unserem TechniksUPPORT-Zentrum unter support.qiagen.com.

Anhang 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit – Handbuch zum Protokoll

Dieser Abschnitt enthält Anweisungen zur Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit mit Rotor-Gene Q-Software, Version 2.3.5 im offenen Modus (d. h. ohne Verwendung des *therascreen* KRAS Assay Package).

Allgemeine Informationen

- Informationen zu den benötigten Materialien finden Sie unter „Zusätzlich benötigtes Material“ auf Seite 14.
- Vollständige Anweisungen zur Probenvorbereitung und Probenanordnung finden Sie unter „Protokoll: Bewertung von DNA-Proben“ auf Seite 27 und „Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen“ auf Seite 42.

Protokoll: Erstellung eines Temperaturprofils

Erstellen Sie vor Beginn ein Temperaturprofil für die *KRAS*-Analyse. Die Zyklusparameter für Probenbestimmung und Mutationsbestimmung sind identisch.

Verfahren

Die Zyklusparameter sind in Tabelle 37 aufgeführt.

Tabelle 37. Zyklusparameter

Zyklen	Temperatur	Zeit	Datenerfassung
1	95 °C	15 Minuten	Keine
40	95 °C	30 Sekunden	Keine
	60 °C	60 Sekunden	Green und Yellow

1. Doppelklicken Sie auf das Symbol der Rotor-Gene Q-Software, Version 2.3.5 Software auf dem Desktop des Laptops, der an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät angeschlossen ist. Wählen Sie im daraufhin angezeigten Fenster „New Run“ (Neuer Lauf) die Registerkarte **Advanced** (Erweitert) aus.
2. Um eine neue Vorlage zu erstellen, wählen Sie **Empty Run** (Leerer Lauf) aus und klicken Sie anschließend auf **New** (Neu), um den „New Run Wizard“ (Assistenten für neuen Lauf) zu öffnen.
3. Wählen Sie als Rotortyp den **72-Well Rotor** (72-Well-Rotor) aus. Vergewissern Sie sich, dass der Schließring angebracht ist, und setzen Sie ein Häkchen im Kästchen **Locking Ring Attached**. Klicken Sie auf **Next** (Weiter) (Abbildung 26).

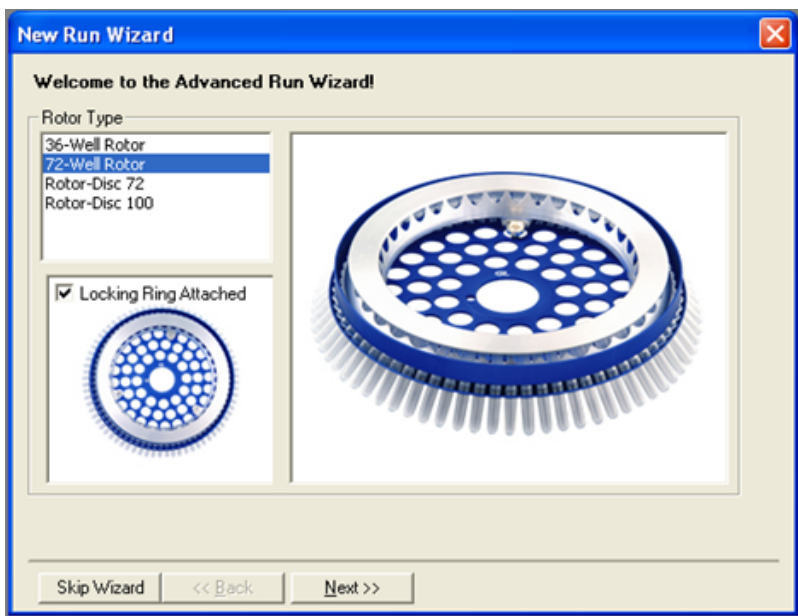
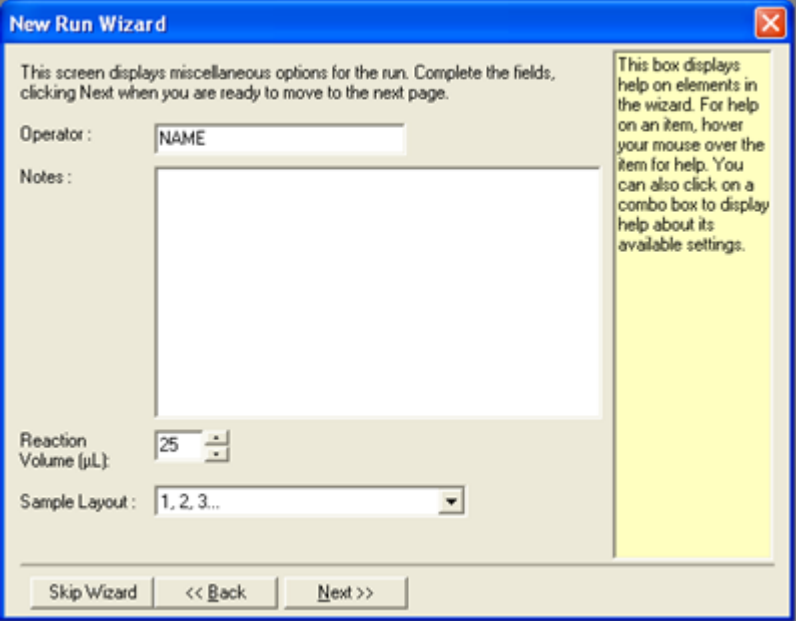


Abbildung 26. Dialogfeld „New Run Wizard“. 1 = „Rotor Type“ (Rotortyp), 2 = Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht), 3 = „Next“ (Weiter).

4. Geben Sie den Namen des Bedieners ein. Fügen Sie gegebenenfalls Anmerkungen hinzu und geben Sie das Reaktionsvolumen mit **25** an. Stellen Sie sicher, dass das Feld **Sample Layout** (Probenkonfiguration) den Wert **1, 2, 3...** enthält. Klicken Sie auf **Next** (Abbildung 27).



New Run Wizard

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

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

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

Abbildung 27. Eingabe des Bedienernamens und der Reaktionsvolumina. 1 = Dialogfeld „Operator“, 2 = Dialogfeld „Notes“, 3 = Dialogfeld „Reaction Volume“, 4 = Sample Layout, 5 = Next.

5. Klicken Sie im Fenster „New Run Wizard“ (Assistent für neuen Lauf) (Abbildung 28) auf **Edit Profile** (Profil bearbeiten) und programmieren Sie das Temperaturprofil gemäß den Angaben in den folgenden Schritten.

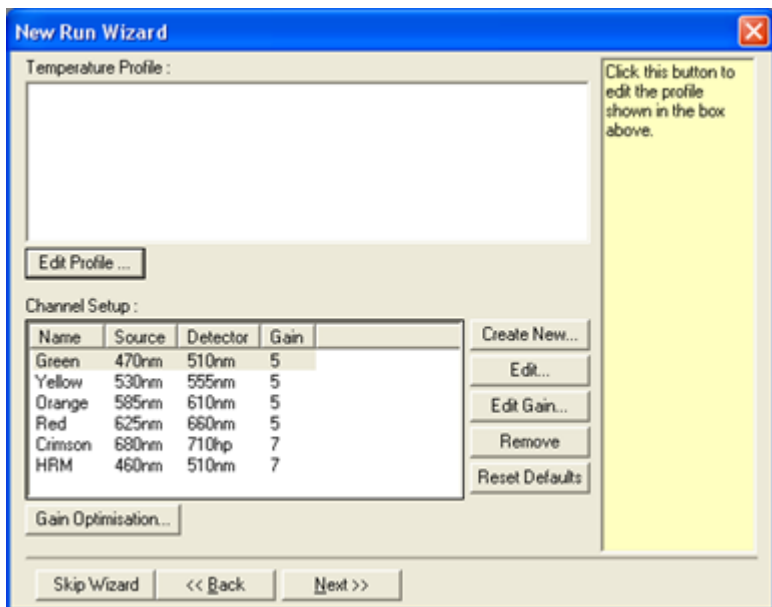


Abbildung 28. Bearbeiten des Profils.

6. Klicken Sie auf **Insert after** (Einfügen nach) und wählen Sie **New Hold at Temperature** (Neue Haltetemperatur) (Abbildung 29).

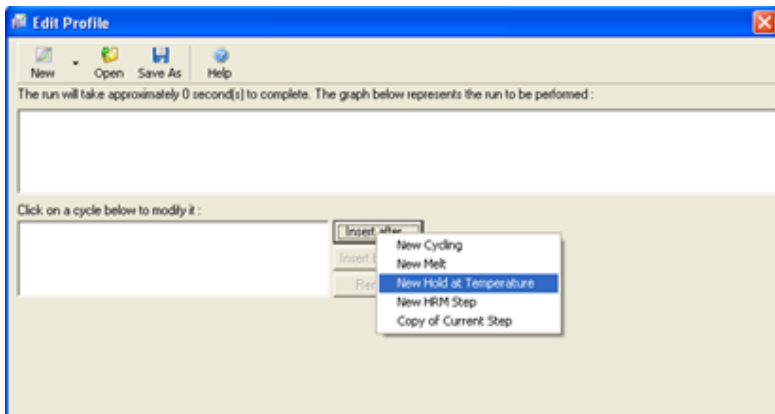


Abbildung 29. Einfügen eines ersten Inkubationsschritts. 1 = „Insert after“ (Einfügen nach), 2 = „New Hold at Temperature“ (Neue Haltetemperatur).

7. Stellen Sie den Wert im Feld **Hold Temperature** (Haltetemperatur) auf **95 °C** und im Feld **Hold Time** (Haltedauer) auf **15 Min. 0 Sek.** ein. Klicken Sie auf **Insert After** und wählen Sie dann **New Cycling** (Neuer Zyklus) (Abbildung 30).

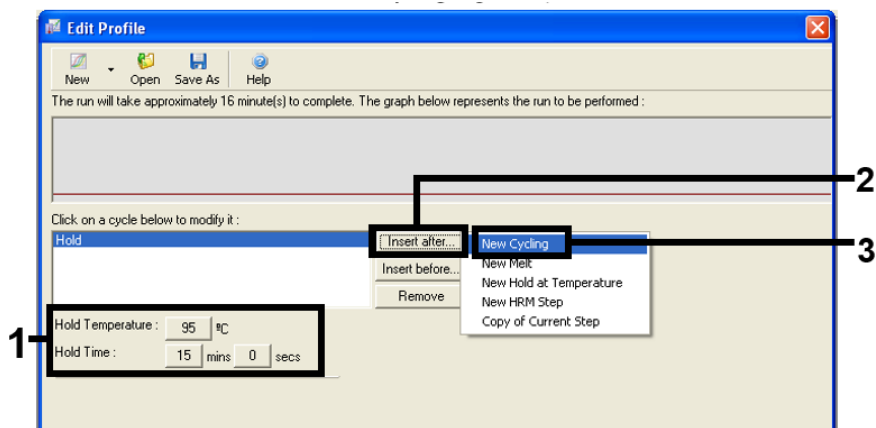


Abbildung 30. Anfänglicher Inkubationsschritt bei 95 °C. 1 = Hold Temperature und Hold Time, 2 = Insert after, 3 = New Cycling.

8. Stellen Sie die Anzahl der Zykluswiederholungen auf **40** ein. Wählen Sie den ersten Schritt aus und stellen Sie diesen auf **95 °C für 30 Sek.** (Abbildung 31) ein.

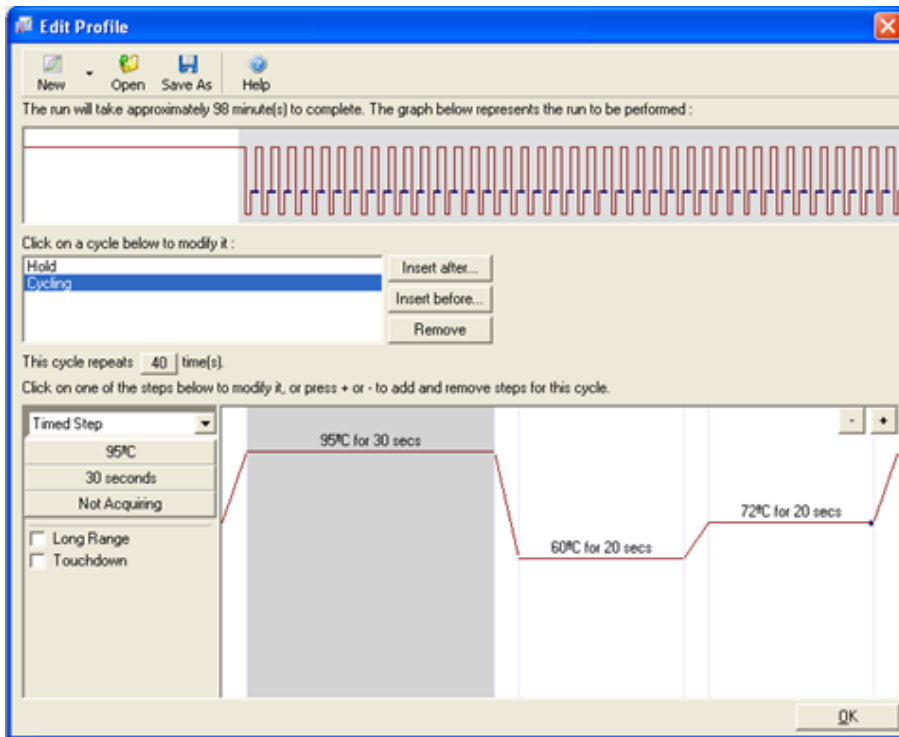


Abbildung 31. Zyklusschritt bei 95 °C. 1 = Feld für Zykluswiederholungen, 2 = Temperatureinstellung für Schritt eins, 3 = Zeiteinstellung für Schritt eins.

9. Markieren Sie den zweiten Schritt und stellen Sie diesen auf **60°C for 60 secs** (60 °C für 60 Sek.) ein. Klicken Sie auf **Not Acquiring** (Keine Erfassung) (Abbildung 32), um die Datenerfassung während dieses Schritts zu aktivieren.

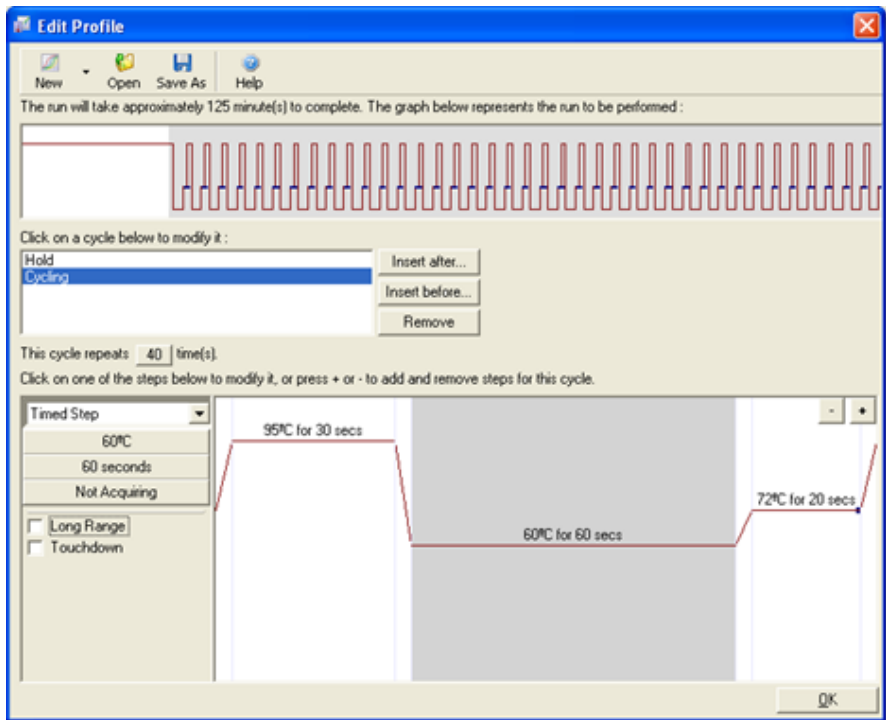


Abbildung 32. Zyklusschritt bei 60 °C. 1 = Temperatur- und Zeiteinstellung für den zweiten Schritt, 2 = Not Acquiring.

10. Wählen Sie aus der Liste **Green** (Grün) und **Yellow** (Gelb) aus. Klicken Sie dann auf ➤, um sie in die Liste „Acquiring Channels“ (Erfassende Kanäle) zu verschieben. Klicken Sie auf **OK** (Abbildung 33).

Acquisition

Same as Previous : (New Acquisition) ▼

Acquisition Configuration :

Available Channels :

Name
Crimson
HRM
Orange
Red

> < <<

Acquiring Channels :

Name
Green
Yellow

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

Dye Chart >>

Dye Channel Selection Chart

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

Abbildung 33. Erfassung im Zyklusschritt bei 60 °C.

- Markieren Sie den dritten Schritt und klicken Sie auf –, um diesen zu löschen. Klicken Sie auf **OK** (Abbildung 34).

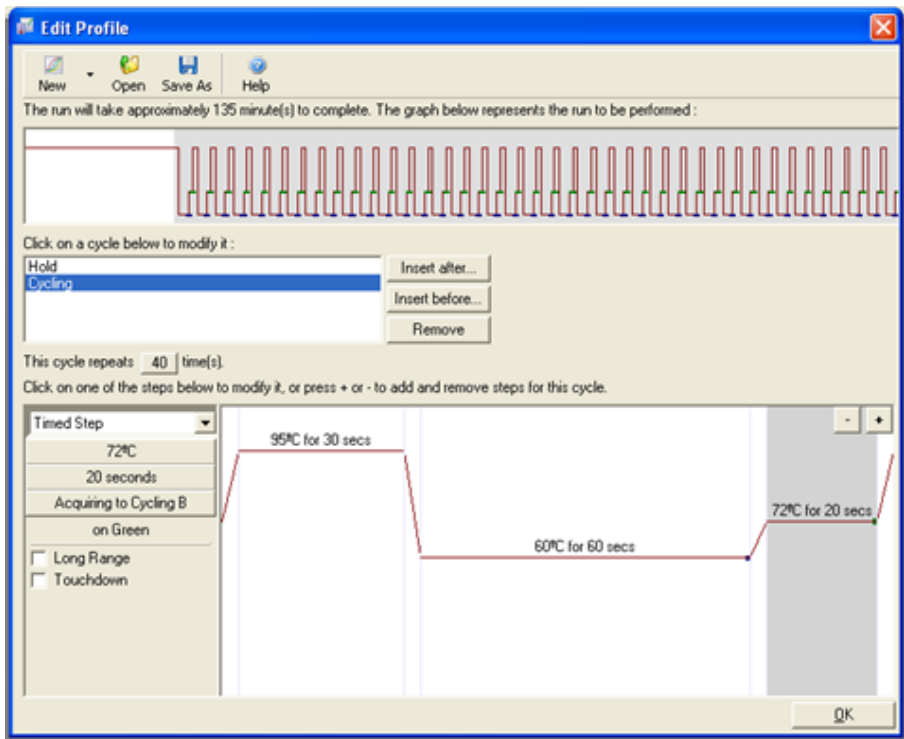


Abbildung 34. Entfernen des Extensionsschritts.

12. Klicken Sie im nächsten Fenster auf **Gain Optimization** (Verstärkungsoptimierung) (Abbildung 35).

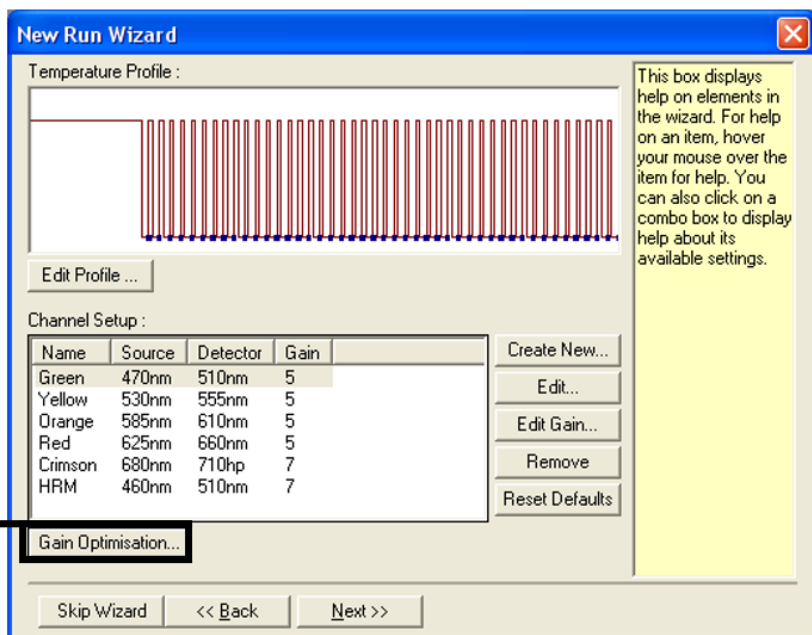


Abbildung 35. „Gain Optimization“ (Verstärkungsoptimierung).

- Klicken Sie auf **Optimize Acquiring** (Erfassung optimieren). Es werden für jeden Kanal die Kanaleinstellungen angezeigt. Klicken Sie auf **OK**, um diese Standardwerte zu übernehmen. (Abbildung 36).

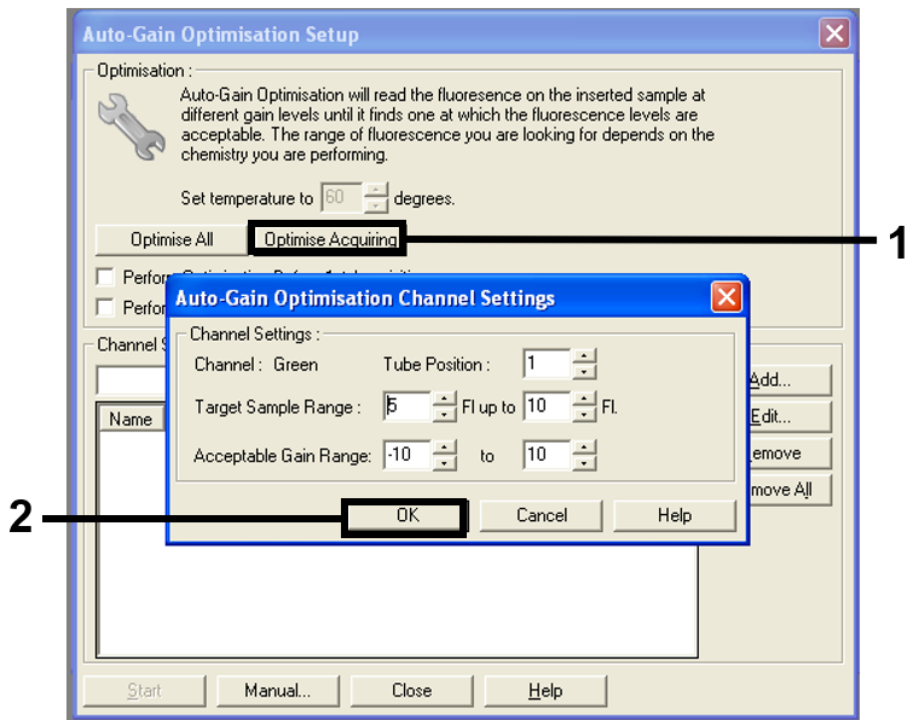


Abbildung 36. Automatische Verstärkungsoptimierung für den Kanal Green.

14. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Perform Optimization before 1st Acquisition** (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen) und klicken Sie dann auf **Close** (Schließen), um zum Assistenten zurückzukehren (Abbildung 37).

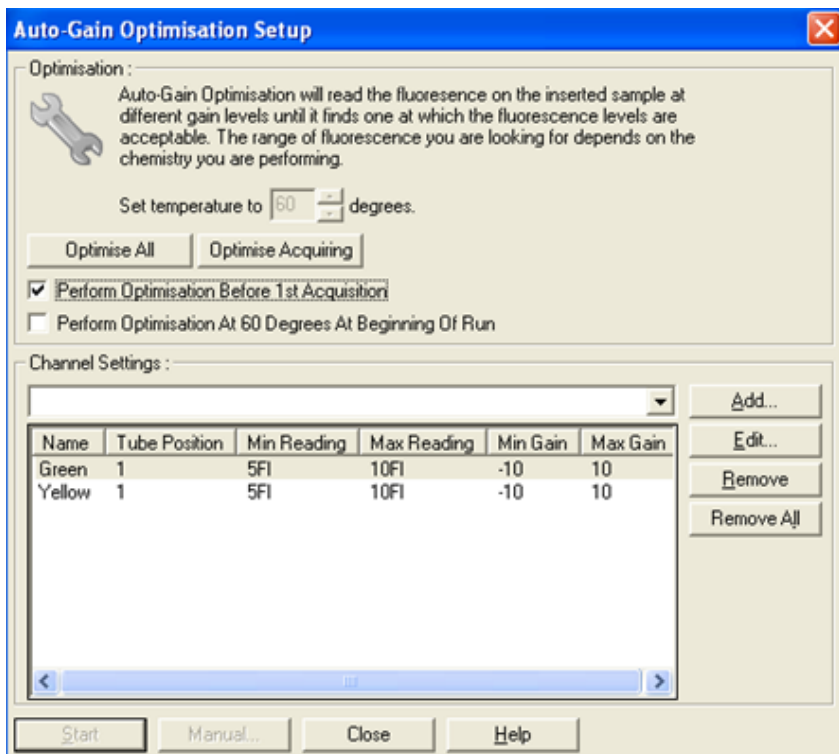


Abbildung 37. Auswahl des grünen und gelben Kanals.

15. Klicken Sie auf **Next**. Klicken Sie dann auf **Save** (Speichern), um die Vorlage an einem geeigneten Speicherort zu speichern.

Protokoll: Probenbewertung (manuell)

Dieses Protokoll dient der Bestimmung der gesamten amplifizierbaren DNA in Proben und sollte vor der KRAS-Mutationsanalyse durchgeführt werden.

- Bereiten Sie die Proben wie unter „Protokoll: Bewertung von DNA-Proben“ auf Seite 27 beschrieben vor!
- Richten Sie den PCR-Lauf auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät ein, wie in „Protokoll: Einrichtung des theascreen KRAS PCR RGQ“ unten beschrieben.
- Nachdem der Lauf abgeschlossen ist, analysieren Sie die Daten gemäß den Anweisungen in Sample assessment data analysis.

Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen (manuell)

Sobald eine Probe die Probenbewertung bestanden hat, kann sie auf KRAS-Mutationen untersucht werden.

- Bereiten Sie die Proben wie unter „Protokoll: Bewertung von DNA-Proben“ auf Seite 27 beschrieben vor!
- Richten Sie den PCR-Lauf auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-Gerät ein, wie in „Protokoll: Einrichtung des theascreen KRAS PCR RGQ“ unten beschrieben.
- Nachdem der Lauf abgeschlossen ist, analysieren Sie die Daten gemäß den Anweisungen in Sample assessment data analysis.

Protokoll: Einrichtung des *theascreen* KRAS PCR RGQ

1. Öffnen Sie Rotor-Gene Q-Software, Version 2.3.5 und das entsprechende erstellte Temperaturprofil.
2. Erstellen Sie das Temperaturprofil gemäß „Protokoll: Erstellung eines Temperaturprofils“ auf Seite 149.

Vergewissern Sie sich, dass der korrekte Rotor ausgewählt ist und aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Locking Ring Attached**. Klicken Sie auf **Next** (Abbildung 38).

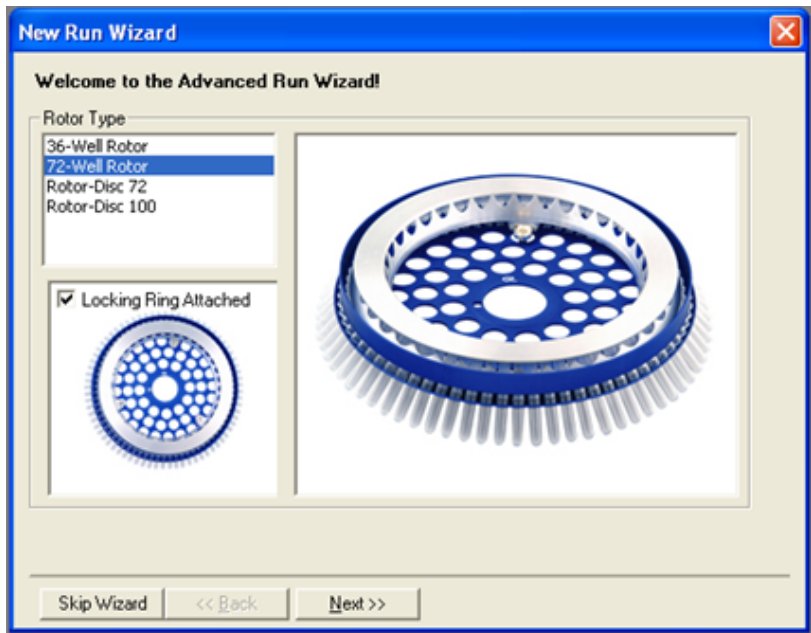


Abbildung 38. New Run Wizard – Dialogfeld und Begrüßungsbildschirm. 1 = Rotor type (Rotortyp),
2 = Kontrollkästchen Locking Ring Attached, 3 = Next (Weiter).

3. Geben Sie den Namen des Bedieners ein. Geben Sie etwaige Anmerkungen ein und stellen Sie sicher, dass das Feld **Reaction Volume** (Reaktionsvolumen) auf **25** eingestellt ist und das Feld **Sample Layout** (Probenkonfiguration) den Wert **1, 2, 3...** enthält. Klicken Sie auf **Next** (Abbildung 39).

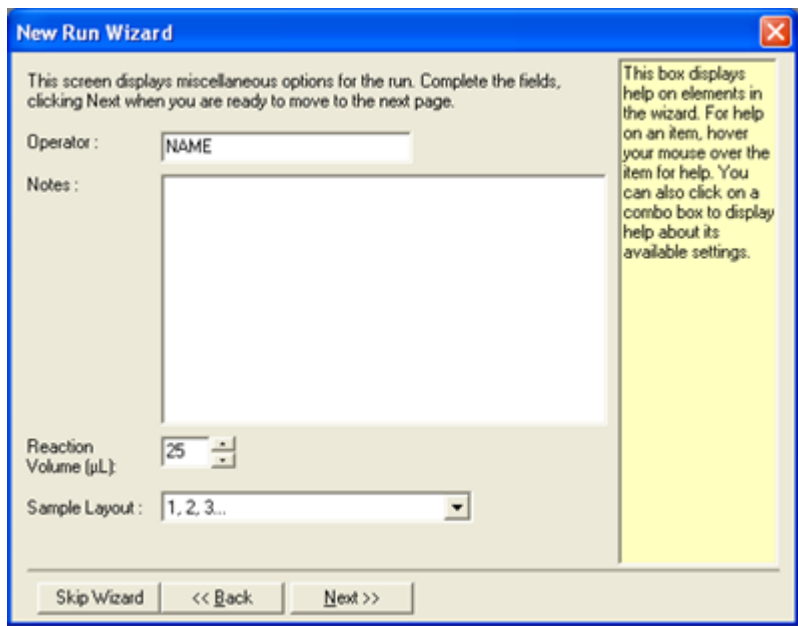


Abbildung 39. Dialogfeld „New Run Wizard“. 1 = Felder „Operator“ (Bediener) und „Notes“ (Notizen), 2 = Felder „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen) und „Sample Layout“ (Probenkonfiguration), 3 = „Next“ (Weiter).

4. Belassen Sie im nächsten Fenster alle Werte so, wie sie angezeigt werden. Es ist keine Bearbeitung erforderlich, da das Temperaturprofil gemäß den Anweisungen in „Protokoll: Erstellung eines Temperaturprofils“ auf Seite 149 erstellt wurde. Klicken Sie auf **Next** (Abbildung 40).

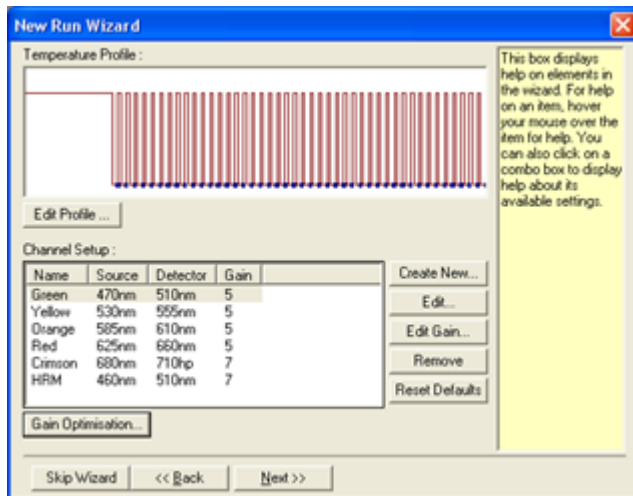


Abbildung 40. Dialogfeld „New Run Wizard“ und Bildschirm zur Temperaturbearbeitung. 1 = „Next“ (Weiter).

- Überprüfen Sie die Zusammenfassung und klicken Sie auf **Start Run**, um die Laufdatei zu speichern und den Lauf zu starten (Abbildung 41).

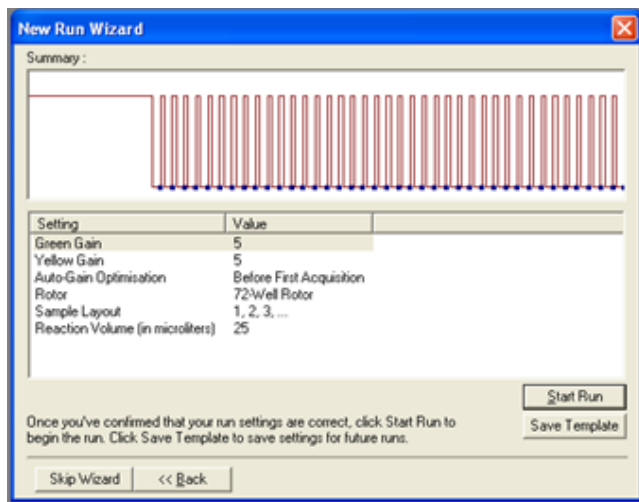


Abbildung 41. Dialogfeld „New Run Wizard“. 1 = „Start Run“ (Lauf starten).

Hinweis: Nach dem Start des Laufs wird ein neues Fenster geöffnet, in dem Sie entweder sofort die Probenamen eingeben oder auf **Finish** (Fertigstellen) klicken können, um diese später einzugeben, indem Sie während des Laufs oder nach dessen Abschluss auf die Schaltfläche **Sample** (Probe) klicken.

Wenn Sie auf **Finish and Lock Samples** (Fertigstellen und Proben sperren) klicken, können die Probenamen nicht mehr bearbeitet werden. Gehen Sie beim Eingeben der Probenamen besonders sorgfältig vor, um einen korrekten Testablauf und eine korrekte Analyse der Proben zu gewährleisten.

Hinweis: Bei der Benennung von Proben sollten leere Wells in der Spalte „Name“ (Name) leer gelassen werden.

- Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs je nach Bedarf gemäß den Abschnitten Sample assessment data analysis oder KRAS mutation detection analysis,.

7. Falls Quantifizierungsberichte erforderlich sind, klicken Sie in der Symbolleiste der Rotor-Gene Q-Laufdatei auf das Symbol **Reports** (Berichte).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.- Nr.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: 1 Kontrollassay, 7 Assays für Mutationen, Positivkontrolle, Wasser, Taq-DNA-Polymerase	874011
Rotor-Gene Q und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzanalysator mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) sowie einem HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeitsleistung; Installation und Schulung sind nicht enthalten	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-Cycler und hochauflösender Schmelzanalysator mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, purpurrot) sowie einem HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeitsleistung, Installation und Schulung	9002033
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionseinrichtung mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1.000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen	981106
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – zur Aufreinigung genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Isolierungen: QIAamp Mini Spin-Säulen, Proteinase K, Puffer, Reagenzien und Sammelröhrchen (2 ml)	60404

Produkt	Inhalt	Kat.- Nr.
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Isolierungen: QIAamp Mini Spin-Säulen, Proteinase K, Puffer, Reagenzien und Sammelröhrchen (2 ml)	56404

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie in der Gebrauchsanweisung für das jeweilige QIAGEN Kit. Gebrauchsanweisungen für QIAGEN Kits sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Revisionsverlauf des Dokuments

Revision	Beschreibung
R5, November 2019	Hersteller i. S. d. Gesetzes geändert (Titelseite) Symbol „EC + REP“ von der Titelseite und aus dem Abschnitt „Symbole“ entfernt Namen des Instruments von Rotor-Gene Q MDx zu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM geändert, um Übereinstimmung mit dem Geräteetikett zu erreichen. Protokoll „Nachweis von KRAS-Mutationen“ um zusätzlichen Schritt beim Ansetzen der Master-Mixe ergänzt Wertkorrekturen in den Spalten „Häufigkeit“ und „95%-Konfidenzintervall“ in Tabelle 9. Prozentuale Gesamtübereinstimmung für CRC von 96,4 % auf 96,82% aktualisiert Wertkorrekturen in der Spalte „LOD C95“ in Tabelle 14

Revision	Beschreibung
R6, November 2020	Version der therascreen KRAS Assay Package Software auf 3.0.3 korrigiert Dieses Dokument wurde durchgehend hinsichtlich der Verfügbarkeit des Assay-Pakets zum Herunterladen unter www.qiagen.com aktualisiert. Im gesamten Dokument Hinweis zu Maßnahmen in Bezug auf Markierungen für die NSCLC-Indikation hinzugefügt, die aktualisiert wurden, um die korrekte Funktionsweise des Kits zu gewährleisten In den Anleitungen dieses Dokuments wurden durchgehend Hinweise zum korrekten Mischen der Reagenzien hinzugefügt. Der Abschnitt „Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“ wurde aktualisiert. Hinweis zur korrekten Platzierung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments hinzugefügt Es wurde ein Hinweis zur Verwendung von trockenen Skalpellen hinzugefügt. Protokoll aktualisiert: „Bewertung von DNA-Proben“ – Hinzufügung weiterer wichtiger Punkte vor Beginn. Protokoll aktualisiert: Abschnitt „Nachweis von KRAS-Mutationen“ – Hinzufügung weiterer wichtiger Punkte vor Beginn sowie eines Hinweises für NSCLC-Proben zur Interpretation verschiedener Markierungen als „ungültig“. Abschnitt „Markierungen der Rotor-Gene Q therascreen KRAS Assay Package Software“ um Tabellen ergänzt, welche die RGQ-Markierungen, ihre Bedeutung und die empfohlenen Maßnahmen veranschaulichen Interpretation der Ergebnisse bezüglich Maßnahmen im Zusammenhang mit Markierungen aktualisiert. Der Abschnitt „Leitfaden zur Fehlerbehebung“ wurde aktualisiert und um Tabellen ergänzt, die die RGQ-Markierungen, deren Bedeutung sowie empfohlene Maßnahmen veranschaulichen Der Abschnitt „Einschränkungen“ wurde aktualisiert, um Informationen zu NSCLC-Proben hinzuzufügen.

Revision	Beschreibung
	Der Abschnitt „Leistungsmerkmale“ wurde überarbeitet, um die Daten in den Tabellen zu aktualisieren. Der Abschnitt „DNA-Input und Linearität“ wurde aktualisiert Der Abschnitt „Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit“ wurde aktualisiert. Der Abschnitt „Variabilität bei der Handhabung von Proben“ wurde aktualisiert. Abschnitt „Klinische Leistungsmerkmale“ hinzugefügt. Der Abschnitt zur Analyse der Probenbewertungsdaten wurde aktualisiert, um die empfohlene Lösung für den CT-Wert des Kontroll-Assays von > 32 anzupassen. Die Kennzeichnung für die europäische Konformität wurde dem Abschnitt „Symbole“ hinzugefügt. Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ (manuell) hinsichtlich Maßnahmen im Zusammenhang mit Markierungen aktualisiert. Der Abschnitt „Nachweis von KRAS-Mutationen“ des Protokolls wurde aktualisiert und um Anweisungen zur Herstellung der Master-Mixe ergänzt.

Revision	Beschreibung
R7, Mai 2026	Der Abschnitt „Zusätzliches benötigtes Material“ wurde aktualisiert. Der Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ wurde aktualisiert, um Gefahren- und Sicherheitshinweise hinzuzufügen. Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Spezimen wurde aktualisiert, um Informationen zur Lagerung von NSCLC-Proben hinzuzufügen. Abschnitt Protokoll: DNA-Extraktion aktualisiert. Anmerkung zur Taq-DNA-Polymerase im Abschnitt „Verfahren“ von Protokoll: Bewertung von DNA-Proben hinzugefügt. Im Abschnitt „Auswertung der Ergebnisse“ wurden RGQ-Markierungen hinzugefügt. Abschnitt „Einschränkungen“ aktualisiert. • Informationen zur Prävalenzrate bei seltenen Erkrankungen hinzugefügt. • Die Textausrichtung wurde angepasst, um deutlich zu machen, dass das Testdesign sowohl für CRC-Proben als auch für NSCLC-Proben gilt. Mehrere Abschnitte in Performance Characteristics for CRC Specimens regarding NSCLC and CRC claims aktualisiert. PC_MUTATION_ASSAY_FAIL und PC_CTRL_INVALID_DATA in der Spalte „Markierungen“ von Hilfe zur Fehlerbehebung wieder hinzugefügt. Markierungen in Hilfe zur Fehlerbehebung aktualisiert. Der Verweis auf das QIAamp-Kit in Bestellinformationen wurde korrigiert. Wesentliche Aktualisierung des Layouts.

Vereinbarung über eine eingeschränkte Lizenz für das *therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennt der Käufer oder Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und dieser Gebrauchsanweisung bereitgestellten Protokollen und nur mit den im Panel enthaltenen Komponenten verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer geistigen Eigentumsrechte keine Lizenz zur Verwendung oder Kombination der Komponenten dieses Panels mit anderen Komponenten, die nicht in diesem Panel enthalten sind, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt bereitgestellten Protokollen, dieser Gebrauchsanweisung sowie zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN weder gründlich getestet noch optimiert. QIAGEN übernimmt weder eine Garantie noch eine Gewähr dafür, dass sie die Rechte Dritter nicht verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN ist berechtigt, die Untersagungen in dieser begrenzten Lizenzvereinbarung vor einem beliebigen Gericht einzuklagen und wird alle seine Untersuchungs- und Gerichtskosten, einschließlich der Anwaltsgebühren, in jedwedem Verfahren zur Durchsetzung dieser begrenzten Lizenzvereinbarung oder seiner geistigen Eigentumsrechte an dem Panel und/oder seinen Komponenten zurückfordern.

Aktualisierte Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, *therascreen*®, HotStarTaq®, MinElute®, Rotor-Disc®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, RNeasy® (QIAGEN-Gruppe); Balversa™ (Janssen Research & Development, LLC), TaqMan® (Roche-Gruppe). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

Nicht zur Verwendung mit Stuhlproben bestimmt.

Nicht zur Verwendung mit Urinproben bestimmt.

Nicht zur Verwendung mit extrazellulärer Nukleinsäure aus Blutproben bestimmt.

Nicht zur Verwendung mit zellfreien Knochenmarkproben bestimmt.

Nicht zur Verwendung mit Speichelproben bestimmt.

DER KAUF DIESES PRODUKTS GEWÄHRT DEM KÄUFER RECHTE IM RAHMEN BESTIMMTER ROCHE-PATENTE ZUR NUTZUNG DES PRODUKTS AUSSCHLIESSLICH ZUR ERBRINGUNG VON IN-VITRO-DIAGNOSTIKDIENSTLEISTUNGEN FÜR DEN MENSCHEN. MIT DER VORLIEGENDEN VEREINBARUNG WIRD KEINE ALLGEMEINE PATENT- ODER SONSTIGE LIZENZ JEDLICHER ART GEWÄHRT, DIE ÜBER DIESES SPEZIFISCHE NUTZUNGSRECHT AUS DEM KAUF HINAUSGEHT.

05/2026 HB-1861-007 1134665 © 2026 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

