

April 2022

therascreen[®] KRAS RGQ PCR Kit

Gebrauchsanweisung (Handbuch)



Version 1



Qualitatives In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

Zur Verwendung mit dem QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1,
40724 Hilden, DEUTSCHLAND



1127513DE

Inhalt

Verwendungszweck	5
Zusammenfassung und Erläuterung	6
Verfahrensprinzip	7
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	11
Kit-Inhalt	11
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	12
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	14
Sicherheitshinweise	14
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	14
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	16
Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Spezimen	17
Verfahren	19
Protokoll: DNA-Probenbestimmung	22
Interpretation der Ergebnisse (manuell)	36
Einstellungen für die Analyse in der Software	36
Analyse der Daten aus der Probenbestimmung	37
Probenanalyse	40
Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen	46
Interpretation der Ergebnisse	60
Analyse und Mutationsergebnisse	60
Grenzen des Assays	63
Leistungsmerkmale	64

Analytische Leistung	64
Cut-off-Wert	64
Leerwertgrenze	65
Vergleich mit der analytischen Referenzmethode: CRC.....	65
Vergleich mit der analytischen Referenzmethode: NSCLC.....	68
Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)	70
DNA-Ausgangsmenge und Linearität.....	72
Störsubstanzen	76
Kreuzkontamination	77
Exklusivität/Kreuzreaktivität	78
Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit.....	80
Variabilität der Probenhandhabung.....	93
Äquivalenz der Probengewinnungsmethoden (nur NSCLC)	95
Klinische Leistungsmerkmale	98
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	105
Von der <i>therascreen</i> KRAS Assay Package Software angezeigte Markierungen ...	106
Qualitätskontrolle.....	112
Literatur	113
Symbole	116
Kontakt.....	117
Anhang 1: <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.....	118
Anhang 2: Installation der <i>therascreen</i> KRAS Assay Package Software	135
Bestellinformationen	139
Revisionsverlauf des Dokuments.....	141

Verwendungszweck

Beim *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit handelt es sich um einen qualitativen Realtime-PCR-Assay für den Nachweis von 7 somatischen Mutationen in den Codons 12 und 13 des humanen KRAS-Onkogens auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument. Das Kit ist zur Verwendung mit DNA vorgesehen, die aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE-)Gewebeproben des Kolorektalkarzinoms (Colorectal Carcinoma, CRC) oder des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) extrahiert wurde. Die Gewebeproben werden mittels Exzision, Stanzbiopsie oder Feinnadelbiopsie gewonnen.

Somatische Mutationen im KRAS-Gen sind potenzielle prädiktive Biomarker einer Resistenz gegen Therapien, die gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (Human Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) gerichtet sind, wie z. B. Panitumab und Cetuximab zur Behandlung des CRC. Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist auch als Hilfsmittel bei der Identifizierung von NSCLC-Patienten zur Behandlung mit Sotorasib (LUMYKRAS[®]) auf Grundlage einer nachgewiesenen KRAS-G12C Mutation vorgesehen.

Somatische Mutationen im KRAS-Gen können auch als potenzieller prädiktiver Biomarker zur Unterstützung von Behandlungsentscheidungen bei anderen NSCLC-Therapien dienen.

Der Mutationsstatus des Patienten wird zusammen mit anderen Krankheitsfaktoren von einem Arzt beurteilt, damit eine Therapieentscheidung getroffen werden kann. Therapieentscheidungen für Krebspatienten dürfen keinesfalls ausschließlich auf dem KRAS-Mutationsstatus beruhen.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist nicht für die Diagnose eines CRC, eines NSCLC oder sonstiger Erkrankungen ausgelegt.

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

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

Zusammenfassung und Erläuterung

In menschlichen Karzinomen treten häufig Mutationen des KRAS-Onkogens auf (1–4). Das auf ARMS®- (Allele Refractory Mutation System) und Scorpions®-Technologie (5, 6) basierende *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ermöglicht den Nachweis von 7 Mutationen in den Codons 12 und 13 des KRAS-Onkogens in einem Hintergrund genomischer Wildtyp-DNA (Tabelle 1). Die 7 mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachweisbaren Mutationen machen laut den Daten in der COSMIC-Datenbank (2015 v72) über 95 % aller nachgewiesenen KRAS-Mutationen bei CRC-Patienten sowie > 88 % aller nachgewiesenen Mutationen bei NSCLC-Patienten aus (7).

Tabelle 1. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs

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 wurden dem *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) entnommen.

Der Test ist hochspezifisch und -sensitiv, sodass ein niedriger prozentualer Anteil der mutierten DNA auf einem Hintergrund genomischer Wildtyp-DNA nachgewiesen werden kann. Sofern ausreichend DNA-Kopien vorhanden sind, kann ein Mutationsanteil von 0,8 % in einem Hintergrund genomischer Wildtyp-DNA nachgewiesen werden.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wird im Rahmen einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, 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 verwendet für den Nachweis von Mutationen mittels Realtime-PCR 2 Technologien: ARMS und Scorpions.

Mutationsreaktionsgemische

Die mutierte DNA wird in jedem Reaktionsgemisch mithilfe eines mutationspezifischen ARMS-Primers selektiv amplifiziert und das Amplifikationsprodukt danach mit einem Scorpions-Primer nachgewiesen.

ARMS

Die allelspezifische Amplifikation wird mithilfe der ARMS-Technologie erreicht, die auf der Fähigkeit der *Taq*-DNA-Polymerase beruht, zwischen einer übereinstimmenden und einer nicht übereinstimmenden 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 mutiert ist, selektiv amplifiziert.

Scorpions

Der Nachweis der Amplifikation wird mithilfe der Scorpions-Technologie durchgeführt. Scorpions sind bifunktionelle Moleküle, die aus einem PCR-Primer und einer kovalent daran gebundenen Sonde bestehen. Die Sonde umfasst das Fluorophor Carboxyfluorescein (FAM™) und einen Quencher. Letzterer hat die Aufgabe, die Fluoreszenz des Fluorophors zu unterdrücken. Wenn die Sonde bei der PCR an das ARMS-Amplifikat bindet, werden Fluorophor und Quencher 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, 12ASP)

Die Reaktionsgemische sind doppelfunktional: Sie enthalten FAM-markierte Reagenzien zur Detektion der Zielsequenzen sowie eine HEXTM-markierte Reagenzien zur Detektion der internen Kontrollen. Die Reaktionsgemische und Positivkontrollreagenzien enthalten Tris-EDTA-Puffer und die Positivkontrolle enthält Poly-A-Carrier-RNA.

Assays

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit beruht auf einem zweistufigen 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 enthält einen Scorpions-Primer und einen nicht markierten Primer, mit denen eine kurze Sequenz von Exon 4 des KRAS-Gens amplifiziert wird. 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 gekennzeichnete Kontrollassay dient zur Bestimmung der gesamten amplifizierbaren KRAS-DNA in einer Probe. Der Kontrollassay amplifiziert eine Region von Exon 4 des KRAS-Gens. Primer und Scorpions-Sonde sind so ausgelegt, dass die Amplifikation unabhängig von bekannten KRAS-Polymorphismen abläuft.

Mutationsassays

Jeder Mutationsassay enthält eine FAM-markierte Scorpions-Sonde sowie einen ARMS-Primer zur Unterscheidung zwischen der Wildtyp-DNA und einer spezifischen mutierten DNA.

Kontrollen

Hinweis: In jedem Versuchslauf müssen Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt werden.

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. Allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die Ziel-DNA verdünnt wird. Im Kit ist ein Röhrchen mit Wasser zur Probenverdünnung (Dil.) enthalten. Probenverdünnungen müssen mit dem Wasser zur Probenverdünnung (Dil.) durchgeführt werden.

Positivkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 1-5 eine Positivkontrolle enthalten sein. Das *therascreen* KRAS RGQ Kit enthält eine KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC), die in der Positivkontrollreaktion als Template zum Einsatz kommt. 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 (No Template Control, NTC), das in der Kontrolle ohne Template anstelle von Template zum Einsatz kommt. Die Kontrolle ohne Template dient zum Nachweis von möglicherweise bei der Laufkonfiguration aufgetretenen Kontaminationen und zur Bestimmung der Leistung der internen Kontrollreaktion.

Probenbestimmung

Zur Bestimmung der gesamten in einer Probe enthaltenen amplifizierbaren KRAS-DNA wird das im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthaltene Kontrollreaktionsgemisch (Control Reaction Mix, CTRL) verwendet. Der Kontrollassay amplifiziert eine Region von Exon 4 des KRAS-Gens. Es sollten Proben ausschließlich mit dem Kontrollassay bestimmt werden, wobei die KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC) als Positivkontrolle und Wasser als NTC als Kontrolle ohne Template zu verwenden sind.

Plattform und Software

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist speziell für den Gebrauch mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument ausgelegt. Die Rotor-Gene Q Software und das *therascreen* KRAS Assay Package sind unter www.qiagen.com als Download oder separat auf CD erhältlich.

- Die kompatiblen Versionen von RGQ-Software und *therascreen* KRAS Assay Package finden Sie unter Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien auf Seite 12.
- Weitere Informationen zum Instrument finden Sie im Benutzerhandbuch des Instruments.
- Zur Minimierung der Markierungen für Kontrollen und Proben ist hinsichtlich der Positionierung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments die genaue Befolgung der Anweisungen in der *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit *Gebrauchsanweisung* unter Installationsverfahren und Standortanforderungen erforderlich.
- Anweisungen zur Installation der Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package Software finden Sie unter Anhang 2: Installation der *therascreen* KRAS Assay Package Software auf Seite 135.

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrumente müssen gemäß den Anweisungen im Benutzerhandbuch des Instruments gewartet werden. Weitere Informationen zum Instrument finden Sie im entsprechenden Benutzerhandbuch.

Weitere Installationsanweisungen finden Sie unter Anhang 2: Installation der *therascreen* KRAS Assay Package Software.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

therascreen KRAS RGQ PCR Kit				(24)
Katalog-Nr.				874011
Anzahl Präparationen		Röhrchenkennzeichnung		24
Farbe	Identität			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 (12ALA-Reaktionsgemisch)	3	12ASP	600 µl
Rosa	12ARG Reaction Mix (12ALA-Reaktionsgemisch)	4	12ARG	600 µl
Grün	12CYS Reaction Mix (12ALA-Reaktionsgemisch)	5	12CYS	600 µl
Gelb	12SER Reaction Mix (12ALA-Reaktionsgemisch)	6	12SER	600 µl
Grau	12VAL Reaction Mix (12ALA-Reaktionsgemisch)	7	12VAL	600 µl
Blau	13ASP Reaction Mix (12ALA-Reaktionsgemisch)	8	13ASP	600 µl
Beige	KRAS Positive Control (KRAS-Positivkontrolle)	9	PC	250 µl
Minigrün	Taq DNA Polymerase (Taq-DNA-Polymerase)		<i>Taq</i>	80 µl
Weiß	Water for NTC (Wasser als NTC)		NTC	1,9 ml
Weiß	Water for Sample Dilution (Wasser zur Probenverdünnung)		Dil.	1,9 ml
therascreen KRAS RGQ PCR Kit Handbuch (Englisch)				1

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen sind den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) zu entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Reagenzien

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Kat.-Nr. 56404)
- Xylen
- Ethanol (96–100 %) *

Verbrauchsmaterialien

- Sterile Pipettenspitzen mit Filtern (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern)
- Sterile Mikrozentrifugenröhrchen zum Ansetzen von Master-Mix
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps zur Verwendung mit einem 72-Well-Rotor (Kat-Nr. 981103 oder 981106)

Ausstattung/Geräte

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument mit den Fluoreszenzkanälen Cycling Green und Cycling Yellow (für den Nachweis von FAM bzw. HEX)
- Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.1 oder höher, mit installiertem KRAS Assay Package (Version 3.0.3) für den automatischen Mutationsnachweis

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

Hinweis: Zum manuellen Mutationsnachweis kann die Rotor-Gene Q Software ohne KRAS Assay Package verwendet werden. Siehe Anhang 1: *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* – manuelles Protokoll.

- Thermomixer*, beheizter Orbitalinkubator, Heizblock oder Wasserbad zur Inkubation bei 56 °C und 90 °C
- Tischzentrifuge† mit Rotor für 1,5-ml-Röhrchen
- Tisch-Vortexer†
- Spezielle (einstellbare) Pipetten zur Probenvorbereitung †
- Spezielle (einstellbare) Pipetten zur Herstellung des PCR-Master-Mix*
- Spezielle (einstellbare) Pipetten zur Dispensierung von Template-DNA*

* Stellen Sie sicher, dass die Instrumente gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

† 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 Instrument

Zur Verwendung mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN-Kit und jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie bei Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits stets folgende Punkte:

- 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 Gefahrenstoffe behandelt werden.
- Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Die Reagenzien im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien wird nicht empfohlen, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann. Eine Verwendung von Reaktionsvolumen (Reaktionsgemisch plus Probe) unter 25 µl wird nicht empfohlen.
- Alle Reagenzien im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurden speziell für die in diesem Kit enthaltenen Tests formuliert.

- Alle im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vorgesehen. Tauschen Sie nicht die Reagenzien der *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits aus, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann.
- Verwenden Sie ausschließlich die im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit mitgelieferte Taq-DNA-Polymerase (Röhrchen Taq). Diese darf nicht durch die Taq-DNA-Polymerase aus anderen Kits desselben Typs oder eines anderen Typs oder durch die Taq-DNA-Polymerase anderer Hersteller ersetzt werden.
- Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Zur Minimierung der Markierungen für Kontrollen und Proben sind die Anweisungen in der *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit *Gebrauchsanweisung* genau zu befolgen. Dies umfasst unter anderem:
 - Ein korrektes Mischen der Reagenzien ist erforderlich und muss während der Assaykonfiguration bei jedem Mischschritt sichergestellt werden.
 - Die Positionierung des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments hat gemäß den Installationsverfahren und Standortanforderungen zu erfolgen.

Hinweis: Äußerste Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Kontroll- und Reaktionsgemisch-Reagenzien mit synthetischem Material zu vermeiden, das im Positivkontrollreagenz enthalten ist.

Hinweis: Verwenden Sie für die Einrichtung der Reaktionsgemische und die Zugabe von Positivkontrollreagenzien einzelne Pipetten, die ausschließlich für den jeweiligen Vorgang vorgesehen sind.

Hinweis: Führen Sie die Vorbereitung und Dispensierung der Reaktionsgemische in einem Bereich durch, der von dem Bereich, in dem die Positivkontrolle zugegeben wird, physisch getrennt ist.

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

Hinweis: Öffnen Sie die Rotor-Gene Q Rörhrchen nach dem Lauf nicht.

Hinweis: Ergreifen Sie alle nötigen Vorsichtsmaßnahmen, um sicherzustellen, dass die Proben korrekt analysiert werden. Achten Sie diesbezüglich besonders auf das Einsetzen der Proben, Beladungsfehler und Pipettierfehler.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versendet. Wenn Bestandteile des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits beim Empfang nicht gefroren sind, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde, die Lieferung keine Stückliste, kein Handbuch oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -30 bis -15 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Scorpions müssen, wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle, vor Licht geschützt werden, um Photobleichung und einen Leistungsverlust zu vermeiden.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist bei Lagerung unter den empfohlenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung bis zum Ablauf des angegebenen Verfallsdatums stabil. 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 infektiös 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; daher stimmen die Daten einer Tumorprobe nicht unbedingt mit den Daten anderer Schnitte desselben Tumors überein. Tumorproben können auch nicht tumoröses Gewebe enthalten. Bei DNA aus nicht tumorösem Gewebe ist davon auszugehen, dass sie keine Mutationen enthält, die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachgewiesen werden können.

Vorbereitung von Gewebeproben

Hinweis: Verwenden Sie trockene Skalpelle. Dieser Schritt darf nicht in einer Laminar-Flow-Sterilbank oder einem Abzug durchgeführt werden.

- Überführen Sie das Tumorgewebe für jede Probe mit einem frischen Skalpell von den Schnitten in gekennzeichnete Mikrozentrifugenröhrchen.

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- μ m-Serienschnitte von einem Paraffinblock ab und ziehen Sie diese auf einen Objektträger aus Glas auf.
- Lassen Sie einen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbten Schnitt von einem Spezialisten (z. B. Pathologen) auf Tumorgehalt und -fläche untersuchen. Kennzeichnen Sie den angefärbten Objektträger, um das Tumor- vom Normalgewebe zu unterscheiden. Verwenden Sie für die DNA-Extraktion Serienschnitte.

- Verwenden Sie zur Verarbeitung ohne Makrodissektion Schnitte mit > 20 % Tumorgehalt nach Fläche (siehe unten).
- Bei Schnitten mit ≤ 20 % Tumorgehalt nach Fläche müssen ein oder mehrere Schnitte einer Makrodissektion unterzogen werden. Nicht tumoröses Gewebe wird verworfen.
- Bei Schnitten mit einer Fläche < 4 mm² verarbeiten Sie zwei oder mehr Schnitte, um die Gesamtumorphfläche auf mindestens 4 mm² zu erhöhen (gilt sowohl für Proben mit als auch ohne Makrodissektion). Nicht tumoröses Gewebe wird verworfen.
- Entfernen Sie mit einem frischen sterilen Skalpell überschüssiges Paraffin von den Gewebeschnitten.

Hinweis: Verwenden Sie trockene Skalpelle. Dieser Schritt darf nicht in einer Laminar-Flow-Sterilbank oder einem Abzug durchgeführt werden.

- Überführen Sie das Tumorgewebe für jede Probe mit einem frischen Skalpell von den Schnitten in gekennzeichnete Mikrozentrifugenröhrchen.

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.
- Lassen Sie einen mit HE angefärbten Schnitt von einem Spezialisten (z. B. Pathologen) auf das Vorliegen eines Tumors untersuchen. Verwenden Sie für die DNA-Extraktion Serienschnitte.
- Entfernen Sie mit einem frischen sterilen Skalpell überschüssiges Paraffin von den Gewebeschnitten.
- Kennzeichnen, handhaben und lagern Sie Tumorproben, Blöcke, Objektträger, Proben und Mikrozentrifugenröhrchen, die für die Extraktion bereit sind, auf kontrollierte Weise und unter Einhaltung der geltenden Vorschriften.

Lagerung der Spezimen

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

Genomische DNA kann nach der Extraktion 1 Woche lang bei 2–8 °C und dann vor dem Gebrauch bis zu 8 Wochen lang bei –25 bis –15 °C gelagert werden.

Verfahren

DNA-Extraktion aus CRC-Proben

Verwenden Sie zur Aufreinigung genomischer DNA aus Proben, die aus FFPE-CRC-Material gewonnen wurden, das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 56404) unter Beachtung der nachstehend aufgeführten Veränderungen gegenüber dem Protokoll.

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

Führen Sie die DNA-Extraktion gemäß den Anweisungen im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* (Version 1) durch und beachten Sie dabei Folgendes:

- Sehen Sie vor der DNA-Extraktion das *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* zur Handhabung der Proben ein.
- Das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit darf nur manuell eingesetzt werden.
- Der im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschriebene RNase-Schritt darf nicht ausgeführt werden.
- Die mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit gelieferte QIAGEN Deparaffinization Solution darf nicht verwendet werden. Setzen Sie zur Entparaffinierung nur die Xylen-/Ethanol-Methode ein, die im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschrieben ist.

- Verwenden Sie für alle erforderlichen Schritte Ethanol in Molekularbiologie-Qualität.*
- Verwenden Sie pro Extraktion 1 Objektträger.
- Der Proteinase K-Verdau (Schritt 11 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch*) muss 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Die Proben müssen mit 200 µl Elutionspuffer (Buffer ATE) aus dem *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* eluiert werden.

Hinweis: Genomische DNA kann nach der Extraktion 1 Woche lang bei 2–8 °C und dann vor dem Gebrauch bis zu 8 Wochen lang bei -25 bis -15°C gelagert werden.

DNA-Extraktion aus NSCLC-Proben

Verwenden Sie zur Aufreinigung genomischer DNA aus Proben, die aus FFPE-NSCLC-Material gewonnen wurden, das *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (QIAGEN, Kat.-Nr. 56404) unter Beachtung der nachstehend aufgeführten Veränderungen gegenüber dem Protokoll.

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

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

- Der im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschriebene RNase-Schritt darf nicht ausgeführt werden.
- Die mit dem *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* gelieferte QIAGEN Deparaffinization Solution darf nicht verwendet werden. Setzen Sie zur Entparaffinierung nur die Xylen-/Ethanol-Methode ein, die im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschrieben ist.

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

- Verwenden Sie für alle erforderlichen Schritte Ethanol in Molekularbiologie-Qualität.*
- Verwenden Sie pro Extraktion einen Schnitt von 2 × 5 µm.
- Das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit darf nur manuell eingesetzt werden.
- Der im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschriebene RNase-Schritt darf nicht ausgeführt werden.
- Die mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit gelieferte QIAGEN Deparaffinization Solution darf nicht verwendet werden. Setzen Sie zur Entparaffinierung nur die Xylen-/Ethanol-Methode ein, die im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschrieben ist.
- Der Proteinase K-Verdau (Schritt 11 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch*) muss 1 Stunde lang durchgeführt werden.
- Fügen Sie 60 µl Elutionspuffer (ATE) aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit hinzu und inkubieren Sie die Proben 2,5 Minuten bei Raumtemperatur.
- Zentrifugieren Sie die Proben anschließend 1 Minute bei voller Drehzahl.
- Fügen Sie nochmals 60 µl Elutionspuffer (ATE) aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit hinzu und inkubieren Sie die Proben erneut 2,5 Minuten bei Raumtemperatur.
- Zentrifugieren Sie die Proben anschließend 1 Minute bei voller Drehzahl.

Hinweis: Genomische DNA kann nach der Extraktion 1 Woche lang bei 2–8 °C und dann vor dem Gebrauch bis zu 8 Wochen lang bei -25 bis -15°C gelagert werden.

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

Protokoll: DNA-Probenbestimmung

Dieses Protokoll dient der Bestimmung der Gesamtmenge an amplifizierbarer DNA in Proben unter Verwendung des „KRAS CE Sample Assessment Locked Template“ (Assay Package) als Vorlage für die automatische Probenbestimmung.

Hinweis: Informationen zur manuellen Probenbestimmung finden Sie unter Anhang 1: *therascreen KRAS RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll*.

Wichtige Hinweise vor Beginn

Hinweis: Die DNA-Probenbestimmung ist nicht für den Nachweis von PCR-Inhibitoren ausgelegt, da nur die gesamte amplifizierbare DNA in einer Probe mit der Kontrollreaktion bestimmt wird.

Hinweis: Es ist wichtig, dass für diese Bestimmung wie unten beschrieben das Kontrollreaktionsgemisch verwendet wird und nicht etwa Spektralphotometrie oder andere Alternativmethoden. Stark zersetzte DNA kann u. U. nicht amplifiziert werden, obwohl die Primer kurze DNA-Fragmente erzeugen.

- Mit dem vorhandenen Kontrollreaktionsgemisch (Röhrchen CTRL) können bis zu 24 Proben bestimmt werden.
- Führen Sie vor dem Test mit dem Mutationsassay eine DNA-Bestimmung mit CTRL durch.
- Zur Gewährleistung eines möglichst effizienten Gebrauchs der Reagenzien des *therascreen KRAS RGQ PCR Kits* fassen Sie die DNA-Proben zu Chargen zusammen, damit die Läufe möglichst voll besetzt sind. Durch das Testen einzelner Proben oder kleiner Serien von Proben steigt der Reagenzienverbrauch an, und die Gesamtzahl der Proben, die mit dem *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* getestet werden können, nimmt ab.
- Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*) oder andere Gemische, die *Taq* DNA-Polymerase enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.

-
- Pipettieren Sie die *Taq*-DNA-Polymerase, indem Sie die Pipettenspitze nur kurz vorsichtig unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.
 - Zur Minimierung der Markierungen für die Kontrollen ist hinsichtlich des korrekten Mischens der Reagenzien die genaue Befolgung der Anweisungen in der *therascreen KRAS RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung* bei jedem Mischschritt während der Assaykonfiguration erforderlich.

Vorbereitende Schritte

- Stellen Sie vor dem ersten Gebrauch des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments sicher, dass die *therascreen KRAS Assay Package Software* installiert ist, die der Version der Rotor-Gene Software entspricht (siehe Anhang 2: Installation der *therascreen KRAS Assay Package Software*).
- Alle Reagenzien müssen vor jedem Gebrauch mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig aufgetaut, durch zehnmaliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt. Bei der Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.
- Stellen Sie vor jeder Verwendung sicher, dass die *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*) Raumtemperatur (15–25 °C) erreicht hat. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

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

Die Zeiten zum Auftauen der Reagenzien, für die PCR-Konfiguration und für die Lagerung vor dem Start des Laufs sind in Tabelle 2 angegeben.

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

Minimum	Auftauzeit	Lagertemperatur* nach der PCR-Konfiguration	Max. Zeit für PCR-Konfiguration und Lagerung
	Maximum		
1 Stunde	4,5 Stunden	Raumtemperatur (15 bis 30 °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-Konfiguration muss bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

2. Mischen Sie die Reagenzien nach dem Auftauen, indem Sie jedes Röhrchen 10-mal umschwenken, um im gesamten Röhrchen eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten, und zentrifugieren Sie dann kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.

Hinweis: Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) oder andere Gemische, die *Taq* enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.

Hinweis: Bei der Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.

3. Setzen Sie gemäß den Volumenangaben in Tabelle 3 ausreichend Master-Mixes (Kontrollreaktionsgemisch [CTRL] plus *Taq*-DNA-Polymerase [*Taq*]) an für:
 - 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, damit ausreichend Material für die PCR-Konfiguration vorhanden ist

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

Tabelle 3. Herstellung des Kontrollassay-Master-Mix

Komponente	Volumen
Kontrollreaktionsgemisch (Control Reaction Mix, CTRL)	19,76 µl × (n+1)*
Taq-DNA-Polymerase (Taq)	0,24 µl × (n+1)*
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 Herstellung des Master-Mix wird zuerst das erforderliche Volumen an Kontrollreaktionsgemisch (Control Reaction Mix, CTRL) in das jeweilige Röhrchen gegeben; erst dann wird die Taq-DNA-Polymerase (Taq) zugegeben.

Hinweis: Pipettieren Sie die Taq-DNA-Polymerase, indem Sie die Pipettenspitze nur kurz vorsichtig unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.

4. Setzen Sie die benötigte Anzahl von PCR-4-Röhrchenstreifen (jeder Streifen besteht aus 4 Röhrchen) gemäß der Anordnung in Tabelle 4 in den Ladeblock. Verschließen Sie die Röhrchen nicht.

Hinweis: Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden.

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	-	-	-	-	-	-
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 Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.

6. Geben Sie sofort 20 µl Master-Mix in jedes PCR-Röhrchen des Streifens.

Hinweis: Die Röhrchenanordnung finden Sie in Tabelle 4. Für die DNA-Probenbestimmung geben Sie Kontrollassay-Master-Mix in ein PC-Röhrchen, ein NTC-Röhrchen und ein Röhrchen für jede DNA-Probe.

7. Geben Sie sofort 5 µl nukleasefreies Wasser für die Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) in das NTC-Röhrchen (Röhrchenposition 2) und verschließen Sie das Röhrchen mit Deckel.

8. Geben Sie jeweils 5 µl DNA-Probe in die Probenröhrchen (Röhrchenpositionen 3–26), und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.

9. Geben Sie 5 µl KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC) in das PC-Röhrchen (Röhrchenposition 1), und verschließen Sie das Röhrchen mit Deckel.

Hinweis: Jedes Röhrchen sollte ein Reaktionsvolumen von insgesamt 25 µl enthalten (20 µl Master-Mix gemäß Tabelle 3 plus 5 µl NTC/Probe/PC).

10. Kennzeichnen Sie mit einem wasserfesten Filzstift die Deckel der ersten Röhrchen, die sich in jedem PCR-4-Röhrchenstreifen in der Position mit der niedrigsten Nummer befinden (z. B. Positionen 1, 5 und 9 usw.), um die Ausrichtung für das Laden der Röhrchen in den 72-Well-Rotor des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments anzuzeigen.

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

Hinweis: Bei der Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.

12. Setzen Sie alle PCR-4-Röhrchenstreifen gemäß Laufrichtung (Tabelle 4) in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors; verwenden Sie dabei die Kennzeichnungen auf den Deckeln zur richtigen Ausrichtung.

Hinweis: Wenn nicht alle Positionen des Rotors belegt sind, müssen alle unbesetzten Positionen im Rotor mit jeweils einem verschlossenen, leeren Röhrchen bestückt werden. Dadurch wird gewährleistet, dass ein optimaler thermischer Wirkungsgrad des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments erreicht wird.

13. Setzen Sie den 72-Well-Rotor in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (im Lieferumfang des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments enthalten) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.

14. Doppelklicken Sie auf dem Desktop des Notebooks, das an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument angeschlossen ist, auf das Symbol theascreen KRAS QC Locked Template (theascreen KRAS QK – gesperrte Vorlage) (Abbildung 1), um die Rotor-Gene Q Software zu starten.



Abbildung 1. Das Symbol „therascreen KRAS QC Locked Template“ (therascreen KRAS QK – gesperrte Vorlage).

Standardmäßig wird die Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) angezeigt (Abbildung 2).

The screenshot shows the 'Setup' tab of the software. Key elements include:

- Kit Name:** theascreen KRAS CE RGQ PCR Kit
- Template Version:** 3.0.2
- Run ID:** DNA Sample Assessment
- Notes:** A text area for additional information.
- Locking Ring Attached:** A checked checkbox with a circular icon.
- Layout of the pipetting adapter:** A grid table showing the arrangement of samples and controls across 96 positions.

Position	Sample	Position	Sample	Position	Sample	Position	Sample	Position	Sample
Position 1	IC Control	Position 9	Sample 7 Control	Position 17	Not used	Position 25	Not used	Position 33	Not used
Position 2	NTC Control	Position 10	Sample 8 Control	Position 18	Not used	Position 26	Not used	Position 34	Not used
Position 3	Sample 1 Control	Position 11	Not used	Position 19	Not used	Position 27	Not used	Position 35	Not used
Position 4	Sample 2 Control	Position 12	Not used	Position 20	Not used	Position 28	Not used	Position 36	Not used
Position 5	Sample 3 Control	Position 13	Not used	Position 21	Not used	Position 29	Not used	Position 37	Not used
Position 6	Sample 4 Control	Position 14	Not used	Position 22	Not used	Position 30	Not used	Position 38	Not used
Position 7	Sample 5 Control	Position 15	Not used	Position 23	Not used	Position 31	Not used	Position 39	Not used
Position 8	Sample 6 Control	Position 16	Not used	Position 24	Not used	Position 32	Not used	Position 40	Not used
Position 41	Not used	Position 49	Not used	Position 57	Not used	Position 65	Not used	Position 73	Not used
Position 42	Not used	Position 50	Not used	Position 58	Not used	Position 66	Not used	Position 74	Not used
Position 43	Not used	Position 51	Not used	Position 59	Not used	Position 67	Not used	Position 75	Not used
Position 44	Not used	Position 52	Not used	Position 60	Not used	Position 68	Not used	Position 76	Not used
Position 45	Not used	Position 53	Not used	Position 61	Not used	Position 69	Not used	Position 77	Not used
Position 46	Not used	Position 54	Not used	Position 62	Not used	Position 70	Not used	Position 78	Not used
Position 47	Not used	Position 55	Not used	Position 63	Not used	Position 71	Not used	Position 79	Not used
Position 48	Not used	Position 56	Not used	Position 64	Not used	Position 72	Not used	Position 80	Not used

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

15. Vergewissern Sie sich, dass der Schließring richtig angebracht ist, und aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Locking Ring Attached** (Schließring angebracht). Schließen Sie den Deckel des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments.
16. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention die Lauf-ID in das Feld **Run ID** (Lauf-ID) ein. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention den Probenamen in das Dialogfeld **Sample Name** (Probenname) ein, und drücken Sie die **Return Taste** (Eingabetaste).

Dadurch wird der Probenname in die unten dargestellte Probenliste eingefügt und der Probe wird eine „Sample ID“ (Proben-ID) (1, 2, 3, usw.) zugewiesen. Darüber hinaus wird der Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters) aktualisiert; er enthält nun den Probennamen (Abbildung 3).

Alternativ können Probenamen, die im Format *.smp (Rotor-Gene Q Probendatei) oder *.csv (kommagetrennte Werte) gespeichert wurden, über die Schaltfläche **Import Samples** (Proben importieren) importiert werden. Dabei werden die Probenamen automatisch eingetragen.

Hinweis: Überprüfen Sie im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters), dass der hinzugefügte Probenname durch eine Farbänderung hervorgehoben ist und sich der Probenname in der entsprechenden Probenposition befindet (Abbildung 3).

Hinweis: Probenamen mit mehr als 8 Zeichen werden im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters) u. U. nicht vollständig angezeigt.

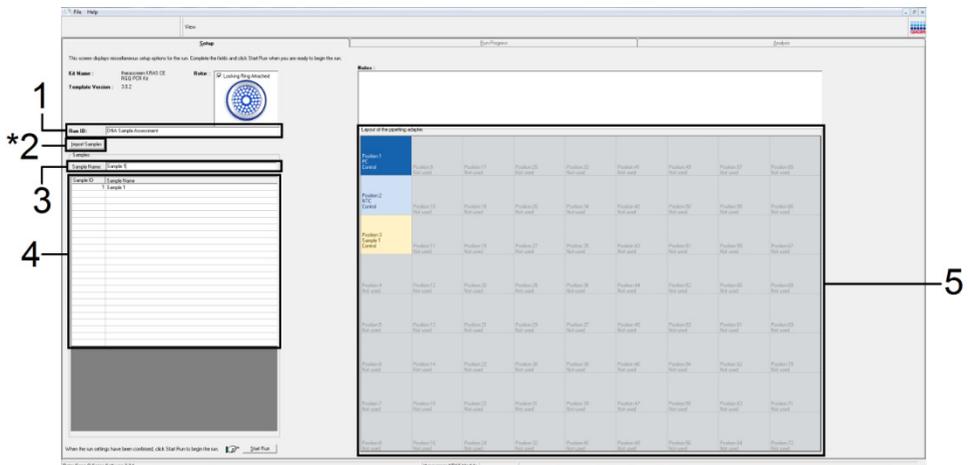


Abbildung 3. Eingabe von „Run ID“ (Lauf-ID) und „Sample Name“ (Probenname). 1 = Dialogfeld „Run ID“ (Lauf-ID), 2 = Schaltfläche „Import Sample“ (Probe importieren), 3 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname), 4 = Probenliste, 5 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters).

17. 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 (Probenname); die ausgewählte Probe wird in dem darüberstehenden Dialogfeld Sample Name (Probenname) angezeigt. Bearbeiten Sie die Probe gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention, und drücken Sie die Return Taste (Eingabetaste), um den Namen zu aktualisieren.

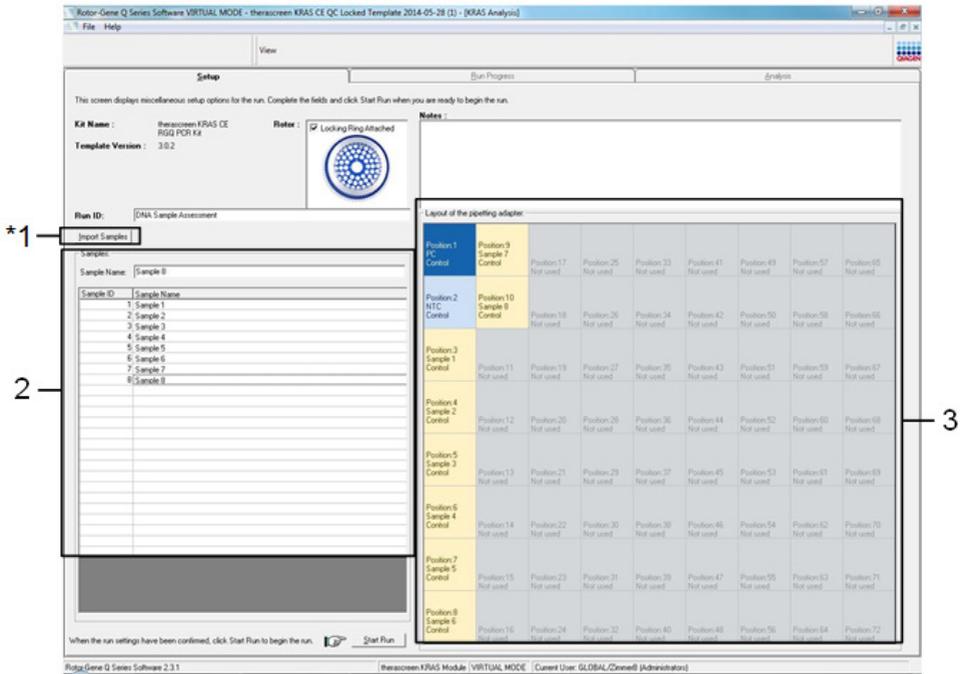


Abbildung 4. Eingabe weiterer Probenamen in das Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname). *1 = Schaltfläche „Import Sample“ (Probe importieren), 2 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname) und Probenliste, 3 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters) mit zusätzlichem Probenamen.

18. Nachdem alle Probenamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, dass diese korrekt sind. Geben Sie bei Bedarf zusätzliche Informationen in das Dialogfeld Notes (Notizen) ein und klicken Sie dann auf Start Run (Lauf starten) (Abbildung 5).

Hinweis: Wenn eine Rotorposition unbesetzt ist, wird eine Warnmeldung eingeblendet (Abbildung 5 und Abbildung 6), um den Anwender daran zu erinnern, dass unbesetzte Positionen im Rotor mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt werden müssen. Stellen Sie sicher, dass alle unbesetzten Rotorpositionen mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt sind, und klicken Sie dann auf OK, um fortzufahren.

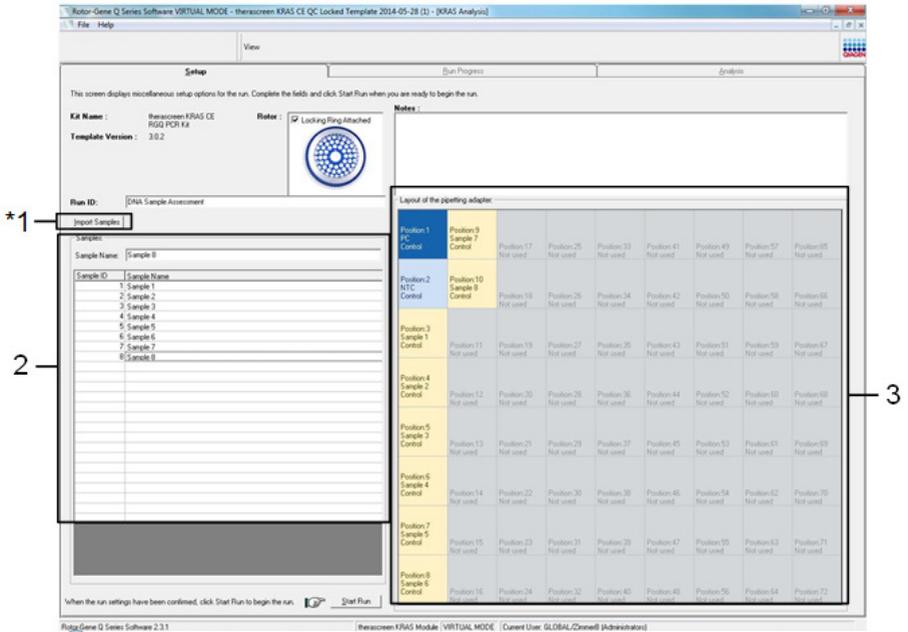


Abbildung 5. Dialogfeld „Notes“ (Notizen), Schaltfläche „Start Run“ (Lauf starten) und Warnung über unbesetzte Rotorpositionen.

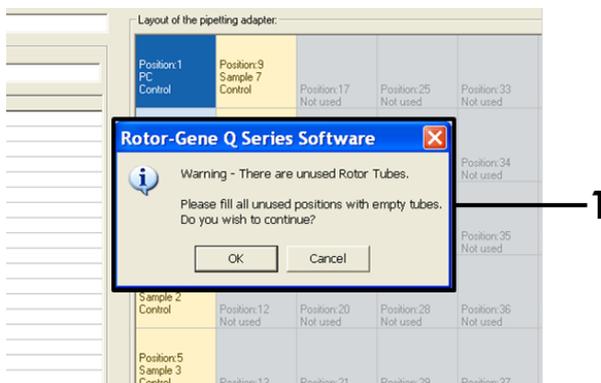


Abbildung 6. 1 = Warnung über unbesetzte Rotorpositionen.

19. 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).

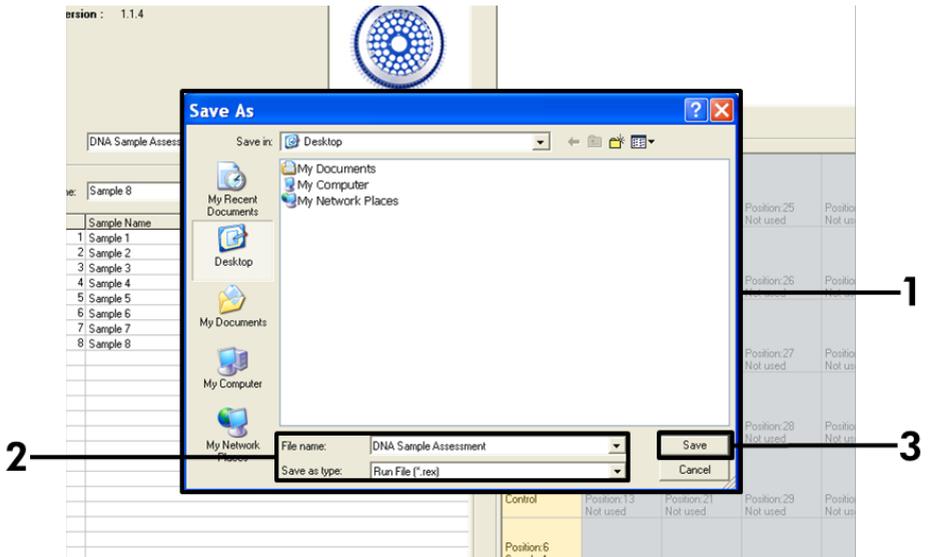


Abbildung 7. Speichern der Laufdatei. 1 = Fenster „Save As“ (Speichern unter), 2 = „File name“ (Dateiname) und „Save as type“ (Speichern als Typ) *.rex-Datei, 3 = „Save“ (Speichern).

Der PCR-Lauf wird gestartet.

Hinweis: Beim Start des Laufs wird automatisch die Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt) geöffnet, auf der die Temperaturkurve und die verbleibende Laufzeit angezeigt werden (Abbildung 8).

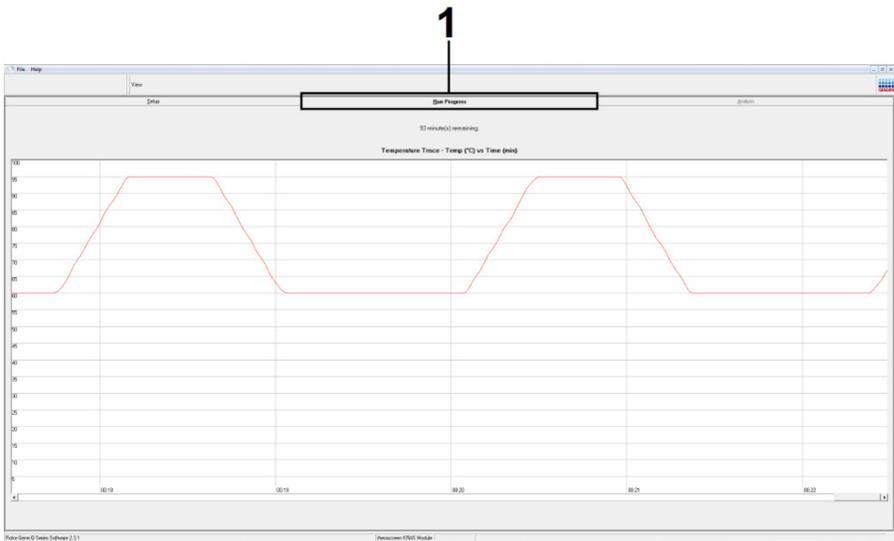


Abbildung 8. Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt).

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

Hinweis: Wenn die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) nicht geöffnet wird, klicken Sie auf diese Registerkarte (Abbildung 9).

Hinweis: Eine Beschreibung der Berechnungsmethode finden Sie unter Interpretation der Ergebnisse.

Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	03771070B	28.39	-	Valid
4	03771071B	27.38	-	Valid
5	03771072B	30.07	-	Valid
6	03771073B	28.53	-	Valid
7	03771074B	29.55	-	Valid
8	03771075B	28.45	-	Valid
9	03771076B	29.95	-	Valid
10	03771077B	29.02	-	Valid
11	03771078B	31.42	-	Valid
12	03771079B	28.93	-	Valid
13	03771081B	29.68	-	Valid
14	03771082B	31.44	-	Valid
15	03771083B	31.02	-	Valid
16	03771084B	28.09	-	Valid
17	03771085B	29.91	-	Valid
18	03771087B	30.33	-	Valid
19	03771088B	30.22	-	Valid
20	03771090B	27.17	-	Valid
21	03771090B	29.67	-	Valid
22	03771091B	29.32	-	Valid
23	03771092B	29.22	-	Valid
24	03771093B	28.57	-	Valid
25	03771094B	28.80	-	Valid
26	03771095B	30.41	-	Valid

Abbildung 9. Registerkarte „Analysis“ (Analyse) mit den Ergebnissen. 1 = Registerkarte „Analysis“ (Analyse), 2 = „Sample QC Result Table“ (Tabelle der GK-Probenergebnisse).

Hinweis: Die Ergebnisse der Kontrollen werden wie folgt in der Tabelle „Sample QC Result Table“ (Tabelle der GK-Probenergebnisse) angegeben (2 in Abbildung 9).

- Laufkontrollen (PC und NTC, Röhrchenpositionen 1 und 2): „Valid“ (Gültig) wird angezeigt, wenn die Ergebnisse innerhalb des zulässigen Bereichs liegen. Andernfalls wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt.
- C_T-Wert der Probenkontrollreaktion > 32,00: Es wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt. Die Menge an DNA ist nicht ausreichend für die Mutationsanalyse. Wiederholen Sie den Test der Probe. Wenn die Menge an DNA weiterhin unzureichend ist, extrahieren Sie mehr Tumorgewebe, sofern verfügbar (siehe Interpretation der Ergebnisse (manuell)).

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 über die Rotor-Gene Q Software 2.3 die entsprechende Datei.
2. Falls Sie vor dem Lauf noch keine Probenamen eingegeben 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 (Analyse). Klicken Sie auf der Analysenseite auf Cycling A. Yellow, 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).
7. Wählen Sie Linear Scale (Lineare Skalierung).
8. Klicken Sie auf Outlier Removal (Ausreißer entfernen) und geben Sie in das Feld NTC Threshold (NTC-Schwellenwert) 10 % ein.
9. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0.05 (0,05) ein und überprüfen Sie die CT-Werte für HEX.
10. Klicken Sie auf der Analysenseite auf Cycling A. Green, um den FAM-Kanal anzuzeigen.
11. Stellen Sie sicher, dass Dynamic Tube (Dynamisches Röhrchen) aktiviert ist. Klicken Sie auf Linear Scale (Lineare Skalierung).
12. Klicken Sie auf Outlier Removal (Ausreißer entfernen) und geben Sie in das Feld NTC Threshold (NTC-Schwellenwert) 10 % ein.
13. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0.05 (0,05) ein und überprüfen Sie die CT-Werte für FAM.

Analyse der Daten aus der Probenbestimmung

Analyse der Laufkontrollen

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Flussdiagramm „Analyse der Laufkontrollen“ in Abbildung 42.

- **Negativkontrolle:** Damit eine Kontamination des Reaktionsgemisches ausgeschlossen werden kann, darf der C_T -Wert der Kontrolle ohne Template im grünen Kanal nicht unter 40 liegen. Um sicherzustellen, dass die Platte korrekt konfiguriert wurde, muss die NTC im gelben Kanal eine Amplifikation von 31,91–35,16 aufweisen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs gehören noch zu den zulässigen Werten.
- **Positivkontrolle:** Die KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC) muss in jedem der 8 Assays im grünen Kanal einen C_T -Wert von 23,5–29,5 ergeben. 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.

Wenn beide Laufkontrollen gültig sind, muss der C_T -Wert jeder Probe im grünen Kanal im Bereich von 21,92–32,00 liegen. Wenn die Probe außerhalb dieses Bereichs liegt, gehen Sie wie folgt vor.

Probenanalyse – Kontrollassay

- C_T -Wert des Probenkontrollassays $< 21,92$: Proben mit einem Kontroll- C_T von $< 21,92$ müssen verdünnt werden, da dieser Wert das untere Ende des validierten Assaybereichs darstellt. Damit die verschiedenen Mutationen schon in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden können, müssen übermäßig hoch konzentrierte Proben so verdünnt werden, dass sie im oben angegebenen Bereich liegen. Als Faustregel hierbei gilt, dass eine Verdünnung um die Hälfte den C_T -Wert um 1 erhöht. Wenn die Probe nahe am Wert 21,92 liegt, wird eine Verdünnung empfohlen, um sicherzustellen, dass beim Proben test (dem Nachweis der KRAS-Mutation) ein Ergebnis erhalten wird. Die Proben sind mit dem im Kit enthaltenen Wasser zu verdünnen (nukleasefreies Wasser zur Verdünnung, Dil.).

- C_T -Wert des Probenkontrollassays > 32 : Eine erneute Extraktion der Probe wird empfohlen, da eine unzureichende Menge DNA-Starttemplate vorhanden ist, um alle Mutationen an den für den Assay angegebenen Cut-off-Werten nachzuweisen.

Analyse des KRAS-Mutationsnachweises

Analyse der Laufkontrollen

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Flussdiagramm „Analyse der Laufkontrollen“ (Abbildung 10).

- **Negativkontrolle:** Damit eine Kontamination des Reaktionsgemisches ausgeschlossen werden kann, darf der C_T -Wert der Kontrolle ohne Template im grünen Kanal nicht unter 40 liegen. Um sicherzustellen, dass die Platte korrekt konfiguriert wurde, muss die NTC im gelben Kanal eine Amplifikation von 31,91–35,16 aufweisen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs gehören noch zu den zulässigen Werten.
- **Positivkontrolle:** Die KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC) muss in jedem der 8 Assays im grünen Kanal einen C_T -Wert von 23,5–29,5 ergeben. 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.

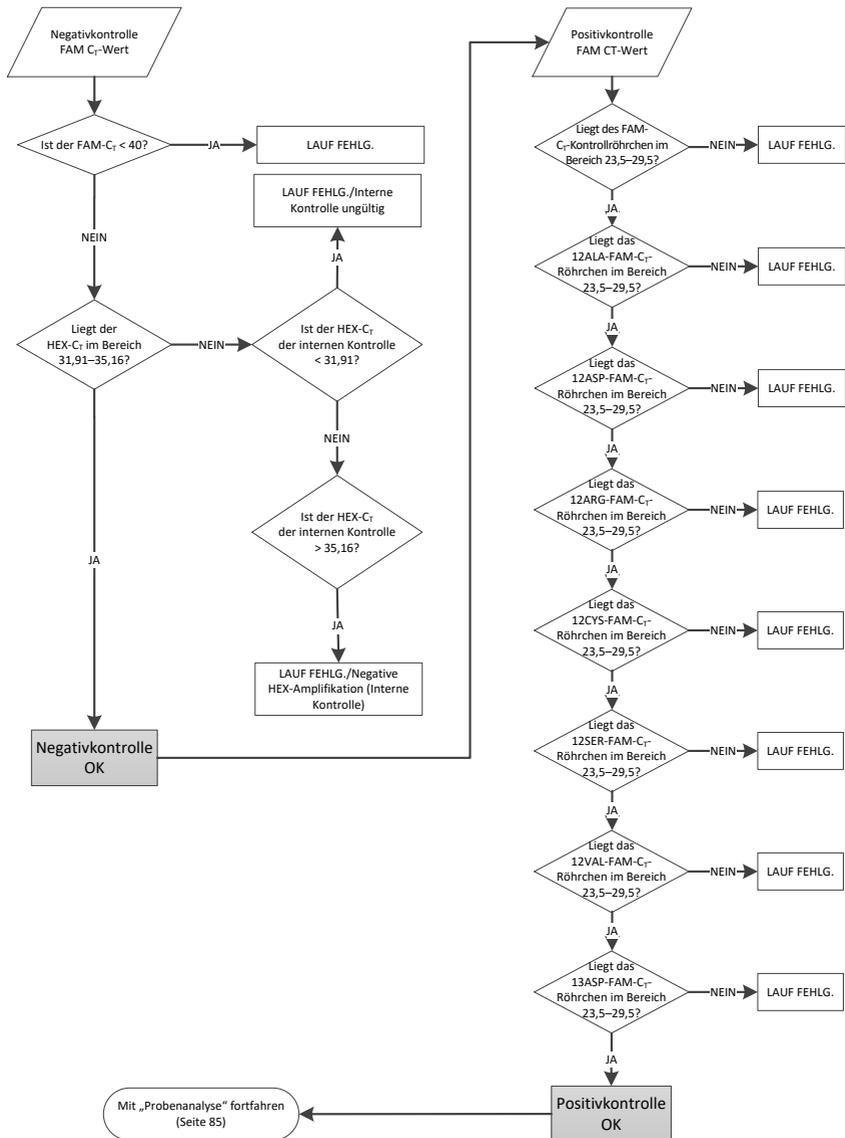


Abbildung 10. Flussdiagramm zur Analyse der Laufkontrollen.

Probenanalyse

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Flussdiagramm „Probenanalyse“ in Abbildung 11.

FAM-CT-Wert der Probenkontrolle

Wenn beide Laufkontrollen für den Kontrollassay gültig sind, muss der C_T -Wert jeder Probenkontrolle im grünen Kanal im Bereich 21,92–32,00 liegen.

Wenn die Probe außerhalb dieses Bereichs liegt, gehen Sie wie folgt vor.

- C_T -Wert des Probenkontrollassays $< 21,92$: Proben mit einem Kontroll- C_T von $< 21,92$ müssen verdünnt werden, da sie die Mutationsassays sonst überlasten würden. Damit die verschiedenen Mutationen schon in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden können, müssen übermäßig hoch konzentrierte Proben so verdünnt werden, dass sie im oben angegebenen Bereich liegen. Als Faustregel hierbei gilt, dass eine Verdünnung um die Hälfte den C_T -Wert um 1 erhöht. Die Proben sind mit dem im Kit enthaltenen Wasser zu verdünnen (nukleasefreies Wasser zur Verdünnung, Dil.).
- C_T -Wert des Probenkontrollassays > 32 : Das Ergebnis sollte mit Vorsicht interpretiert werden, da besonders niedriggradige Mutationen möglicherweise nicht erkannt werden.

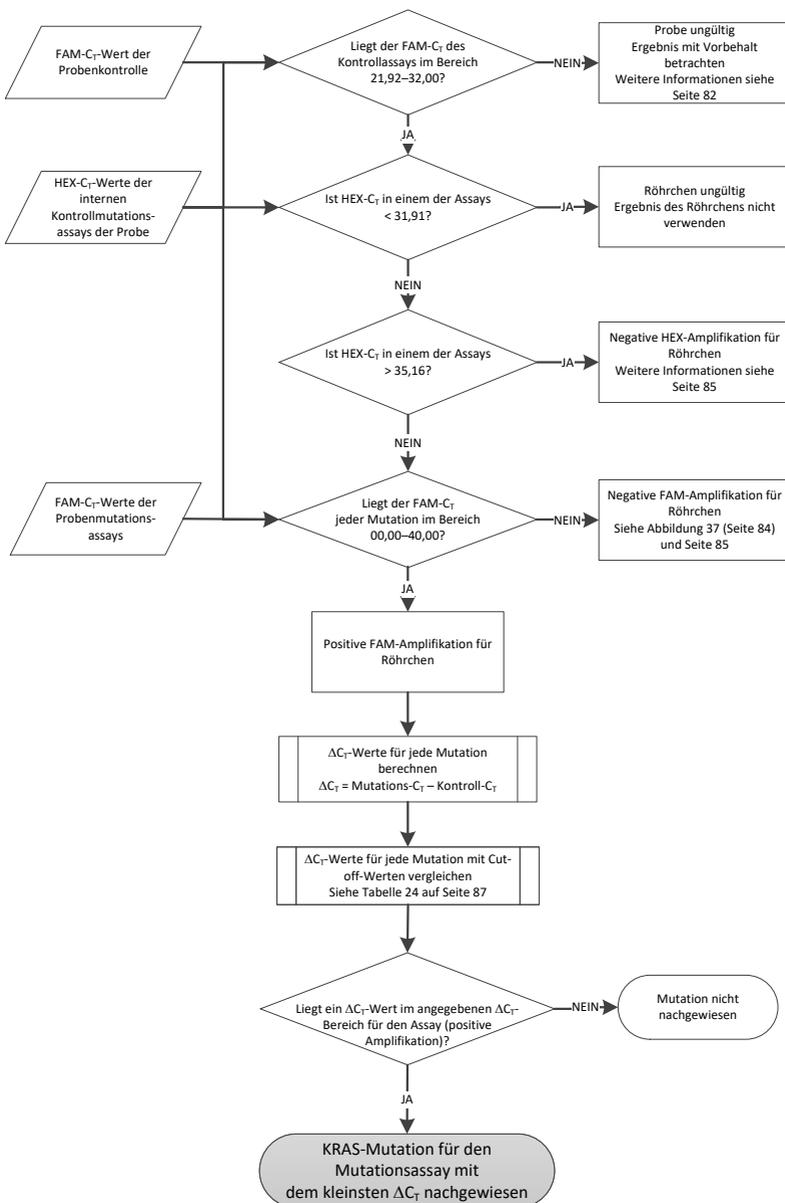


Abbildung 11. Flussdiagramm der Probenanalyse.

HEX-Werte der internen Kontrollmutationsassays der Probe

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Flussdiagramm „Probenanalyse“ in Abbildung 11. Es müssen alle Wells jeder Probe analysiert werden. Stellen Sie sicher, dass für jedes Well ein HEX-Signal von der internen Kontrolle vorliegt. Es gibt 3 verschiedene Möglichkeiten.

- Wenn der C_T -Wert der internen Kontrolle im zulässigen Bereich (31,91–35,16) liegt, ist die HEX-Amplifikation positiv.
- Wenn der C_T -Wert der internen Kontrolle über dem zulässigen Bereich ($> 35,16$) liegt, ist die HEX-Amplifikation negativ.
- Wenn der C_T -Wert der internen Kontrolle unter dem zulässigen Bereich ($< 31,91$) liegt, ist er ungültig.
- 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; allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die Ziel-DNA verdünnt wird. Im Kit ist ein Röhrchen mit Wasser zur Probenverdünnung (Dil.) enthalten.

FAM-CT-Wert der Probenmutationsassays

Die FAM-Werte aller 7 Reaktionsgemische sind mit den in Tabelle 5 aufgeführten Werten zu vergleichen.

Tabelle 5. Zulässige Werte für Probenmutationsreaktionen (FAM)*

Assay	Zulässiger C_T -Bereich	ΔC_T -Bereich
12ALA	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12ASP	0,00-40,00	$\leq 6,60$
12ARG	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12CYS	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12SER	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12VAL	0,00-40,00	$\leq 7,50$
13ASP	0,00-40,00	$\leq 7,50$

* Die Grenzwerte der angegebenen Bereiche gehören noch zu den zulässigen Werten.

- Wenn der FAM-CT-Wert im angegebenen Bereich liegt, ist die FAM-Amplifikation positiv.
- Wenn der FAM-CT-Wert über dem angegebenen Bereich liegt oder keine Amplifikation stattfindet, ist die FAM-Amplifikation negativ.
- Berechnen Sie für jedes Mutationsröhrchen mit einer positiven FAM-Amplifikation wie folgt den DCT-Wert und achten Sie darauf, dass die Mutations- und Kontroll-CT-Werte von derselben Probe stammen.

$$\Delta C_T = \text{Mutations-}C_T - \text{Kontroll-}C_T$$

Vergleichen Sie den ΔC_T -Wert der Probe mit dem Cut-off-Wert des jeweiligen Assays (Tabelle 22) und achten Sie darauf, dass für jeden Assay der korrekte Cut-off-Wert verwendet wird.

Ist der Cut-off-Wert überschritten, so könnte ein positives Signal auch nur ein Hintergrundsignal des ARMS-Primers bei Wildtyp-DNA sein. Liegt der ΔC_T -Wert der Probe über dem Cut-off-Wert, so wird sie als negativ oder außerhalb der Nachweisgrenze des Kits eingestuft.

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 nachgewiesen:

- Die FAM-Amplifikation ist positiv und der DCT-Wert ist kleiner oder gleich dem Cut-off-Wert. Wenn mehrere Mutationen nachgewiesen werden, sollte die Mutation mit dem kleinsten DCT-Wert angegeben werden.

Mutation nicht nachgewiesen:

- Die FAM-Amplifikation ist positiv und der DCT-Wert ist größer als der Cut-off-Wert.
- Die FAM-Amplifikation ist negativ und die HEX-Amplifikation (interne Kontrolle) ist positiv.

Ungültig:

- Die HEX-Amplifikation (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 die HEX-Amplifikation einer Probe negativ und die FAM-Amplifikation im gleichen Röhrchen positiv ist, ist das Ergebnis „Mutation detected“ (Mutation nachgewiesen) als gültig zu betrachten.
- 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:

- Mutation nachgewiesen: Mindestens eine der 7 Mutationsreaktionen ist positiv. Wenn mehrere Mutationen nachgewiesen werden, sollte die Mutation mit dem kleinsten DCT-Wert angegeben werden.
- Mutation nicht nachgewiesen: Alle 7 Mutationsreaktionen sind negativ.
- Ungültig: Keine der Mutationsreaktionen ist positiv und mindestens eine Mutationsreaktion ist ungültig.

Hinweis: Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist für den Nachweis von Mutationen im KRAS-Gen einer DNA-Probe vorgesehen. Wenn eine Probe als „KRAS-Mutation nachgewiesen“ eingestuft wird, sollte nur eine bestimmte Mutation angegeben werden. Wenn mehrere Mutationen nachgewiesen werden, sollte die Mutation mit dem kleinsten ΔC_T -Wert angegeben werden.

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 Doppelmутanten festgestellt.

Wenn mindestens eine der Mutationsreaktionen ungültig, mindestens eine aber positiv ist, kann die Probe noch als „KRAS-Mutation nachgewiesen“ eingestuft werden, da eine Mutation vorhanden ist. Die angegebene spezifische Mutation ist u. U. jedoch nicht korrekt und kann auf eine Kreuzreaktivität zurückgehen. Die Probe sollte daher nur als „KRAS-Mutation nachgewiesen“ eingestuft werden.

- C_T-Wert der Probenkontrollreaktion < 21,92: Es wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt. Die DNA-Konzentration ist zu hoch für die Mutationsanalyse. Verdünnen Sie mit nukleasefreiem Wasser zur Verdünnung (Dil.) und wiederholen Sie den Test. Verdünnen Sie auf einen C_T-Wert im Bereich von 21,92–32,00. Durch eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 erhöht sich der C_T-Wert um etwa 1,0.
- C_T-Wert der Probenkontrollreaktion von 21,92–32,00 (21,92 ≤ Kontroll-C_T ≤ 32,00): Es wird „Valid“ (Gültig) angezeigt. Die DNA-Konzentration ist für die Mutationsanalyse geeignet.

Hinweis: Wenn eine erneute Extraktion oder eine Verdünnung erforderlich ist, wiederholen Sie die Kontrollreaktion, um zu bestätigen, dass die DNA-Konzentration für die Mutationsanalyse geeignet ist.

14. Klicken Sie zum Erstellen von Berichtsdateien auf Report (Bericht). Es wird das Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser) angezeigt. Wählen Sie unter „Templates“ (Vorlagen) die Option KRAS Analysis Report (KRAS-Analysebericht) aus und klicken Sie dann auf Show (Anzeigen) (Abbildung 12).

Hinweis: Berichte können im Web Archives-Format an einem alternativen Speicherort gespeichert werden, indem Sie oben links im jeweiligen Bericht auf die Schaltfläche Save As (Speichern unter) klicken.

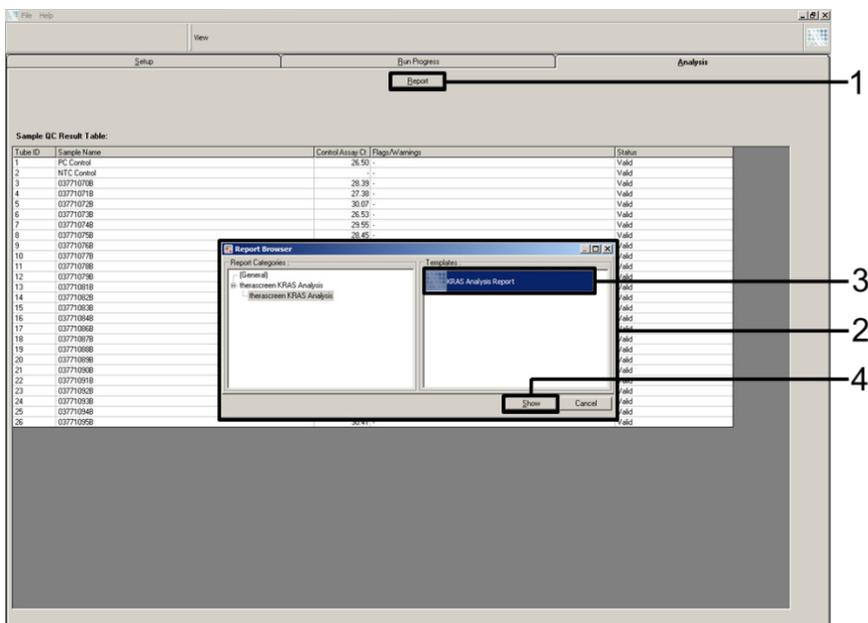


Abbildung 12. Auswählen des „KRAS Analysis Report“ (KRAS-Analyseberichts). 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = Auswahl „KRAS Analysis Report“ (KRAS-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen

Dieses Protokoll ist für den Nachweis von KRAS-Mutationen vorgesehen.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Nach einer erfolgreichen Probenbestimmung kann die Probe mit den KRAS-Mutationsassays getestet werden.
- Die Proben müssen (zum Füllen des 72-Well-Rotors) in Chargen zu jeweils 7 Proben zusammengefasst werden, um das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit effizient zu nutzen. Bei kleineren Chargengrößen wird die Anzahl der Proben, die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit getestet werden können, verringert.

- Für den Test einer Probe müssen alle im *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit enthaltenen Reaktionsgemische verwendet werden.
- Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*) oder andere Gemische, die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*-DNA-Polymerase, indem Sie die Pipettenspitze nur kurz vorsichtig unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.
- Zur Minimierung der Markierungen für die Kontrollen und Proben ist hinsichtlich des korrekten Mischens der Reagenzien die genaue Befolgung der Anweisungen in der *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit *Gebrauchsanweisung* bei jedem Mischschritt während der Assaykonfiguration erforderlich.
- Stellen Sie vor dem ersten Gebrauch des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments sicher, dass die richtige *therascreen* KRAS Assay Package Software installiert ist, die der Version der Rotor-Gene Q Software entspricht.

Vorbereitende Schritte

- Alle Reagenzien müssen vor jedem Gebrauch mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig aufgetaut, durch zehnmaliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt.
- Stellen Sie vor jeder Verwendung sicher, dass die *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*) Raumtemperatur (15–25 °C) erreicht hat. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt. Bei der Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.

Verfahren

1. Tauen Sie alle Röhrchen mit Reaktionsgemisch, das nukleasefreie Wasser für die Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) und die KRAS-Positivkontrolle (Röhrchen PC) mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig auf.

Die Zeiten zum Auftauen der Reagenzien, für die PCR-Konfiguration und für die Lagerung vor dem Start des Laufs sind in der nachstehenden Tabelle angegeben.

Tabelle 6. Zeit zum Auftauen der Reagenzien

Auftauzeit			
Minimum	Maximum	Lagertemperatur nach der PCR-Konfiguration	Max. Zeit für PCR-Konfiguration und Lagerung
1 Stunde	4,5 Stunden	Raumtemperatur (15-25°C)	7 Stunden
1 Stunde	4,5 Stunden	2-8°C	18 Stunden

Hinweis: Die PCR-Konfiguration muss bei Raumtemperatur durchgeführt werden. 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 Instrument.

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

- Mischen Sie die Reagenzien nach dem Auftauen, indem Sie jedes Röhrchen zehnmals umschwenken, um im gesamten Röhrchen eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten, und zentrifugieren Sie dann direkt, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.

Hinweis: Bei der Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.

- Kennzeichnen Sie 8 Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) gemäß den in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Reaktionsgemischen. Setzen Sie gemäß den Volumenangaben in der Tabelle ausreichend Master-Mixe (Kontroll- oder Mutationsreaktionsgemisch [Röhrchen CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL oder 13ASP] plus *Taq*-DNA-Polymerase [*Taq*]) für die DNA-Proben, eine KRAS-Positivkontrollreaktion (Röhrchen PC) und eine Reaktion mit nukleasefreiem Wasser als Kontrolle ohne Template (Röhrchen NTC) an. Planen Sie Reagenzien für 1 zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.

Hinweis: Die Master-Mixe enthalten mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 7. Master-Mix und entsprechendes Volumen

Assay und Reaktionsgemischröhrchen	Volumen des Reaktionsgemisches	Volumen der Taq-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 und Kontrollen).

Setzen Sie ausreichend Master-Mix für 1 zusätzliche Proben (n + 1) an, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material zur Verfügung steht. Der Wert n darf 7 (plus Kontrollen) nicht überschreiten, da 7 die maximale Anzahl von Proben ist, die in einem Lauf verarbeitet werden kann.

Hinweis: Bei der Herstellung der Assay-Master-Mixes wird zuerst das erforderliche Volumen an Kontroll- oder Mutationsreaktionsgemisch in das jeweilige Röhrchen gegeben; erst dann wird die Taq-DNA-Polymerase (Röhrchen Taq) zugegeben.

- Setzen Sie die benötigte Anzahl von PCR-4-Röhrchenstreifen (jeder Streifen besteht aus 4 Röhrchen) gemäß der Anordnung in Tabelle 4 in den Ladeblock. Laufanordnung im Ladeblock für die DNA-Probenbestimmung. Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an. Verschließen Sie die Röhrchen nicht.

Hinweis: Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden.

- Stellen Sie eine Pipette auf ein Volumen ein, das kleiner ist als das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches, und mischen Sie die Master-Mixe gründlich durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren.

Hinweis: Bei der Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.

Für den Nachweis von KRAS-Mutationen geben Sie Assay-Master-Mix in 8 PC-Röhrchen, 8 NTC-Röhrchen und 8 Röhrchen für jede DNA-Probe.

6. Geben Sie sofort 20 µl Master-Mix in jedes erforderliche PCR-Röhrchen des Streifens.

Hinweis: Die Röhrchenanordnung für die Konfiguration der Reaktionsgemische finden Sie in Tabelle 8. Für den Nachweis von KRAS-Mutationen geben Sie Master-Mix in 8 PC-Röhrchen, 8 NTC-Röhrchen und 8 Röhrchen für jede DNA-Probe.

Tabelle 8. Laufanordnung im Ladeblock für den Nachweis von KRAS-Mutationen

Assay	Kontrollen		Probennummer						
	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 Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an.

7. Geben Sie sofort 5 µl nukleasefreies Wasser für die Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) in die NTC-Röhrchen (Röhrchenpositionen 9–16) und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.
8. Geben Sie jeweils 5 µl DNA-Probe in die Probenröhrchen (Röhrchenpositionen 17-72), und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.
9. Geben Sie 5 µl KRAS-Positivkontrolle (Positive Control, PC) in die PC-Röhrchen (Röhrchenpositionen 1–8), und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.
10. Kennzeichnen Sie mit einem wasserfesten Filzstift die Deckel der ersten Röhrchen, die sich in jedem PCR-4-Röhrchenstreifen in der Position mit der niedrigsten Nummer befinden (z. B. Positionen 1, 5 und 9 usw.), um die Ausrichtung für das Laden der Röhrchen in den 72-Well-Rotor des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments anzuzeigen.

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

Hinweis: Bei der Assaykonfiguration muss ein korrektes Mischen der Reagenzien sichergestellt werden.

12. Setzen Sie alle PCR-4-Röhrchenstreifen gemäß Laufrichtung (Tabelle 8) in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors; verwenden Sie dabei die Kennzeichnungen auf den Deckeln zur richtigen Ausrichtung.

Hinweis: Jeder PCR-Lauf kann maximal 7 Proben umfassen. Wenn nicht alle Positionen des Rotors belegt sind, müssen alle unbesetzten Positionen im Rotor mit jeweils einem verschlossenen, leeren Röhrchen bestückt werden. Dadurch wird gewährleistet, dass ein optimaler thermischer Wirkungsgrad des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments erreicht wird.

13. Setzen Sie den 72-Well-Rotor in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (im Lieferumfang des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.
14. Doppelklicken Sie auf dem Desktop des Notebooks, das an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument angeschlossen ist, auf das Symbol *therascreen KRAS Locked Template* (*therascreen KRAS – gesperrte Vorlage*) (Abbildung 13), um die Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Software zu starten.



Abbildung 13. Das Symbol „*therascreen KRAS Locked Template*“ (*therascreen KRAS – gesperrte Vorlage*).

Standardmäßig wird die Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) angezeigt (Abbildung 14).

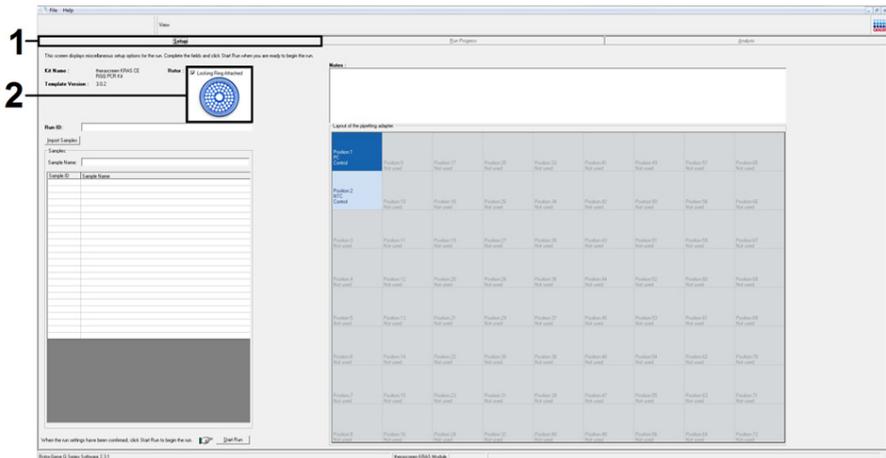


Abbildung 14. 1 = Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) und 2 = Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht).

15. Vergewissern Sie sich, dass der Schließring richtig angebracht ist, und aktivieren Sie das Kontrollkästchen Locking Ring Attached (Schließring angebracht). Schließen Sie den Deckel des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments.
16. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention die Lauf-ID in das Feld Run ID (Lauf-ID) ein.
17. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention den Probennamen in das Dialogfeld Sample Name (Probenname) ein und drücken Sie die Eingabetaste.

Dadurch wird der Probenname in die unten dargestellte Probenliste eingefügt und der Probe wird eine „Sample ID“ (Proben-ID) (1, 2, 3, usw.) zugewiesen. Darüber hinaus wird der Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters) aktualisiert; er enthält nun den Probennamen (Abbildung 15).

Hinweis: Überprüfen Sie im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters), dass der hinzugefügte Probenname durch eine Farbänderung hervorgehoben ist und alle 8 Assays in der Spalte unter dem Probenkreis markiert sind (Abbildung 15).

Hinweis: Es können maximal 7 Proben hinzugefügt werden. Die Proben-IDs (in den Probenkreisen) werden automatisch von 1 bis 7 zugewiesen.

Hinweis: Probenamen mit mehr als 8 Zeichen werden im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters) u. U. nicht vollständig angezeigt. Alternativ können Probenamen, die im Format *.smp (Rotor-Gene Q Probendatei) oder *.csv (kommagetrennte Werte) gespeichert wurden, über die Schaltfläche Import Samples (Proben importieren) importiert werden. Dabei werden die Probenamen automatisch eingetragen.

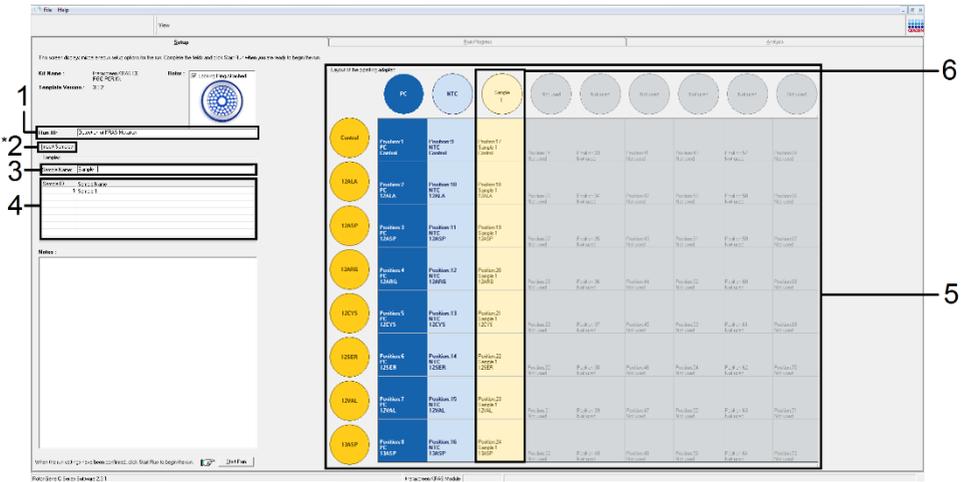


Abbildung 15. Eingabe von „Run ID“ (Lauf-ID) und „Sample Name“ (Probenname). 1 = Dialogfeld „Run ID“ (Lauf-ID), 2 = Schaltfläche „Import Sample“ (Probe importieren) (mit Version 2.1 der Software nicht verfügbar), 3 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname), 4 = Probenliste, 5 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters), 6 = hervorgehobener Probenkreis und darunter hervorgehobene Spalte mit 8 Assays.

18. Wiederholen Sie Schritt 14, um die Namen aller weiteren Proben einzugeben (Abbildung 16).

Hinweis: Um einen Probenamen zu bearbeiten, klicken Sie in der Probenliste auf Sample Name (Probenname); die ausgewählte Probe wird in dem darüber stehenden Feld Sample Name (Probenname) angezeigt. Bearbeiten Sie die Probe gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention, und drücken Sie die Eingabetaste, um den Namen zu aktualisieren.

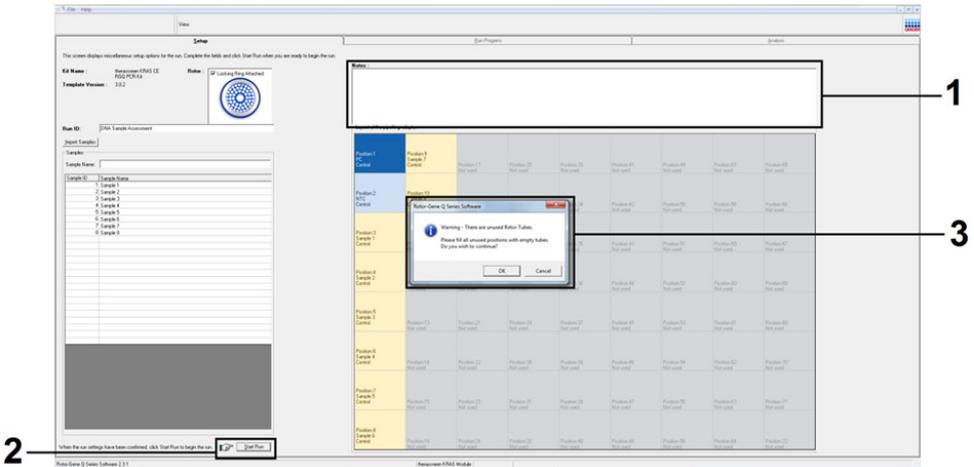


Abbildung 16. Eingabe weiterer Probenamen in das Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname). 1 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname), 2 = Probenliste, 3 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters) mit Namen zusätzlicher Proben.

19. Nachdem alle Probenamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, dass diese korrekt sind. Geben Sie bei Bedarf zusätzliche Informationen in das Feld Notes (Notizen) ein; klicken Sie dann auf die Schaltfläche Start Run (Lauf starten) (Abbildung 17).

Hinweis: Wenn eine Rotorposition unbesetzt ist, wird eine Warnmeldung eingeblendet (Abbildung 17 und Abbildung 18), um den Anwender daran zu erinnern, dass unbesetzte Positionen im Rotor mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt werden müssen. Stellen Sie sicher, dass alle unbesetzten Rotorpositionen mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt sind, und klicken Sie dann auf OK, um fortzufahren.

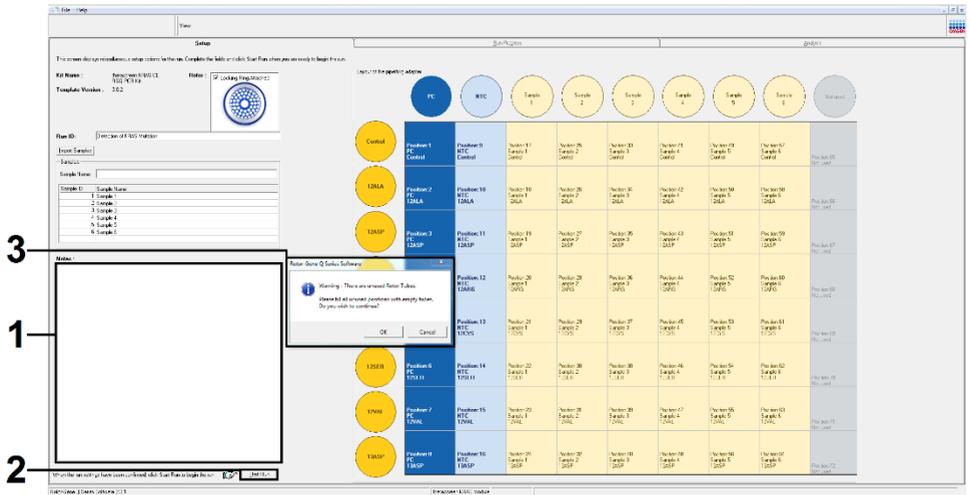


Abbildung 17. 1 = Dialogfeld „Notes“(Notizen), 2 = Schallfläche „Start Run“ (Lauf starten) und 3 = Warnung über unbesetzte Rotorpositionen.

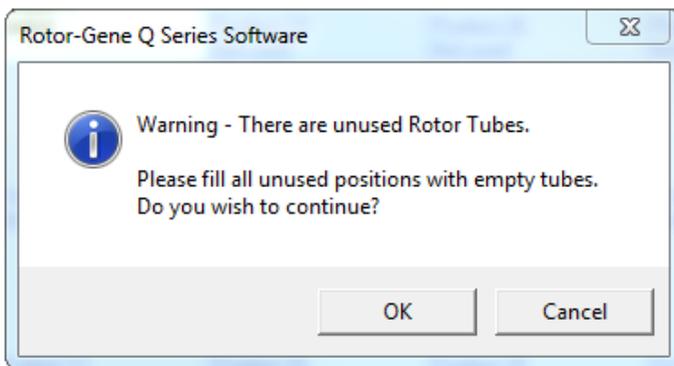


Abbildung 18. Warnung über unbesetzte Rotorpositionen.

20. Wählen Sie im Fenster „Save As“ (Speichern unter) einen geeigneten Dateinamen aus und speichern Sie den PCR-Lauf als *.rex-Laufdatei am ausgewählten Speicherort (Abbildung 19).

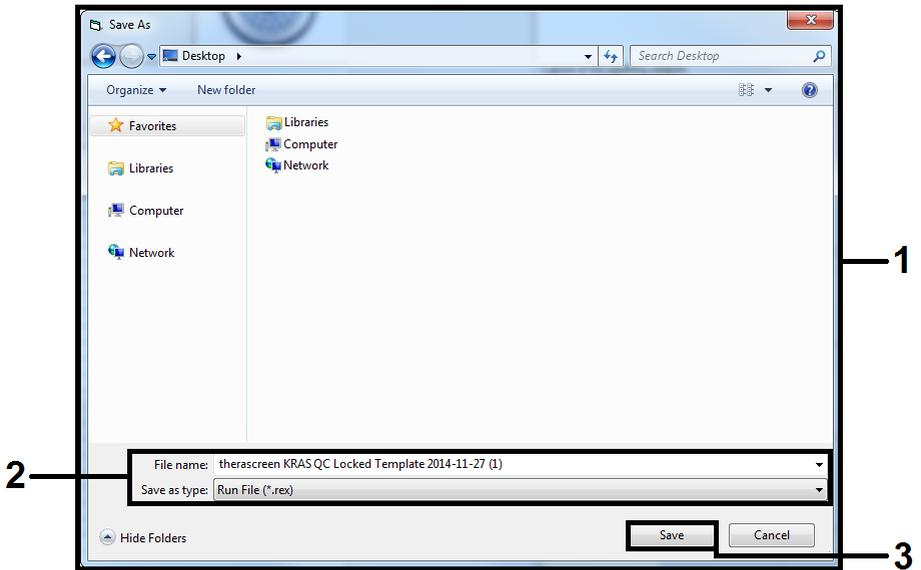


Abbildung 19. Speichern der Laufdatei.

Der PCR-Lauf wird gestartet.

Hinweis: Beim Start des Laufs wird automatisch die Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt) geöffnet, auf der die Temperaturkurve und die verbleibende Laufzeit angezeigt werden (Abbildung 20).

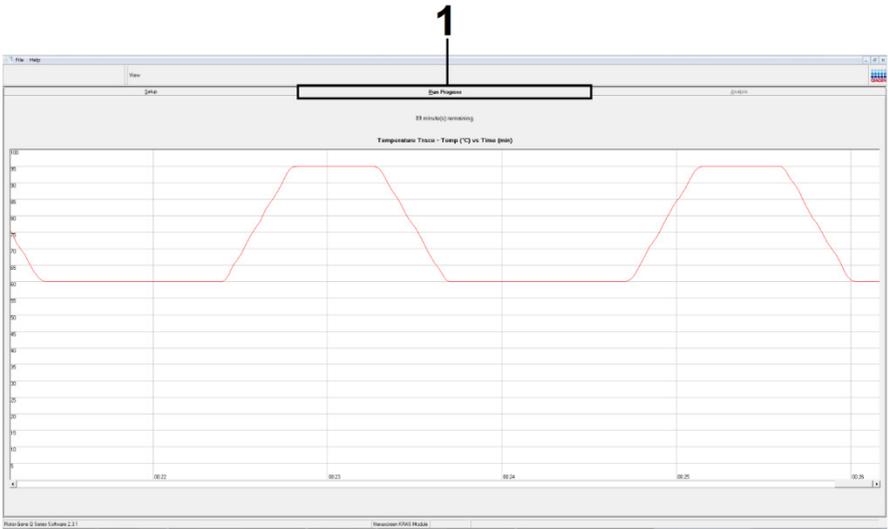


Abbildung 20. Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt).

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

Hinweis: Wenn die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) nicht geöffnet wird, klicken Sie auf diese Registerkarte (Abbildung 21).

Hinweis: Eine Beschreibung der Berechnungsmethode finden Sie im Abschnitt Interpretation der Ergebnisse.

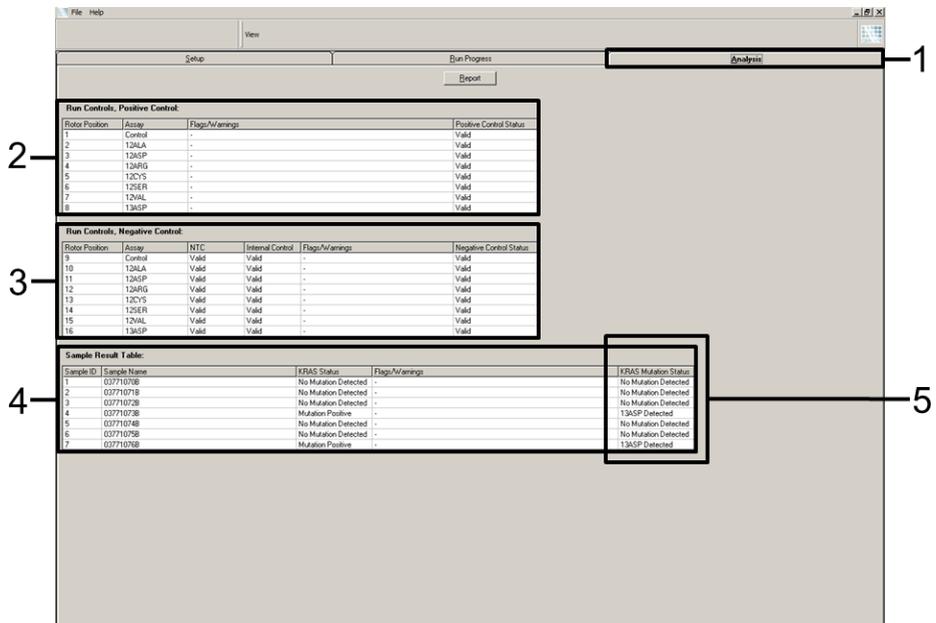


Abbildung 21. Registerkarte „Analysis“ (Analyse) mit den Ergebnissen. 1 = Registerkarte „Analysis“ (Analyse), 2 = Fensterabschnitt „Run Controls, Positive Control“ (Laufkontrollen, Positivkontrolle), 3 = Fensterabschnitt „Run Controls, Negative Control“ (Laufkontrollen, Negativkontrolle), 4 = „Sample Result Table“ (Tabelle der Probenergebnisse), 5 = Spalte „KRAS Mutation Status“ (KRAS-Mutationsstatus).

Die Assay-Ergebnisse werden wie folgt angegeben (Abbildung 21):

- Fensterabschnitt „Run Controls, Positive Control“ (Laufkontrollen, Positivkontrolle): Wenn die Ergebnisse im zulässigen Bereich liegen, wird für „Positive Control Status“ (Status der Positivkontrolle) das Ergebnis „Valid“ (Gültig) angezeigt; ansonsten lautet die Anzeige „Invalid“ (Ungültig).

- Fensterabschnitt „Run Controls, Negative Control“ (Laufkontrollen, Negativkontrolle): Wenn die Ergebnisse für „NTC“ und „Internal Control“ (Interne Kontrolle) im zulässigen Bereich liegen, wird für „Negative Control Status“ (Status der Negativkontrolle) das Ergebnis „Valid“ (Gültig) angezeigt; ansonsten lautet die Anzeige „Invalid“ (Ungültig).
- Fensterabschnitt „Sample Result Table“ (Tabelle der Probenergebnisse): Für mutationspositive Proben werden in der Spalte „KRAS Mutation Status“ (KRAS-Mutationsstatus) die jeweiligen Mutationen angegeben.

21. Klicken Sie zum Erstellen von Berichtsdateien auf Report (Bericht). Es wird das Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser) angezeigt. Wählen Sie unter „Templates“ (Vorlagen) die Option KRAS Analysis Report (KRAS-Analysebericht) aus und klicken Sie dann auf Show (Anzeigen) (Abbildung 22).

Hinweis: Berichte können im Web Archives-Format an einem alternativen Speicherort gespeichert werden, indem Sie oben links im jeweiligen Bericht auf Save As (Speichern unter) klicken.

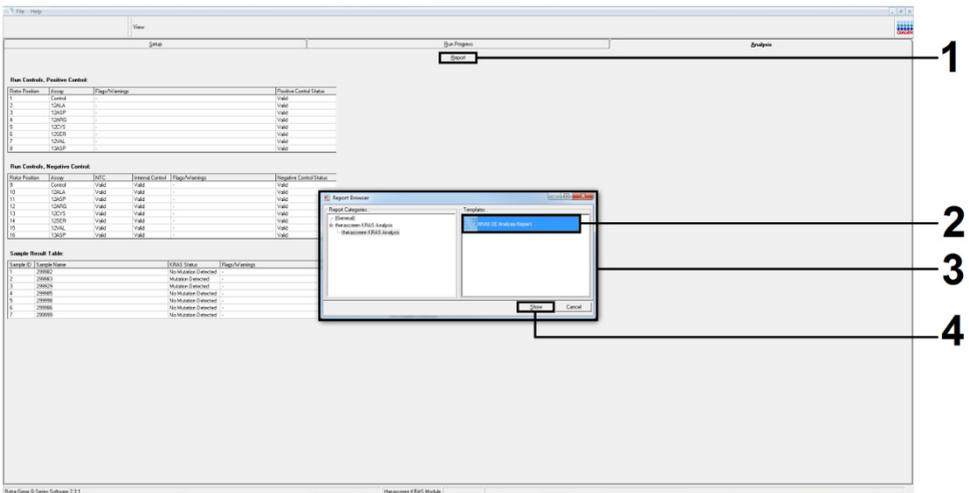


Abbildung 22. Auswählen des „KRAS Analysis Report“ (KRAS-Analyseberichts). 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = Auswahl „KRAS Analysis Report“ (KRAS-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Hinweis nur für NSCLC-Proben: Um ein falsches Mutationsergebnis für G12C (12CYS) zu vermeiden, müssen Proben mit den nachstehend aufgeführten Markierungen als „Invalid“ (Ungültig) interpretiert werden.

- SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT
- SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID
- SAMPLE_INT_CTRL_FAIL
- MUTATION_EARLY_CT
- SAMPLE_INVALID_DATA

Interpretation der Ergebnisse

Die Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package Software führt nach Abschluss eines Laufs automatisch die Analyse durch und zeigt die Mutationsergebnisse an. Im Folgenden finden Sie weitere Informationen zur Durchführung der Analyse und Anzeige der Mutationsergebnisse durch die Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package Software.

Analyse und Mutationsergebnisse

Der PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz einer bestimmten Reaktion einen Schwellenwert überschreitet, ist definiert als der C_T -Wert. C_T -Werte sind ein Maß für die Menge der jeweils eingesetzten DNA. Niedrige C_T -Werte zeigen hohe DNA-Ausgangskonzentrationen an, wohingegen hohe C_T -Werte für niedrige DNA-Ausgangskonzentrationen stehen. Reaktionen mit einem C_T -Wert werden als positive Amplifikation klassifiziert.

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

Der Schwellenwert für das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist auf 0,05 relative Fluoreszenzeinheiten festgelegt. Dieser Wert ist in der *therascreen* KRAS Assay Package Software für die beiden Fluoreszenzkanäle „Green“ und „Yellow“ konfiguriert. Der Schwellenwert wurde im Rahmen der Entwicklung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits festgelegt.

Der ΔC_T -Wert wird anhand der folgenden Gleichung berechnet:

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

Die Laufkontrollen (Positivkontrolle, NTC und interne Kontrollen) werden ausgewertet, um sicherzustellen, dass die C_T -Werte im zulässigen Bereich liegen und die Reaktionen einwandfrei durchgeführt werden.

Die ΔC_T -Werte der Probe werden als Differenz zwischen dem Mutationsassay- C_T und dem Kontrollassay- C_T derselben Probe berechnet. Proben werden als mutationspositiv eingestuft, wenn der ΔC_T -Wert kleiner oder gleich dem ΔC_T -Cut-off-Wert für diesen Assay ist. Über diesem Wert enthält die Probe entweder weniger als den Prozentsatz an Mutation, der mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachgewiesen werden kann (außerhalb der Assay-Grenzwerte), oder die Probe ist mutationsnegativ, was zu der Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) führt.

Wenn in den Mutationsreaktionen keine Amplifikation festgestellt wird, wird die Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgegeben. Von aus der Hintergrundamplifikation berechneten ΔC_T -Werten ist zu erwarten, dass sie über den ΔC_T -Cut-off-Werten liegen, und für die Probe wird dementsprechend die Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgegeben.

Für die Assay-Ergebnisse werden die Bewertungen „[Name der Mutation] Detected“ ([Name der Mutation] nachgewiesen), „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) oder „Invalid“ (Ungültig) angezeigt. Das Fehlschlagen einer Laufkontrolle führt zur Bewertung „Run Control Failed“ (Laufkontrolle fehlgeschlagen). Für mutationspositive Proben werden die jeweiligen Mutationen angegeben.

Hinweise zur Interpretation der Markierungen, die von der Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package Software angezeigt werden, finden Sie unter Von der *therascreen* KRAS Assay Package Software angezeigte Markierungen.

Hinweis: In seltenen Fällen enthält ein Tumor mehr als eine Mutation. In diesen Fällen wird die Mutation mit dem niedrigsten ΔC_T -Wert angegeben.

Grenzen des Assays

Der Test ist für den Nachweis von 7 Mutationen in den Codons 12 und 13 des KRAS-Gens bestimmt. Proben, für die das Ergebnis „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) angegeben wird, können KRAS-Mutationen enthalten, die vom Assay nicht erkannt werden (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 einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) eingesetzt. 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.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit darf nicht für die Diagnose von Erkrankungen eingesetzt werden.

Bei CRC-Proben ist das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ausschließlich zur Unterscheidung zwischen Wildtyp- und mutationspositiven Proben vorgesehen. Der Test ist so ausgelegt, dass jede Mutationsreaktion für die jeweils zu messende Mutation die optimale Sensitivität aufweist. In Proben, in denen eine Mutation nachgewiesen wird, kann jedoch eine Kreuzreaktivität mit anderen Mutationsreaktionen auftreten. Wenn mehrere Mutationsreaktionen positiv sind, gilt das Ergebnis mit dem niedrigsten ΔC_T -Wert.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist ausschließlich für formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe von Kolorektalkarzinomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen validiert.

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit validiert. Für den Gebrauch mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde ausschließlich das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument validiert.

Leistungsmerkmale

Analytische Leistung

Die Leistungsmerkmale des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits wurden in Untersuchungen an FFPE-Gewebeproben von Patienten mit Kolorektalkarzinom (Colorectal Cancer, CRC) oder nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) bestimmt. Die NSCLC-Proben wurden mittels Stanzbiopsie, Feinnadelbiopsie und Exzision gewonnen. Für jeden Probentyp wurden 8 humane FFPE-Zelllinien verwendet, von denen 7 bekannte, mit dem Assay nachweisbare KRAS-Mutationen aufwiesen und eine den KRAS-Wildtyp (d. h. keine Mutationen in Codon 12 und 13) darstellte. Der Mutationsstatus der Proben wurde durch bidirektionale Sanger-Sequenzierung bestätigt.

Cut-off-Wert

Unter Anwendung einer Methode, die an CLSI EP17-A (2004) (8) angelehnt ist, wurden 225 FFPE-Proben getestet, um die Cut-off-Werte für den Assay festzulegen. Der C_T -Bereich der Kontrollreaktion wurde als 21,92 bis 32,00 bestimmt. Die Cut-off-Werte, die auf den ΔC_T -Werten (C_T der Mutationsreaktion minus C_T der Kontrollreaktion) beruhen, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9. Für die einzelnen Mutationsassays bestimmte Cut-off-Werte.

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

Leerwertgrenze

Proben ohne Template wurden untersucht, um die Leistung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits in Abwesenheit mutationspositiver Templates zu bestimmen und um sicherzustellen, dass eine Leerprobe kein analytisches Signal liefert, das eine niedrige Mutationskonzentration anzeigen könnte. Im Rahmen der Untersuchung wurden in keinem der Mutations- oder Kontrollreaktionsröhrchen nachweisbare Kontroll- oder Mutations- C_T -Werte festgestellt (die C_T -Werte der internen Kontrolle waren allesamt gültig).

Vergleich mit der analytischen Referenzmethode: CRC

Es wurden zwei Studien durchgeführt, um nachzuweisen, dass der mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bestimmte Mutationsstatus von CRC-Proben mit dem der bidirektionalen Sequenzierung übereinstimmt. Für insgesamt 137 FFPE-Proben wurden sowohl für das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit als auch für die bidirektionale Sequenzierung gültige Ergebnisse erzielt.

Die Gesamtergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Ergebnisse der Analyse der Übereinstimmung zwischen *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit und bidirektionaler Sequenzierung sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. bidirektionale Sanger-Sequenzierung

		Mutationsbestimmung gem. bidirektionaler Sequenzierung							Gesamt	
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL		13ASP
Bestimmung gem. <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	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
	Gesamt	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tabelle 11. 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.

Die Analyse der Übereinstimmung wurde an 247 Proben durchgeführt, für die gültige Ergebnisse sowohl der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung als auch des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits vorlagen. Es gab 9 nicht übereinstimmende Proben. Die Gesamtübereinstimmung betrug 96,4 %. Die Daten belegen die hohe Richtigkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits (Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 12. *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* vs. bidirektionale Sanger-Sequenzierung (zweite Studie)

		Mutationsbestimmung gem. bidirektionaler Sequenzierung								
Bestimmung gem. <i>therascreen KRAS RGQ PCR Kit</i>	Neg.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Gesamt
	Negativ	26 1	-	-	-	-	-	-	-	1
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
Gesamt	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

Tabelle 13. Analyse der Übereinstimmung (zweite Studie)

Übereinstimmungsparameter	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

Vergleich mit der analytischen Referenzmethode: NSCLC

Zum Nachweis der Übereinstimmung des Gesamtmutationsstatus von NSCLC-Proben, die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit oder mittels bidirektionaler Sanger-Sequenzierung getestet wurden, wurden in dieser Studie klinische FFPE-NSCLC-Proben verwendet, die durch Resektion, Stanzbiopsie oder Feinnadelbiopsie gewonnen wurden. Vor dem Testen mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde aus jeder Probe DNA extrahiert. Die Ergebnisse dieses Tests wurden mit denen einer bidirektionalen Sanger-Sequenzierung verglichen.

Bei insgesamt 360 Proben wurden sowohl mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit als auch mit der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung gültige Ergebnisse erzielt, wobei 340 Proben übereinstimmende Ergebnisse lieferten.

Die Übereinstimmung zwischen dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit und der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung ist in Tabelle 14 dargestellt. Bei zwei Proben ergab die bidirektionale Sanger-Sequenzierung eine doppelte Mutationsbestimmung. Da jeweils eine Mutation dem Ergebnis des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits entsprach, wurden diese Proben für die in Tabelle 15 dargestellte Analyse von Gesamtübereinstimmung, positiver Übereinstimmung und negativer Übereinstimmung als übereinstimmend gewertet.

Tabelle 14. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. bidirektionale Sanger-Sequenzierung

		Mutationsbestimmung gem. bidirektionaler Sequenzierung								
Bestimmung gem. <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit										
	Neg.	12ALA	12ALA_12CYS	12ARG	12ASP	12CYS	12CYS_12VAL	12VAL	13ASP	Gesamt
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
Gesamt	280	4	1	3	14	35	1	17	5	360

Tabelle 15. Analyse der Übereinstimmung

Übereinstimmungsparameter	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 (Limit of Detection, LOD)

Der Messbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits basiert auf der Menge an amplifizierbarer DNA im Spezimen, die anhand des C_T -Werts der Kontrollreaktion bestimmt wird. Der durch den Kontroll- C_T festgelegte Bereich geeigneter Ausgangsmengen für den Assay beträgt 21,92 bis 32,00. Die LOD ist der minimale Prozentsatz an mutierter DNA, der in einem Wildtyp-Hintergrund noch nachgewiesen werden kann, vorausgesetzt, die Gesamtmenge an amplifizierbarer DNA liegt im angegebenen Ausgangsbereich und noch unterhalb des ΔC_T -Cut-off-Werts.

CRC

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die LOD für jede der 7 mutationsspezifischen Reaktionen des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits zu bestimmen. Für das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist die Nachweisgrenze für die Detektion von mutierter DNA auf einem Hintergrund aus Wildtyp-DNA als der niedrigste Verdünnungsfaktor definiert, bei dem 95 % der Testreplikate für jede mutationspositive Probe positiv getestet werden.

Für Datensätze mit niedriger und hoher DNA-Ausgangsmenge wurden für jeden Assay einzeln logistische Regressionen durchgeführt. Als Response-Variable diente in diesen Modellen die binäre Ausgabe „Mutation nachgewiesen“ (Nachweis = 1) und „Mutation nicht nachgewiesen“ (Nachweis = 0) und als kontinuierliche erklärende Variable \log_2 % Mutationsverdünnung. Die LODs wurden als die prozentuale Mutationsverdünnung berechnet, bei der eine voraussichtliche Nachweiswahrscheinlichkeit von 0,95 erhalten wird (Tabelle 16).

Tabelle 16. LOD-Werte der FFPE-Zelllinien für die verschiedenen Mutationsassays

Assay	LOD C₉₅ (Prozentsatz mutierter DNA in Wildtyp-DNA)
12ALA	0,8
12ARG	2,6
12ASP	6,4
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

NSCLC

Die LOD des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit-Assays wurde unter Verwendung von CRC-Gewebe bestimmt und validiert. Diese LOD-Ergebnisse wurden für NSCLC-Gewebe 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. Bei allen 60 gültigen FFPE-Zelllinien-Replikaten der getesteten Proben wurde die jeweilige Mutation an der LOD zu 100 % nachgewiesen.

In Teil 2 wurden 96 Replikate von klinischen, mittels 3 Methoden (Exzision, Stanzbiopsie und Feinnadelbiopsie) gewonnenen FFPE-NSCLC-Proben, die jeweils eine Mutation repräsentierten, auf die LOD des jeweiligen Assays verdünnt und getestet.

Die 96 gültigen Replikate von 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL und 13ASP wurden zu 100 % korrekt bestimmt. Die Assays 12CYS und 12SER erreichten 95,8 % Nachweis an der LOD.

Dadurch wurde belegt, dass die zuvor bestimmte LOD für alle Mutationsassays validiert ist, wenn NSCLC-Gewebeproben und klinische FFPE-NSCLC-Proben/FFPE-Zelllinien-Proben/patientengleiche Proben getestet werden.

DNA-Ausgangsmenge und Linearität

Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte

Es kann davon ausgegangen werden, dass die gemessenen ΔC_T -Werte konstant bleiben, wenn Proben mit verschiedenen DNA-Gesamtkonzentrationen den gleichen Anteil an mutierter DNA enthalten. Ziel dieser Studie war es, nachzuweisen, dass die Leistung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits über den gesamten DNA-Aufgabebereich (Kontroll-CT-Bereich) des Assays gleich bleibt. Unter Verwendung von DNA, die aus 8 FFPE-Zelllinien extrahiert wurde, wurden DNA-Pools mit dem niedrigsten erreichbaren C_T -Wert der Kontrollreaktion hergestellt. Die konzentrierten DNA-Stammlösungen wurden anschließend auf DNA-Konzentrationen verdünnt, die den gesamten Messbereich abdeckten (insgesamt 5 Verdünnungen, einschließlich der konzentrierten Ausgangs-Stammlösung).

Es wurde für jeden Punkt des Messbereichs ausreichend Material für 6 Replikate hergestellt. Der Verdünnungsbereich für die verschiedenen Mutationsreaktionen und der mittlere ΔC_T -Wert, der von den Ergebnissen erhalten wurde, sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 zusammengefasst. Insgesamt waren die ΔC_T -Werte bei allen Assays über den Messbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits konsistent, wodurch belegt wurde, dass die DNA-Konzentration keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Mutationsbestimmung hat.

Tabelle 17. Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte über den C_T -Bereich der Kontrollreaktion nach Ausgangsmenge – CRC-FFPE-Zelllinien

Assay	ΔC_T				
	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
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 Gesamtanzahl der Replikate für 12ASP betrug 27.

Tabelle 18. Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte über den C_T -Bereich der Kontrollreaktion nach Ausgangsmenge – FFPE-NSCLC-Zelllinien

Assay	ΔC_T				
	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
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

* Aufgrund zu geringer DNA-Konzentration wurde kein C_T -Wert für die Mutationsreaktion ermittelt, daher wurde kein ΔC_T berechnet.

Linearität/Amplifikationseffizienz als Funktion der DNA-Ausgangsmenge

Für jede Mutationsreaktion wurden die Linearität und Amplifikationseffizienz der PCR relativ zur Kontrollreaktion über den gesamten Messbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits nachgewiesen. Die Amplifikationseffizienz wurde für die verschiedenen Mutationsreaktionen und die Kontrollreaktion nach der Gleichung $[10(-1/\text{Steigung})] - 1$ berechnet.

Die Amplifikationseffizienz der Kontrolle im Vergleich zur Mutationsreaktion macht deutlich, dass der ΔC_T -Wert und somit die Mutationsbestimmung über den Messbereich des Assays gleich bleibt. Eine Übersicht über die Daten ist in Tabelle 19 (CRC-Proben) und Tabelle 20 (NSCLC-Proben) aufgeführt.

Tabelle 19. Amplifikationseffizienz bei Kontroll- und Mutationsreaktionen: CRC-Zelllinien

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

Tabelle 20. Amplifikationseffizienz bei Kontroll- und Mutationsreaktionen: NSCLC-Proben

Probe	Achsenabs.	Achsenabs. Standardfehler	Berechn. Steigung	Standardfehler (Steigung)	Untere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)	Obere Grenze des zweiseit. 95 %-KI (Steigung)	Amplifikationseffizienz	Unterschied der Amplifikationseffizienzen
12ALA	Kontroll-C _T	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	0,94 1,01	0,069
	12ALA C _T	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20		
12ARG	Kontroll-C _T	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	0,94 1,04	0,093
	12ARG C _T	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96		
12ASP	Kontroll-C _T	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	0,96 0,96	-0,001
	12ASP C _T	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00		
12CYS	Kontroll-C _T	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	0,98 1,00	0,019
	12CYS C _T	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03		
12SER	Kontroll-C _T	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	0,97 1,09	0,127
	12SER C _T	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99		
12VAL	Kontroll-C _T	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,92 0,91	0,011
	12VAL C _T	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01		
13ASP	Kontroll-C _T	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	0,94 1,01	0,066
	12ASP C _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00		

Linearität/Amplifikationseffizienz als Funktion des prozentualen Mutationsanteils

Ziel dieser Studie war es, den Effekt einer seriell verdünnten mutationspositiven Probe auf die Amplifikationseffizienz über den gesamten Messbereich des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits zu beurteilen. Begonnen wurde dabei mit Ausgangskonzentrationen mit einem C_T von ca. 22–23.

Vor der Durchführung der PCR mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit wurde zunächst die optische Dichte der DNA-Extrakte aus den CRC-FFPE-Zelllinien und den NSCLC-Proben gemessen. Dann wurden DNA-Stammlösungen mit einem C_T der Kontrollreaktion von ungefähr 23 angesetzt. 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. Für jede Mutation und jede Verdünnung wurden C_T - und ΔC_T -Werte berechnet. Für den C_T -Wert der Mutationsreaktion vs. \log_2 DNA-Ausgangsverdünnung wurde eine lineare Regression berechnet. Die Studie zeigte, dass die Verdünnung der Mutationen auf einem Hintergrund aus Wildtyp-DNA konstanter Konzentration zu Amplifikationseffizienzen führte, die nicht signifikant von den in der oben beschriebenen Linearitätsstudie ermittelten Werte abwichen.

Störsubstanzen

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen potenzieller Störsubstanzen auf die Leistung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits auszuwerten. Dazu wurden mittels Aufstockungs-Versuchen bei verschiedenen Konzentrationen die Auswirkungen jeder Substanz auf die ΔC_T -Werte und den Mutationsstatus der Testproben analysiert. 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.

In den bei normalem Gebrauch zu erwartenden Konzentrationen hat keine der untersuchten potenziellen Störsubstanzen Auswirkungen auf die Fähigkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits, zwischen mutationspositiven und mutationsnegativen Proben zu unterscheiden.

Neben der Studie der Störsubstanzen wurde der potenzielle Effekt von Nekrose in klinischen Proben beurteilt, um zu bestimmen, ob hohe Anteile von nekrotischem Gewebe in Tumorproben einen Einfluss auf die Fähigkeit haben, gültige Daten zu erzeugen. 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 wurden für 28 gültige Ergebnisse erhalten, die mit den Ergebnissen der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung übereinstimmten. Ein einzelnes Ergebnis war ungültig, weil nicht genügend DNA vorlag.

Kreuzkontamination

Ziel dieser Studie war es, das Ausmaß an Kreuzkontamination zwischen DNA-Proben bei Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits zu bestimmen, welche möglicherweise zu falsch positiven Ergebnissen führen können. 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 es sich bei der 12ALA-Reaktion um die Reaktion mit der niedrigsten Nachweisgrenze im Kit handelt).

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. In diesen Läufen wurden Röhrchen mit Wildtyp-DNA verwendet, um auf Kontamination durch mutierte DNA zu testen.

Diese Studie ergab für keinen der zum Nachweis von Kreuzkontaminationen verwendeten Wildtyp-DNA-Extrakte nachweisbare Kontaminationen.

Exklusivität/Kreuzreaktivität

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit umfasst 8 verschiedene Reaktionen: 1 Kontrollreaktion zum Nachweis einer nicht polymorphen Region des KRAS-Gens und 7 mutationsspezifische Reaktionen. Es gibt keine Reaktion zur spezifischen Messung der KRAS-Wildtyp-Sequenz in Codon 12 oder 13. 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 muss der Umfang der nicht spezifischen Amplifikation oder Kreuzreaktivität bestimmt werden, der in jeder Reaktion mit einem Überschuss an KRAS-Wildtyp-DNA auftritt, um sicherzustellen, dass keine falsch positiven Ergebnisse erhalten werden. Gleichmaßen wird die nicht spezifische Amplifikation von KRAS-Mutationen beurteilt, die vom Assay nicht nachgewiesen werden sollen. Dadurch wird belegt, dass das Ausmaß an Kreuzreaktivität zwischen den Mutationsreaktionen bei einem Überschuss an mutierter DNA nicht zu fehlerhaften Mutationsbestimmungen führt. Da die DNA-Ausgangsmenge für diesen Assay auf dem C_T -Bereich der Kontrolle (21,92–32,00) beruht, wird die höchste DNA-Ausgangskonzentration für einen C_T -Kontrollwert von ungefähr 22 festgelegt.

Nicht spezifische Amplifikation/Kreuzreaktivität: KRAS-Wildtyp-DNA

Bestimmt wurde das Ausmaß an nicht spezifischer Amplifikation von Wildtyp-DNA nach jeweils für die Amplifikation spezifischer Mutationen vorgesehenen Reaktionsgemischen. Hierzu wurden mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit insgesamt 60 Replikate von Wildtyp-DNA aus FFPE-Zelllinien und 60 NSCLC-Proben bei der höchsten amplifizierbaren DNA-Ausgangskonzentration beurteilt.

Der C_T -Wert der Kontrolle lag bei ca. 22–23. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die ΔC_T -Werte die festgelegten Cut-off-Werte überschritten haben und mindestens 95 % der Wildtyp-Replikate korrekt bestimmt wurden.

Nicht spezifische Amplifikation/Kreuzreaktivität/Exklusivität: mutationspositive KRAS-DNA

Es wurden Mutationsproben mit einer hohen DNA-Ausgangskonzentration gegen alle Reaktionsgemische getestet. Dazu wurden von jeder CRC- und NSCLC-FFPE-Zelllinie DNA-Proben hergestellt, die auf einen C_T -Wert der Kontrollreaktion von ca. 23 eingestellt wurden. 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 21 und Tabelle 22 dargestellten mittleren ΔC_T -Werte zeigen, dass zwischen den Mutationsreaktionen Kreuzreaktivität besteht. Die Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass mit der passenden Mutationsreaktion in allen Fällen die richtige Mutation bestimmt wurde (d. h. der niedrigste ΔC_T -Wert entsprach der korrekten Mutationsbestimmung). Alle anderen Testfälle wurden entweder nicht nachgewiesen oder lagen außerhalb des ΔC_T -Schwellenwerts.

Tabelle 21. Kreuzreaktivität (ΔC_T) zwischen Mutationsreaktionen unter Verwendung von DNA aus CRC-FFPE-Zelllinien mit hoher Ausgangsmenge

Mutierte DNA	Cut-off-Wert	Assay- ΔC_T						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,42*	12,66	N. u.	5,81†	2,78†	6,31†	13,21
12ASP	6,6	12,56	2,42*	N. u.	N. u.	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	1,12*	11,42	N. u.	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	0,98*	N. u.	7,96†	12,88
12SER	8	N. u.	13,39	13,31	N. u.	3,02*	12,99	13,97
12VAL	7,5	6,83†	N. u.	N. u.	N. u.	13,38	0,28*	13,74
13ASP	7,5	N. u.	13,29	13,89	N. u.	N. u.	14,36	4,5*

n. z.: Keine Kreuzreaktion.

* ΔC_T -Werte von passenden Reaktionen.

† ΔC_T -Werte von kreuzreaktiven Reaktionen unterhalb des Cut-off-Wertes.

Tabelle 22. Kreuzreaktivität (ΔC_T) zwischen Mutationsreaktionen unter Verwendung von DNA aus NSCLC-FFPE-Zelllinien mit hoher Ausgangsmenge

Mutierte DNA	Cut-off-Wert	Assay- ΔC_T						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,31*	12,8	N. u.	5,01[†]	2,26[†]	5,57[†]	12,65
12ASP	6,6	12,61	1,66*	N. u.	N. u.	N. u.	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	0,81*	11,24	N. u.	12,66	12,62
12CYS	8	N. u.	12,22	7,84[†]	0,56*	N. u.	13,06	11,84
12SER	8	N. u.	12,87	13,21	N. u.	1,93*	13,25	12,93
12VAL	7,5	5,93[†]	14,29	N. u.	N. u.	13,14	0,45*	12,39
13ASP	7,5	N. u.	N. u.	N. u.	N. u.	N. u.	N. u.	2,02*

n. z.: Keine Kreuzreaktion.

* ΔC_T -Werte von passenden Reaktionen.

[†] ΔC_T -Werte von kreuzreaktiven Reaktionen unterhalb des Cut-off-Wertes.

Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits wurde anhand eines an CLSI EP12-A und EP5-A2 (21. 22) angelehnten Protokolls bestimmt. Für diese Bestimmung wurden klinische CRC-Proben verwendet. Eine Wildtyp-Probe und eine Probe je Mutation wurden mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit getestet. Dabei kamen an jedem der 3 Standorte 2 Bediener zum Einsatz, die sowohl Proben als auch Kontrollen unter Verwendung von 3 Chargen des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits täglich über einen Zeitraum von 5 Tagen testeten. Pro Tag wurden 2 Läufe und pro Probe und Tag jeweils 2 Replikate durchgeführt. Die für die einzelnen Reaktionen jeder Probe erhaltenen C_T - und ΔC_T -Werte wurden darüber hinaus einer Varianzkomponentenanalyse unterzogen.

Die Reproduzierbarkeit des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits wurde anhand von Proben mit niedrig konzentrierter mutierter DNA (3x LOD) und Wildtyp-DNA demonstriert, für die über alle Assays mehrerer Chargen, Plattformen und Bediener hinweg sowohl innerhalb von als auch zwischen den Laborexperimenten mindestens 39 von 40 Mutationsbestimmungen korrekt waren. Die Schätzungen der Varianzen (1x Standardabweichung), die mit den Proben (C50 und 3x LOD) erhalten wurden, sind in Tabelle 23 und Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 23. Schätzungen der Assay-Varianz

Assay	% VK für ΔC_T		% VK für Mutations- C_T		% VK für Kontroll- C_T		
	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	9,66	15,47	1,52	1,65	1,11	3,74	1,26
13ASP	13,73	9,35	1,91	2,08	1,11	1,41	1,19

Tabelle 24. Ermittelte Wiederholpräzision

Assay	% VK für ΔC_T		% VK für Mutations- C_T		% VK für Kontroll- C_T		
	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
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

Die ermittelten Anteile der Proben bei 3x LOD, die zum Testen von mutierter DNA und Wildtyp-DNA verwendet wurden, wurden insgesamt und für jeden Standort angegeben. Für alle Assays und Probenkombinationen wurde für mindestens 79 aus 80 Replikaten die korrekte Mutation bestimmt. Der Gesamtanteil der korrekten Bestimmungen betrug 99,6 % (1115/1120): 99,6 % (558/560) für mutationspositive Proben (3xLOD) und 99,5 % (557/560) für Proben, bei denen keine Mutation nachgewiesen wurde (Wildtyp) (Tabelle 25).

Tabelle 25. 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 Kits innerhalb eines Labors (Wiederholbarkeit) wurde bestimmt. Es wurden sowohl die Richtigkeit der Mutationsergebnisse als auch die Präzision der C_T-Werte (Differenz zwischen den C_T-Werten einer Mutationsreaktion und der Kontrollreaktion) ermittelt.

Insgesamt wurden Proben für 15 Panelmitglieder vorbereitet: eine für jede der 7 mit dem KRAS-Kit nachweisbaren Mutationen (bei LOD und 2x LOD) und eine Probe eines Wildtyp(WT)-Panelmitglieds. Die mutierten Panelmitglieder wurden je nach Verfügbarkeit entweder durch eine FFPE-Zelllinie oder eine klinische Probe repräsentiert. Alle Proben wurden auf einen Kontroll-C_T von 27 normalisiert und die mutierten Proben wurden in Wildtyp-DNA verdünnt, um ausreichend Material für Proben mit Mutationskonzentrationen von 1x LOD und 2x LOD zu erzeugen.

Der Anteil korrekter Bestimmungen für jedes Testpanel ist in Tabelle 26 und die Werte der quantitativen Präzision sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 26. Anteil korrekter Mutationsbestimmungen

Gruppierungsvariablen		Anteil		Grenzen des zweiseitigen 95%-KI	
Probenkonzentration	Assay	Anteil	Prozentsatz	Untere	Obere
2xLOD	12ALA	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12ARG*	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12ASP	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12CYS	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12SER*	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	12VAL	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
	13ASP*	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %
LOD	12ALA	39/40	97,50 %	86,84 %	99,94 %
	12ARG	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12ASP	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12CYS	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12SER*	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	12VAL	40/40	100,00 %	91,19 %	100,00 %
	13ASP*	38/40	95,00 %	83,08 %	99,39 %
WT	Alle	28/28	100,00 %	87,66 %	100,00 %

* Repräsentiert durch FFPE-Zelllinie

Tabelle 27. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Wiederholbarkeit

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

* SD, % VK

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 27. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Wiederholbarkeit (Fortsetzung)

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	Mittelwert	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Riqq*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bedienern*	Resi*	Gesamt
C _T für Green	2xLOD	12ALA	28	32,09	(0,0000; 0,00 %)	(0,1314; 0,41 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0675; 0,21 %)	(0,1073; 0,33 %)	(0,1158; 0,36 %)	(0,1957; 0,61 %)
		12ARG	28	31,50	(0,0000; 0,00 %)	(0,2598; 0,82 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,3324; 1,06 %)	(0,4189; 1,33 %)
		12ASP	28	31,30	(0,0000; 0,00 %)	(0,1891; 0,60 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0920; 0,29 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1800; 0,58 %)	(0,2667; 0,85 %)
		12CYS	28	32,07	(0,0000; 0,00 %)	(0,2523; 0,79 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1606; 0,50 %)	(0,2011; 0,63 %)	(0,1512; 0,47 %)	(0,3388; 1,06 %)
		12SER	28	32,06	(0,0000; 0,00 %)	(0,2049; 0,64 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1250; 0,39 %)	(0,1177; 0,37 %)	(0,1263; 0,39 %)	(0,2648; 0,83 %)
		12VAL	28	30,65	(0,0000; 0,00 %)	(0,1772; 0,58 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1198; 0,39 %)	(0,1063; 0,35 %)	(0,1656; 0,54 %)	(0,2639; 0,86 %)
		13ASP	28	31,98	(0,0000; 0,00 %)	(0,3773; 1,18 %)	(0,0497; 0,16 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1813; 0,57 %)	(0,4138; 1,29 %)
		LOD	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 %)
	12ARG	40	31,90	(0,0000; 0,00 %)	(0,2186; 0,69 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2289; 0,72 %)	(0,1519; 0,48 %)	(0,3106; 0,97 %)	
	12ASP	40	31,02	(0,0000; 0,00 %)	(0,1762; 0,57 %)	(0,1093; 0,35 %)	(0,1296; 0,42 %)	(0,2492; 0,80 %)	(0,1005; 0,32 %)	(0,2908; 0,94 %)	
	12CYS	40	33,14	(0,1216; 0,37 %)	(0,0493; 0,15 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,3468; 1,05 %)	(0,0501; 0,15 %)	(0,3155; 0,95 %)	(0,4216; 1,27 %)	
	12SER	40	33,08	(0,0832; 25 %)	(0,2591; 0,78 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2424; 0,73 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2258; 0,68 %)	(0,3864; 1,17 %)	
	12VAL	40	31,62	(0,2858; 0,90 %)	(0,0951; 0,30 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2244; 0,71 %)	(0,0344; 0,11 %)	(0,1763; 0,56 %)	(0,3432; 1,09 %)	
	13ASP	38	33,09	(0,3237; 0,98 %)	(0,1009; 0,31 %)	(0,1409; 0,43 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2785; 0,84 %)	0,4133	

* SD, % VK

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 27. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Wiederholbarkeit (Fortsetzung)

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	Mittelwert	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rngq*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bedienern*	Resi*	Gesamt
C _T für Yellow	2xLOD	12ALA	28	33,20	{0,0000; 0,00 %}	{0,0515; 0,16 %}	{0,0330; 0,10 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0607; 0,18 %}	{0,2117; 0,64 %}	{0,2235; 0,67 %}
		12ARG	28	33,05	{0,1397; 0,42 %}	{0,1321; 0,40 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,2393; 0,72 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,3792; 1,15 %}	{0,4559; 1,38 %}
		12ASP	28	33,00	{0,0597; 0,18 %}	{0,2131; 0,65 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1313; 0,40 %}	{0,1954; 0,59 %}	{0,3059; 0,93 %}
		12CYS	28	33,19	{0,0646; 0,19 %}	{0,0971; 0,29 %}	{0,0233; 0,07 %}	{0,0679; 0,20 %}	{0,0863; 0,26 %}	{0,1943; 0,59 %}	{0,2378; 0,72 %}
		12SER	28	32,85	{0,0525; 0,16 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0337; 0,10 %}	{0,0937; 0,29 %}	{0,1320; 0,40 %}	{0,1588; 0,48 %}
		12VAL	28	33,11	{0,0000; 0,00 %}	{0,1026; 0,31 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1469; 0,44 %}	{0,1469; 0,44 %}	{0,2912; 0,88 %}	{0,3458; 1,04 %}
		13ASP	28	33,03	{0,0000; 0,00 %}	{0,1928; 0,58 %}	{0,1015; 0,31 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1450; 0,44 %}	{0,2493; 0,75 %}
		LOD	12ALA	40	33,37	{0,0000; 0,00 %}	{0,2010; 0,60 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1942; 0,58 %}	{0,2177; 0,65 %}
	12ARG	40	33,14	{0,0000; 0,00 %}	{0,2168; 0,65 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,3061; 0,92 %}	{0,1637; 0,49 %}	{0,1748; 0,53 %}	{0,3717; 1,12 %}	
	12ASP	40	32,98	{0,0000; 0,00 %}	{0,2599; 0,79 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1735; 0,53 %}	{0,2228; 0,68 %}	{0,3618; 1,10 %}	
	12CYS	40	33,31	{0,0000; 0,00 %}	{0,2028; 0,61 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1209; 0,36 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,2132; 0,64 %}	{0,3050; 0,92 %}	
	12SER	40	33,08	{0,1254; 0,38 %}	{0,2847; 0,86 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1505; 0,46 %}	{0,3263; 0,99 %}	
	12VAL	40	33,29	{0,3133; 0,94 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,2621; 0,79 %}	{0,3574; 1,07 %}	
	13ASP	40	33,13	{0,1101; 0,33 %}	{0,1326; 0,40 %}	{0,1666; 0,50 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,0000; 0,00 %}	{0,1925; 0,58 %}	{0,2804; 0,85 %}	

* SD, % VK

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 27. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Wiederholbarkeit (Fortsetzung)

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	Mittelwert	Zw. Tagen*	Zw. Läufen N*	Zw. Rgq*	Zw. Kit-Chargen*	Zw. Bedienern*	Resi*	Gesamt
C _T für Yellow	WT	12ALA	28	33,41	(0,1443; 0,43 %)	(0,1997; 0,60 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2269; 0,68 %)	(0,3248; 0,97 %)
		12ARG	28	33,30	(0,0875; 0,26 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,4098; 1,23 %)	(0,0904; 0,27 %)	(0,2368; 0,71 %)	(0,3983; 1,20 %)
		12ASP	28	33,12	(0,1591; 0,48 %)	(0,1748; 0,53 %)	(0,0477; 0,14 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2131; 0,64 %)	(0,3075; 0,93 %)
		12CYS	28	33,42	(0,0000; 0,00 %)	(0,2009; 0,60 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1444; 0,43 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2121; 0,63 %)	(0,3077; 0,92 %)
		12SER	28	33,22	(0,2485; 0,75 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0633; 0,19 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1497; 0,45 %)	(0,2517; 0,76 %)
		12VAL	28	33,35	(0,0000; 0,00 %)	(0,2591; 0,78 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1429; 0,43 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2721; 0,82 %)	(0,3863; 1,16 %)
		13ASP	28	33,45	(0,0000; 0,00 %)	(0,1194; 0,36 %)	(0,0526; 0,16 %)	(0,0341; 0,10 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1651; 0,49 %)	(0,2078; 0,62 %)

* SD, % VK

Die Präzision des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits zwischen Laboren (Reproduzierbarkeit) wurde bestimmt. 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 nach RGQ-Instrument, Bediener und KRAS-Kit-Charge variiert und Läufen pro Tag variiert. So wurden je Standort insgesamt 88 Läufe an 22 nicht aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

Der Anteil der korrekten Mutationsbestimmungen ist in Tabelle 28 angegeben. Die Werte der quantitativen Präzision sind in Tabelle 29 aufgeführt. Die Gesamtproduzierbarkeit des KRAS-Kits ist in der Spalte „Gesamtanz.“ (SD, % VK) in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 28. Anteil korrekter Mutationsbestimmungen über Standorte hinweg

Gruppierungsvariablen		Anteil		Grenzen des zweiseitigen 95%-KI	
Probenkonzentration	Assay	Anteil	Prozentsatz	Untere	Obere
2xLOD	12ALA	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12ARG*	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12ASP	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12CYS	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12SER*	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	12VAL	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
	13ASP*	84/84	100,00 %	95,70 %	100,00 %
LOD	12ALA	118/120	98,33 %	94,11 %	99,80 %
	12ARG	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	12ASP	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	12CYS	119/120	99,17 %	95,44 %	99,98 %
	12SER*	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	12VAL	120/120	100,00 %	96,97 %	100,00 %
	13ASP*	118/120	98,33 %	94,11 %	99,80 %
WT	Alle	82/84	97,62 %	91,66 %	99,71 %

* Repräsentiert durch FFPE-Zelllinie

Tabelle 29. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Reproduzierbarkeit

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	Mittelwert	Zwischen-Standarden*	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*	Gesamt
Delta C _t	2x10D	12ALA	84	5,48	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1669; 3,05 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1287; 2,35 %)	(0,1679; 3,07 %)	(0,2640; 4,82 %)
		12ARG	84	4,81	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1172; 2,43 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2729; 5,67 %)	(0,2967; 6,16 %)
		12ASP	84	4,57	(0,0000; 0,00 %)	(0,0943; 2,06 %)	(0,1457; 3,19 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0600; 1,31 %)	(0,1718; 3,76 %)	(0,1565; 3,43 %)	(0,2854; 6,25 %)
		12CYS	84	5,61	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2060; 3,67 %)	(0,0264; 0,47 %)	(0,0698; 1,24 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1671; 2,98 %)	(0,2728; 4,87 %)
		12SER	84	5,34	(0,0000; 0,00 %)	(0,1362; 2,55 %)	(0,1669; 3,13 %)	(0,1527; 2,86 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2020; 3,79 %)	(0,2382; 4,46 %)	(0,3902; 7,31 %)
		12VAL	84	4,13	(0,0874; 2,11 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1677; 4,06 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0869; 2,10 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2711; 6,56 %)	(0,3359; 8,12 %)
		13ASP	84	5,22	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2161; 4,14 %)	(0,2712; 5,20 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1930; 3,70 %)	(0,2275; 4,36 %)	(0,4279; 8,20 %)
LOD	12x10D	12ALA	119	6,33	(0,0000; 0,00 %)	(0,0410; 0,65 %)	(0,1207; 1,91 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0247; 0,39 %)	(0,2640; 4,17 %)	(0,2936; 4,64 %)
		12ARG	120	5,42	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1797; 3,31 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1872; 3,45 %)	(0,2590; 4,78 %)
		12ASP	120	4,66	(0,1183; 2,54 %)	(0,0646; 1,38 %)	(0,2121; 4,55 %)	(0,0261; 0,56 %)	(0,0217; 0,46 %)	(0,0440; 0,94 %)	(0,1455; 3,12 %)	(0,2862; 6,14 %)
		12CYS	120	6,54	(0,0000; 0,00 %)	(0,0132; 0,20 %)	(0,1775; 2,72 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1621; 2,48 %)	(0,1708; 2,61 %)	(0,4202; 6,43 %)	(0,4981; 7,62 %)
		12SER	120	6,28	(0,0000; 0,00 %)	(0,0824; 1,31 %)	(0,2271; 3,62 %)	(0,0775; 1,24 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2383; 3,80 %)	(0,3164; 5,04 %)	(0,4570; 7,28 %)
		12VAL	120	5,05	(0,0315; 0,62 %)	(0,1648; 3,26 %)	(0,0955; 1,89 %)	(0,0703; 1,39 %)	(0,0320; 0,63 %)	(0,0795; 1,57 %)	(0,2120; 4,20 %)	(0,2965; 5,87 %)
		13ASP	118	6,17	(0,0000; 0,00 %)	(0,1673; 2,71 %)	(0,1987; 3,22 %)	(0,2332; 3,78 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0843; 1,37 %)	(0,3075; 4,99 %)	(0,4488; 7,28 %)

** SD, % VK

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 29. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Reproduzierbarkeit (Fortsetzung)

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	Mittelwert	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zw. Läufen N am gleichen Standort*	Zw. Rggs am gleichen Standort*	Zw. Kit-Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest*	Gesamt
C _i für Green	2xLOD	12ALA	84	32,13	(0,1578; 0,49 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2509; 0,78 %)	(0,0745; 0,23 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1249; 0,39 %)	(0,1362; 0,42 %)	(0,3390; 1,06 %)
		12ARG	84	31,61	(0,0882; 0,28 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2430; 0,77 %)	(0,1339; 0,42 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2604; 0,82 %)	(0,3828; 1,21 %)
		12ASP	84	31,24	(0,1655; 0,53 %)	(0,0391; 0,13 %)	(0,2178; 0,70 %)	(0,0600; 0,19 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2052; 0,66 %)	(0,1426; 0,46 %)	(0,3542; 1,13 %)
		12CYS	84	32,15	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2836; 0,88 %)	(0,0852; 0,26 %)	(0,0940; 0,29 %)	(0,1658; 0,52 %)	(0,1318; 0,41 %)	(0,3636; 1,13 %)
		12SER	84	32,14	(0,1457; 0,45 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2659; 0,83 %)	(0,1807; 0,56 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2715; 0,84 %)	(0,1783; 0,55 %)	(0,4554; 1,42 %)
		12VAL	84	30,69	(0,0646; 0,21 %)	(0,0480; 0,16 %)	(0,2124; 0,69 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1031; 0,34 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2000; 0,65 %)	(0,3143; 1,02 %)
		13ASP	84	32,12	(0,2111; 0,66 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,3218; 1,00 %)	(0,2966; 0,92 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1743; 0,54 %)	(0,1980; 0,62 %)	(0,5184; 1,61 %)
LOD		12ALA	119	32,93	(0,0000; 0,00 %)	(0,1524; 0,46 %)	(0,1821; 0,55 %)	(0,1048; 0,32 %)	(0,0757; 0,23 %)	(0,1007; 0,31 %)	(0,2526; 0,77 %)	(0,3721; 1,13 %)
		12ARG	120	31,98	(0,0000; 0,00 %)	(0,0743; 0,23 %)	(0,1936; 0,61 %)	(0,1262; 0,39 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1332; 0,42 %)	(0,1619; 0,51 %)	(0,3096; 0,97 %)
		12ASP	120	31,06	(0,1880; 0,61 %)	(0,1184; 0,38 %)	(0,1681; 0,54 %)	(0,1033; 0,33 %)	(0,1171; 0,38 %)	(0,1481; 0,48 %)	(0,1333; 0,43 %)	(0,3511; 1,13 %)
		12CYS	120	33,19	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2513; 0,76 %)	(0,0776; 0,23 %)	(0,2128; 0,64 %)	(0,1427; 0,43 %)	(0,2712; 0,82 %)	(0,4401; 1,33 %)
		12SER	120	33,13	(0,2194; 0,66 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2433; 0,73 %)	(0,1263; 0,38 %)	(0,1470; 0,44 %)	(0,1973; 0,60 %)	(0,2052; 0,62 %)	(0,4437; 1,34 %)
		12VAL	120	31,65	(0,0000; 0,00 %)	(0,1254; 0,40 %)	(0,1645; 0,52 %)	(0,1307; 0,41 %)	(0,1271; 0,40 %)	(0,0976; 0,31 %)	(0,1792; 0,57 %)	(0,3159; 1,00 %)
13ASP	118	33,08	(0,0000; 0,00 %)	(0,1789; 0,54 %)	(0,1661; 0,50 %)	(0,3569; 1,08 %)	(0,0649; 0,20 %)	(0,1565; 0,47 %)	(0,2588; 0,78 %)	(0,4894; 1,48 %)		

** SD, % VK

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 29. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Reproduzierbarkeit (Fortsetzung)

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	Mittelwert	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zw. Läufen N am gleichen Standort*	Zw. Rigs am gleichen Standort*	Zw. Kit-Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest*	Gesamt
C _i für Yellow	2xLOD	12ALA	84	33,25	(0,0706; 0,21 %)	(0,0399; 0,12 %)	(0,1314; 0,40 %)	(0,1303; 0,39 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1124; 0,34 %)	(0,1913; 0,58 %)	(0,2883; 0,87 %)
		12ARG	84	33,07	(0,0000; 0,00 %)	(0,1406; 0,43 %)	(0,1353; 0,41 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2024; 0,61 %)	(0,1262; 0,38 %)	(0,2831; 0,86 %)	(0,4016; 1,21 %)
		12ASP	84	32,98	(0,0000; 0,00 %)	(0,0480; 0,15 %)	(0,1706; 0,52 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0797; 0,24 %)	(0,1795; 0,54 %)	(0,2616; 0,79 %)
		12CYS	84	33,20	(0,0000; 0,00 %)	(0,0976; 0,29 %)	(0,1781; 0,54 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1454; 0,44 %)	(0,1723; 0,52 %)	(0,2939; 0,89 %)
		12SER	84	32,91	(0,0000; 0,00 %)	(0,1101; 0,33 %)	(0,0549; 0,17 %)	(0,0669; 0,20 %)	(0,0677; 0,21 %)	(0,1186; 0,36 %)	(0,2274; 0,69 %)	(0,2916; 0,89 %)
		12VAL	84	33,17	(0,0688; 0,21 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1896; 0,57 %)	(0,0937; 0,28 %)	(0,1140; 0,34 %)	(0,1311; 0,40 %)	(0,2605; 0,79 %)	(0,3768; 1,14 %)
		13ASP	84	33,10	(0,0000; 0,00 %)	(0,0482; 0,15 %)	(0,2035; 0,61 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0466; 0,14 %)	(0,1460; 0,44 %)	(0,1688; 0,51 %)	(0,3019; 0,91 %)
LOD		12ALA	119	33,33	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2108; 0,63 %)	(0,0820; 0,25 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1443; 0,43 %)	(0,2253; 0,68 %)	(0,3411; 1,02 %)
		12ARG	120	33,15	(0,1092; 0,33 %)	(0,0537; 0,16 %)	(0,1605; 0,48 %)	(0,0507; 0,15 %)	(0,2157; 0,65 %)	(0,1276; 0,39 %)	(0,2180; 0,66 %)	(0,3749; 1,13 %)
		12ASP	120	32,96	(0,0000; 0,00 %)	(0,0832; 0,25 %)	(0,2022; 0,61 %)	(0,0864; 0,26 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1117; 0,34 %)	(0,2223; 0,67 %)	(0,3343; 1,01 %)
		12CYS	120	33,26	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2232; 0,67 %)	(0,1691; 0,51 %)	(0,0789; 0,24 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,2097; 0,63 %)	(0,3516; 1,06 %)
		12SER	120	33,01	(0,1573; 0,48 %)	(0,0716; 0,22 %)	(0,2134; 0,65 %)	(0,0951; 0,29 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0784; 0,24 %)	(0,1689; 0,51 %)	(0,3263; 0,99 %)
		12VAL	120	33,25	(0,1519; 0,46 %)	(0,1960; 0,59 %)	(0,1272; 0,38 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1298; 0,39 %)	(0,0553; 0,17 %)	(0,2162; 0,65 %)	(0,3487; 1,05 %)
13ASP	118	33,16	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1768; 0,53 %)	(0,0998; 0,30 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,0000; 0,00 %)	(0,1973; 0,59 %)	(0,2802; 0,84 %)		

** SD, % VK

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 29. Varianzkomponenten in Bezug auf SD und % VK – Reproduzierbarkeit (Fortsetzung)

Analysevariable	Probenkonzentration	Assay	Anz. Beobachtungen	Mittelwert	Zwischen Standorten*	Zwischen Tagen am gleichen Standort*	Zw. Läufen N am gleichen Standort*	Zw. Rigs am gleichen Standort*	Zw. Kit-Chargen am gleichen Standort*	Zw. Bedienern am gleichen Standort*	Rest*	Gesamt
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 %)	

Variabilität der Probenhandhabung

Ziel dieser Untersuchung war es, die Auswirkungen von Abweichungen in der Probenhandhabung, speziell der DNA-Extraktion, auf die Leistung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits zu beurteilen. Diese Untersuchung ergänzt die Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitsuntersuchung durch eine Analyse der Abweichungen in der Probenhandhabung bei Verarbeitung der gleichen klinischen FFPE-Schnitte und FFPE-Zellinienschnitte an 3 Standorten und anschließendem Test mittels *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CRC

Von 10 FFPE-CRC-Proben wurden jeweils 30 sequenzielle 5-µm-Schnitte genommen (3 Wildtyp und 1 pro Mutation). Die Schnitte wurden auf 1 von 3 Standorten randomisiert, sodass jeder Testort pro FFPE-Probe 10 Schnitte erhielt (insgesamt 100 Schnitte). Von den 300 getesteten DNA-Extrakten waren 298 Proben gültig. Für die KRAS-Mutationsbestimmungen wurde über die 3 Standorte eine Übereinstimmung von 99,33 % erzielt.

Ein Vergleich der mittleren DCT-Werte für mutierte Proben und Wildtyp-Proben nach Standort ergab für die Ergebnisse eine sehr gute Übereinstimmung. Die Ergebnisse belegen, dass bei der DNA-Extraktion und Probenvorbereitung in Verbindung mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit eine gute Übereinstimmung erzielt wird.

NSCLC

Für diese Untersuchung wurden 13 klinische NSCLC-Proben (3 x 12ASP, 3 x 12CYS, 4 x 12VAL, 3 x Wildtyp) sowie 4 FFPE-Zelllinienproben (12ALA, 12ARG, 12SER, 13ASP) verwendet. Die Proben wurden jeweils auf andere Art gewonnen: mittels chirurgischer Exzision, Feinnadelbiopsie oder Stanzbiopsie. Die Zelllinien wurden zur Repräsentation seltener Mutationen genutzt, von denen 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 aus einer Charge von 20 FFPE-Schnitten (10 Paaren) pro Mutation bzw. Wildtyp extrahiert.

Bei den Tests der vorbereiteten Proben mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit an den 3 verschiedenen Teststandorten war die Mutationsbestimmung bei allen 7 Mutationen und den Wildtyp-Proben korrekt. Die Gesamtquote der korrekten Bestimmungen bei den 7 Mutationen und den Wildtyp-Proben betrug 100 %, was belegt, dass die DNA-Extraktion und der Mutationsnachweis mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit standortübergreifend konsistent waren.

Es wurde eine weitere Studie zur Probenhandhabung unter Verwendung für 12ALA-, 12ARG-, 12SER- und 13ASP-Mutationen repräsentativer klinischer FFPE-NSCLC-Proben durchgeführt, da in der vorherigen Studie für diese Mutationen repräsentative Zelllinienproben verwendet wurden. Diese zusätzliche Studie erfolgte nach dem gleichen Studiendesign wie die vorherige Studie. Alle Probenvorbereitungen für Proben mit 12ALA-, 12ARG- und 13ASP-Mutation, die an den drei verschiedenen Teststandorten extrahiert wurden, lieferten bei der Analyse mit dem KRAS Kit ein korrektes Mutationsergebnis. Insgesamt wurden für 100 % dieser Proben korrekte Ergebnisse erhalten. Bei den Probenvorbereitungen für die 12SER-Mutation wurde über alle drei Teststandorte ein Anteil korrekter Mutationsbestimmungen von 28/30 (Prozentsatz korrekter Bestimmungen von 93,33 %) erreicht. Die Ergebnisse belegen, dass bei der DNA-Extraktion und Probenverarbeitung, die für die Tests mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit eingesetzt wurden, eine gute Konsistenz erzielt wird.

Äquivalenz der Probengewinnungsmethoden (nur NSCLC)

Mit dieser Untersuchung sollte beurteilt werden, ob die Mutationsbestimmung mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bei NSCLC-Proben durch die Methode der Probengewinnung beeinflusst wird. Es wurden die 3 Probengewinnungsmethoden Exzision, Feinnadelbiopsie und Stanzbiopsie untersucht.

Für diese Untersuchung wurden „patientengleiche“ Stanz- und Feinnadelbiopsate aus chirurgisch exzidierten Tumorproben gewonnen, damit Proben desselben Tumors mit allen 3 Methoden gewonnen werden konnten. Jede Probe wurde mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit extrahiert und getestet.

Jede Probe wurde mit dem KRAS-Kontrollassay extrahiert und getestet. Alle Proben, die ein gültiges Ergebnis lieferten (169 Exzisionsproben, 169 Stanzbiopsate und 164 Feinnadelbiopsate), wurden mit allen 8 KRAS-Assays getestet.

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

Tabelle 30. Übereinstimmung zwischen Probengewinnungsmethoden

Vergleich	Übereinstimmung	Häufigkeiten n	Prozentsatz (%)	Untergrenze des zweiseitigen KI	Obergrenze des zweiseitigen 95%-KI
Stanzbiopsie vs Feinnadelbiopsie mit Stanzbiopsie als Referenz	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
Stanzbiopsie vs Resektion mit Stanzbiopsie als Referenz	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
Feinnadelbiopsie vs Stanzbiopsie mit Feinnadelbiopsie als Referenz	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
Feinnadelbiopsie vs Resektion mit Feinnadelbiopsie als Referenz	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

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 30. Übereinstimmung zwischen Probengewinnungsmethoden (Fortsetzung)

Vergleich	Übereinstimmung	Häufigkeiten	Prozentsatz (%)	Untergrenze des zweiseitigen KI	Obergrenzen des zweiseitigen 95%-KI
Resektion vs Stanzbiopsie mit Resektion als Referenz	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
Resektion vs Feinnadelbiopsie mit Resektion als Referenz	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

Zusätzlich wurde eine Passing-Bablok- und Deming-Regressionsanalyse durchgeführt, um die C_T - und ΔC_T -Werte zwischen verschiedenen Probengewinnungsmethoden zu vergleichen. Die Regressionsanalyse ergab keine Hinweise darauf, dass ein konstanter oder proportionaler Unterschied zwischen den Probenotypen Resektion, Stanzbiopsie und Feinnadelbiopsie in Bezug auf C_T oder ΔC_T vorliegt. Es wurde auch eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um den Effekt des prozentualen Anteils von nekrotischem und Tumorgewebe auf die relevanten ΔC_T -Werte zu untersuchen. Die Steigung der Regressionsgeraden für den prozentualen Anteil von sowohl nekrotischem als auch Tumorgewebe vs. ΔC_T liefert keine Hinweise darauf, dass bei steigenden prozentualen Anteilen von nekrotischem oder Tumorgewebe ein signifikanter Unterschied der ΔC_T -Werte vorliegt.

Klinische Leistungsmerkmale

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist für den spezifischen Nachweis von 7 *KRAS*-Mutationen in den Codons 12 und 13 des *KRAS*-Gens bestimmt. 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. In den nachstehend aufgeführten klinischen Studien stehen *KRAS*-mutationspositive Ergebnisse für jene Patienten, deren Tumorgewebe für eine oder mehrere der 7 mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachweisbaren Mutationen positiv war (G12A, G12D, G12C, G12S, G12V, G13D). *KRAS*-mutationsnegativ (Wildtyp) bezieht sich auf Patienten, deren Tumorgewebe für die 7 mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nachweisbaren Mutationen negativ war (d. h. die Probe könnte Mutationen im *KRAS*-Gen enthalten, die mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit nicht identifizierbar sind).

Klinische Studie, die die Verwendung mit Erbitux (Cetuximab) stützt

Es wurde eine klinische Leistungsstudie durchgeführt, um Daten zu generieren, die den klinischen Nutzen des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits als diagnostisches Hilfsmittel bei der Auswahl von Patienten für die Behandlung mit Erbituximab (Cetuximab) unterstützen. Die Sicherheit und Wirksamkeit von Erbitux (Cetuximab) wurden in der CA225025-Studie demonstriert. CA225025 war eine multizentrische, randomisierte Open-Label-Studie, die an 572 Patienten mit EGFR-exprimierendem, zuvor behandeltem, rezidivierendem metastatischem 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 als Initialdosis von 400 mg/m² verabreicht, gefolgt von 250 mg/m² wöchentlich bis zur Krankheitsprogression oder zur inakzeptablen Toxizität.

Das mediane Alter der 572 randomisierten Patienten lag bei 63 Jahren; 64 % waren männlich, 89 % waren Kaukasier und 77 % wiesen einen Baseline-ECOG-Ergebnisstatus von 0–1 auf. Die demographischen und Baseline-Merkmale waren in den beiden Studienarmen ähnlich. Alle Patienten mussten sich zuvor einer Behandlung unterzogen und unter dieser eine Krankheitsprogression erlebt haben, einschließlich einer Behandlung mit Irinotecan und einer Behandlung mit Oxaliplatin.

Der *KRAS*-Mutationsstatus war für 453/572 (79 %) der Patienten verfügbar: Gemäß Untersuchung mit dem *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* lagen bei 245 Patienten (54 %) *KRAS*-mutationsnegative Tumoren und bei 208 Patienten (46 %) *KRAS*-mutationspositive Tumoren vor.

Das wichtigste Ergebnismaß der Studie war das Gesamtüberleben (Overall Survival, OS). Die mediane Überlebenszeit (95%-KI) der *KRAS*-mutationsnegativen (Wildtyp-) Population lag bei 8,6 (7,0; 10,3) Monaten in der Erbituximab (Cetuximab) + BSC-Gruppe und bei 5,0 (4,3, 5,7) Monaten 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).

Die mediane Überlebenszeit der *KRAS*-mutationspositiven Population lag bei 4,8 (3,9; 5,6) Monaten in der Erbituximab (Cetuximab) + BSC-Gruppe und bei 4,6 (3,6, 4,9) Monaten in der BSC-Gruppe. Die Hazard-Ratio lag bei 0,91 mit 95%-KI (0,67, 1,24). Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 und Abbildung 23 dargestellt.

Tabelle 31. Gesamtüberleben bei zuvor behandeltem, EGFR-exprimierendem metastasierendem Kolorektalkarzinom (alle randomisiert und *KRAS*-Status)

	Alle randomisiert		Wildtyp <i>KRAS</i> -mutationsnegativ		<i>KRAS</i> -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		–		–	

* Auf der Grundlage des stratifizierten Log-Rank-Tests.

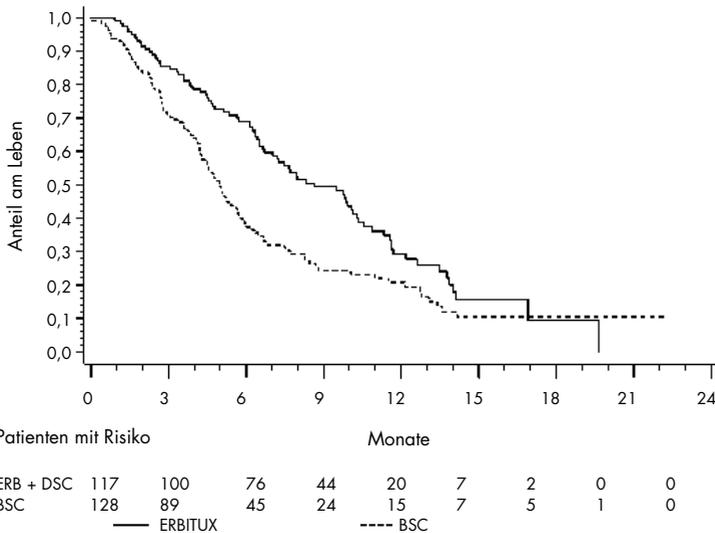


Abbildung 23. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben bei Patienten mit KRAS-mutationsnegativem (Wildtyp-) metastasierendem Kolorektalkarzinom.

Die auf den Kaplan-Meier-Schätzungen basierenden Gesamtüberlebensraten nach 6 und 12 Monaten für die KRAS-Wildtyp-Untergruppe waren in der Erbitux (Cetuximab) + BSC-Gruppe höher als in der BSC-Gruppe. Dieser Vorteil wurde in der KRAS-Mutations-Untergruppe nicht beobachtet.

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

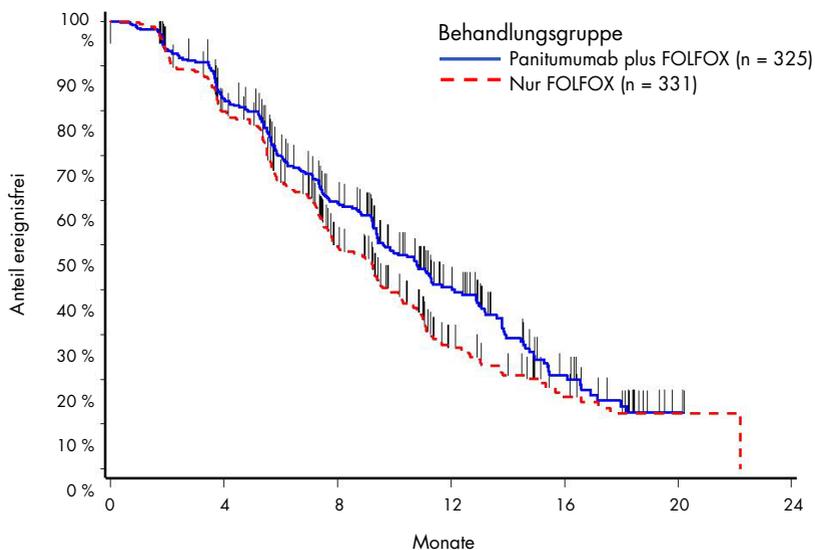
Es wurde eine klinische Leistungsstudie durchgeführt, um Daten zu generieren, die den klinischen Nutzen des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits als diagnostisches Hilfsmittel bei der Identifizierung von Patienten für die Behandlung mit Vectibix (Panitumumab) unterstützen. Ziel der Studie war es, zu beurteilen, ob der mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bestimmte KRAS-Mutationsstatus zur Auswahl von Patienten mit mCRC, die von einer Behandlung mit Vectibix (Panitumumab) profitieren könnten, verwendet werden kann. Die klinische Studie 20050203 war eine multizentrische, prospektive, randomisierte Open-Label-Phase III-Studie zur Beurteilung der Wirksamkeit von Panitumumab in Kombination mit Oxaliplatin, 5-Fluorouracil (5-FU) und Leukovarin (FOLFOX) gegenüber ausschließlich FOLFOX bei Patienten mit zuvor unbehandeltem, rezidivem mCRC.

Gelagerte Tumorproben von Patienten der Studie 20050203 wurden mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit getestet, um zwei Untergruppen zu identifizieren: KRAS-mutationspositiv (KRAS-Mutation) und KRAS-mutationsnegativ (KRAS-Wildtyp), basierend darauf, ob mindestens eine oder keine der 7 KRAS-Mutationen in den Codons 12 und 13 von Exon 2 im KRAS-Gen nachgewiesen wurde. In retrospektiven Analysen wurden die Wirksamkeitsdaten der Studie 20050203 nach KRAS-Untergruppe stratifiziert. Primäres Ziel der KRAS-Analyse war es, zu beurteilen, ob die Gesamtverbesserung des PFS bei Behandlung mit Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX gegenüber der Behandlung ausschließlich mit FOLFOX bei Patienten mit Tumoren mit KRAS-Wildtyp im Vergleich zu Patienten mit Tumoren mit KRAS-Mutation signifikant höher war.

Der vorab festgelegte primäre Wirksamkeitsendpunkt war das progressionsfreie Überleben (Progression-Free Survival, PFS) in der Patientengruppe (n = 656) mit Wildtyp-KRAS-mCRC gemäß Beurteilung im Rahmen einer verblindeten, unabhängigen, zentralen Bildgebungsuntersuchung. Weitere wichtige Wirksamkeitsendpunkte waren u. a. OS und ORR. Die Ergebnisse für die Wirksamkeit bei Patienten mit Wildtyp-KRAS mCRC sind in Tabelle 32 und Abbildung 24 dargestellt.

Tabelle 32. Ergebnisse für die Wirksamkeit bei Patienten mit Wildtyp-KRAS-mCRC

	Wildtyp-KRAS-Population	Progressionsfreies Überleben			
		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%)



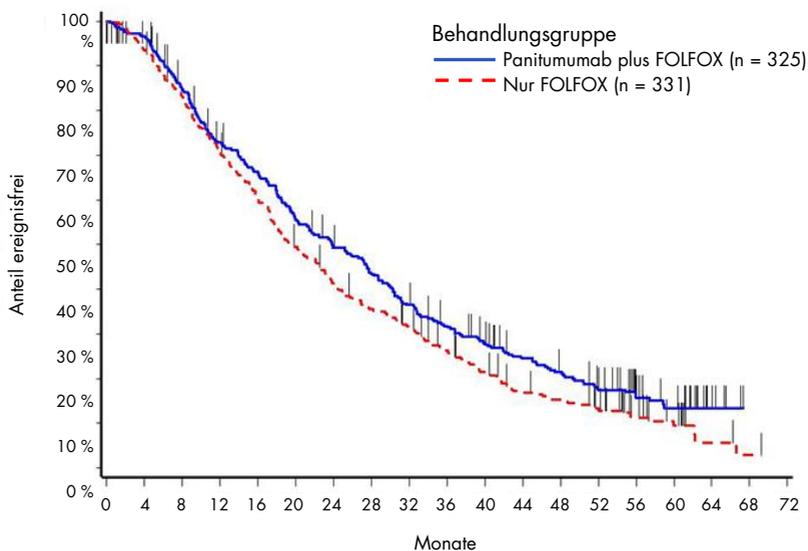
Patienten mit Risiko

Panitumumab plus FOLFOX	325	254	156	73	22	1	0
Nur FOLFOX	331	242	127	41	16	2	0

Abbildung 24. Kaplan-Meier-Auftragung des progressionsfreien Überlebens (Progression-Free Survival, PFS) bei Patienten mit Wildtyp-KRAS-mCRC.

Unter den Patienten mit Tumoren mit *KRAS*-Mutation lag das mediane PFS bei 7,3 Monaten (95%-KI: 6,3; 8,0) bei den 221 Patienten, die Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX erhalten hatten, gegenüber einem medianem PFS von 8,8 Monaten (95%-KI: 7,7; 9,4) bei den 219 Patienten, die ausschließlich FOLFOX erhalten hatten (HR = 1,29; 95%-KI: 1,04; 1,62). Das mediane OS lag bei 15,5 Monaten (95%-KI: 13,1; 17,6) bei den Patienten, die Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX erhalten hatten, gegenüber einem medianem OS von 19,3 Monaten (95%-KI: 16,5; 21,8) bei den Patienten, die ausschließlich FOLFOX erhalten hatten (HR = 1,24; 95%-KI: 0,98; 1,57).

In einer explorativen Analyse des OS mit aktualisierten Informationen basierend auf Ereignissen bei 82 % der Patienten mit Wildtyp-KRAS-mCRC wurde der Behandlungseffekt von Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX im Vergleich zu ausschließlich FOLFOX abgeschätzt. Das mediane OS lag bei 325 Patienten mit Wildtyp-KRAS-mCRC, die Vectibix (Panitumumab) plus FOLFOX erhielten, bei 23,8 Monaten (95%-KI: 20,0; 27,7) gegenüber 19,4 Monaten (95%-KI: 17,4; 22,6) bei den 331 Patienten, die ausschließlich FOLFOX erhalten hatten (HR = 0,83; 95%-KI: 0,70; 0,98). Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.



Patienten mit Risiko

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

Abbildung 25. Kaplan-Meier-Auftragung des Gesamtüberlebens (Overall Survival, OS) bei Patienten mit Wildtyp-KRAS-mCRC.

Klinische Studie, die die Verwendung von LUMYKRAS® (Sotorasib) stützt

Es wurde eine klinische Leistungsstudie durchgeführt, um die klinische Validität des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits als diagnostisches Hilfsmittel bei der Identifizierung von KRAS-G12C-positiven NSCLC-Patienten für die Behandlung mit LUMYKRAS (Sotorasib) zu demonstrieren. Ziel der Studie war es, zu beurteilen, ob der mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bestimmte G12C-Mutationsstatus zur Auswahl von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC, die von einer Behandlung mit LUMYKRAS (Sotorasib) profitieren könnten, verwendet werden kann. Bei der klinischen Studie 20170543 handelte es sich um eine multizentrische Open-Label-Phase-I/II-Studie zur Beurteilung der Wirksamkeit und Sicherheit von LUMYKRAS (Sotorasib) bei Erwachsenen mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, die die KRAS-G12C-Mutation aufwiesen.

Die Daten aus der primären Analyse des NSCLC-Phase-II-Teils dieser Studie wurden verwendet, um die klinische Validität des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits als diagnostisches Hilfsmittel zu unterstützen.

Die Studienaufnahme war auf Patienten mit NSCLC mit KRAS-G12C-Mutation, festgestellt auf Grundlage eines lokalen Laborergebnisses, beschränkt. Das Vorliegen der Mutation wurde durch zentrale Tests mit dem *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bestätigt. Der primäre Endpunkt des NSCLC-Phase II-Teils dieser Studie war die Bewertung der objektiven Ansprechrate (Objective Response Rate, ORR) anhand der Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST), Version 1.1, für LUMYKRAS (Sotorasib) als Einzeltherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren mit KRAS-G12C-Mutation.

Von den insgesamt 126 Patienten mit NSCLC wurden 124 in die komplette Analyse aufgenommen. Zwei Patienten wurden ausgeschlossen, da sie gemäß verblindeter, unabhängiger, zentralisierter Überprüfung (Blinded Independent Centralized Review, BICR) keine messbare Läsion ≥ 1 aufwiesen.

Der primäre Endpunkt der ORR (vollständiges Ansprechen + teilweises Ansprechen), gemessen mittels Computertomographie- oder Magnetresonanztomographie und bewertet gemäß RECIST 1.1 durch ein BICR-Labor, für Patienten mit NSCLC mit KRAS-G12C-Mutation betrug 37,1 % (46 von 124 Probanden; 95%-KI:28,6–46,2 %); drei (3) Patienten (2,4 %) erreichten ein vollständiges Ansprechen und 43 Patienten (34,7 %) erreichten ein teilweises Ansprechen*.

* Basierend auf Daten bis 01. Dezember 2020.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Für technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen wenden Sie sich unter www.qiagen.com/Support an unser Technikuszentrum (für Kontaktinformationen besuchen Sie www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Ungültige Ergebnisse

- | | |
|---|--|
| a) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Komponenten des Kits stimmten nicht mit den Anweisungen im Abschnitt Entnahme, Vorbereitung und Lagerung von Spezimen auf Seite 17 überein. | 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. | Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits), und verwenden Sie bei Bedarf einen neuen <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit. |

NTC-Proben zeigen im FAM-Kanal positive Ergebnisse.

- | | |
|---|---|
| Kontamination bei Vorbereitung der PCR. | Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit neuen Reagenzien.
Verschließen Sie die PCR-Röhrchen möglichst sofort nach der Zugabe der zu testenden Probe.
Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Instrumente regelmäßig dekontaminiert werden. |
|---|---|

Von der *therascreen* KRAS Assay Package Software angezeigte Markierungen

Die Markierungen, die von der *therascreen* KRAS Assay Package Software angezeigt werden können, ihre Bedeutung und die zu ergreifenden Maßnahmen sind in Tabelle 33 aufgeführt. Die Markierungen sind sowohl für NSCLC als auch für CRC relevant.

Tabelle 33. Markierungen der Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package Software: Bedeutung und empfohlene Maßnahmen

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-Lauf ungültig – FAM-C _T für die Positivkontrolle in der Kontrollreaktion außerhalb des zulässigen Bereichs	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 über dem Bereich für die Negativkontrolle	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR-Lauf ungültig – interne Kontrolle unter dem Bereich für die Negativkontrolle	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
NTC_INVALID_CT	PCR-Lauf ungültig – FAM für die Negativkontrolle ungültig (unterhalb des Grenzwerts)	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	Probe ungültig – Fluoreszenzdaten der Probenkontrolle können nicht ausgewertet werden	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die entsprechende(n) Probe(n) zu wiederholen.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 33. Markierungen der Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package Software: Bedeutung und empfohlene Maßnahmen

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Probe ungültig – FAM-C _T in Probenkontrolle zu niedrig	Probe verdünnen, um den C _T -Wert der Kontrolle zu erhöhen. Diese Verdünnung ist auf der Grundlage der Annahme zu berechnen, dass eine Verdünnung mit dem im Kit enthaltenen Wasser im Verhältnis 1:1 den C _T um 1,0 erhöht. Nach der Verdünnung der Probe einen neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Probe ungültig – FAM-C _T in Probenkontrollreaktion zu hoch	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten (≥ 4 Schnitte) extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.

Für NSCLC spezifische Markierungen

Die Markierungen, die von der Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package Software angezeigt werden können, die Bedeutung der Markierungen und die für NSCLC-Proben zu ergreifenden Maßnahmen sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Tabelle 34. Markierungen der Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package Software: Bedeutung und empfohlene Maßnahmen für NSCLC-Proben

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C ₁ für die interne Kontrolle (HEX) zu hoch (oder kein C ₁), FAM-Kanal mutationsnegativ	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutationsröhrchen ungültig – C ₁ -HEX für die Probe (interne Kontrolle) zu niedrig.	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 34. Markierungen der Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package Software: Bedeutung und empfohlene Maßnahmen für NSCLC-Proben

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsröhrchen ungültig – Fluoreszenzdaten der internen Kontrolle können nicht ausgewertet werden	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
MUTATION_EARLY_CT	Mutationsröhrchen ungültig – C _{FAM} für die Probe zu niedrig.	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Mindestens eine Mutation ist für eine Probe gültig und positiv, und gleichzeitig ist mindestens eine Mutation für dieselbe Probe ungültig (Warnung, kein Fehler)	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.

Für CRC spezifische Markierungen

Die Markierungen, die von der Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package Software angezeigt werden können, die Bedeutung der Markierungen und die für CRC-Proben zu ergreifenden Maßnahmen sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 35. Markierungen der Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package Software: Bedeutung und empfohlene Maßnahmen für CRC-Proben

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T für die interne Kontrolle (HEX) zu hoch (oder kein C _T), FAM-Kanal mutationsnegativ	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. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutationsröhrchen ungültig – C _T -HEX für die Probe (interne Kontrolle) 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. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 35. Markierungen der Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package Software: Bedeutung und empfohlene Maßnahmen für CRC-Proben (Fortsetzung)

Markierung	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. Wenn die Probe den Status „Ungültig“ erhält, einen neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
MUTATION_EARLY_CT	Mutationsröhrchen ungültig – C _T -FAM 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. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, die Probe aus frischen FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um eine frische Extraktion zu testen. Wenn ungültig, diese zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Mindestens eine Mutation ist für eine Probe gültig und positiv, und gleichzeitig ist mindestens eine Mutation für dieselbe Probe ungültig (Warnung, kein Fehler)	Keine.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Literatur

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. Catalog of Somatic Mutations in Cancer: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Nützliche Quellangaben

- Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.
- Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.
- Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

- Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.
- De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.
- Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.
- Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.
- Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.
- Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.
- Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.

-
- Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.
 - Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.
 - Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.
 - Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* 120, 1145.
 - Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).
 - Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
 - Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:



Kennzeichnung für die Europäische Gemeinschaft



<N>

Reagenzien ausreichend für <N> Reaktionen



Verfallsdatum



In-vitro-Diagnostikum



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Enthält



Anzahl

Rn

R = Revision des Handbuchs; n = Revisionsnummer



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Gebrauchsanweisung beachten



Vorsicht

Kontakt

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem technischen Support-Center unter **www.qiagen.com/Support**. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000, oder wenden Sie sich an eine der technischen Serviceabteilungen von QIAGEN oder an örtliche Händler (siehe hintere Umschlagseite oder www.qiagen.com).

Anhang 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll

In diesem Abschnitt finden Sie Anleitungen zur Verwendung des *therascreen* KRAS RGQ PCR Kits mit RGQ Software, Version 2.3, im offenen Modus (d. h. ohne KRAS Assay Package).

Allgemeine Informationen

- Weitere Informationen zu benötigtem Material finden Sie unter Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien.
- Vollständige Anleitungen zur Vorbereitung und Anordnung der Proben finden Sie unter Protokoll: DNA-Probenbestimmung und Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen.

Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils

Bevor Sie mit dem Verfahren beginnen, erstellen Sie zunächst ein Temperaturprofil für die KRAS-Analyse. Die Zyklusparameter für Probenbestimmung und Mutationsbestimmung sind identisch.

Verfahren

Die Zyklusparameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36. 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 dem Desktop des Notebooks, das mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument verbunden ist, auf das Symbol der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3. Wählen Sie im daraufhin angezeigten Fenster Neuer Lauf die Registerkarte „Advanced“ (Erweitert) aus.
2. Wählen Sie zum Erstellen einer neuen Vorlage Empty Run (Leerer Lauf) und klicken Sie dann auf New (Neu), um den „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) aufzurufen.
3. Wählen Sie „72-Well Rotor“ (72-Well-Rotor) als Rotortyp aus. Vergewissern Sie sich, dass der Schließring angebracht ist und aktivieren Sie das Kontrollkästchen Locking Ring Attached (Schließring angebracht). Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 26).

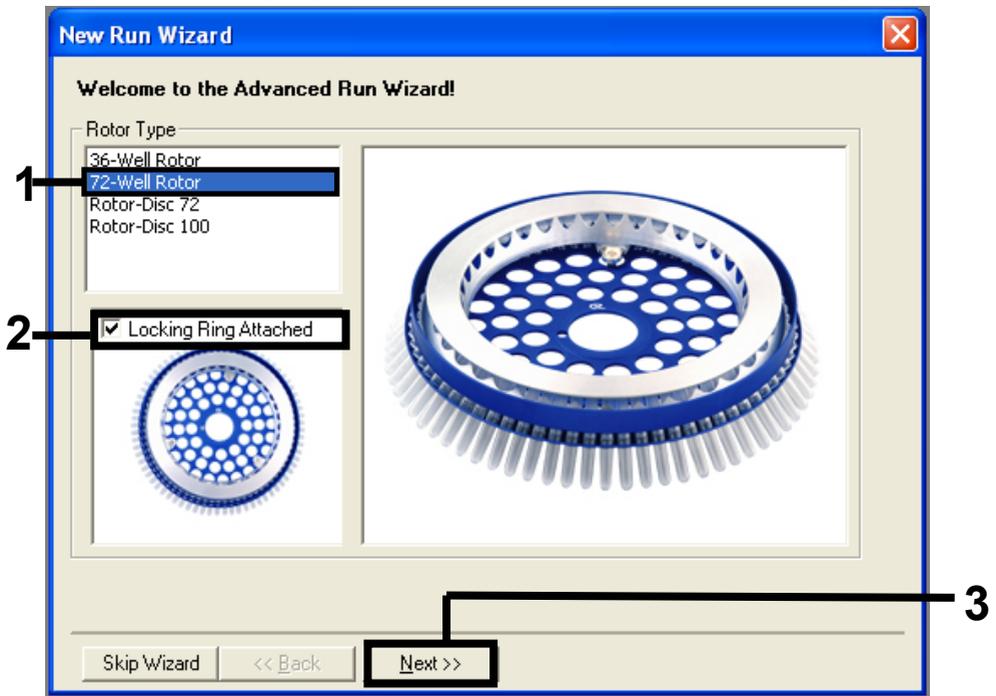


Abbildung 26. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) 1 = „Rotor Type“ (Rotortyp), 2 = Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht), 3 = „Next“ (Weiter).

4. Geben Sie den Namen des Bedieners ein. Geben Sie Anmerkungen ein und wählen Sie für Reaktionsvolumen den Wert 25 aus. Stellen Sie sicher, dass im Feld Sample Layout (Probenkonfiguration) 1, 2, 3... angezeigt wird. Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 27).

1 Operator : NAME

2 Notes :

3 Reaction Volume (µL): 25

4 Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

Abbildung 27. Eingeben des Bediennamens und der Reaktionsvolumen. 1 = Dialogfeld „Operator“ (Bediener), 2 = Dialogfeld „Notes“ (Notizen), 3 = Feld „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen), 4 = „Sample Layout“ (Probenkonfiguration), 5 = „Next“ (Weiter).

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

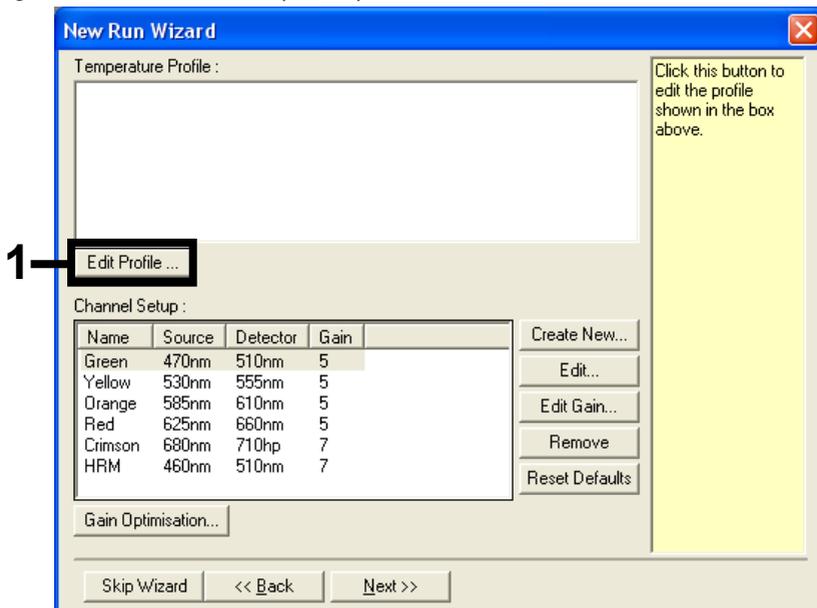


Abbildung 28. Bearbeiten des Profils.

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

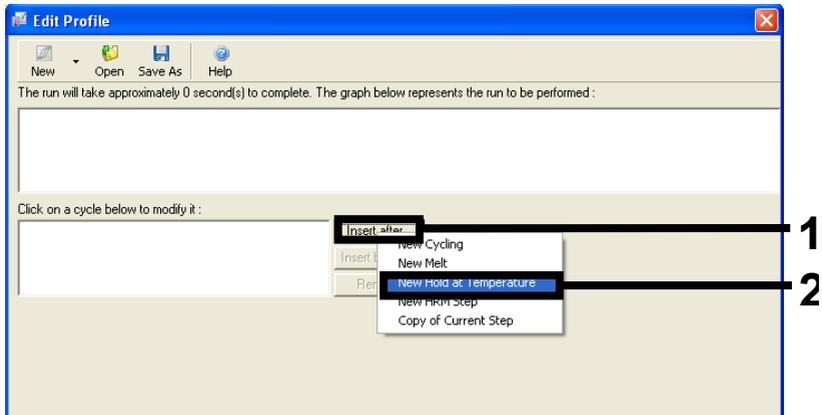


Abbildung 29. Einfügen eines ersten Inkubationsschritts. 1 = „Insert after“ (Einfügen nach), 2 = „New Hold at Temperature“ (Neue Haltetemperatur).

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

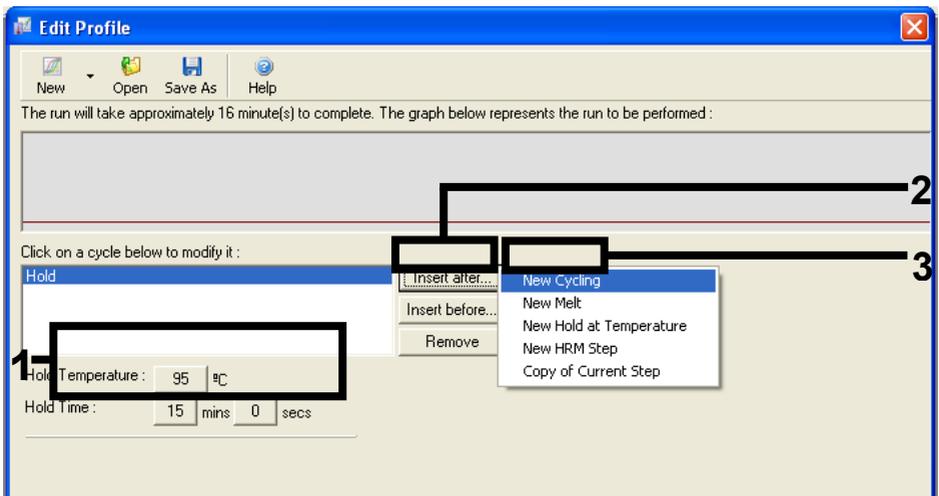


Abbildung 30. Erster Inkubationsschritt bei 95 °C. 1 = „Hold Temperature“ (Haltetemperatur) und „Hold Time“ (Haltedauer), 2 = „Insert after“ (Einfügen nach), 3 = „New Cycling“ (Neuer Zyklus).

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

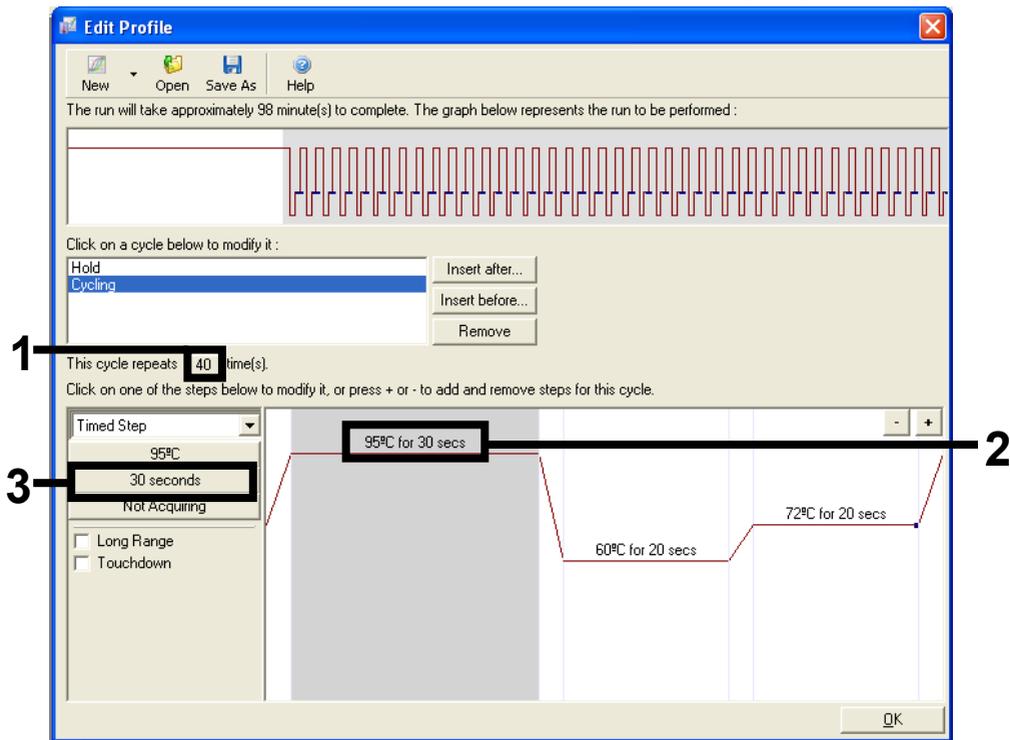


Abbildung 31. Zyklusschritt bei 95 °C. 1 = Kästchen „Cycle Repeats“ (Anzahl der Zykluswiederholungen), 2 = Temperatureinstellung für ersten Schritt, 3 = Zeiteinstellung für ersten Schritt.

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), um die Datenerfassung für diesen Schritt zu aktivieren (Abbildung 32).

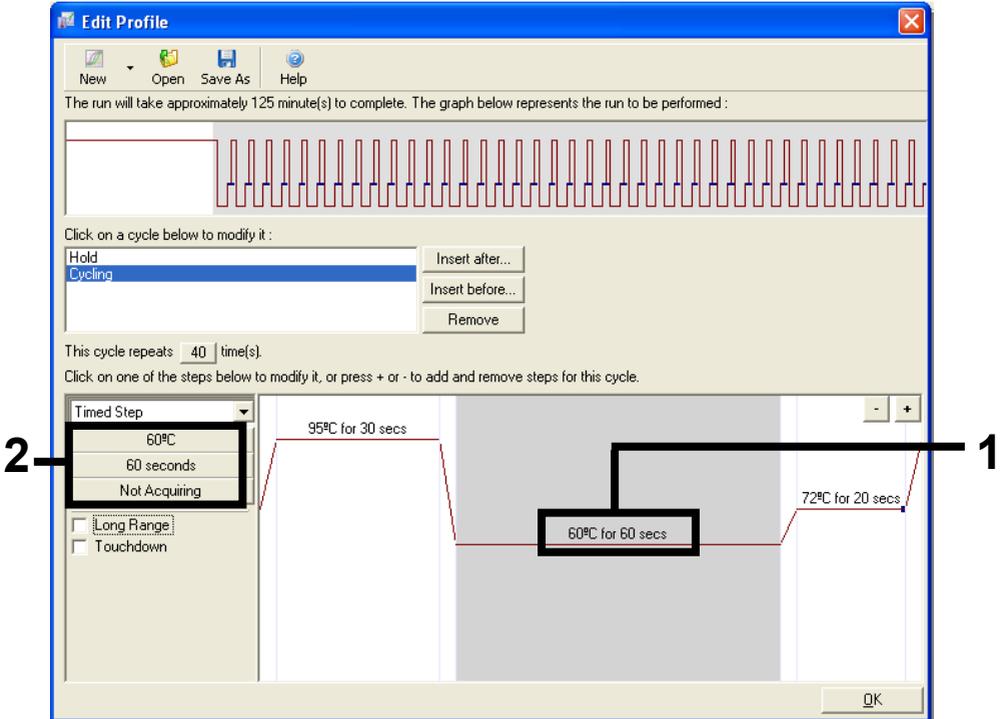


Abbildung 32. Zyklusschritt bei 60 °C. 1 = Temperatur- und Zeiteinstellung für zweiten Schritt, 2 = „Not Acquiring“ (Keine Erfassung).

10. Wählen Sie aus der Liste „Available Channels“ (Verfügbare Kanäle) die Kanäle Green und Yellow 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 >> Don't Acquire Help

Dye Channel Selection Chart

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

Abbildung 33. Erfassung im Zyklusschritt bei 60 °C.

11. Markieren Sie den dritten Schritt und löschen Sie diesen, indem Sie auf – klicken. Klicken Sie auf OK (Abbildung 34).

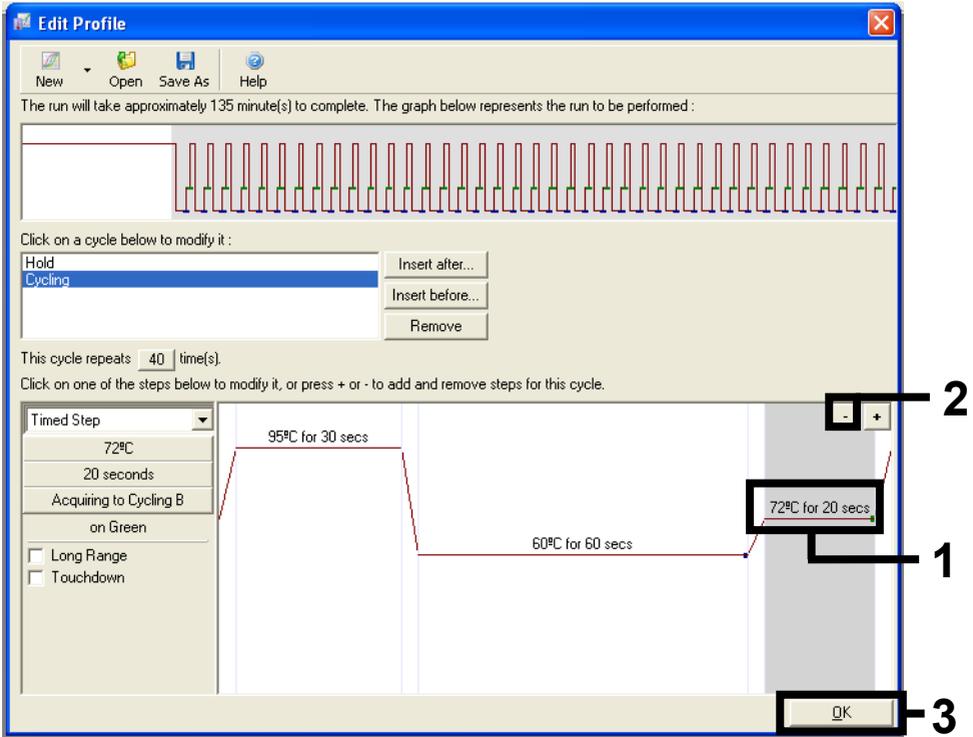


Abbildung 34. Entfernen des Verlängerungsschrittes.

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

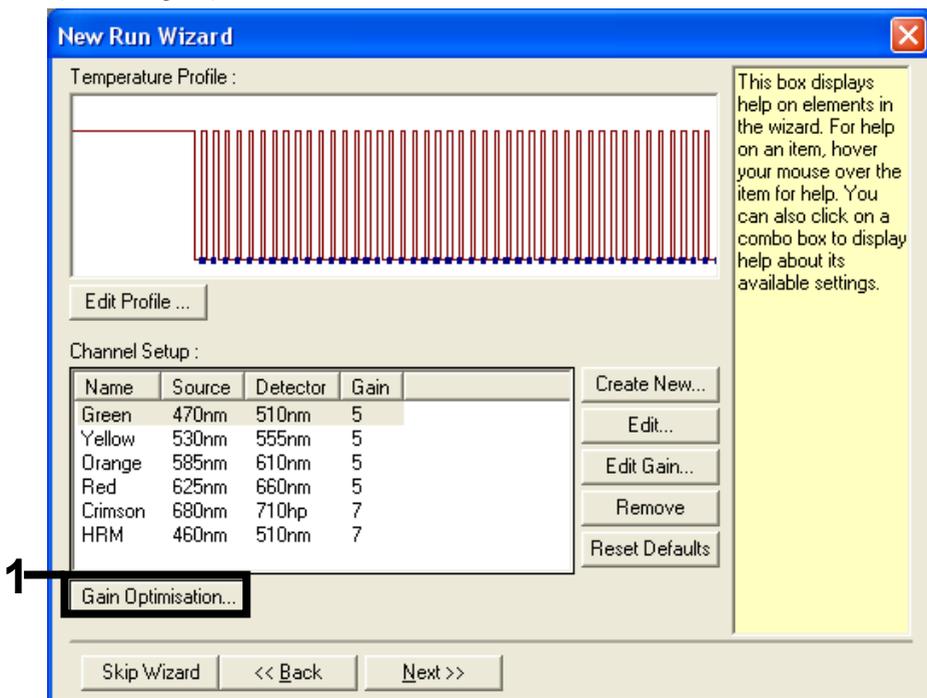


Abbildung 35. „Gain Optimization“ (Verstärkungsoptimierung).

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

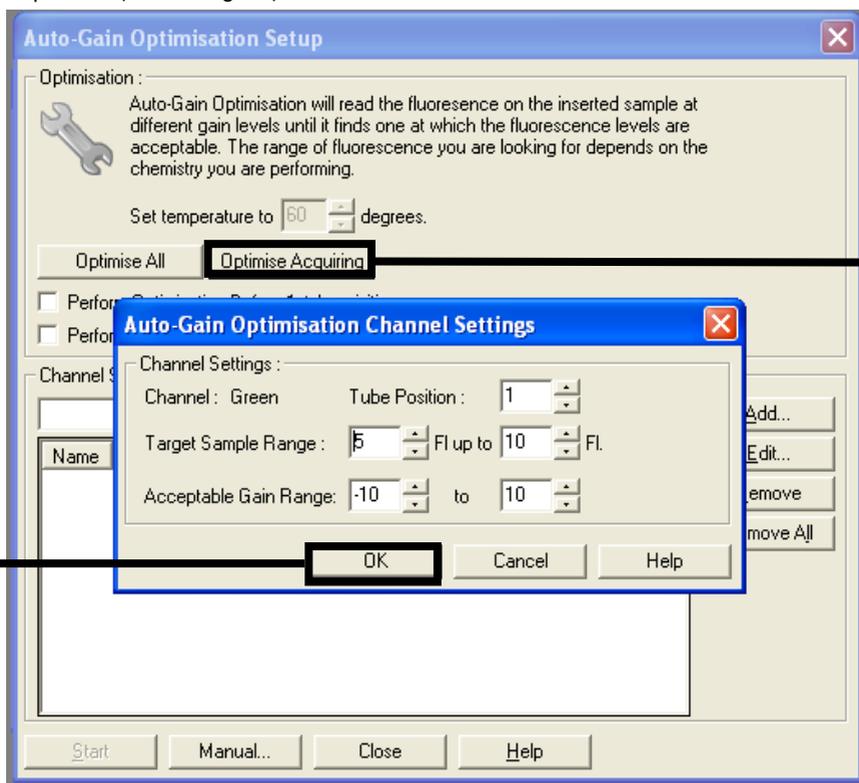


Abbildung 36. Automatische Verstärkungsoptimierung für den Kanal Green.

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).

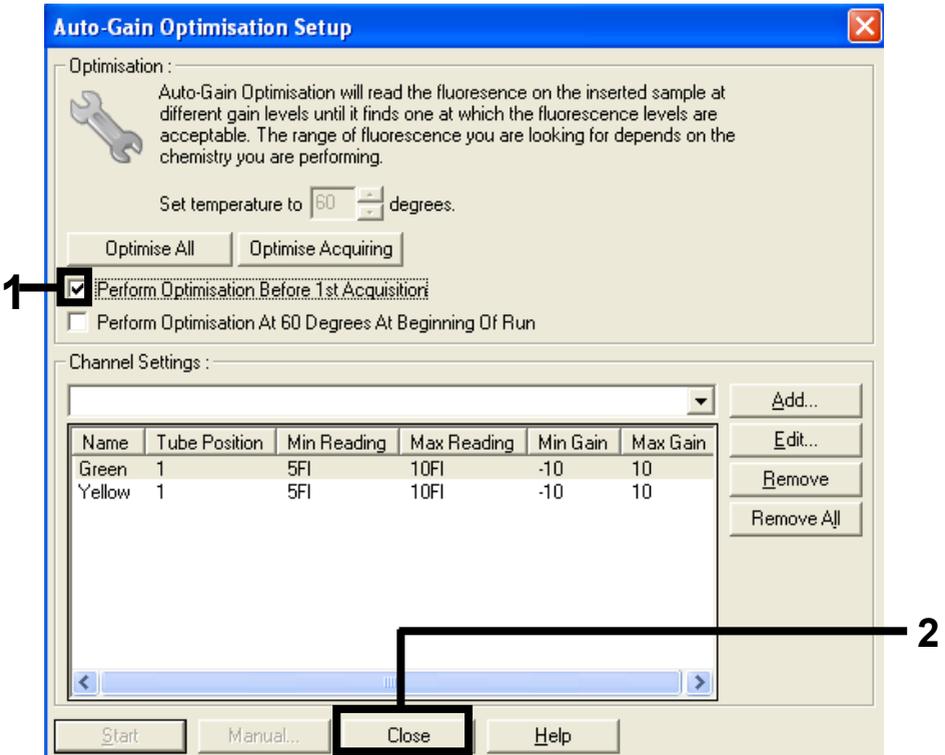


Abbildung 37. Auswahl des grünen und des gelben Kanals.

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

Protokoll: Probenbestimmung (manuell)

Dieses Protokoll wird zur Bestimmung der Gesamtmenge an amplifizierbarer DNA in Proben verwendet und muss vor der KRAS-Mutationsanalyse durchgeführt werden.

- Bereiten Sie die Proben wie unter Protokoll: DNA-Probenbestimmung beschrieben vor.
- Richten Sie den PCR-Lauf auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument wie unter Protokoll: *therascreen* KRAS RGQ PCR Setup beschrieben ein.
- Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß der Anleitung unter Analyse der Daten aus der Probenbestimmung.

Protokoll: KRAS-Mutationsnachweis (manuell)

Nach einer erfolgreichen Probenbestimmung kann die Probe zum Nachweis von KRAS-Mutationen getestet werden.

- Bereiten Sie die Proben wie unter Protokoll: DNA-Probenbestimmung beschrieben vor.
- Richten Sie den PCR-Lauf auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument wie unter Protokoll: *therascreen* KRAS RGQ PCR Setup beschrieben ein.
- Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß der Anleitung unter Analyse der Daten aus der Probenbestimmung.

Protokoll: *therascreen* KRAS RGQ PCR Setup

1. Öffnen Sie die Rotor-Gene Q Software 2.3 und rufen Sie das gewünschte Temperaturprofil auf.
2. Erstellen Sie das Temperaturprofil gemäß dem Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils. Vergewissern Sie sich, dass der korrekte Rotor ausgewählt ist, und aktivieren Sie das Kontrollkästchen Locking Ring Attached (Schließring angebracht). Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 38).

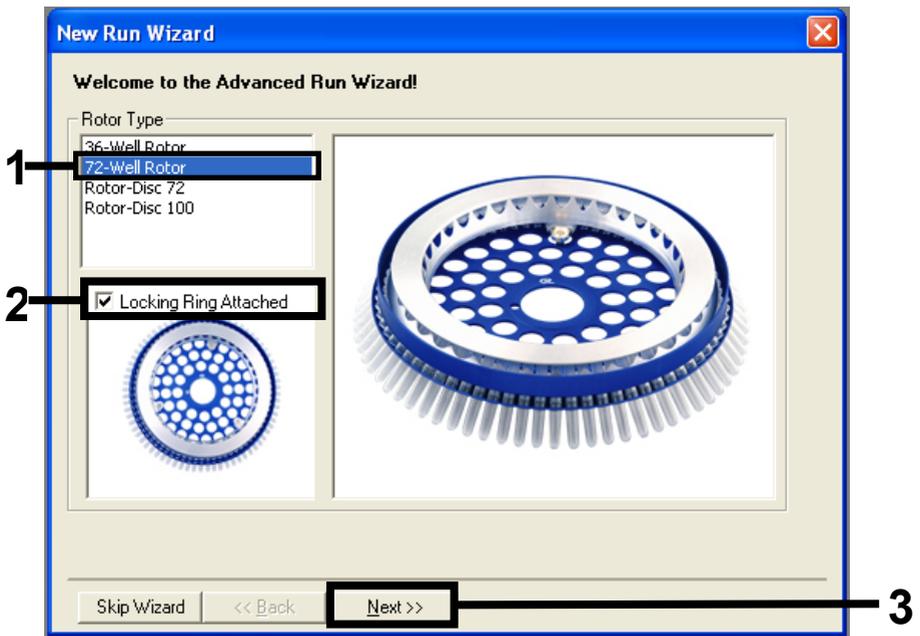


Abbildung 38. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) mit Begrüßungsbildschirm. 1 = „Rotor Type“ (Rotortyp), 2 = Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht), 3 = „Next“ (Weiter).

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

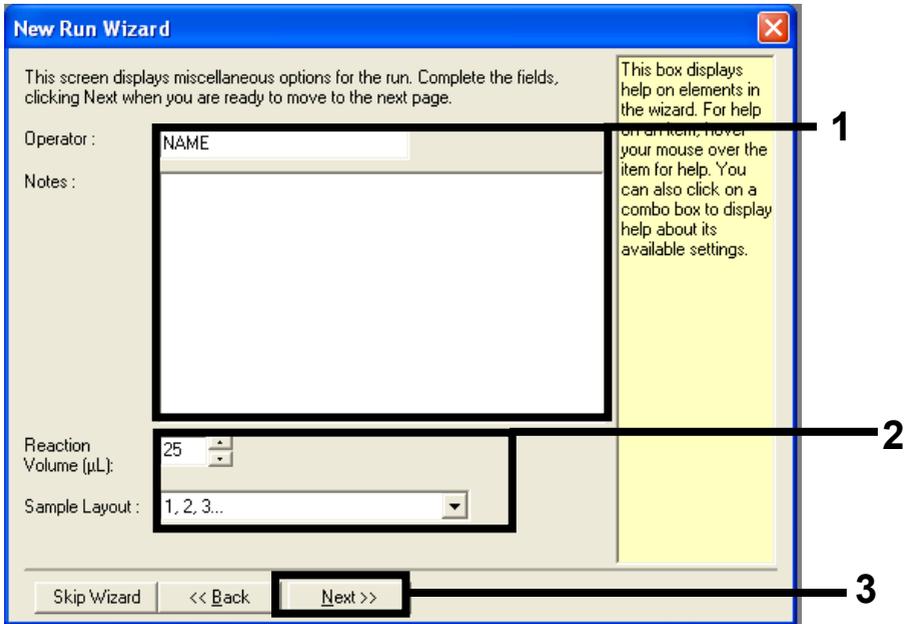


Abbildung 39. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) 1 = Felder „Operator“ (Bediener) und „Notes“ (Notizen), 2 = Felder „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen) und „Sample Layout“ (Probenkonfiguration), 3 = „Next“ (Weiter).

4. Belassen Sie im nächsten Fenster alle Werte so, wie sie angezeigt werden. Wenn das Temperaturprofil gemäß den Anweisungen im folgenden Protokoll erstellt wurde, ist keine Bearbeitung notwendig: Erstellen eines Temperaturprofils. Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 40).

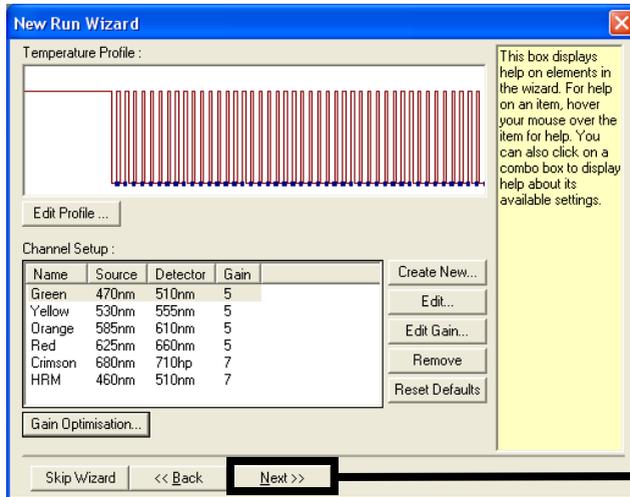


Abbildung 40. Temperaturbearbeitungsfenster des Dialogfelds „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe).
1 = „Next“ (Weiter).

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

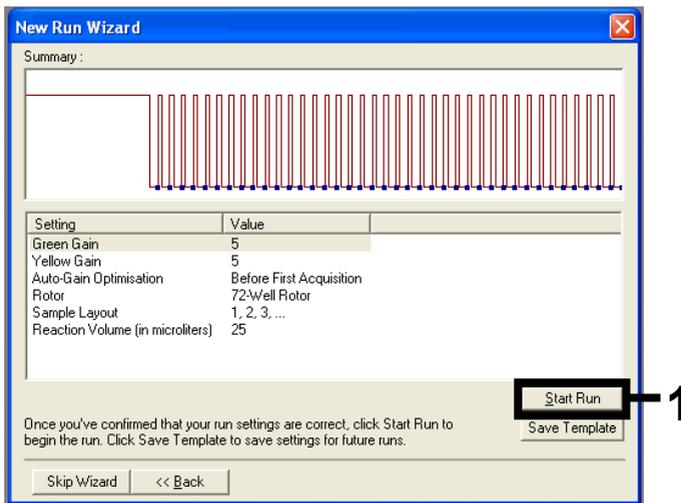


Abbildung 41. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) 1 = „Start Run“ (Lauf starten).

Hinweis: Nach dem Start des Laufs wird ein neues Fenster aufgerufen. Hier können Sie entweder gleich die Probenamen eingeben oder auf Finish (Fertigstellen) klicken und die Namen zu einem späteren Zeitpunkt eingeben, 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 Sie die Probenamen nicht mehr bearbeiten. Gehen Sie beim Eingeben der Probenamen besonders sorgfältig vor, um einen korrekten Testablauf und eine korrekte Analyse der Proben zu gewährleisten.

Hinweis: Bei diesem Vorgang sollte für leere Wells in der Spalte „Name“ kein Eintrag vorgenommen werden.

6. Analysieren Sie nach Abschluss des Laufs die Daten gemäß den Abschnitten „Analyse der Daten aus der Probenbestimmung“ oder „Analyse des KRAS-Mutationsnachweises“, sofern angemessen.
7. Falls Quantifizierungsberichte erforderlich sind, klicken Sie in der Symbolleiste der Rotor-Gene Q Laufdatei auf das Symbol Reports (Berichte).

Anhang 2: Installation der *therascreen* KRAS Assay Package Software

Das *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ist für den Gebrauch mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM mit einem 72-Well-Rotor bestimmt. Die *therascreen* KRAS Assay Package Software ist separat auf CD erhältlich (Kat.-Nr. 9023675).

Das *therascreen* KRAS Assay Package steht auf der entsprechenden *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Produkt-Website unter www.qiagen.com zum Herunterladen bereit. Die Download-Informationen finden Sie im Bereich „Product Resources“ (Produktressourcen) unter der Registerkarte „Supplementary Protocols“ (Zusatzprotokolle). Die Assay Packages können auch auf CD bestellt werden.

Das Softwarepaket enthält die Vorlagen „*therascreen* KRAS CE QC Locked Template“ und „*therascreen* KRAS CE Locked Template“.

Hinweis: Das *therascreen* KRAS Assay Package, Version 3.0.3 (QIAGEN, Kat.-Nr. 9023675) kann nur mit der entsprechenden Rotor-Gene Q Softwareversion 2.3 verwendet werden. Stellen Sie vor der Installation der *therascreen* KRAS Assay Package Software sicher, dass die richtige Version der Rotor-Gene Q Software installiert ist.

Vorgehensweise (Download)

1. Laden Sie das *therascreen* KRAS RGQ Assay Package von der entsprechenden *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Produkt-Website unter www.qiagen.com herunter.
2. Doppelklicken Sie auf die Datei und extrahieren Sie die im Archiv enthaltene Datei.
3. Doppelklicken Sie auf `therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe`, um den Installationsvorgang zu starten.

Vorgehensweise (CD)

1. Bestellen Sie die mit der installieren Rotor-Gene Q Software (siehe oben) kompatible *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE CD, die separat bei QIAGEN erhältlich ist. Version 3.0.3. Kat.-Nr. 9023675.
2. Legen Sie die CD in das CD-Laufwerk des Notebooks ein, das an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument angeschlossen ist.
3. Doppelklicken Sie auf *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.0.3.exe* oder *therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe*, um den Installationsvorgang zu starten. Der Einrichtungsassistent wird angezeigt.
4. Klicken Sie auf Next (Weiter), um fortzufahren (Abbildung 42).

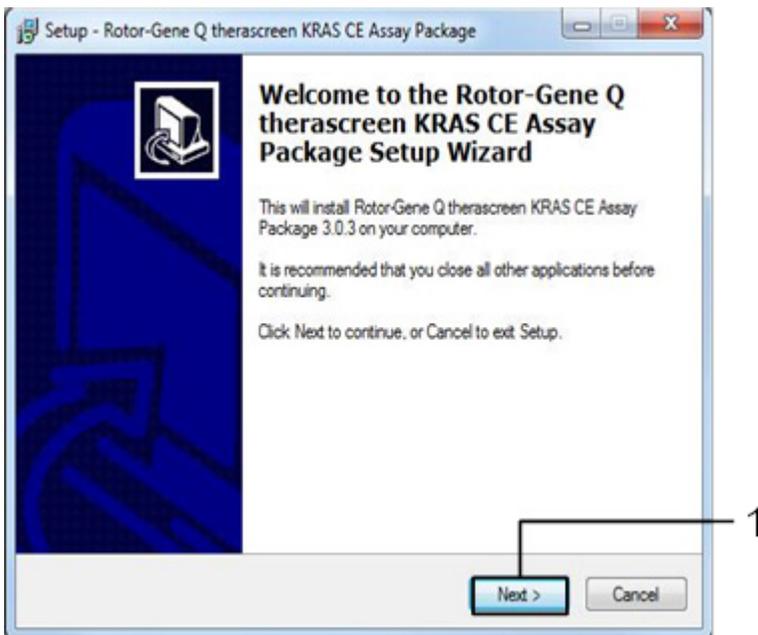


Abbildung 42. Das Dialogfeld „Setup“ (Konfiguration). 1 = „Next“ (Weiter).

5. Lesen Sie im Dialogfeld „License Agreement“ (Lizenzvereinbarung) die Lizenzvereinbarung und aktivieren Sie das Kästchen I accept the agreement (Ich stimme der Vereinbarung zu). Klicken Sie auf Next (Weiter), um fortzufahren (Abbildung 43).

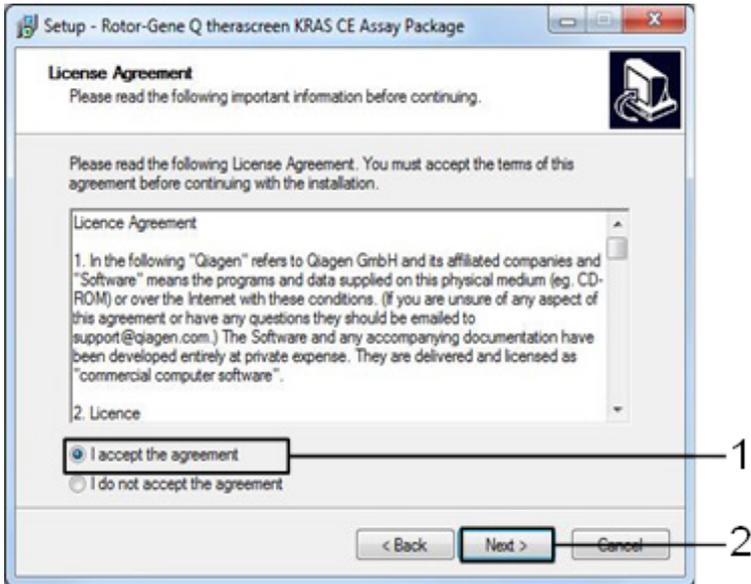


Abbildung 43. Das Dialogfeld „License Agreement“ (Lizenzvereinbarung). 1 = „I accept the agreement“ (Ich stimme der Vereinbarung zu), 2 = „Next“ (Weiter).

Die Vorlageneinrichtung beginnt automatisch.

6. Klicken Sie im abschließenden Setup-Fenster auf Finish (Abschließen), um den Einrichtungsassistenten zu schließen. (Abbildung 44).

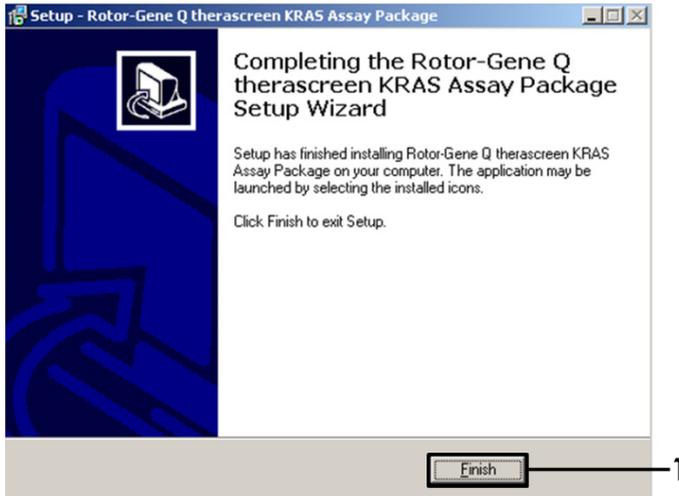


Abbildung 44. Schließen des Assistenten.

7. Starten Sie den Computer neu. Es werden automatisch Verknüpfungen zu den Vorlagen „therascreen KRAS QC Locked Template“ (therascreen KRAS QK – gesperrte Vorlage) und „therascreen KRAS Locked Template“ (therascreen KRAS – gesperrte Vorlage) erstellt und auf dem Desktop angezeigt.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: 1 Kontrollassay, 7 Mutationsassays, Positivkontrolle, Wasser, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (Version 3.0.3)	Softwarepaket mit Protokollen für das <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit und das QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument mit 72-Well-Rotor	9023675
Rotor-Gene Q und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Real-time PCR-Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Real-time PCR-Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002033

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Block zum manuellen Ansetzen der Reaktionen mit einer Einkanal-Pipette 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 1000 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 DNA FFPE Tissue Kit – zur	Aufreinigung genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe	
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: QIAamp MinElute® Säulen, Proteinase K, Puffer, Collection Tubes (2 ml)	56404

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Revisionsverlauf des Dokuments

Datum	Änderungen
R4, Januar 2019	<p>Bevollmächtigter hinzugefügt (Titelseite)</p> <p>Abschnitt „Symbole“ aktualisiert</p> <p>Vorlage aktualisiert</p>
R5, November 2019	<p>Hersteller i. S. d. Gesetzes geändert (Titelseite)</p> <p>Symbol „EC + REP“ von der Titelseite und aus dem Abschnitt „Symbole“ entfernt</p> <p>Gerätename von „Rotor-Gene Q MDx“ auf „Rotor-Gene Q MDx Splex HRM“ aktualisiert, um dem Namen auf dem Instrument zu entsprechen</p> <p>Protokoll „Nachweis von KRAS-Mutationen“ um zusätzlichen Schritt beim Ansetzen der Master-Mixe ergänzt</p> <p>Werte in den Spalten „Häufigkeit“ und „95 %-Konfidenzintervall“ in Tabelle 10 korrigiert.</p> <p>Prozentuale Gesamtübereinstimmung für CRC von 96,4 % auf 96,82% aktualisiert</p> <p>Werte in der Spalte „LOD C₉₅“ in Tabelle 15 korrigiert</p>
R6, November 2020	<p>Version der theascreen KRAS Assay Package Software auf 3.0.3 korrigiert</p> <p>Das vorliegende Dokument bezüglich der Verfügbarkeit zum Download des Assay Package unter www.qiagen.com aktualisiert.</p> <p>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</p> <p>Bei allen in diesem Dokument beschriebenen Verfahren Hinweis zum korrekten Mischen der Reagenzien hinzugefügt</p> <p>Abschnitt Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen aktualisiert</p> <p>Hinweis zur korrekten Platzierung des Rotor-Gene Q MDx Splex HRM Instruments hinzugefügt</p> <p>Hinweis zur Verwendung trockener Skalpelle hinzugefügt</p> <p>Aktualisiertes Protokoll: DNA-Probenbestimmung aktualisiert, um weitere wichtige Punkte vor Beginn hinzuzufügen</p> <p>Abschnitt Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen aktualisiert, um weitere wichtige Punkte vor Beginn und einen Hinweis für NSCLC-Proben zur Interpretation mehrerer Markierungen als „Invalid“ (Ungültig) hinzuzufügen</p> <p>Abschnitt „Markierungen der Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package Software“ um Tabellen ergänzt, welche die RGQ-Markierungen, ihre Bedeutung und die empfohlenen Maßnahmen veranschaulichen</p> <p>Interpretation der Ergebnisse bezüglich Maßnahmen im Zusammenhang mit Markierungen aktualisiert.</p> <p>Abschnitt Hilfe zur Fehlerbehebung um Tabellen ergänzt, welche die RGQ-Markierungen, ihre Bedeutung und die empfohlenen Maßnahmen veranschaulichen</p> <p>Abschnitt Grenzen des Assays aktualisiert, um Informationen über NSCLC-Proben zu ergänzen</p>

Datum	Änderungen
	<p>Abschnitt Leistungsmerkmale überarbeitet, um die Daten in Tabellen zu aktualisieren</p> <p>Abschnitt DNA-Ausgangsmenge und Linearität aktualisiert</p> <p>Abschnitt Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit aktualisiert</p> <p>Abschnitt Variabilität der Probenhandhabung aktualisiert</p> <p>Abschnitt Klinische Leistungsmerkmale hinzugefügt</p> <p>Abschnitt Analyse der Daten aus der Probenbestimmung aktualisiert, um die empfohlene Lösung für einen C_T-Wert des Probenkontrollassays > 32 zu überarbeiten</p> <p>Im Abschnitt Symbole Kennzeichnung für europäische Konformität hinzugefügt</p> <p>Abschnitt Interpretation der Ergebnisse (manuell) bezüglich Maßnahmen im Zusammenhang mit Markierungen aktualisiert.</p> <p>Abschnitt Protokoll: Nachweis von KRAS-Mutationen aktualisiert, um Schritte zur Vorbereitung der Master-Mixes zu ergänzen</p>

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen Käufer oder Benutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren. Ausgenommen sind Anwendungen, wie sie in den mit diesem Produkt und in diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen sowie in zusätzlichen, im Internet unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben sind. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Benutzern für andere QIAGEN-Benutzer zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführten Anwendungen die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Nutzer des Kits 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 kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können im Internet unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

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

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.

MIT DEM KAUF DIESES PRODUKTS ERWIRBT DER KÄUFER DIE BERECHTIGUNG UNTER BESTIMMTEN ROCHE PATENTEN, DIESES PRODUKT AUSSCHLIESSLICH ZUR BEREITSTELLUNG IN-VITRO-DIAGNOSTISCHER DIENSTLEISTUNGEN AN HUMANEN PROBEN ANZUWENDEN. AUSSER DIESER SPEZIELLEN BERECHTIGUNG WIRD DURCH DEN KAUF KEIN ALLGEMEINES PATENT UND KEINE LIZENZ JEGLICHER ART ERWORBEN.

1127513 HB-1861-006 04/2022 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

