

Příručka k soupravě *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR



Verze 1

IVD

Kvalitativní diagnostika in vitro

K použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q MDx



REF

874011



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

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, NĚMECKO

R4

MAT

1116068CS



Technologie pro zpracování a analýzu vzorků

QIAGEN

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování a analýzu vzorků, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického vzorku. Naše vyspělé, vysoce kvalitní produkty a služby vám zajistí úspěšný průběh od odběru vzorku až po výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:

- purifikaci DNA, RNA a proteinů;
- rozборы nukleových kyselin a proteinů;
- výzkum microRNA a RNAi;
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozборы.

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách **www.qiagen.com**.

Obsah

Účel použití	5
Shrnutí a vysvětlení	5
Princip postupu	7
Dodávané materiály	10
Obsah soupravy	10
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	11
Upozornění a bezpečnostní opatření	12
Bezpečnostní informace	12
Obecná ustanovení	12
Skladování činidel a manipulace s nimi	13
Odběr vzorků, příprava pro analýzu a skladování	13
Postup	15
Extrakce DNA	15
Protokol: Vyhodnocení vzorku DNA	16
Protokol: Detekce mutací KRAS	28
Interpretace výsledků	37
Návod na řešení potíží	38
Příznaky generované softwarem <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	39
Kontrola kvality	45
Omezení	45
Charakteristiky funkčních vlastností	46
Analytická účinnost	46
Limit detekce (LOD)	50
Vstupní úrovně DNA a linearita	51
Interferující látky	56
Křížová kontaminace	56
Výlučnost/zkřížená reaktivita	57
Opakovatelnost a reprodukovatelnost	59
Variabilita manipulace se vzorky	61
Rovnocennost metod získávání vzorků (pouze NSCLC)	62
Literatura	62
Symboly	65

Kontaktní údaje	66
Příloha 1: Souprava <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR – Manuální protokol	67
Interpretace výsledků (manuální)	80
Nastavení softwarové analýzy	80
Analýza dat hodnocení vzorku	80
Analýza detekce mutace KRAS	81
Analýza vzorků	83
Příloha 2: Instalace softwaru <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	88
Informace pro objednávky	91
Historie revizí	92

Účel použití

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je souprava pro kvalitativní detekci sedmi somatických mutací v kodonech 12 a 13 lidského onkogenu KRAS v reálném čase (PCR) s využitím přístroje Rotor-Gene Q MDx. Souprava je určena k použití s DNA extrahovanou z nádorové kolorektální tkáně (CRC) fixované formalinem zalité v parafinu (FFPE) nebo z primárních vzorků tkáně nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), které byly odebrány resekcí, punkční biopsií jehlou (core needle biopsy, CNB) nebo aspirační biopsií tenkou jehlou (fine needle aspiration, FNA).

Somatické mutace v genu KRAS jsou potenciální prediktivní biomarkery resistance vůči léčbě epidermálního růstového faktoru (EGFR), jako jsou panitumumab nebo cetuximab v léčbě kolorektálního karcinomu. Somatické mutace v genu KRAS mohou být i potenciálním prediktivním biomarkerem pro rozhodnutí o určitých způsobech léčby NSCLC.

Typ mutace posoudí odborný lékař spolu s dalšími faktory onemocnění a stanoví odpovídající léčbu. Léčebný plán pro pacienty s karcinomem se nesmí opírat pouze o samotný výsledek analýzy mutací onkogenu KRAS.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR není určena k diagnóze CRC, NSCLC nebo jiných onemocnění.

Shrnutí a vysvětlení

Mutace onkogenu KRAS se objevují v lidských karcinomech velmi často (1–4). Díky použití technologií Scorpions® a ARMS® (Allele Refractory Mutation System) (5, 6) umožňuje souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR detekci 7 mutací v kodonech 12 a 13 onkogenu KRAS vůči pozadí genomové DNA „divokého“ typu (tabulka 1). Na základě dat v databázi COSMIC (2015 v72), vykazalo 7 mutací detekovaných soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR >95 % všech hlášených mutací KRAS u pacientů s CRC a >88 % všech hlášených mutací u pacientů s NSCLC (7).

Tabulka 1. Přehled mutací a identit kódů COSMIC

Mutace	Změna báze	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

* Kódy mutací (COSMIC ID) vycházejí z Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (*Catalog of Somatic Mutations in Cancer*) (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tento test je vysoce specifický a citlivý a umožňuje tak detekci nízkého procenta mutované DNA oproti pozadí DNA genu divokého typu. Za předpokladu, že je k dispozici dostatečné množství kopií DNA, je možná detekce 0,8% mutace na pozadí genomové DNA divokého typu (viz „Charakteristiky funkčních vlastností“, strana 46, kde naleznete informace o limitu detekce pro každou mutaci).

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR se používá v postupu PCR (polymerázové řetězové reakce). Výhoda této testovací soupravy spočívá v tom, že je vysoce specifická vůči cíli a je rychlá a účinná bez nutnosti subjektivního stanovení výsledků.

Princip postupu

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR využívá k detekci mutací 2 technologie – ARMS a Scorpions – při PCR v reálném čase.

Reakční směsi mutací

Každá reakční směs využívá primer ARMS specifický pro danou mutaci k selektivní amplifikaci mutované DNA a poté primer Scorpions k detekci produktu amplifikace.

ARMS

Specifické amplifikace alely je dosaženo pomocí ARMS, který využívá schopnost *Taq* DNA polymerázy rozlišovat mezi shodnou a neshodnou bází na 3'-konci PCR primeru. Pokud se primer zcela shoduje, amplifikace pokračuje s plnou účinností. Pokud se 3'-báze neshoduje, může probíhat pouze amplifikace na nízké úrovni v pozadí reakce. Proto lze mutované sekvence selektivně amplifikovat, dokonce i v případech, kdy většina DNA mutaci neobsahuje.

Scorpions

Detekce amplifikace se provádí pomocí detekčních sond Scorpions. Sondy Scorpions jsou bifunkční molekuly obsahující PCR primer kovalentně vázaný na sondu. Tato sonda obsahuje Fluorofor karboxyfluorescein (FAM[™]) a zhášec. Zhášec tlumí fluorescence fluoroforu. Jakmile se sonda během PCR naváže na amplikon ARMS, fluorofor a zhášec se oddělí, což vede k detekovatelnému zvýšení fluorescence.

Formát soupravy

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR obsahuje 8 analýz:

- 1 kontrolní analýza (Kontrolní reakční směs; CTRL)
- 7 analýz mutací (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Reakční směsi jsou duplexní a obsahují činidla značená pomocí FAM určená k detekci cílů a vnitřní kontrolu značenou pomocí HEX[™]. Činidla reakční směsi a pozitivní kontroly obsahují pufr Tris EDTA a pozitivní kontrola obsahuje nosič Poly A RNA.

Testy

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR zahrnuje postup o 2 krocích. V prvním kroku se provádí kontrolní analýza ke stanovení celkového množství amplifikovatelného DNA KRAS ve vzorku. Druhým krokem je provedení analýzy mutace a kontrolní analýzy ke stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti mutované DNA.

Kontrolní reakce

Control Reaction Mix (Kontrolní reakční směs, CTRL) používá primer Scorpions a nezačtený primer k amplifikaci krátké sekvence exonu 4 genu KRAS. Kontrolní reakce se používá ke stanovení, zda vzorek obsahuje patřičnou hladinu amplifikovatelné DNA, a v analytických výpočtech je použit faktor, který se používá k určení stavu mutace.

Kontrolní test

Kontrolní analýza, značená FAM, se používá ke stanovení celkového množství amplifikovatelného DNA KRAS ve vzorku. Při této kontrolní analýze se amplifikuje oblast exonu 4 genu KRAS. Amplifikace pomocí primerů a sondy Scorpions, jejíž amplifikace je nezávislá na všech známých polymorfismech KRAS.

Testy mutací

Každý test mutace zahrnuje sondu Scorpions označenou FAM a primer ARMS pro rozlišení mezi přirozenou DNA divokého typu a specifickou mutovanou DNA.

Kontroly

Poznámka: Všechny cykly experimentů musí zahrnovat pozitivní a negativní kontroly.

Vnitřní kontrola

Každá reakční směs obsahuje vedle cílové reakce navíc i interní kontrolní reakci. Selhání indikuje, že buď jsou přítomny inhibitory, které mohou způsobit nepřesné výsledky, nebo u dané zkumavky došlo k chybě obsluhy při její přípravě. Pokud k selhání kontroly došlo kvůli inhibici PCR, zředění vzorku může pomoci snížit účinek inhibitorů. Je ale třeba poznamenat, že to zředí i cílovou DNA. Souprava obsahuje zkumavku vody pro ředění vzorku (Dil.). Vzorky se mají ředit vodou na ředění vzorků (Dil.).

Pozitivní kontrola

Každý cyklus musí obsahovat pozitivní kontrolu ve zkumavkách 1–5. Souprava *therascreen* KRAS RGQ obsahuje pozitivní kontrolu KRAS Positive Control (PC), která se používá jako templát v reakci pozitivní kontroly. Vyhodnocením výsledků pozitivní kontroly se ověří, že souprava splňuje uvedené parametry přijatelnosti.

Negativní kontrola

Každý cyklus musí obsahovat negativní kontrolu („kontrola bez templátu“) ve zkumavkách 9–13. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR obsahuje vodu pro NTC (NTC), která se používá jako „templát“ v reakci negativní kontroly. Kontrola bez templátu se používá k vyhodnocení potenciální kontaminace v průběhu nastavení cyklu a k vyhodnocení výkonu reakce interní kontroly.

Stanovení vzorku

Kontrolní reakční směs (CTRL) dodávaná spolu se soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR se používá ke stanovení celkového množství amplifikovatelné KRAS DNA ve vzorku. Při této kontrolní analýze se amplifikuje oblast exonu 4 genu KRAS. Vzorky doporučujeme stanovit pouze pomocí této kontrolní analýzy za použití pozitivní kontroly KRAS (PC) jako pozitivní kontroly a vody pro NTC jako kontroly bez templátu.

Platforma a software

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je speciálně navržena pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx. Software Rotor-Gene Q a balíček analýz *therascreen* KRAS Assay Package lze stáhnout z webových stránek nebo objednat na CD.

Přístroje Rotor-Gene Q MDx musí být udržovány dle požadavků v uživatelské příručce přístroje. Informace týkající se přístroje jsou uvedeny v uživatelské příručce.

Návod k instalaci viz „Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package“, strana 88.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
Katalogové č.				874011
Počet prep.				24
Barva	Identita	Identifikace zkumavky		Objem
Červená	Control Reaction Mix (kontrolní reakční směs)	1	CTRL	2 × 600 µl
Fialová	12ALA Reaction Mix (reakční směs 12ALA)	2	12ALA	600 µl
Oranžová	12ASP Reaction Mix (reakční směs 12ASP)	3	12ASP	600 µl
Růžová	12ARG Reaction Mix (reakční směs 12ARG)	4	12ARG	600 µl
Zelená	12CYS Reaction Mix (reakční směs 12CYS)	5	12CYS	600 µl
Žlutá	12SER Reaction Mix (reakční směs 12SER)	6	12SER	600 µl
Šedá	12VAL Reaction Mix (reakční směs 12VAL)	7	12VAL	600 µl
Modrá	13ASP Reaction Mix (reakční směs 13ASP)	8	13ASP	600 µl
Béžová	KRAS Positive Control (pozitivní kontrola KRAS)	9	PC	250 µl
Zelenomodrá	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA polymeráza)		<i>Taq</i>	80 µl
Bílá	Water for NTC (voda pro NTC)		NTC	1,9 ml
Bílá	Water for Sample Dilution (voda pro ředění vzorků)		Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit Handbook (příručka v angličtině)				1

Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Činidla

- Souprava QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat. č. 56404; viz „Extrakce DNA“ na straně 15)
- Xylen
- Etanol (96–100%)*

Spotřební materiál

- Sterilní špičky pipet s filtry (aby se předešlo křížové kontaminaci, doporučujeme pipety s aerosolovými bariérami)
- Sterilní zkumavky do mikrocentrifugy na přípravu master mixů
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (stripy 0,1 ml zkumavek a víčka), použití s rotorem o 72 jamkách (kat. č. 981103 nebo 981106)

Vybavení

- Přístroj Rotor-Gene Q MDx s fluorescenčními kanály „Cycling Green“ a „Cycling Yellow“ (detekce FAM a HEX v uvedeném pořadí)
- Software Rotor-Gene Q verze 2.3 s balíčkem analýz KRAS Assay Package (verze 3.1.1) instalované pro automatickou detekci mutací (viz „Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package“, strana 88)

Poznámka: Software Rotor-Gene Q lze použít pro manuální detekci mutací bez balíčku analýz KRAS Assay Package. Viz „Příloha 1: Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR – Manuální protokol“, strana 67.

- Termomixer†, vyhřívaný orbitální inkubátor, topný blok nebo vodní lázeň s možností inkubace při teplotě 56 °C a 90 °C
- Stolní centrifuga† s rotorem pro 1,5ml zkumavky
- Stolní třepačka†

* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje jiné látky, například metanol nebo metyletylketon.

† Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

- Pipety (nastavitelné), vyhrazené k přípravě vzorku*
- Pipety (nastavitelné) určené výhradně pro přípravu PCR master mixu*
- Pipety (nastavitelné) určené výhradně na dávkování templátu DNA*

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro.

Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

Obecná ustanovení

Uživatel musí vždy věnovat pozornost následujícím okolnostem:

- Pozitivní materiály (vzorky a pozitivní kontroly) skladujte a extrahujte odděleně od všech ostatních činidel. Do reakční směsi je přidávejte v odděleném prostoru.
- Při provádění PCR dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke kontaminaci reakcí PCR syntetickým kontrolním materiálem. Pro přípravu reakčních směsí a přidávání templátu DNA se doporučuje používat zvláště vyhrazené pipety. Příprava a dávkování reakčních směsí musí být prováděny v prostoru odděleném od místa, kde se provádí dávkování templátu. Zkumavky přístroje Rotor-Gene Q po dokončení PCR nikdy neotevírejte. Předejdete tak laboratorní kontaminaci produkty vzniklými po PCR.
- Činidla v soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR jsou již optimálně naředěna. Další ředění činidel se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu. Nedoporučujeme používat menší reakční objemy než 25 µl, protože to zvyšuje riziko falešně pozitivních výsledků.
- Všechna činidla v soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR mají specifické složení pro optimální výkon. Všechna reakční činidla dodávaná v soupravě jsou určena k použití výhradně s ostatními činidly ve stejné soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR. Má-li být zachován optimální výkon testu, nelze se soupravou používat žádná náhradní činidla.

* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

- Používejte výhradně *Taq* DNA polymerázu (*Taq*), která se dodává v soupravě. Nenahrazujte ji *Taq* DNA polymerázou dodávanou jako součást jiné soupravy stejného nebo jiného typu, ani ji nezeměňujte za *Taq* DNA polymerázu od jiného dodavatele.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je dodávána na suchém ledu. Pokud není jakákoliv součást soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR při dodání zmrzlá, během přepravy došlo k otevření vnějšího obalu nebo zásilka neobsahuje balicí list, příručku nebo činidla, obraťte se na oddělení technických služeb QIAGEN Technical Service Department nebo místní prodejce (viz zadní obálka nebo navštivte stránky **www.qiagen.com**).

Soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR uložte ihned po dodání do mrazničky a skladujte v temnu při konstantní teplotě -30 až -15 °C. Jako všechny fluorescentně značené molekuly je třeba i detekční sondy *Scorpions* chránit před světlem, aby nebyly poškozeny vysvícením (photobleaching) a neztratily výkon.

Při uchovávání v doporučených podmínkách v původním balení je souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR stabilní až do uvedeného data expirace. Soupravu opakovaně nerozmrazujte a nezmrazujte. Nepřekračujte maximální počet 6 cyklů zmrazení/rozmrazení.

Odběr vzorků, příprava pro analýzu a skladování

Poznámka: Všechny vzorky jsou potenciálně infekční a podle toho se s nimi musí zacházet.

Materiál vzorků musí být lidská genomová DNA extrahovaná ze vzorků tkání FFPE. Vzorky musí být dopravovány v souladu se standardní patologickou metodologií, aby byla zajištěna kvalita vzorku.

Vzorky nádorů jsou heterogenní a naměřené výsledky ze vzorku nádoru se nemusí shodovat s výsledky z jiných částí téhož nádoru. Vzorky nádoru mohou také obsahovat nenádorovou tkáň. U DNA z nenádorové tkáně se neočekává přítomnost mutací, které detekuje souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR.

Příprava vzorků tkání

Poznámka: Používejte pouze suché skalpely. Neprovádějte tento krok v boxu s laminárním prouděním nebo odsáváním par.

- Seškrábněte nádorovou tkáň z řezů do označených zkumavek do mikrocentrifugy, a to vždy novým skalpelem u každého vzorku.

Příprava vzorků tkáně pro extrakci DNA (CRC)

- S použitím standardních materiálů a metod zafixujte vzorek tkáně do 10% neutrálního pufrovaného formalinu (NBF), a zalijte vzorek tkáně do parafinu. Pomocí mikrotomu nařežte z parafinového bloku sériové řezy o šířce 5 μ m a umístěte je na skleněná podložní sklíčka.
- Školený odborník (např. patolog) musí posoudit řez obarvený hematoxylinem a eosinem a určit obsah nádoru a jeho rozsah. Označte barvené sklíčko k rozlišení nádoru od normální tkáně. Použijte sériové řezy k extrakci DNA.
- Řezy s > 20% obsahem nádoru podle oblasti ke zpracování bez makrodisekce (viz níže).
- Pro řezy s < 20% obsahem nádoru podle oblasti, proveďte makrodisekci jednoho nebo více řezů. Tkáň bez nádoru zlikvidujte.
- U řezů o ploše menší než < 4 mm² zpracujte dva nebo více řezů, aby se zvýšila celková plocha nádorové tkáně alespoň na 4 mm² (platí pro vzorky s provedením makrodisekce i bez ní). Tkáň bez nádoru zlikvidujte.
- Nadbytečný parafin seškrábněte z tkáňového řezu nepoužitým sterilním skalpelem.

Příprava vzorků tkáně pro extrakci DNA (NSCLC)

- S použitím standardních materiálů a metod zafixujte vzorek tkáně do 10% NBF, a zalijte vzorek tkáně do parafinu. Pomocí mikrotomu nařežte z parafinového bloku sériové řezy o šířce 5 μ m a umístěte je na skleněná podložní sklíčka.
- Školený odborník (např. patolog) musí posoudit řez obarvený hematoxylinem a eosinem z hlediska přítomnosti nádoru. Použijte sériové řezy k extrakci DNA.
- Nadbytečný parafin seškrábněte z tkáňového řezu nepoužitým sterilním skalpelem.

Skladování

Bloky FFPE a podložní sklíčka uchovávejte při pokojové teplotě. Sklíčka je možné před extrakcí DNA uchovat při pokojové teplotě až po dobu 4 týdnů.

Genomová DNA může být uchována při teplotě 2–8 °C po dobu 1 týdne po extrakci, poté při teplotě –25 až –15 °C až 8 týdnů před použitím.

Postup

Extrakce DNA

Funkční vlastnosti soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR byly stanoveny na základě DNA extrahované pomocí soupravy QIAamp DNA FFPE Kit (kat. č. 56404). Používáte-li soupravu QIAamp DNA FFPE, proveďte extrakci DNA podle pokynů v příručce a berte na vědomí.

Extrakce DNA (vzorky CRC)

- Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue musí být připravena pouze ručně.
- Nepoužívejte krok s RNázou popsáný v příručce k soupravě QIAamp DNA FFPE Tissue (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).
- Nepoužívejte roztok na odstranění parafinu QIAGEN. Používejte pouze xyleneovou/ethanolovou metodu odstranění parafinu popsanou v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue.
- Rozklad pomocí proteinázy K (krok 11 v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue) musí být prováděn po dobu 1 hodiny.
- Vzorky se musí eluovat pomocí 200 µl elučního pufru (pufr ATE) ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue.

Extrakce DNA (vzorky NSCLC)

- Pro extrakci používejte 2 řezy o šířce 5 µm.
- Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue musí být připravena pouze ručně.
- Nepoužívejte krok s RNázou popsáný v příručce k soupravě QIAamp DNA FFPE Tissue (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).
- Nepoužívejte roztok na odstranění parafinu QIAGEN dodávaný k soupravě QIAamp DNA FFPE. Používejte pouze xyleneovou/ethanolovou metodu odstranění parafinu popsanou v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue.
- Rozklad pomocí proteinázy K (krok 11 v příručce pro soupravu QIAamp DNA FFPE Tissue) musí být prováděn po dobu 1 hodiny.
- Přidejte 60 µl elučního pufru ATE ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue a inkubujte při teplotě místnosti 2,5 minuty.
- Odstředte při plné rychlosti 1 minutu.
- Přidejte dalších 60 µl elučního pufru ATE ze soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue a inkubujte při teplotě místnosti 2,5 minuty.
- Odstředte při plné rychlosti 1 minutu.

Protokol: Vyhodnocení vzorku DNA

Tento protokol je určen ke zjištění celkového amplifikovatelného obsahu DNA ve vzorcích pomocí analýzy KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) pro automatizované stanovení vzorku.

Poznámka: Manuální stanovení vzorku viz „Příloha 1: Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR – Manuální protokol“, strana 67.

Důležité body před zahájením

- Pomocí dostupné Control Reaction Mix (CTRL) (kontrolní reakční směsi) lze vyhodnotit až 24 vzorků.
- K vyhodnocení DNA před testováním používejte Control Reaction Mix (kontrolní reakční směs, CTRL).
- **Poznámka:** Je důležité pro toto vyhodnocení použít Control Reaction Mix (kontrolní reakční směs, CTRL) dle níže uvedeného popisu, nikoliv spektrofotometrii nebo jinou alternativní metodu. Silně rozložená DNA nemusí být amplifikována i když primery vytvoří krátké fragmenty DNA.
- Pro efektivní použití činidel v soupravě *therascreen* KRAS RGQ PCR, použijte co možná nejvíce vzorků DNA, abyste vytvořili kompletně naplněné testovací cykly. Při testování jednotlivých vzorků nebo v menších množstvích se spotřebuje více činidel a sníží se tak celkový počet vzorků, který je možné testovat pomocí jedné soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- Před prvním použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx zajistěte, aby byla instalována správná verze softwaru *therascreen* KRAS Assay Package odpovídající aktuální verzi softwaru Rotor-Gene Q (viz „Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package“, strana 88).

Postup

1. **Úplně rozmrazte Control Reaction Mix (kontrolní reakční směs, CTRL), vodu bez obsahu nukleázy pro kontrolu bez templátu (NTC) a pozitivní kontrolu KRAS (PC) na laboratorní teplotu (15–30 °C) po dobu nejméně 1 hodiny.**
- **Poznámka:** Nechte *Taq* DNA polymerázu (*Taq*) ohřát na pokojovou teplotu (15–30 °C) ve stejnou chvíli jako ostatní činidla (viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“, strana 13). Zkumavku krátce odstředte, aby se veškerý enzym shromáždil na dně zkumavky.

Doby pro rozmrazení činidel, přípravu PCR a skladování před provedením cyklu jsou uvedeny v tabulce 2.

Poznámka: PCR provádějte při teplotě místnosti.

Tabulka 2. Doby pro rozmrazení, přípravu PCR a teploty skladování

Doba pro rozmrazení		Skladovací* teplota po přípravě PCR	Maximální doba přípravy PCR a doba skladování
Minimální	Maximální		
1 hodina	4,5 hodin	Pokožová teplota (15–30 °C)	7 hodin
1 hodina	4,5 hodin	2–8 °C	18 hodin

* Termín „Skladovací“ se týká doby od dokončení přípravy PCR a zahájení cyklu PCR na přístroji Rotor-Gene Q MDx.

- Po rozmrazení činidla promíchejte převrácením každé zkumavky (opakovaným 10krát), aby nedošlo k lokální koncentraci solí, a poté je krátce odstředíte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.**

Poznámka: Neprotřepávejte *Taq* DNA polymerázu (*Taq*) ani žádnou směs obsahující *Taq*, neboť by mohlo dojít k inaktivaci enzymu.

- Připravte dostatek master mixů (kontrolní reakční směs [CTRL] plus *Taq* DNA polymeráza [*Taq*]) podle objemů uvedených v Tabulka 3 pro:**

- všechny vzorky DNA,
- 1 pozitivní kontrolní reakci KRAS,
- 1 vodu bez nukleázy pro kontrolu bez templátu,
- 1 vzorek navíc představující dostatečný přebytek pro přípravu PCR.

Master mix obsahuje všechny složky nutné pro provedení PCR kromě vzorku.

Tabulka 3. Příprava kontrolního master mixu analýzy

Složka	Objem
Kontrolní reakční směs (CTRL)	19,76 µl × (n + 1)*
<i>Taq</i> DNA polymeráza (<i>Taq</i>)	0,24 µl × (n + 1)*
Celkový objem	20 µl/reakci

* n = počet reakcí (vzorky plus kontroly).

Připravte dostatek činidla master mix pro 1 vzorek navíc (n+1) představující dostatečný přebytek pro přípravu PCR.

Hodnota n nesmí překročit 24 (plus kontroly), protože 24 je maximální počet vzorků, které je možné zpracovat v jednom cyklu.

Poznámka: Během přípravy master mixu je do příslušné zkumavky nejprve přidán požadovaný objem Control Reaction Mix (kontrolní reakční směs, CTRL) a *Taq* DNA polymeráza (*Taq*) je přidána naposledy.

Poznámka: *Taq* DNA polymerázu pipetujte tak, že špičku pipety opatrně ponoříte těsně pod hladinu kapaliny, aby na vnějším povrchu špičky neulpělo nadměrné množství enzymu.

3. **Umístěte příslušný počet stripů se 4 zkumavkami PCR (každý strip obsahuje 4 zkumavky) do plnicího bloku podle rozvržení v tabulce 4. Zkumavky neuzavírejte.**

Poznámka: Ponechte víčka v plastové nádobě až do okamžiku, kdy budou třeba.

Tabulka 4. Rozvržení cyklu pro vyhodnocení vzorku DNA v plnicím bloku

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

* Čísla označují pozice v plnicím bloku a indikují konečnou polohu rotoru.

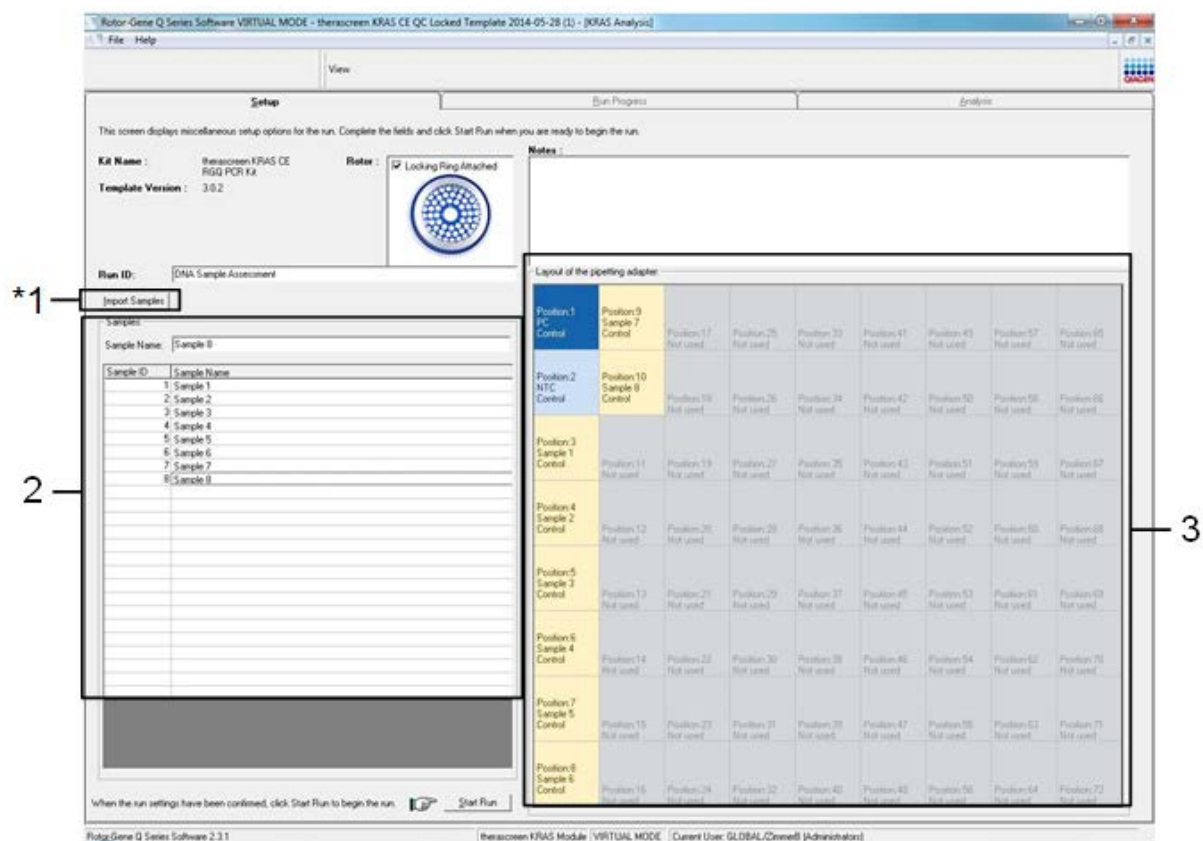
4. **Nastavte nižší objem pipety, než je celkový objem reakčního master mixu a důkladně promíchejte tak, že ho 10krát napipetujete a zcela vypustíte.**
5. **Ihned přidejte 20 µl master mixu do každé stripové zkumavky PCR.**
Poznámka: Rozložení zkumavek naleznete v tabulce 4. Pro vyhodnocení vzorku DNA je třeba přidat kontrolní master mix do jedné ze zkumavek pozitivní kontroly, do jedné zkumavky negativní kontroly a do jedné zkumavky pro každý vzorek DNA.
6. **Ihned přidejte 5 µl vody bez obsahu nukleázy pro kontrolu bez templátu (NTC) do zkumavky na kontrolu bez templátu (pozice zkumavky 2) a tuto zkumavku uzavřete víčkem.**

7. Do zkumavek se vzorky (pozice zkumavek 3–26) přidejte 5 µl každého vzorku DNA a zkumavky uzavřete víčky.
8. Přidejte 5 µl pozitivní kontroly KRAS (PC) do zkumavky na pozitivní kontrolu (pozice zkumavky 1) a zkumavku uzavřete víčkem.
Každá zkumavka musí obsahovat celkový reakční objem 25 µl (20 µl činidla master mix připraveného v tabulce 3, plus 5 µl NTC/vzorku/pozitivní kontroly).
9. Pomocí permanentního popisovače označte víčka prvních zkumavek v nejnižší číselné pozici v každém stripu se 4 zkumavkami PCR (např. pozice 1, 5 a 9 atd.), aby byla naznačena orientace k naplnění zkumavek do rotoru se 72 jamkami přístroje Rotor-Gene Q MDx.
10. 4krát převraťte zavíčkované zkumavky, abyste promíchali vzorky a reakční směsi.
11. Umístěte všechny stripy se 4 zkumavkami PCR do příslušných pozic na rotoru se 72 jamkami podle rozvržení cyklu (tabulka 4) s využitím značek pro správný směr natočení.
Poznámka: Není-li rotor plně obsazen, zaplňte všechny nepoužité pozice rotoru prázdnými zkumavkami s víčky. Tím se zajistí, že bude zachována tepelná účinnost přístroje Rotor-Gene Q MDx.
12. Rotor se 72 jamkami umístěte do přístroje Rotor-Gene Q MDx. Ujistěte se, že je pojistný kroužek (dodáván s přístrojem Rotor-Gene Q MDx) umístěn v horní části rotoru, aby zajistil zkumavky během zpracování.
13. Spust'íte software Rotor-Gene Q a zároveň otevřete šablonu poklepáním na ikonu „therascreen KRAS QC Locked Template“ na pracovní ploše laptopu připojeného k přístroji Rotor-Gene Q MDx (obrázek 1).



Obrázek 1. Ikona „therascreen KRAS QC Locked Template“.

14. Objeví se záložka „Setup“ (Nastavení) (obrázek 2). Zkontrolujte, zda je správně nasazen pojistný kroužek, a zaškrtněte políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen). Uzavřete víko přístroje Rotor-Gene Q MDx.



Obrázek 2. Záložka „Setup“ (Nastavení) a políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen). 1 = záložka „Setup“ (Nastavení); 2 = políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen).

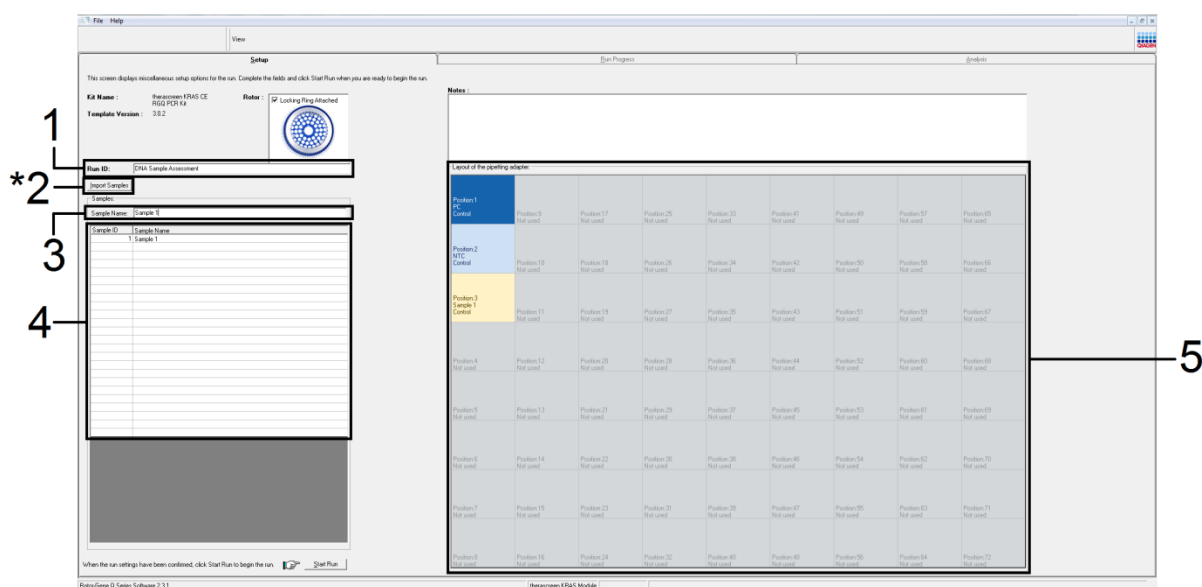
15. Zadejte ID cyklu do dialogového pole „Run ID“ dle místních zásad pro pojmenování. Zadejte název vzorku do dialogového pole „Sample Name“ (Název vzorku) podle místních zásad pro pojmenování a stiskněte klávesu Enter.

Tím přidáte název vzorku do seznamu vzorků níže a přiřadíte vzorku „Sample ID“ (Identifikační číslo vzorku) (1, 2, 3 atd.). Kromě toho dojde k aktualizaci panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) na pravé straně a bude obsahovat název vzorku (obrázek 3).

Názvy vzorků uložené ve formátu *.smp (soubor se vzorky zařízení Rotor-Gene Q) nebo *.csv (hodnoty oddělené čárkou) je možné importovat pomocí tlačítka „Import Samples“ (Importovat vzorky). Při použití tohoto způsobu jsou názvy vzorků vyplněny automaticky.

Poznámka: V panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) zkontrolujte, zda bylo přidání názvu vzorku zvyrazněno změnou barvy a zda je název vzorku v dané pozici vzorku (obrázek 3).

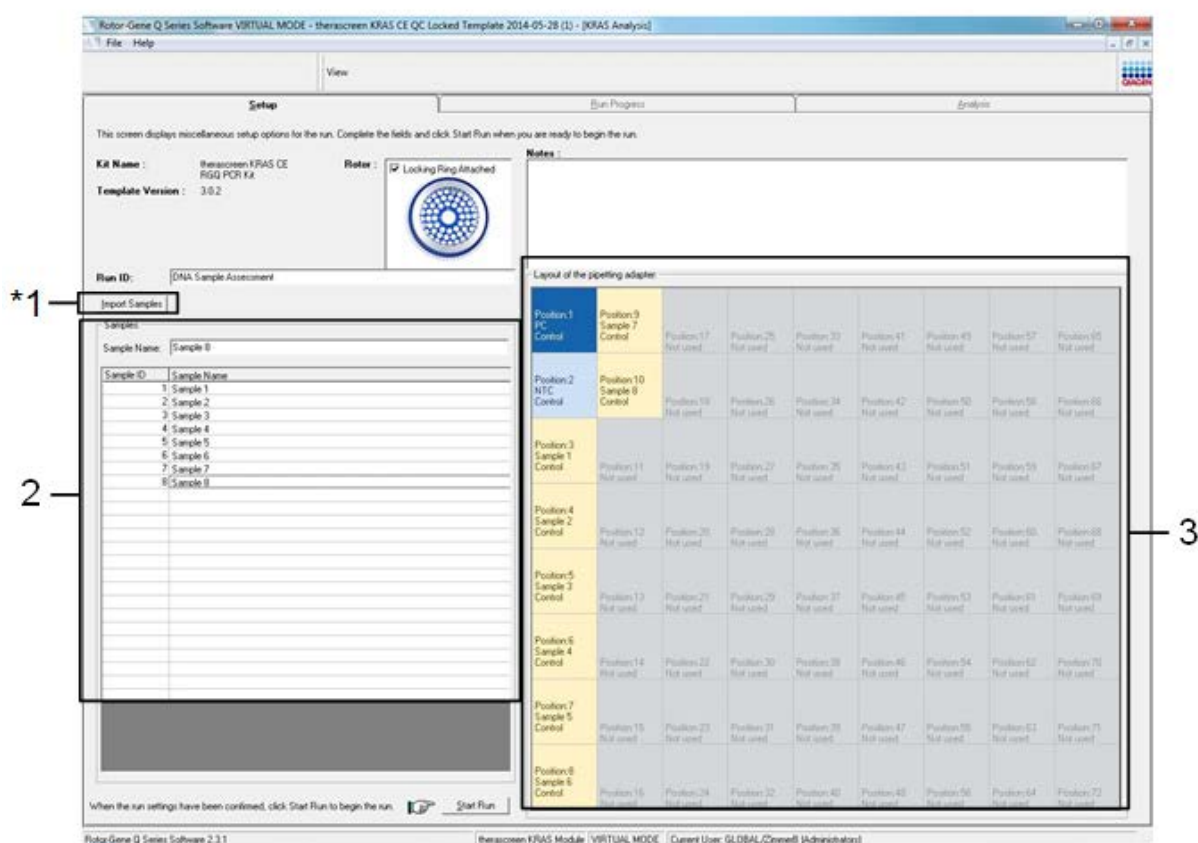
Poznámka: Názvy vzorků s více než 8 znaky nemusí být v panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) úplně zobrazeny.



Obrázek 3. Zadání „Run ID“ (ID cyklu) a „Sample Name“ (Názvu vzorku). 1 = dialogové pole „Run ID“ (ID cyklu); 2 = dialogové pole „Import Sample“ (Import vzorku); 3 = dialogové pole „Sample Name“ (Název vzorku); 4 = seznam vzorků; 5 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce).

16. Zopakováním kroku 16 zadáte názvy všech dalších vzorků (obrázek 4).

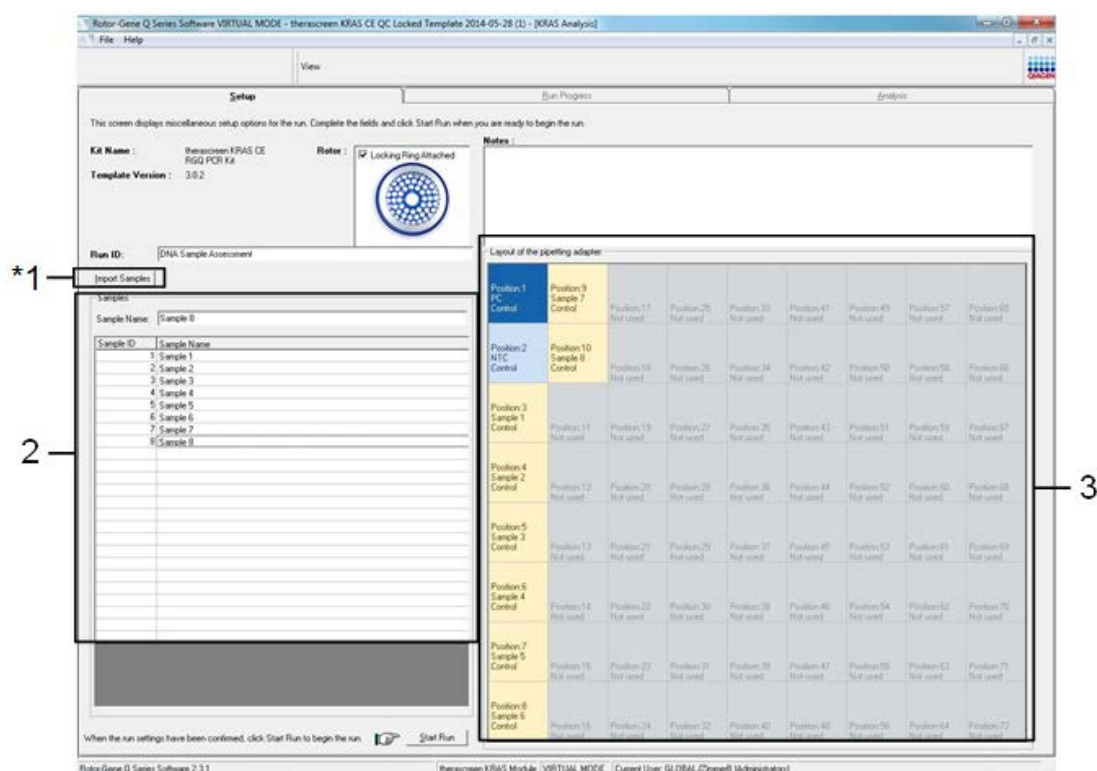
Poznámka: Chcete-li upravit název vzorku, klikněte na „Sample Name“ (Název vzorku) v seznamu vzorků a zvolený vzorek se objeví v dialogovém poli „Sample Name“ (Název vzorku) nahoře. Změňte název vzorku dle místních zásad pro pojmenování a stisknutím klávesy Enter název aktualizujete.



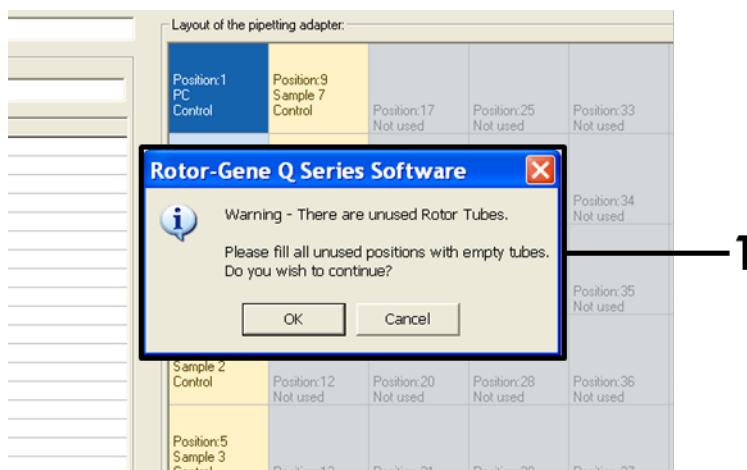
Obrázek 4. Zadání dalších názvů vzorků v dialogovém poli „Sample Name“ (Název vzorku). *1 = tlačítko „Import Sample“ (Import vzorku), 2 = dialogové pole „Sample Name“ (Název vzorku) a seznam vzorků, 3 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) s dodatečným názvem vzorku.

17. Po zadání všech názvů vzorků ověřte, zda jsou správné. V případě potřeby přidejte případné další informace do dialogového pole „Notes“ (Poznámky) a poté klikněte na „Start Run“ (Spustit cyklus) (obrázek 5).

Poznámka: Pokud je jakákoliv pozice rotoru nevyužita, objeví se „Warning“ (Varování) (obrázek 5 a obrázek 6), které uživatele upozorní, že všechny nevyužité pozice na rotoru musí být vyplněny uzavřenou prázdnou zkumavkou. Zkontrolujte, že všechny nevyužité pozice rotoru jsou vyplněny uzavřenou prázdnou zkumavkou a kliknutím na „OK“ pokračujte.

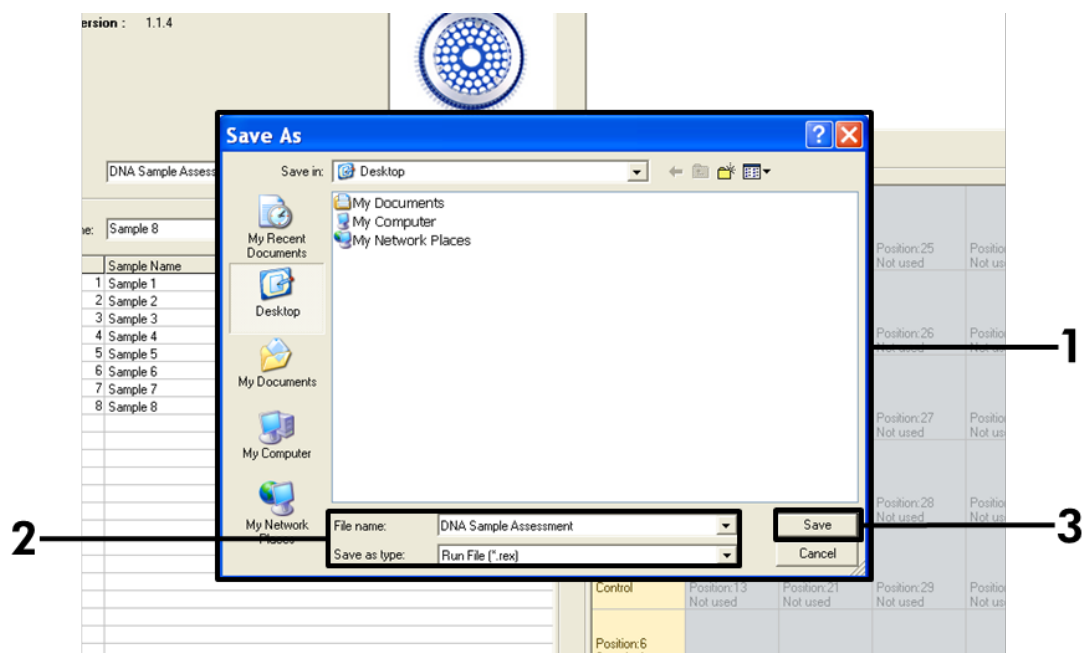


Obrázek 5. Dialogové pole „Notes“ (Poznámky), tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) a „Warning“ (Varování) o nevyužitých pozicích rotoru.



Obrázek 6. 1 = varování o nevyužitých pozicích rotoru.

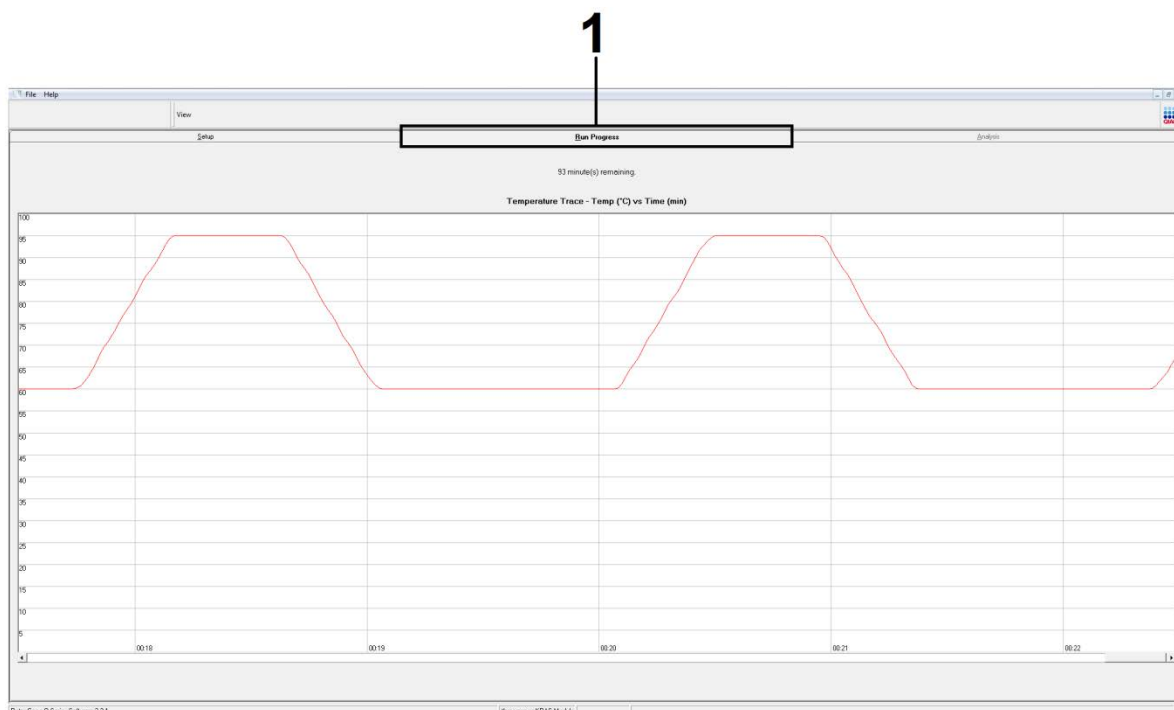
18. Objeví se okno „Save As“ (Uložit jako). Zvolte příslušný název souboru a uložte PCR cyklus jako soubor *.rex na vybrané místo. Klikněte na „Save“ (Uložit) (obrázek 7).



Obrázek 7. Uložení souboru cyklu. 1 = okno „Save As“ (Uložit jako), 2 = název souboru a uložit jako soubor typu *.rex, 3 = „Save“ (Uložit).

19. Spustí se cyklus PCR.

Poznámka: Jakmile se cyklus spustí, automaticky se otevře záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu), v němž se zobrazí sledování teploty a zbývající doba zpracování cyklu (obrázek 8).

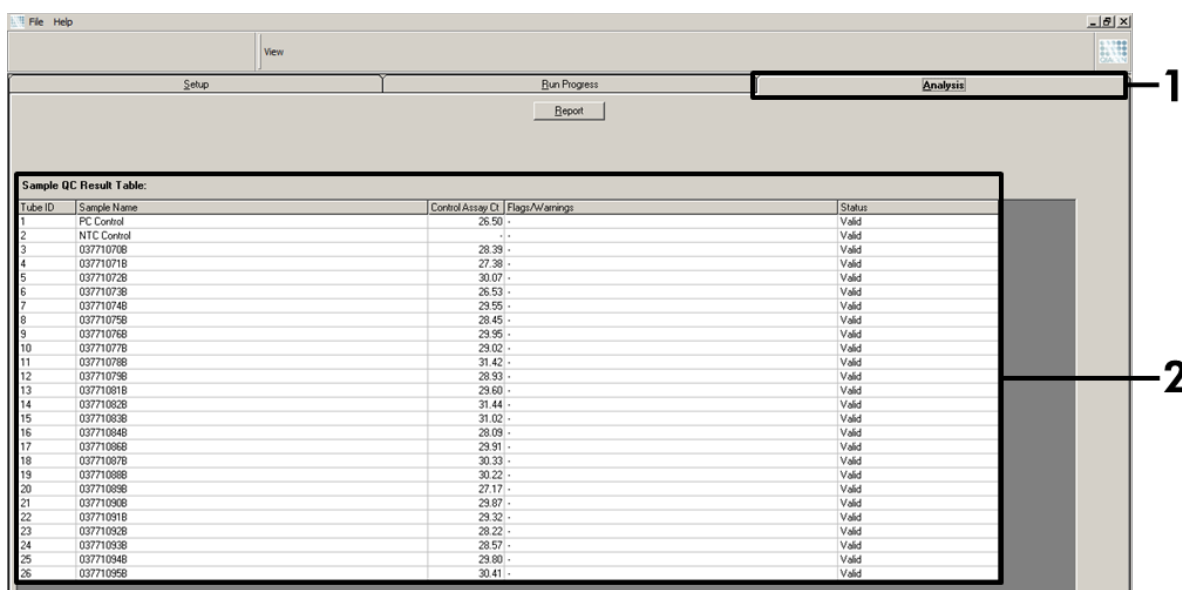


Obrázek 8. Záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu).

20. Po dokončení cyklu se automaticky otevře záložka „Analysis“ (Analýza).

Poznámka: Pokud se záložka „Analysis“ (Analýza) neotevře, klikněte na záložku „Analysis“ (Analýza) (obrázek 9).

Poznámka: Vysvětlení metody výpočtu je uvedeno v části „Interpretace výsledků“, strana 37.



Obrázek 9. Záložka „Analysis“ (Analýza) a uvedení výsledků. 1 = záložka „Analysis“ (Analýza), 2 = „Sample QC Result Table“ (Tabulka s výsledky kontroly kvality vzorků).

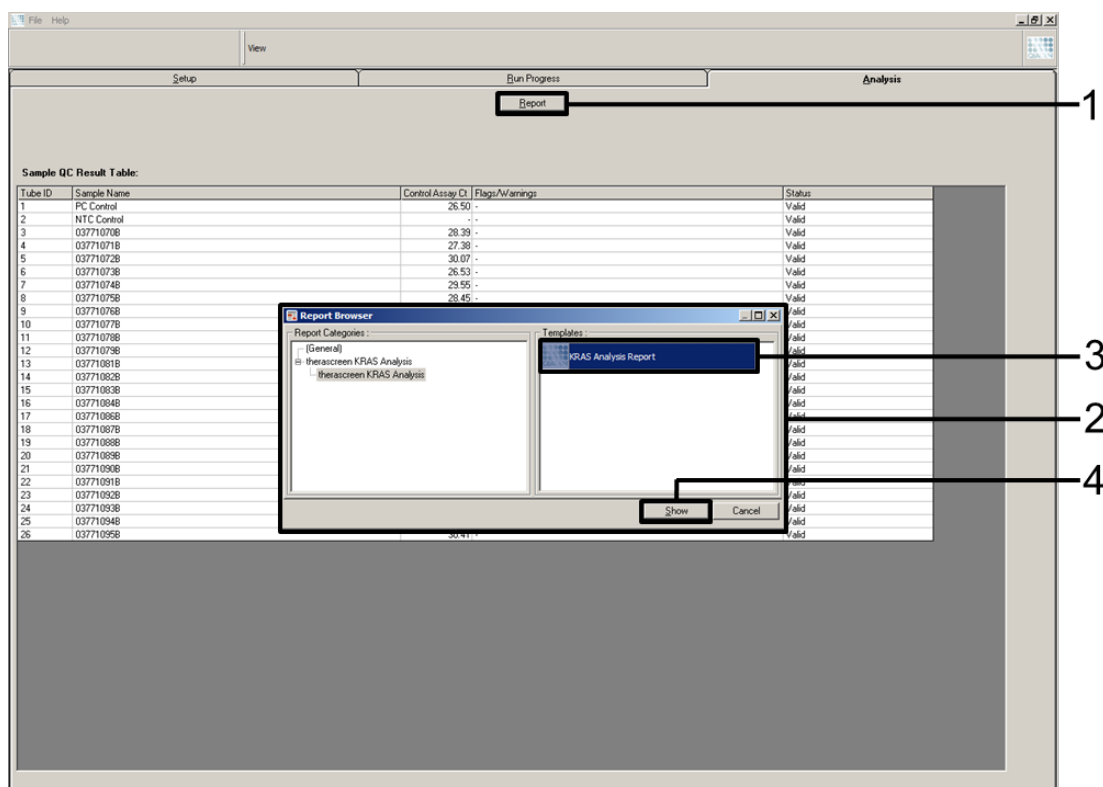
21. Výsledky kontroly budou uvedeny následovně v tabulce „Sample QC Result Table“ (Výsledky kontroly kvality vzorků) (2 na obrázku 9).

- **Kontroly cyklu** (PC a NTC, pozice zkumavky 1, respektive 2): Pokud jsou výsledky v rámci přijatelného rozpětí, zobrazí se hodnota „Valid“ (Platný). V opačném případě se objeví hodnota „Invalid“ (Neplatný).
- **C_T kontrolní analýzy vzorku je > 32,00**: Zobrazí se hodnota „Invalid“. Množství DNA je nedostatečné pro analýzu mutace. Zopakujte testování vzorku. Jestliže je množství DNA stále nedostatečné, extrahujte více nádorové tkáně, pokud je k dispozici (viz „Návod na řešení potíží“, strana 38).
- **C_T kontrolní analýzy vzorku je < 21,92**: Zobrazí se hodnota „Invalid“. Koncentrace DNA je příliš vysoká pro analýzu mutace. Zřed'te vodou bez obsahu nukleázy pro ředění (Dil.) a zopakujte test. Zřed'te na hodnotu C_T 21,92–32,00. Ředění 1:1 zvyšuje hodnotu C_T přibližně o 1,0.
- **C_T kontrolní analýzy vzorku je 21,92–32,00** (21,92 ≤ C_T kontrolní analýzy vzorku ≤ 32,00): Zobrazí se hodnota „Valid“. Koncentrace DNA je vhodná pro analýzu mutace.

Poznámka: V případě, že je vyžadována opakovaná extrakce nebo ředění, zopakujte kontrolní reakci k ověření, že koncentrace DNA je vhodná pro použití.

22. Soubory výsledné zprávy je možné vytvořit kliknutím na „Report“ (Zpráva). Objeví se okno „Report Browser“ (Prohlížeč zpráv). Zvolte „KRAS Analysis Report“ (Zpráva analýzy KRAS) v položce „Templates“ (Šablony) a poté klikněte na „Show“ (Ukázat) (obrázek 10).

Poznámka: Zprávy s výsledky je možné uložit do alternativního umístění ve formátu Webových archivů kliknutím na tlačítko „Save As“ (Uložit jako) v levém horním rohu každé zprávy.



Obrázek 10. Výběr zprávy „KRAS Analysis Report“. 1 = „Report“ (Zpráva); 2 = okno „Report Browser“ (Prohlížeč zpráv); 3 = výběr „KRAS Analysis Report“ (Zpráva analýzy KRAS); 4 = tlačítko „Show“ (Zobrazit).

Protokol: Detekce mutací KRAS

Tento protokol platí pro detekci mutací KRAS.

Důležité body před zahájením

- Vzorek může být testován pomocí analýzy mutací KRAS, jakmile projde vyhodnocením vzorku.
- Pro efektivní použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR je nutné vzorky uspořádat do dávek po 7 (k naplnění jednoho rotoru se 72 jamkami). V případě menších dávek bude možné soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR otestovat méně vzorků.
- Před prvním použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx zajistěte, aby byla instalována správná verze softwaru *therascreen* KRAS Assay Package odpovídající aktuální verzi softwaru Rotor-Gene Q (viz „Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package“, strana 88).

Postup

1. **Promíchejte rozmrazená činidla převrácením každé zkušavky 10krát, aby nedošlo k lokální koncentraci solí. Zkušavky krátce odstředíte, aby se obsah shromáždil na dně zkušavky.**
2. **Nastavte nižší objem pipety, než je celkový objem reakční směsi a důkladně promíchejte master mixy tak, že je 10krát napipetujete a vypustíte.**
3. **Okamžitě přidejte 20 µl master mixu do každé příslušné stripové zkušavky PCR.**

Poznámka: Rozvržení zkumavek při přípravě reakčních směsí naleznete v tabulce 5. Pro detekci mutací KRAS musí být činidla master mix přidána do 8 zkumavek pozitivní kontroly (PC), 8 zkumavek negativní kontroly (NTC) a 8 zkumavek pro každý vzorek DNA.

Tabulka 5. Rozvržení cyklu pro vyhodnocení mutací KRAS v plnicím bloku

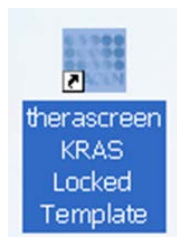
Analýza	Kontroly		Číslo vzorku						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40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

* Čísla označují pozice v plnicím bloku a indikují konečnou polohu rotoru.

4. Ihned přidejte 5 µl vody bez obsahu nukleázy pro kontrolu bez templátu (NTC) do zkumavek pro kontrolu bez templátu (pozice zkumavek 9–16) a tyto zkumavky uzavřete víčkem.
5. Do zkumavek se vzorky (pozice zkumavek 17–72) přidejte 5 µl každého vzorku DNA a zkumavky uzavřete víčky.
6. Přidejte 5 µl pozitivní kontroly KRAS (PC) do zkumavek na pozitivní kontrolu (pozice zkumavek 1–8) a zkumavky uzavřete víčkem.
7. Pomocí permanentního popisovače označte víčka prvních zkumavek v nejnižší číselné pozici v každém stripu se 4 zkumavkami PCR (např. pozice 1, 5 a 9 atd.), aby byla naznačena orientace k naplnění zkumavek do rotoru se 72 jamkami přístroje Rotor-Gene Q MDx.
8. 4krát převraťte zavíčkované zkumavky, abyste promíchali vzorky a reakční směsi.
9. Umístěte všechny stripy se 4 zkumavkami PCR do příslušných pozic na rotoru se 72 jamkami podle rozvržení cyklu (tabulka 5) s využitím značek pro správný směr natočení.

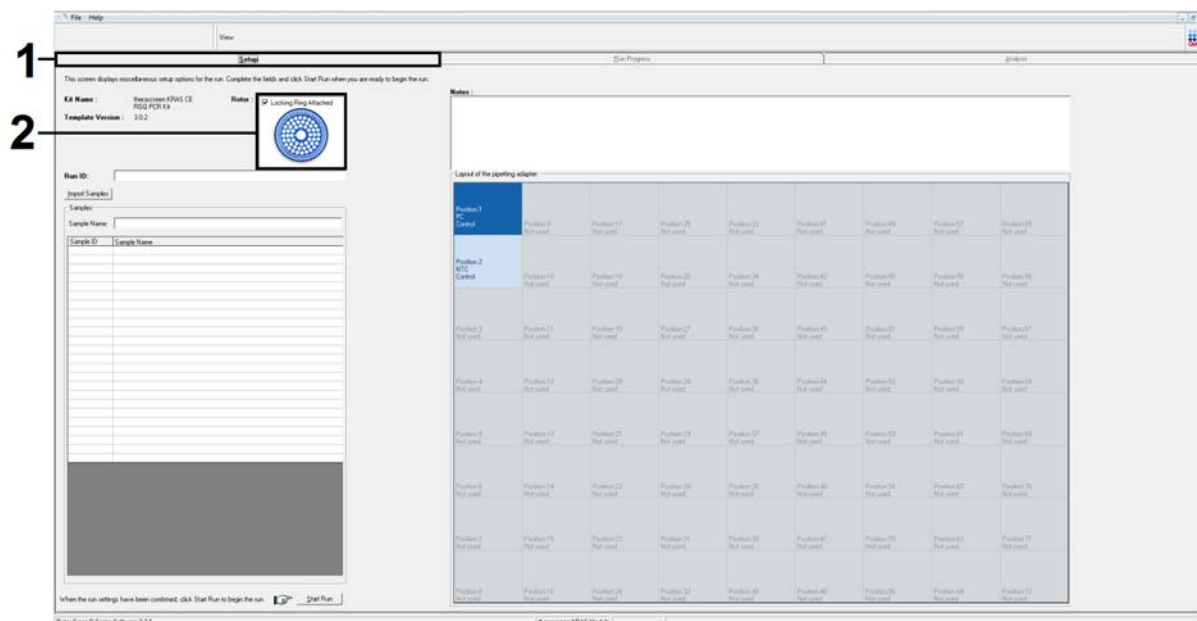
Poznámka: Při každém cyklu PCR lze zpracovat nejvýše 7 vzorků. Není-li rotor plně obsazen, zaplňte všechny nepoužité pozice rotoru prázdnými zkumavkami s víčky. Tím se zajistí, že bude zachována tepelná účinnost přístroje Rotor-Gene Q MDx.

10. Rotor se 72 jamkami umístěte do přístroje Rotor-Gene Q MDx. Ujistěte se, že pojistný kroužek (dodáván s přístrojem Rotor-Gene Q MDx) je umístěn v horní části rotoru, aby zajistil zkumavky během zpracování.
11. Spustíte software Rotor-Gene Q a zároveň otevřete šablonu poklepáním na ikonu „therascreen KRAS Locked Template“ na pracovní ploše laptopu připojeného k přístroji Rotor-Gene Q MDx (obrázek 11).



Obrázek 11. Ikona „therascreen KRAS Locked Template“.

12. Objeví se záložka „Setup“ (Nastavení) (obrázek 12). Zkontrolujte, zda je správně nasazen pojistný kroužek, a zaškrtněte políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen). Uzavřete víko přístroje Rotor-Gene Q MDx.



Obrázek 12. 1 = záložka „Setup“ (Nastavení) a 2 = políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen).

13. Zadejte ID cyklu do dialogového pole „Run ID“ dle místních zásad pro pojmenování.

14. Zadejte název vzorku do dialogového pole „Sample Name“ (Název vzorku) podle místních zásad pro pojmenování a stiskněte klávesu Enter.

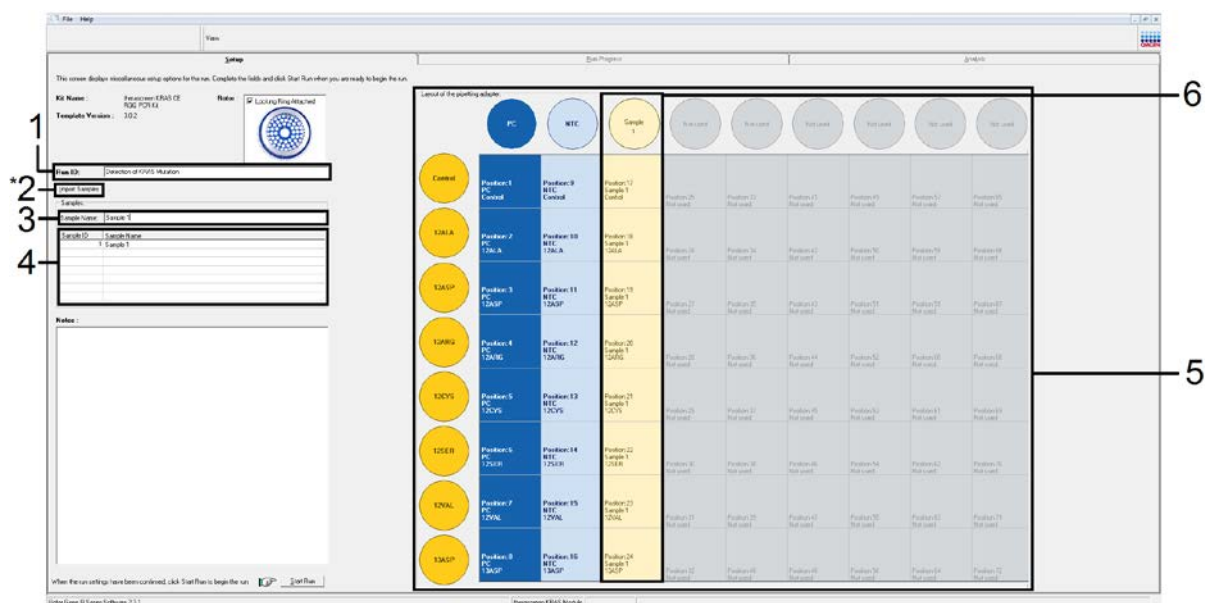
Tím přidáte název vzorku do seznamu vzorků níže a přiřadíte vzorku „Sample ID“ (Identifikační číslo vzorku) (1, 2, 3 atd.). Kromě toho dojde k aktualizaci panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) na pravé straně a bude obsahovat název vzorku (obrázek 13).

Poznámka: V panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) zkontrolujte, zda bylo přidání názvu vzorku zvýrazněno změnou barvy a zda je všech 8 analýz ve sloupci pod kroužkem Sample (Vzorek) zvýrazněno (obrázek 13).

Poznámka: Je možné přidat maximálně 7 vzorků. Identifikační čísla vzorků (ID) (v kroužcích vzorků) budou automaticky přiřazena od 1 do 7.

Poznámka: Názvy vzorků s více než 8 znaků nemusí být v panelu „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) úplně zobrazeny.

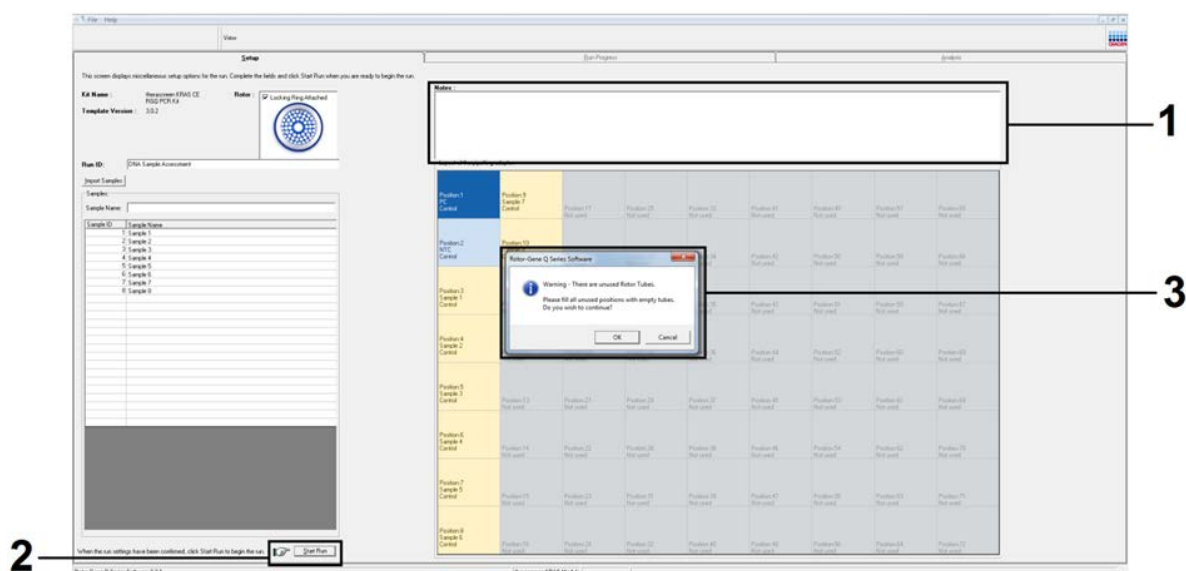
Názvy vzorků uložené ve formátu *.smp (soubor se vzorky zařízení Rotor-Gene Q) nebo *.csv (hodnoty oddělené čárkou) je možné importovat pomocí tlačítka „Import Samples“ (Importovat vzorky). Při použití tohoto způsobu jsou názvy vzorků vyplněny automaticky.



Obrázek 13. Zadání „Run ID“ (ID cyklu) a „Sample Name“ (Názvu vzorku). 1 = dialogové pole „Run ID“ (ID cyklu); 2 = dialogové pole „Import Sample“ (Import vzorku, u verze softwaru 2.1 není k dispozici); 3 = dialogové pole „Sample Name“ (Název vzorku); 4 = seznam vzorků; 5 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce), 6 = zvýrazněný terč vzorku a sloupec 8 analýz pod ním.

15. Zopakováním kroku 14 zadáte názvy všech dalších vzorků (obrázek 14).

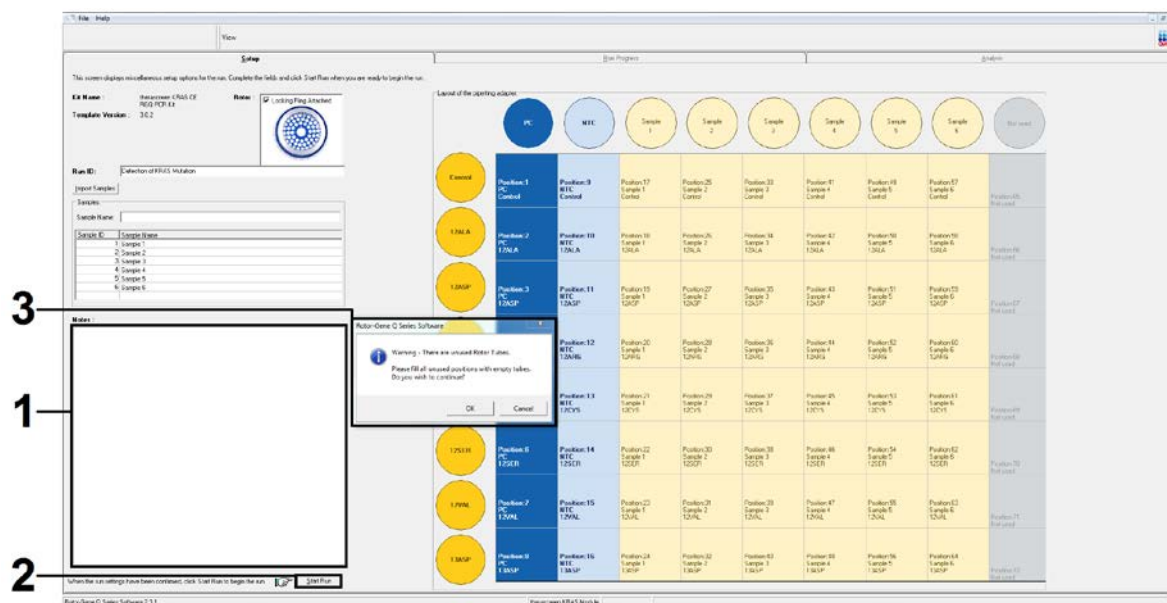
Poznámka: Chcete-li upravit název vzorku, klikněte na „Sample Name“ (Název vzorku) v seznamu vzorků a zvolený vzorek se objeví v dialogovém poli „Sample Name“ (Název vzorku) nahoře. Změňte název vzorku dle místních zásad pro pojmenování a stisknutím klávesy Enter název aktualizujete.



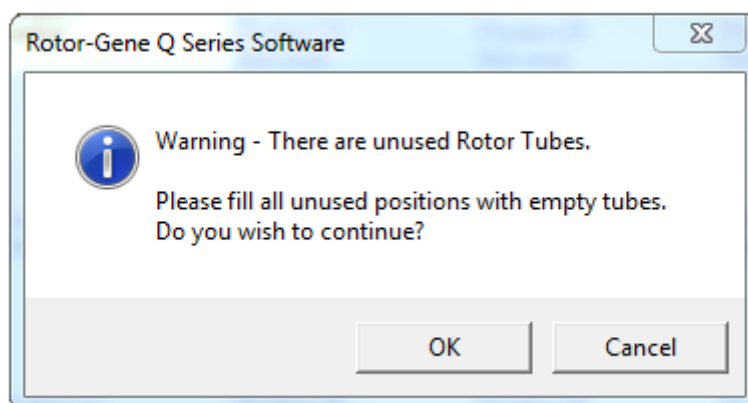
Obrázek 14. Zadání dalších názvů vzorků v dialogovém poli „Sample Name“ (Název vzorku). 1 = dialogové pole „Sample Name“ (Název vzorku); 2 = seznam vzorků; 3 = panel „Layout of the pipetting adapter“ (Rozvržení pipetovacího nástavce) s dodatečnými názvy vzorků.

16. Po zadání všech názvů vzorků ověřte, zda jsou správné. V případě potřeby přidejte případné další informace do dialogového pole „Notes“ (Poznámky) a poté klikněte na tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) (obrázek 15).

Poznámka: Pokud je jakákoliv pozice rotoru nevyužita, objeví se „Warning“ (Varování) (obrázek 15 a obrázek 16), které uživatele upozorní, že všechny nevyužité pozice na rotoru musí být vyplněny uzavřenou prázdnou zkumavkou. Zkontrolujte, že všechny nevyužité pozice rotoru jsou vyplněny uzavřenou prázdnou zkumavkou a kliknutím na „OK“ pokračujte.

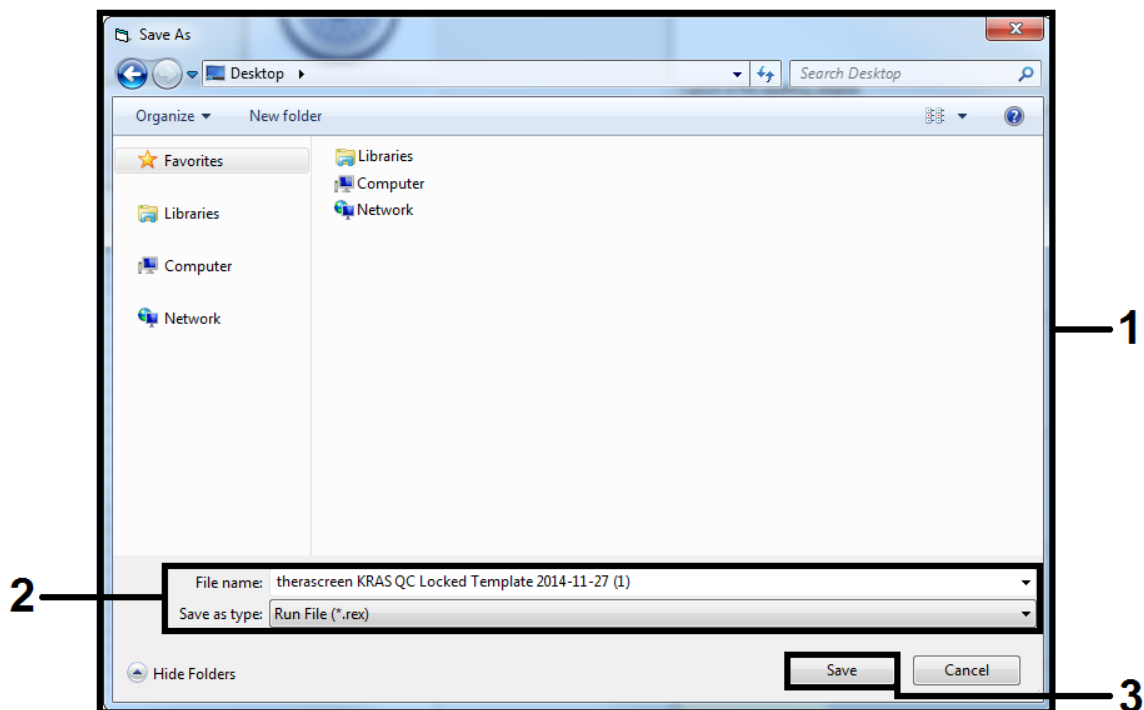


Obrázek 15. 1 = dialogové pole „Notes“ (Poznámky); 2 = tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) a 3 = „Warning“ (Varování) o nevyužitých pozicích rotoru.



Obrázek 16. Varování o nevyužitých pozicích rotoru.

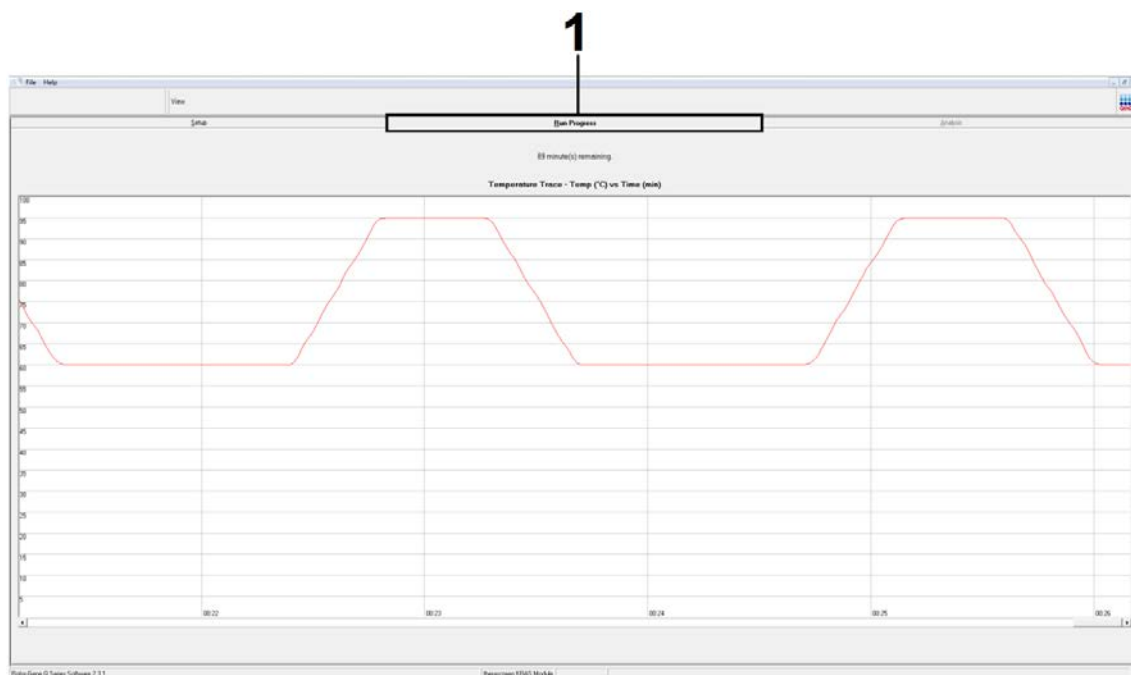
17. Objeví se okno „Save As“ (Uložit jako). Zvolte příslušný název souboru a uložte PCR cyklus jako soubor *.rex na vybrané místo (obrázek 17).



Obrázek 17. Uložení souboru cyklu.

18. Spustí se cyklus PCR.

Poznámka: Jakmile se cyklus spustí, automaticky se otevře záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu), v němž se zobrazí sledování teploty a zbývající doba zpracování cyklu (obrázek 18).



Obrázek 18. 1 = záložka „Run Progress“ (Průběh cyklu).

19. Po dokončení cyklu se automaticky otevře záložka „Analysis“ (Analýza).

Poznámka: Pokud se záložka „Analysis“ (Analýza) neotevře, klikněte na záložku „Analysis“ (Analýza) (obrázek 19).

Poznámka: Vysvětlení metody výpočtu je uvedeno v části „Interpretace výsledků“, strana 37.

Run Controls, Positive Control:

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

Run Controls, Negative Control:

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

Sample Result Table:

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

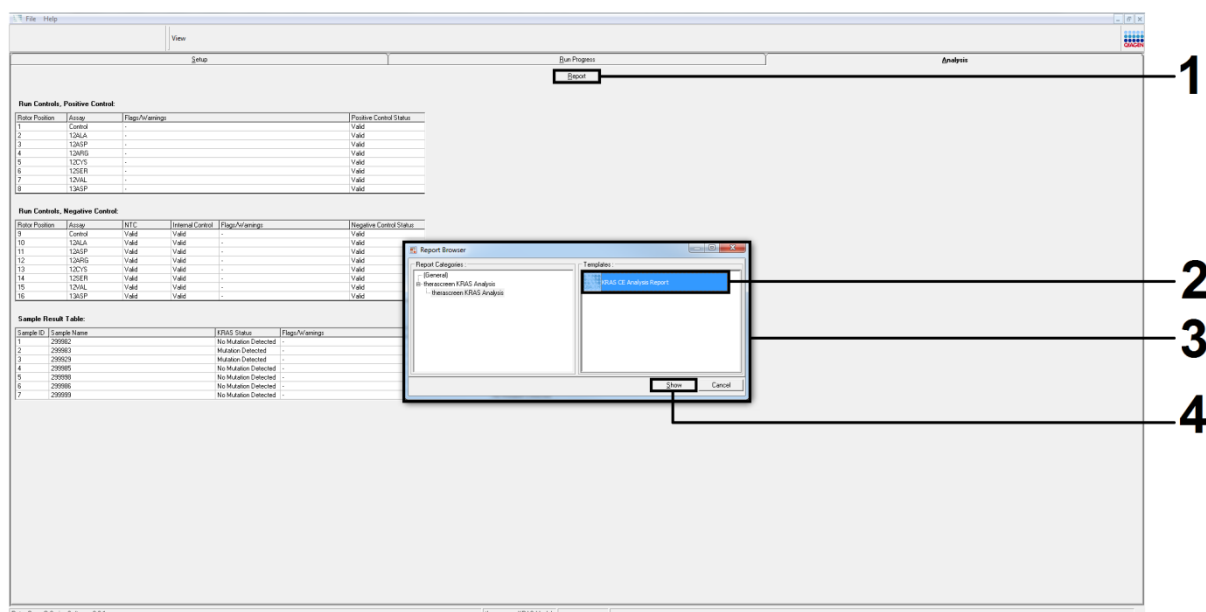
Obrázek 19. Záložka „Analysis“ (Analýza) a uvedení výsledků. 1 = záložka „Analysis“ (Analýza); 2 = panel „Run Controls, Positive Control“ (Kontroly cyklu, pozitivní kontrola); 3 = panel „Run Controls, Negative Control“ (Kontroly cyklu, negativní kontrola); 4 = „Sample Result Table“ (Tabulka s výsledky vzorků); 5 = sloupec „KRAS Mutation Status“ (Stav mutace KRAS).

20. Výsledky analýzy budou uvedeny ve zprávě následujícím způsobem (obrázek 19):

- **Panel „Run Controls, Positive Control“ (Kontroly cyklu, pozitivní kontrola):** Pokud jsou výsledky v přijatelném rozmezí, objeví se ve sloupci „Positive Control Status“ (Stav pozitivní kontroly) „Valid“ (Platný). V opačném případě se objeví výsledek „Invalid“ (Neplatný).
- **Panel „Run Controls, Negative Control“ (Kontroly cyklu, negativní kontrola):** Pokud jsou výsledky „NTC“ (Negativní kontroly) a „Internal Control“ (Vnitřní kontroly) přijatelném rozmezí, objeví se ve sloupci „Negative Control Status“ (Stav negativní kontroly) „Valid“ (Platný). V opačném případě se objeví výsledek „Invalid“ (Neplatný).
- **Panel „Sample Result Table“ (Tabulka s výsledky vzorků):** Specifické mutace budou uvedeny pro vzorky s pozitivní mutací (Mutation Positive) ve sloupci „KRAS Mutation Status“ (Stav mutace KRAS).

21. Soubory výsledné zprávy je možné vytvořit kliknutím na „Report“ (Zpráva). Objeví se okno „Report Browser“ (Prohlížeč zpráv). Zvolte „KRAS Analysis Report“ (Zpráva analýzy KRAS) v položce „Templates“ (Šablony) a poté klikněte na „Show“ (Ukázat) (obrázek 20).

Poznámka: Zprávy s výsledky je možné uložit do alternativního umístění ve formátu Webových archivů kliknutím na „Save As“ (Uložit jako) v levém horním rohu každé zprávy.



Obrázek 20. Výběr zprávy „KRAS Analysis Report“. 1 = „Report“ (Zpráva); 2 = okno „Report Browser“ (Prohlížeč zpráv); 3 = výběr „KRAS Analysis Report“ (Zpráva analýzy KRAS); 4 = tlačítko „Show“ (Zobrazit).

Interpretace výsledků

Analýza a detekce mutace jsou prováděny automaticky softwarem *therascreen* KRAS Assay Package po dokončení cyklu. Následující informace vysvětlují, jak software *therascreen* KRAS Assay Package provádí analýzu a detekci mutace.

Poznámka: Manuální analýza, viz „Příloha 1: Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR – Manuální protokol“, strana 67.

Cyklus PCR při němž fluorescence z určité reakce překračuje prahovou hodnotu, která je definována jako hodnota C_T . Hodnoty C_T označují množství specifické vstupní DNA. Nízké hodnoty C_T ukazují na vyšší hladiny vstupní DNA a vysoké hodnoty C_T ukazují na nižší hladiny vstupní DNA. Reakce s hodnotou C_T jsou vyhodnoceny jako s pozitivní amplifikací.

Software Rotor-Gene Q vloží fluorescenční signály mezi dvě zaznamenané hodnoty. Hodnoty C_T mohou proto být jakákoliv reálná čísla (nejen celá čísla) v rozmezí od 0 do 40.

Pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR, je prahová hodnota nastavena na 0,05 relativních jednotek fluorescence. Tato hodnota je konfigurována v softwaru *therascreen* KRAS Assay Package pro oba fluorescenční kanály, zelený i žlutý. Prahová hodnota byla definována během vývoje soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR.

Byl proveden výpočet za účelem stanovení hodnoty ΔC_T pomocí rovnice:

$$\Delta C_T = [\text{hodnota } C_T \text{ testu mutace}] - [\text{hodnota } C_T \text{ kontrolního testu}]$$

Kontroly cyklu (pozitivní kontrola, NTC a vnitřní kontroly) jsou vyhodnoceny, aby se zajistilo, že jsou splněny přijatelné hodnoty C_T a že reakce jsou prováděny správně.

Hodnoty ΔC_T vzorku se počítají jako rozdíl mezi C_T analýzou mutací a C_T kontrolní analýzou u stejného vzorku: Vzorky jsou hodnoceny jako pozitivní z hlediska mutace, pokud vykazují hodnoty ΔC_T nižší nebo rovny hraniční hodnotě ΔC_T pro danou analýzu. Nad touto hodnotou může vzorek obsahovat méně než danou procentuální hodnotu mutace, kterou lze detekovat soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR (mimo limit analýzy), nebo je mutace u vzorku negativní, což může být uváděno jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována).

Žádná amplifikace v mutačních reakcích nebude vyhodnocena jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována). Očekává se, že hodnoty ΔC_T vypočítané z amplifikace v pozadí budou vyšší než hraniční hodnoty ΔC_T a vzorek bude vyhodnocen jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována).

Výsledky analýzy budou zobrazeny jako „Mutation Positive“ (Mutace pozitivní), „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována), „Invalid“ (Neplatné)

nebo, pokud dojde k selhání cyklu, „Run Control Failed“ (Kontrola cyklu selhala). U vzorků pozitivních na mutaci bude uvedena specifická mutace.

Další možné výsledky, které mohou být zobrazeny, jsou probrány v části „Protokol: Vyhodnocení vzorku DNA“ na straně 16 této příručky.

Ve vzácných případech může nádor obsahovat více než jednu mutaci. V takových případech bude identifikována mutace vykazující nejnižší hodnotu ΔC_T .

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědečtí pracovníci, kteří pracují v technických službách společnosti QIAGEN, vám vždy ochotně odpoví na jakékoli dotazy týkající se informací či protokolů v této příručce nebo technologií přípravy vzorků či zpracování analýz (kontaktní informace najdete na zadní straně obálky nebo na stránkách **www.qiagen.com**).

Komentáře a návrhy

Neplatné výsledky

- | | |
|--|---|
| a) Skladovací podmínky jedné nebo několika součástí soupravy neodpovídaly instrukcím v části „Skladování činidel a manipulace s nimi“ (strana 13). | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek soupravy) činidel a případně použijte novou soupravu. |
| b) Doba použitelnosti soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR již uplynula. | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek soupravy) činidel a případně použijte novou soupravu. |

Vzorky NTC ukazují pozitivní výsledky v kanálu FAM

- | | |
|--|---|
| Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci. | Zopakujte PCR s novými reakčními činidly.
Je-li to možné, zavřete zkumavky PCR přímo po přidání testovaného vzorku.
Zkontrolujte, zda jsou přístroje a pracoviště pravidelně dekontaminovány. |
|--|---|

Příznaky generované softwarem *therascreen* KRAS Assay Package

V tabulce 6 jsou uvedeny možné příznaky, které mohou být vytvořeny softwarem *therascreen* KRAS Assay Package, jejich význam a kroky, které je nutné provést.

Tabulka 6. Příznaky softwaru *therascreen* KRAS Assay Package

Příznak	Význam	Kroky
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Cyklus PCR neplatný – FAM C _T mimo rozsah pro pozitivní kontrolu v kontrolní reakci.	Zopakujte celý cyklus PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Cyklus PCR neplatný – FAM C _T mimo rozsah pro jednu nebo více kontrolních reakcí mutace.	Zopakujte celý cyklus PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v pozitivní kontrole (Control Reaction Mix, kontrolní reakční směs) nelze interpretovat.	Zopakujte celý cyklus PCR.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v pozitivní kontrole (mutační reakční směs) nelze interpretovat.	Zopakujte celý cyklus PCR.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Cyklus PCR neplatný – vnitřní kontrola vyšší než rozsah pro negativní kontrolu.	Zopakujte celý cyklus PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Cyklus PCR neplatný – vnitřní kontrola nižší než rozsah pro negativní kontrolu.	Zopakujte celý cyklus PCR.
NTC_INVALID_CT	Cyklus PCR neplatný – FAM neplatný (nižší než limit) pro negativní kontrolu.	Zopakujte celý cyklus PCR.

Příznak	Význam	Kroky
NTC_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v negativní kontrole nelze interpretovat.	Zopakujte celý cyklus PCR.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Cyklus PCR neplatný – údaje fluorescence v kontrolním vzorku nelze interpretovat.	Připravte nový cyklus PCR pro zopakování příslušného vzorku(ů).
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Vzorek neplatný – hodnota FAM C _T kontrolního vzorku příliš nízká.	Zředte vzorek, aby se zvýšila kontrolní hodnota C _T . Toto ředění musí být vypočítáno s předpokladem, že ředění 1:1 vodou dodanou v soupravě zvýší hodnotu C _T o 1,0; jakmile je vzorek zředěn, připravte nový cyklus PCR pro zopakování vzorku.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Vzorek neplatný – hodnota FAM C _T kontrolní reakce vzorku příliš vysoká.	Připravte nový cyklus PCR pro zopakování reakce vzorku. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte vzorek z nového řezu(ů) FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného vzorku. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže vzorek po tomto cyklu nedává platný výsledek, je vzorku přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.

Příznak	Význam	Kroky
SAMPLE_INT _CTRL_FAIL	C _T příliš vysoká (nebo žádná hodnota C _T) pro vnitřní kontrolu (HEX), mutace kanálu FAM negativní.	<p>Pokud je vzorku přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Vzorky CRC: Pokud je vzorku přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování vzorku. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte vzorek z nového řezu(ů) FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného vzorku. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže vzorek po tomto cyklu nedává platný výsledek, je vzorku přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>

Příznak	Význam	Kroky
SAMPLE_INT _CTRL_FAIL (pokračování)		<p>Vzorky NSCLC: Pokud je vzorku přidělen neplatný stav, rozřeďte zbývající vzorek 1 ku 8 s vodou ze zkumavky označené DIL tak, aby byl konečný objem větší než 40 µl (např. 10 µl DNA a 70 µl vody ze zkumavky označené DIL) a připravte nový cyklus PCR pro zopakování vzorku. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte vzorek z nového řezu(ů) FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného vzorku. Pokud je neplatný, rozřeďte zbývající vzorek 1 ku 8 s vodou ze zkumavky označené DIL tak, aby byl konečný objem větší než 40 µl a tento roztok testujte. Jestliže vzorek po tomto cyklu nedává platný výsledek, je vzorku přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>

Příznak	Význam	Kroky
SAMPLE_INT _CTRL_EARLY _CT	Zkumavka mutace neplatná – hodnota C _T HEX vzorku příliš nízká (vnitřní kontrola).	<p>Pokud je vzorku přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Pokud je vzorku přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování vzorku.</p> <p>Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte vzorek z nového řezu(ů) FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného vzorku. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže vzorek po tomto cyklu nedává platný výsledek, je vzorku přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>

Příznak	Význam	Kroky
SAMPLE_INVALID_DATA	Zkumavka mutace neplatná – údaje fluorescence vnitřní kontroly nelze interpretovat.	<p>Pokud je vzorku přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Pokud je vzorku přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování vzorku. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte vzorek z nového řezu(ů) FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného vzorku. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže vzorek po tomto cyklu nedává platný výsledek, je vzorku přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>
MUTATION_EARLY_CT	Zkumavka mutace neplatná – hodnota C_T FAM vzorku příliš nízká.	<p>Pokud je vzorku přidělen platný stav – žádné kroky.</p> <p>Pokud je vzorku přidělen neplatný stav, připravte nový cyklus PCR pro zopakování vzorku. Pokud je neplatný při opakovaném cyklu PCR, extrahujte vzorek z nového řezu(ů) FFPE. Připravte nový cyklus PCR k testování tohoto nově extrahovaného vzorku. Pokud je neplatný, zopakujte i druhou extrakci. Jestliže vzorek po tomto cyklu nedává platný výsledek, je vzorku přidělen stav neurčitelné mutace a žádné další testování nemusí být prováděno.</p>

Příznak	Význam	Kroky
SAMPLE _POSITIVE _AND_INVALID	Jedna nebo více mutací vzorku je platná a pozitivní, zároveň jedna nebo více mutací u stejného vzorku je neplatná (varování, ne chyba).	Žádné.

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN, certifikovaným podle ISO, je každá výrobní šarže souprav *therascreen* KRAS RGQ PCR testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

Omezení

Tento test je určen k detekci 7 mutací v kodonech 12 a 13 genu KRAS. Vzorky s výsledky uvedenými jako „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována) mohou ukrývat mutace KRAS nedetekované touto analýzou (např. 13CYS).

Detekce mutací závisí na celistvosti vzorku a množství amplifikovatelné DNA přítomné ve vzorku. Postup by měl být zopakován v případě, že prvotní vyhodnocení DNA ve vzorku ukazuje, že množství buď není dostatečné nebo příliš vysoké pro analýzu mutace.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR se používá v postupu PCR (polymérázové řetězové reakce). Stejně jako u všech postupů PCR mohou být vzorky kontaminovány vnějšími zdroji DNA v prostředí, kde probíhá testování a DNA přítomnou v pozitivní kontrole. Dbejte na to, abyste zabránili kontaminaci vzorků a činidel reakční směsi.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je určena pouze k rozlišení mezi divokým typem genu a mutací. Tento test byl navržen tak, aby každá mutační reakce byla co nejvíce citlivá na konkrétní testovanou mutaci. Nicméně u vzorků, kde je mutace detekována, mohlo dojít ke zkřížené reakci s jinými mutačními reakcemi. Jestliže je pozitivní více než jedna mutační reakce, výsledkem je ta s nejnižší hodnotou ΔC_T .

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je validována pouze pro tkáň kolo-rectálního karcinomu (CRC) a nemalobuněčného karcinomu plic fixované metodou FFPE.

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je validována pouze s použitím soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je validována pouze s použitím přístroje Rotor-Gene Q MDx.

Charakteristiky funkčních vlastností

Analytická účinnost

Specifické funkční vlastnosti soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR byly stanoveny na základě studií zahrnujících vzorky fixovaných metodou FFPE odebrané od pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) a nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC). Metody odběru vzorků NSCLC zahrnovaly punkční jehlovou biopsii tkáně (CNB), aspirační biopsii tenkou jehlou (FNA) a resekci. Pro každý typ vzorku bylo použito 8 FFPE lidských buněčných linií, z nichž 7 obsahuje známé mutace KRAS detekované v analýze a jedna obsahuje divoký typ alely KRAS (tj. bez mutací v kodonech 12 a 13). Stav mutace vzorků byl potvrzen obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou.

Mezní hodnota

Pomocí metody, která se řídí směrnicí v CLSI EP17-A (2004) (8), jsme analyzovali 225 vzorků FFPE za účelem stanovení mezních hodnot pro tuto analýzu. Rozsah hodnot C_T kontrolní reakce byl stanoven na 21,92 až 32,00. Mezní hodnoty, které jsou založeny na hodnotě C_T kontrolní reakce odečtené od hodnoty C_T mutačních reakcí (ΔC_T), jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7. Zavedené mezní hodnoty jednotlivých analýz mutací

	Mutační analýza						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mezní hodnota ($\leq \Delta C_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Hodnoty meze slepého vzorku

K vyhodnocení účinnosti soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR bez přítomnosti templátu pozitivního na mutaci a aby se zajistilo, že slepý vzorek nevytváří analytický signál, který může ukazovat na nízkou koncentraci mutace, byly vyhodnoceny vzorky bez templátu. Výsledky neukázaly žádné detekovatelné hodnoty C_T kontroly nebo mutace v žádné z mutačních ani kontrolních reakčních zkumavek (hodnoty C_T vnitřní kontroly byly všechny platné).

Porovnání s analytickou referenční metodou: CRC

Byly provedeny dvě studie k prokázání shody ve stavu mutace vzorků CRC testovaných pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR v porovnání s obousměrnou sekvenační metodou. Celkem 137 vzorků FFPE vykázalo platné výsledky pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR i obousměrnou sekvenační metodu.

Celkové výsledky, kromě 6 neplatných vzorků zpracovaných Sangerovou obousměrnou sekvenační metodou, jsou uvedeny v tabulce 8. Tabulka 9 zobrazuje analýzu shody mezi výsledky analýz soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR a obousměrnou sekvenční analýzou.

Tabulka 8. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR vs. Sangerova obousměrná sekvenační metoda

Stanovení dle soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR	Zjištění mutace obousměrnou sekvenační metodou									
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Celkem
	Negativní	80	–	–	1	–	–	–	1	82
	Pozitivní 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
	Pozitivní 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
	Pozitivní 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
	Pozitivní 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
	Pozitivní 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
	Pozitivní 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	16
	Pozitivní 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
	Celkem	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tabulka 9. Analýza shody

Měření shody	Frekvence (%)	95% interval spolehlivosti (CI)
Celkové procento shody	132/137 (96,35)	92,69–98,21
Procento pozitivní shody	52/54 (96,30)	89,41–98,77
Procento negativní shody	80/83 (96,39)	91,30–98,55

Druhý jedinečný soubor vzorků byl vyhodnocen za účelem doplnění údajů z první studie. Byl vybrán soubor 271 vzorků CRC FFPE; 250 s neznámým stavem mutace a 21 vzorků se známým stavem mutace pro obohacení vzácnými mutacemi bylo porovnáno se Sangerovou obousměrnou sekvenační metodou, viz popis výše.

U 247 vzorků byla provedena analýza shody s platnými výsledky obousměrné sekvenační metody i soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR. 9 vzorků bylo nesouhlasných. Celkově bylo dosaženo shody 96,4 %. Tyto údaje podporují výsledky přesnosti soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR (tabulka 10 a tabulka 11).

Tabulka 10. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR vs. Sangerova obousměrná sekvenační metoda (druhá studie)

Stanovení dle soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR	Zjištění mutace obousměrnou sekvenační metodou									
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Celkem
	Negativní	132	–	–	–	–	1	–	–	133
	Pozitivní 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
	Pozitivní 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	–	10
	Pozitivní 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	–	31
	Pozitivní 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
	Pozitivní 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
	Pozitivní 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
	Pozitivní 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
	Celkem	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabulka 11. Analýza shody (druhá studie)

Měření shody	Frekvence (%)	95% interval spolehlivosti (CI)
Celkové procento shody	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Procento pozitivní shody	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Procento negativní shody	132/140 (94,29)	89,93–97,13

Porovnání s analytickou referenční metodou: NSCLC

Shoda mutačního stavu vzorků NSCLC testovaných pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR ve srovnání s obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou byla prokázána analýzou klinických vzorků FFPE NSCLC odebraných pomocí resekce, CNB nebo FNA. Před analýzou soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR byla z každého vzorku extrahována DNA. Výsledky z tohoto testu byly porovnány s hodnotami získanými obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou.

Celkem 360 vzorků vykázalo platné výsledky pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR i obousměrnou sekvenační metodu, z čehož 340 vzorků mělo shodné výsledky.

Shoda mezi soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR a obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou je uvedena v tabulce 12. Dva vzorky vykázaly obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou dvojistou mutaci. Protože jedna z mutací byla stejná jako mutace ve výsledku obdrženém soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR, byly tyto vzorky klasifikovány jako souhlasné při analýze celkového souhlasu, pozitivního souhlasu a negativního souhlasu (tabulka 13).

Tabulka 12. Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR vs. Sangerova obousměrná sekvenační metoda

Stanovení dle soupravy <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR										
Zjištění mutace obousměrnou sekvenační metodou		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Celkem
	Negativní	261	1	–	4	6	2	5	1	280
	Pozitivní 12ALA	–	4	–	–	–	–	–	–	4
	Positive 12ALA_12CYS	–	1	–	–	–	–	–	–	1
	Pozitivní 12ARG	–	–	3	–	–	–	–	–	3
	Pozitivní 12ASP	–	–	–	14	–	–	–	–	14
	Pozitivní 12CYS	–	–	–	–	35	–	–	–	35
	Pozitivní 12SER	–	–	–	–	–	–	1	–	1
	Pozitivní 12VAL	2	–	–	–	–	–	17	–	17
	Pozitivní 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	4	5
Celkem		262	6	3	18	41	2	23	5	360

Tabulka 13. Analýza shody

Měření shody	Frekvence (%)	95% interval spolehlivosti (CI)
Celkové procento shody	340/360 (94,44)	92,03–96,29
Procento pozitivní shody	79/80 (98,75)	94,21–99,94
Procento negativní shody	261/280 (93,21)	90,20–95,51

Limit detekce (LOD)

Pracovní rozsah soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR je založen na množství amplifikovatelné DNA ve vzorků, jak je stanoveno hodnotou C_T kontrolní reakce. Uvedený vstupní rozsah pro testování je definován předem stanoveným rozsahem hodnot C_T kontroly 21,92 až 32,00. LOD je minimální procento mutované DNA, které lze detekovat na pozadí divokého typu pokud je celková hladina amplifikovatelné DNA v rámci uvedeného vstupního rozsahu avšak nižší než hranice mezní hodnoty ΔC_T .

CRC

Byla zpracována studie na stanovení LOD všech 7 reakcí specifických pro jednotlivé mutace, jež jsou součástí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR. Pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR, byl detekční limit mutované DNA na pozadí DNA divokého typu definován jako nejnižší faktor ředění při kterém bylo 95 % testovaných replikátů pro každý vzorek pozitivní na mutaci určeno jako pozitivní.

Modely logistické regrese byly použity individuálně na každý test pro datové sady s nízkou a vysokou vstupní hladinou DNA. U těchto modelů byla proměnnou reakce binární výstup detekované mutace (detekce = 1) a nedetekované mutace (detekce = 0), průběžnou vysvětlující proměnnou byl \log_2 % ředění mutace. LOD byly vypočítány jako procento ředění mutace, které poskytlo predikovanou pravděpodobnost detekce 0,95 (tabulka 14).

Tabulka 14. Hodnoty LOD pro jednotlivé analýzy mutací s použitím buněčných linií FFPE

Analýza	LOD C₉₅ (procento mutované DNA v DNA „divokého“ typu)
12ALA	0,8
12ARG	2,6
12ASP	6,4
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

NSCLC

LOD soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR byl stanoven a ověřen pomocí tkáně CRC. Tyto výsledky LOD byly znovu ověřeny pro tkáně NSCLC.

Studie měla 2 části. V části 1 bylo naředěno 60 replikátů 7 mutačních buněčných linií NSCLC FFPE představujících jednotlivé mutace zředěné na LOD příslušného testu a testováno. Všechny 60 platných replikátů buněčných linií FFPE každého vyhodnoceného vzorku vykázalo 100% detekci příslušné mutace v rámci hodnocené LOD.

V části 2 bylo 96 replikátů klinických vzorků NSCLC FFPE, představujících jednotlivé mutace získané třemi metodami získávání (resekce, CNB a FNA), po naředění na LOD příslušného testu testováno.

Devadesát šest platných replikátů pro mutace 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL a 13ASP bylo identifikováno se 100% správností. Analýzy mutací 12CYS a 12SER ukázaly 95,8% detekci při LOD.

To ukazuje, že dříve stanovená hodnota LOD je ověřena pro všechny testy mutace při posuzování vzorků tkáně NSCLC a klinických vzorků NSCLC FFPE/FFPE/buněčných linií/párových vzorků pacienta.

Vstupní úrovně DNA a linearita

Vliv vstupní úrovně DNA na hodnoty ΔC_T

Pokud vzorky při různých celkových vstupních úrovních DNA obsahují stejný podíl mutační DNA, očekává se, že zjištěné hodnoty ΔC_T zůstanou konzistentní. DNA extrahovaná z 8 FFPE buněčných linií byla použita k přípravě směsí DNA s nejnižší dosažitelnou hodnotou C_T kontrolní reakce.

Rozsah ředění pro každou mutační reakci a střední hodnota ΔC_T získaná z výsledků jsou uvedeny v tabulce 15 a 16. Celkově jsou hodnoty ΔC_T konzistentní u všech testů v celém pracovním rozsahu soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR; to dokazuje, že hladina vstupní DNA nebude mít dopad na přesnost stanovení mutace vzorku.

Tabulka 15. Vliv hladiny vstupní DNA na hodnoty ΔC_T v rozsahu vstupních hodnot C_T kontrolní reakce – buněčné linie CRC FFPE

Analýza	ΔC_T				
	Ředění 1 ~20–21 C_T	Ředění 2 ~23–24 C_T	Ředění 3 ~26–27 C_T	Ředění 4 ~29–30 C_T	Ředění 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

* Celkový počet replikátů pro 12ASP byl 27.

Tabulka 16. Vliv hladiny vstupní DNA na hodnoty ΔC_T v rozsahu vstupních hodnot C_T kontrolní reakce – vzorky FFPE NSCLC

Analýza	ΔC_T				
	Ředění 1 ~20–21 C_T	Ředění 2 ~23–24 C_T	Ředění 3 ~26–27 C_T	Ředění 4 ~29–30 C_T	Ředění 5 ~32–33 C_T
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
<input type="checkbox"/> 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	–*

* Žádné C_T mutační reakce kvůli nízké koncentraci DNA – nebyla vypočítána žádná hodnota ΔC_T .

Linearita/účinnost amplifikace jako funkce vstupní DNA

Linearita a účinnost amplifikace PCR pro každou mutační reakci v porovnání s kontrolní reakcí v celém pracovním rozsahu soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR byla prokázána. Účinnost amplifikace byla vypočítána pro každou mutační reakci a kontrolní reakci jako $[2(-1/\text{sklon křivky})] - 1$.

Účinnost amplifikace kontroly v porovnání s mutační reakcí ukazuje, že hodnota ΔC_T a tedy zjištění mutace, je konzistentní v celém pracovním rozsahu testu. Souhrn údajů je uveden v tabulce 17 a 18.

Linearita/účinnost amplifikace jako funkce procenta mutace

Cílem této studie bylo vyhodnotit vliv sériově ředěného vzorku pozitivního na mutaci na účinnost amplifikace v rámci pracovního rozsahu soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR, počínaje od hodnot C_T vstupních hladin přibližně 22–23 C_T .

Extrakty DNA z buněčných linií CRC FFPE a vzorků NSCLC byly nejprve vyhodnoceny pomocí hodnot OD před provedením PCR pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR. Poté byly připraveny zásobní DNA tak, aby hodnota C_T kontrolní reakce odpovídala přibližně 23 C_T . Zásobní DNA byly sériově zředěny, vždy pomocí DNA divokého typu, aby byla zachována konstantní celková DNA divokého typu a zároveň se měnil procentní podíl mutační DNA v templátu.

Byly připraveny směsi DNA dostatečné pro 6 replikátů na mutaci. Byly vypočítány hodnoty C_T a ΔC_T pro každou mutaci a každé ředění. Model lineární regrese byl použit na hodnotu C_T mutační reakce oproti vstupnímu ředění DNA \log_2 . Studie ukázala, že ředění mutací na pozadí konstantní koncentrace DNA divokého typu vykazala účinnosti amplifikace, které se významně nelišily od hodnot stanovených ve výše uvedené studii.

Tabulka 17. Účinnost amplifikace u kontrolních a mutačních reakcí: Buněčné linie CRC

Vzorek		Úsek	Standardní chyba úseku	Vypočítaný sklon křivky	Standardní chyba (sklon křivky)	Dolní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Horní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Účinnost amplifikace	Rozdíl v účinnosti amplifikace
12ALA	Kontrolní 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	Kontrolní 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	Kontrolní C _T	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	12ASP C _T	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	Kontrolní 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	Kontrolní 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	Kontrolní 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	Kontrolní C _T	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	13ASPC _T	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Tabulka 18. Účinnost amplifikace u kontrolních a mutačních reakcí: Vzorky NSCLC

	Vzorek	Kontrolní C _T	Úsek	Standardní chyba úseku	Vypočítaný sklon křivky	Standardní chyba (sklon křivky)	Dolní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Horní oboustranná 95% mez spolehlivosti (sklon křivky)	Účinnost amplifikace	Rozdíl v účinnostech amplifikace
12ALA	Kontrolní C _T	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	0,94		0,069
	12ALA C _T	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	1,01		
12ARG	Kontrolní C _T	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94		0,093
	12ARG C _T	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04		
12ASP	Kontrolní C _T	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96		-0,001
	12ASP C _T	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96		
12CYS	Kontrolní C _T	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98		0,019
	12CYS C _T	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00		
12SER	Kontrolní C _T	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97		0,127
	12SER C _T	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09		
12VAL	Kontrolní C _T	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92		0,011
	12VAL C _T	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91		
13ASP	Kontrolní C _T	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94		0,066
	13ASPC _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01		

Interferující látky

Cílem této studie bylo vyhodnotit vliv potenciálně interferujících látek na výsledky při použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR. To bylo provedeno analýzou vlivu jednotlivých látek přidávaných do experimentů v různých koncentracích, na hodnoty ΔC_T a stav mutace zkušebních vzorků. Potenciálně interferující látky z testované extrakce DNA byly: Pufr AL, pufr ATL, etanol, parafinový vosk, proteináza K, promývací pufr AW1, promývací pufr AW2 a xylen. Jako slepá kontrola byl testován i konečný eluční pufr ze soupravy, pufr ATE.

Žádné z potenciálně interferujících látek, které byly vyhodnoceny v koncentracích očekávaných při běžném použití, nemají vliv na schopnost soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR rozlišit mezi vzorky s pozitivní a negativní reakcí na mutace.

Kromě studie interferujících látek byl posouzen potenciální vliv nekrózy u klinických vzorků za účelem stanovení, zda vysoké úrovně nekrotické tkáně ve vzorcích nádorů mají vliv na schopnost testu dosáhnout platných výsledků. Z celkem 421 vyhodnocených vzorků jako součást studií Porovnání s analytickou referenční metodou, obsahovalo 29 vzorků dle hodnocení patologa nekrózu v úrovni >50 %. Z těchto 29 vzorků 28 vykázalo platné výsledky, které se shodovaly s obousměrnou Sangerovou sekvenční metodou. Jeden výsledek byl neplatný v důsledku nedostatečného množství DNA.

Křížová kontaminace

Cílem této studie bylo vyhodnotit rozsah vzájemné kontaminace, která by mohla potenciálně vést k nesprávným pozitivním výsledkům, mezi vzorky DNA při použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR. Mezi potenciální zdroje křížové kontaminace patří:

- Extrakce vzorku (například seškrábnutí sklíček)
- pipetování vzorků
- uzavření zkumavek se vzorky (víčkem)
- kontaminace činidel soupravy v průběhu používání
- vkládání zkumavek analýzy do přístroje Rotor-Gene Q MDx.

U této studie byly použity standardy FFPE: standard genu divokého typu a standard 12ALA (protože reakce 12ALA je reakcí s nejnižší hodnotou LOD v soupravě).

Tato studie sestávala z 10 cyklů PCR, určených k prozkoumání možné kontaminace v rámci cyklů na přístroji Rotor-Gene Q MDx i mezi nimi. V těchto testovacích cyklech byly zkumavky obsahující DNA divokého typu použity k testování kontaminace z mutované DNA.

Výsledky uvedené studie neprokázaly žádnou zjištěnou kontaminaci v žádném z extraktů DNA divokého typu, které byly určeny k detekci vzájemné kontaminace.

Výlučnost/zkřížená reaktivita

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR se skládá z 8 samostatných reakcí. Jedná se o 1 reakci s kontrolou, která detekuje nepolymorfní oblast genu KRAS a 7 reakcí specifických pro mutaci. Není k dispozici žádná reakce, která by specificky zjišťovala sekvenci KRAS divokého typu na kodonu 12 nebo 13. Výsledek KRAS „No Mutation Detected“ (Mutace nebyla detekována), (tj. divokého typu) je určen na základě nepřítomnosti jakékoliv ze 7 mutací dávající výsledek pozitivní na mutaci.

Proto je nezbytné demonstrovat množství nespecifické amplifikace, nebo zkřížené reaktivity, ke kterým dochází v každé reakci s nadměrným množstvím DNA KRAS divokého typu, aby se zajistilo, že nedojde k žádným falešně pozitivním výsledkům. Podobně je nespecifická amplifikace vyhodnocována u mutací KRAS, které analýza nemá detekovat. To ukazuje, že množství zkřížené reaktivity mezi mutačními reakcemi nemá za následek chybně pozitivní výsledky mutací v přítomnosti nadměrných množství mutační DNA. Protože vstupní hladina DNA pro tuto analýzu je založena na rozsahu hodnoty C_T kontroly (21,92–32,00), nejvyšší vstupní koncentrace DNA je založena na hodnotě C_T kontroly přibližně 22.

Nespecifická amplifikace/zkřížená reaktivita: DNA KRAS divokého typu

V reakci na množství nespecifické amplifikace DNA divokého typu reakčními směsmi navrženými k amplifikaci specifických mutací byla nespecifická amplifikace DNA vyhodnocena u 60 replikátů DNA divokého typu buněčné linie FFPE a 60 vzorků NSCLC při nejvyšší vstupní koncentraci amplifikovatelné DNA pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR.

Hodnoty C_T kontrol byly v rozsahu 22–23. Výsledky ukázaly, že hodnoty ΔC_T překročily dosažené mezní hodnoty analýzy a nejméně 95 % replikátů divokého typu bylo správně identifikováno.

Nespecifická amplifikace/zkřížená reaktivita/exkluzivita: DNA KRAS pozitivní na mutaci

Mutační vzorky s vysokou koncentrací vstupní DNA byly testovány oproti všem reakčním směsím. Vzorky DNA byly připraveny z každé z buněčných linií CRC a NSCLC FFPE tak, aby hodnota C_T kontrolní reakce byla přibližně 23. Z těchto ředění bylo vyhodnoceno 6 replikátů každého vzorku mutace. Procento mutace ve vzorku se řídilo procentem mutace v DNA buněčné linie.

Průměrné hodnoty ΔC_T jsou uvedeny v tabulkách 19 a 20 a prokazují, že mezi mutačními reakcemi dochází ke zkřížené reaktivitě. Ve všech případech výsledky prokázaly, že byla zjištěna správná mutace v odpovídající mutační reakci (tj. nejmenší hodnota ΔC_T byla správným pozitivním výsledkem

mutace). Všechny ostatní případy buď nebyly detekovány nebo byly mimo prahovou hodnotu ΔC_T .

Tabulka 19. Zkřížená reaktivita ΔC_T mezi mutačními reakcemi s použitím DNA buněčné linie CRC FFPE při vysokém vstupním rozmezí

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

ND: Žádná zkřížená reakce.

* Hodnoty ΔC_T odpovídajících reakcí.

[†] ΔC_T ze zkříženě reaktivních reakcí, které jsou nižší než mezní hodnota.

Tabulka 20. Zkřížená reaktivita ΔC_T mezi mutačními reakcemi s použitím DNA buněčné linie NSCLC FFPE při vysokém vstupním rozmezí

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

ND: Žádná zkřížená reakce.

* Hodnoty ΔC_T odpovídajících reakcí.

[†] ΔC_T ze zkříženě reaktivních reakcí, které jsou nižší než mezní hodnota.

Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Cílem této studie bylo prokázat přesnost soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR v rámci laboratoře (opakovatelnost) a mezi laboratořemi (reprodukovatelnost). Jsou uváděny jak správnost výsledků stanovení mutace, tak přesnost hodnot ΔC_T (rozdíl v hodnotách C_T mezi mutační reakcí a kontrolní reakcí).

CRC

Pro toto vyhodnocení byly použity klinické vzorky CRC. Jeden vzorek divokého typu a po jednom vzorku každé mutace byly testovány soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR; testy vzorků a kontrolní testy provedli 2 pracovníci na každém ze 3 pracovišť a ve 3 dávkách soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR, každý den po dobu 5 dnů, se 2 cykly za den a dvěma replikáty pro každý vzorek každého cyklu. Hodnoty C_T a ΔC_T získané pro každou reakci u každého vzorku byly rovněž analyzovány analýzou variance složek.

Reprodukovatelnost testů soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR byla demonstrována pro vzorky mutace nízké úrovně ($3 \times \text{LOD}$) a vzorky „divokého typu“ s nejméně 39/40 správnými identifikacemi mutace pro všechny analýzy napříč dávkami, platformami, pracovníky, v rámci jednotlivých laboratoří i mezi laboratořemi. Odhadovaný podíl $3 \times \text{LOD}$ vzorků mutací a divokého typu byl hlášen celkově a v rámci každého pracoviště. U všech analýz a kombinací vzorků alespoň 79 z 80 replikátů vykázalo správnou detekci mutace (tabulka 21).

Tabulka 21. Celkový počet správných detekcí

Vzorek	Správné detekce mutací						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mutace 3 × LOD	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Divoký typ (nízká úroveň)	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

NSCLC

Pro každou ze 7 mutací NSCLC KRAS byly použity 3 vzorky reprezentující každou ze 3 metod získávání vzorků (resekce, CNB a FNA). Pro vytvoření naředěných směsí DNA divokého typu bylo použito dalších 6 klinických vzorků DNA divokého typu (vždy 2 vzorky reprezentující každou ze 3 metod získávání vzorků).

Smíšením více extrakcí každého mutačního vzorku byla vytvořena vždy jedna směs vzorků každé mutace. Každá směs mutačních vzorků byla zředěna tak, aby vznikly testovací vzorky s hladinami mutací $1 \times \text{LOD}$ a $3 \times \text{LOD}$.

Laboratoře účastníci se této studie byly na 3 různých místech. Laboratorní podmínky byly na každém pracovišti různé: 2 zařízení Rotor-Gene Q MDx, 2 obsluhy, 2 šarže soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR a 2 cykly za den (na každou obsluhu) po dobu 16 dnů, které neproběhly v řadě za sebou.

U všech analýz a kombinací vzorků alespoň 284 z 288 replikátů vykázalo správnou detekci mutace. Celkový podíl správných stanovení mutace, pro všechny testy dohromady, byl u skupiny 1 × LOD 100 %. Celkový podíl správných stanovení mutace, pro všechny testy dohromady, byl u skupiny 3 × LOD 99,6 %. Celkový podíl správných stanovení u vzorků, kde mutace nebyla detekována (divokého typu) byl 100 % (tabulka 22).

Tabulka 22. Správná stanovení mutace pro 1 × LOD, 3 × LOD a DNA divokého typu

Úroveň mutace	Analýza	Správné detekce	Správné detekce, %	Dolní oboustranný 90% CI
1 × LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
3 × LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
Divokého typu		285/285	100	98,95

Variabilita manipulace se vzorky

Cílem této studie bylo vyhodnotit vliv variability manipulace se vzorky, zvláště extrakce DNA, na výsledky při použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR. Tato studie doplňuje studii opakovatelnosti a reprodukovatelnosti analýzou variability manipulace se vzorky. Stejně klinické řezy FFPE a buněčné linie FFPE byly zpracovány na 3 místech a poté testovány soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR.

CRC

Z každého z 10 vzorků CRC FFPE bylo nařezáno 30 po sobě jdoucích vzorků (3 divokého typu a 1 pro každou mutaci). Řezy byly randomizovány k 1 ze 3 testovacích pracovišť tak, aby každé pracoviště získalo 10 řezů z každého vzorku FFPE (celkem 100 řezů). Ze 300 testovaných extrakcí DNA bylo 298 vzorků platných. Mezi těmito 3 pracovišti bylo dosaženo shody 99,33 % s ohledem na detekci mutace KRAS.

Porovnání průměrné hodnoty ΔC_T pro vzorky mutací a DNA divokého typu podle jednotlivých pracovišť ukázalo velmi blízkou shodu výsledků. Výsledky prokázaly shodu v postupu extrakce DNA a zpracování vzorků ve spojení se soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR.

NSCLC

V této studii bylo použito 13 klinických vzorků NSCLC (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL a 3 divokého typu) a 4 vzorky buněčných linií FFPE (12ALA, 12ARG, 12SER a 13ASP). Vzorky představovaly různé metody odběru: chirurgickou resekci, FNA a CNB. Kde klinická tkáň NSCLC nebyla k dispozici, buněčné linie představovaly vzácné mutace.

Tyto 3 dávky 20 řezů FFPE byly poté náhodně distribuovány na 3 pracoviště. Na každém ze 3 pracovišť byla provedena extrakce DNA z 20 řezů FFPE v dávce (10 párů) podle mutace a divokého typu.

Při testování všech přípravků vzorků na 3 jednotlivých pracovištích pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR bylo všech 7 mutačních vzorků a vzorků divokého typu správně stanoveny. Celkový výsledek stanovení mutace pro každý ze 7 mutačních vzorků a vzorků divokého typu byl 100 %, což dokazuje shodu při extrakci DNA a detekci mutace pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR mezi pracovišti.

Rovnocennost metod získávání vzorků (pouze NSCLC)

Účelem této studie bylo posoudit, zda stanovení mutace u vzorků NSCLC pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR bylo ovlivněno způsobem získání vzorku. 3 metody získání vzorku posuzované v rámci této studie byly řez, FNA a CNB.

V této studii „párové vzorky CNB a FNA pacienta“ byly získány z chirurgických řezů vzorků nádoru, aby bylo možné stejný nádor odebrat 3 metodami získávání vzorků. Pro tuto studii bylo k dispozici celkem 169 vzorků odebraných resekci, 169 pomocí CNB a 169 pomocí FNA.

Každý vzorek byl extrahován a testován pomocí kontrolního testu KRAS. Každý vzorek s platným výsledkem (169 řezů, 169 vzorků CNB a 164 vzorků FNA) byl testován pomocí všech 8 testů KRAS.

Kromě toho ze všech klinických vzorků NSCLC FFPE, byla DNA extrahovaná pro test pomocí soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR vyhodnocena i pomocí obousměrné Sangerovy sekvenační metody, aby mohla být stanovena úroveň shody mezi soupravou *therascreen* KRAS RGQ PCR a obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou. Ve všech typech vzorků souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR přesně vyhodnocuje stav mutace a ve srovnání s obousměrnou Sangerovou sekvenační metodou dosahuje celkové procento shody 96,96 %.

Výsledky z této studie ukazují, že souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR poskytuje rovnocenné výsledky při všech 3 zkoumaných způsobech získávání, jak ukazují párové celkové míry shody:

- CNB vs. FNA 97,52 (meze spolehlivosti 94,41–99,15)
- CNB vs. řez 96,39 (meze spolehlivosti 92,99–98,41)
- FNA vs. řez 98,76 (meze spolehlivosti 96,14–99,78)

Literatura

Citované reference

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**, 511.
2. Bachiredy, 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).

Užitečná literatura

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 IIb 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).

Symbols

Na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:



<N>

Obsahuje dostatek činidel pro <N> reakcí.



Datum použitelnosti



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Obsahuje



Číslo



Autorizovaný zástupce

Rn

R označuje revizi příručky a n je číslo revize



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití



Pozor

Kontaktní údaje

Technickou pomoc a další informace si vyhledejte v našem centru technické podpory na stránkách **www.qiagen.com/Support**, nebo se obraťte telefonicky na telefonní číslo 00800-22-44-6000, nebo kontaktujte některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN Technical Service Departments nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte stránky **www.qiagen.com**).

Příloha 1: Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR – Manuální protokol

Tato část obsahuje pokyny k použití soupravy *therascreen* KRAS RGQ PCR se softwarem RGQ verze 2.3 v otevřeném režimu (tj. bez použití KRAS Assay Package).

Všeobecné informace

- Požadované materiály viz „Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy,“ strana 11.
- Úplné pokyny k přípravě vzorků a rozvržení vzorků jsou v částech „Protokol: Vyhodnocení vzorku DNA“, strana 16 a „Protokol: Detekce mutací KRAS“, strana 28.

Protokol: Vytvoření nového teplotního profilu

Předtím, než začnete, vytvořte tepelný profil pro analýzu KRAS. Parametry cyklování jsou stejné pro vyhodnocení vzorku a vyhodnocení mutace.

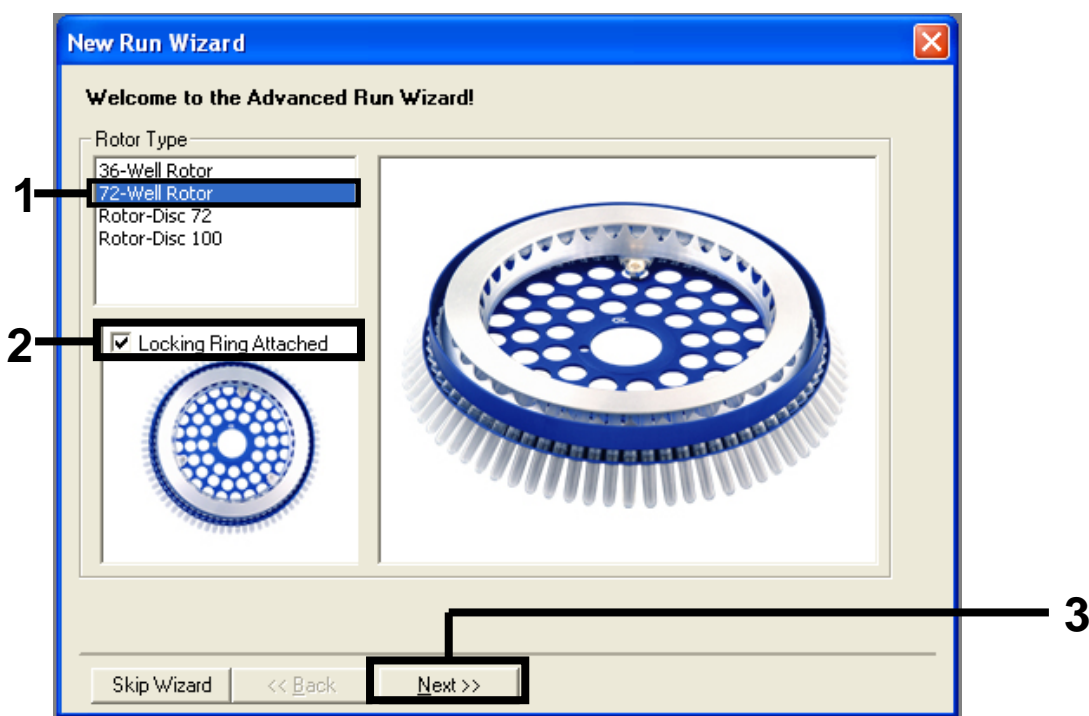
Postup

Parametry cyklování jsou uvedeny v tabulce 23.

Tabulka 23. Parametry cyklování

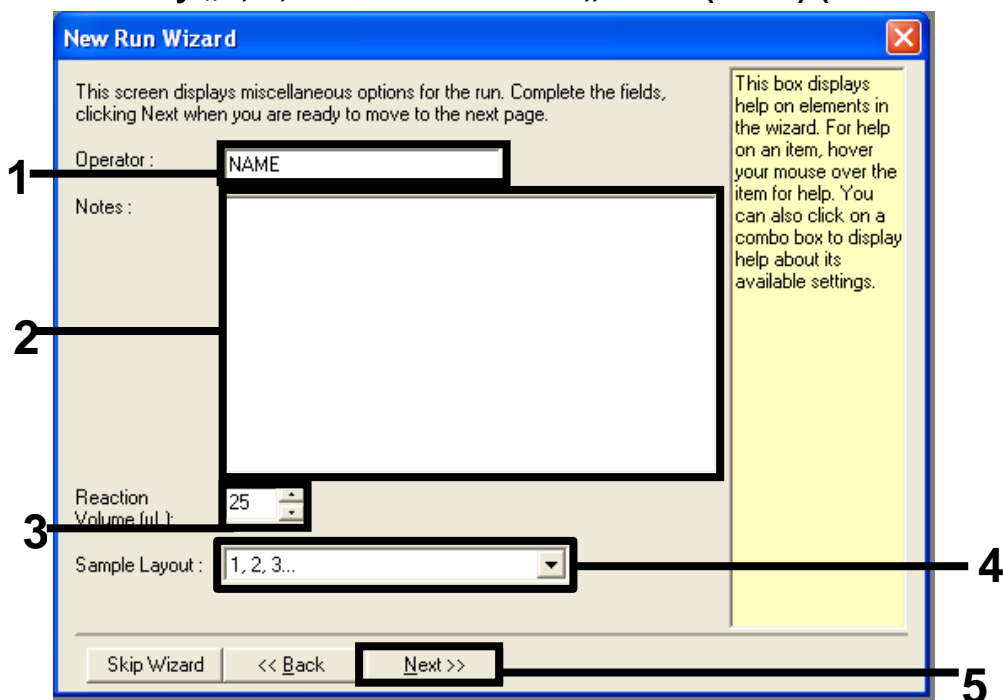
Cyklování	Teplota	Čas	Pořizování dat
1	95 °C	15 minut	Žádné
40	95 °C	30 sekund	Žádné
	60 °C	60 sekund	Zelená a žlutá

1. Dvakrát klikněte na ikonu softwaru Rotor-Gene Q Series Software 2.3 na pracovní ploše laptopu připojeného k přístroji Rotor-Gene Q MDx. V dialogu „New Run“ (Nový cyklus), který se zobrazí, vyberte kartu „Advanced“ (Pokročilé).
2. Chcete-li vytvořit novou šablonu, vyberte „Empty Run“ (Prázdný cyklus) a poté klikněte na „New“ (Nový), tím vyvoláte průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem).
3. Jako typ rotoru vyberte „72-Well Rotor“ (Rotor se 72 jamkami). Zkontrolujte, zda je správně nasazen pojistný kroužek, a zaškrtněte políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen). Klikněte na „Next“ (Další) (obrázek 21).



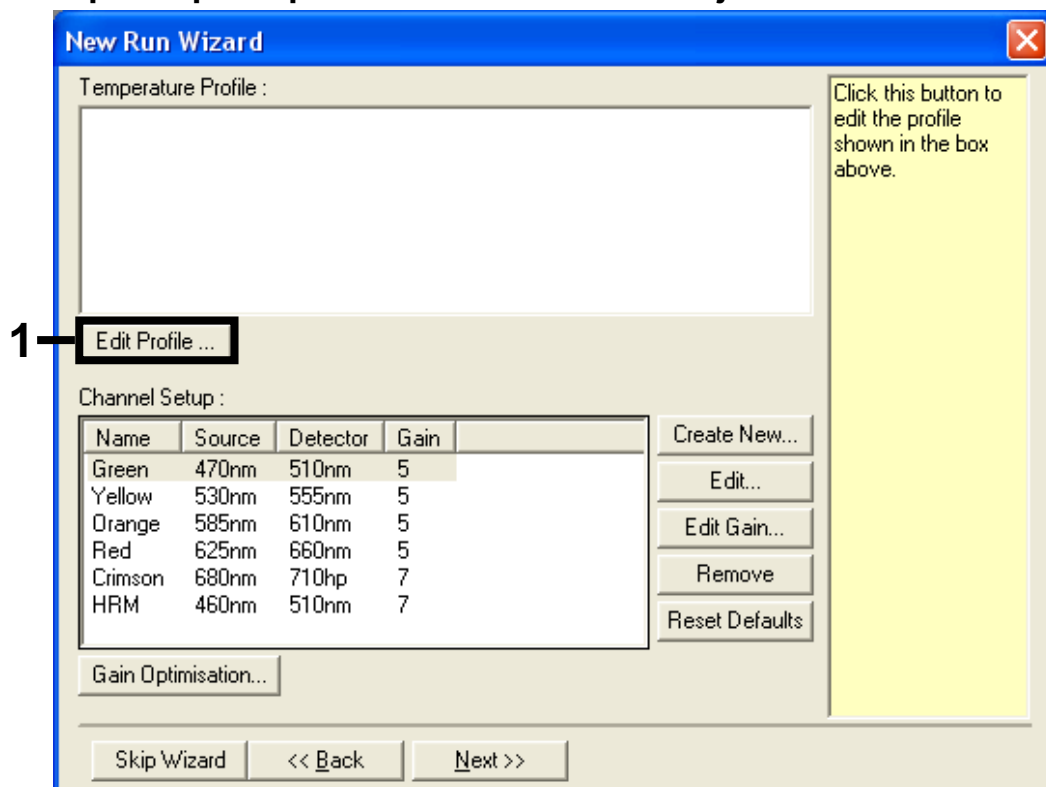
Obrázek 21. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem).
 1 = „Rotor type“ (Typ rotoru); 2 = pole „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen);
 3 = „Next“ (Další).

4. Zadejte jméno obsluhy. Zadejte poznámky a reakční objem jako 25. Zkontrolujte, zda pole „Sample Layout“ (Rozvržení vzorků) obsahuje hodnoty „1, 2, 3...“. Klikněte na „Next“ (Další) (obrázek 22).



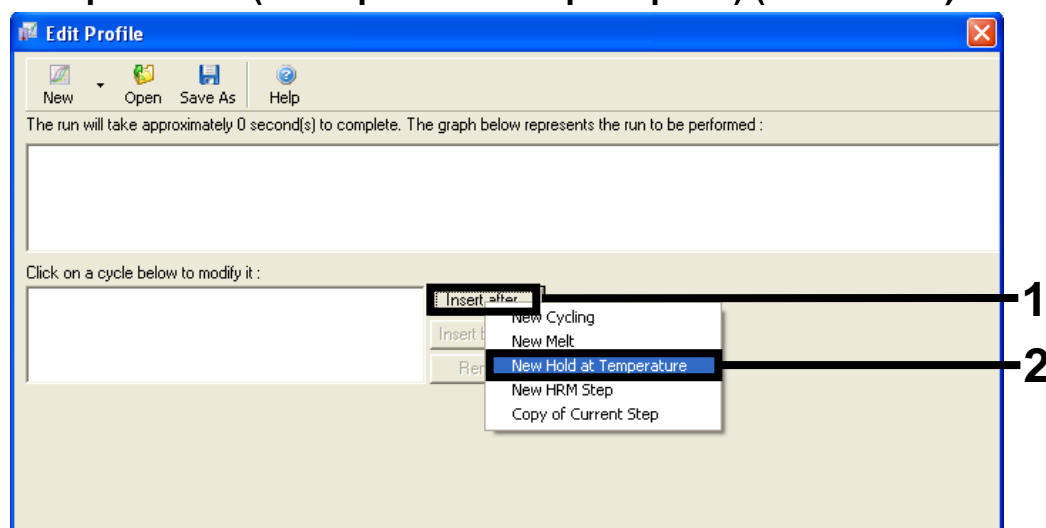
Obrázek 22. Zadání jména obsluhy a objemů reakční směsi. 1 = dialogové pole „Operator“ (Obsluha); 2 = dialogové pole „Notes“ (Poznámky); 3 = pole „Reaction Volume“ (Reakční objem); 4 = pole „Sample Layout“ (Rozvržení vzorků); 5 = tlačítko „Next“ (Další).

- Klikněte na „Edit Profile“ (Upravit profil) v dialogovém okně „New Run Wizard“ (Průvodce novým během) (obrázek 23) a naprogramujte teplotní profil podle informací v následujících krocích.



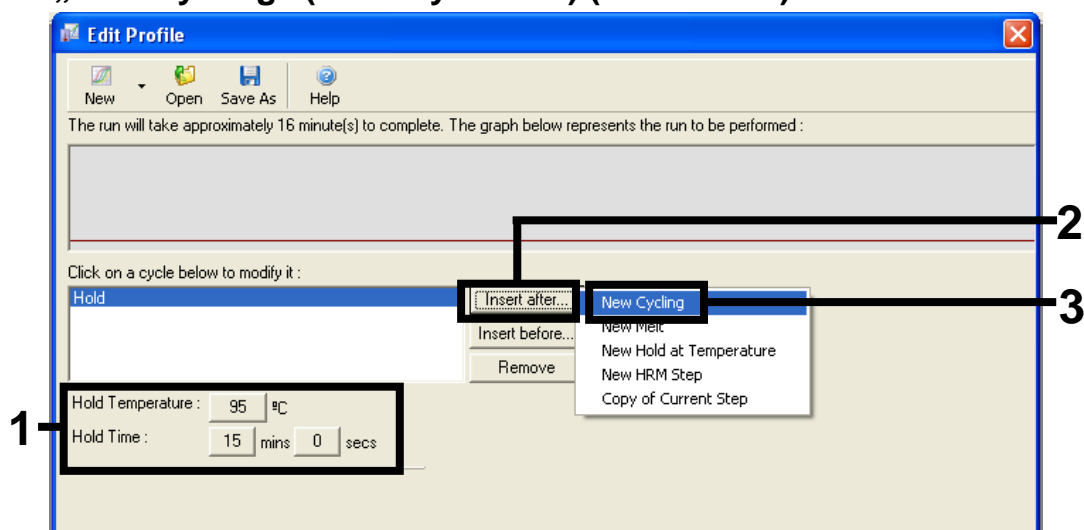
Obrázek 23. Úprava profilu.

- Klikněte na „Insert after“ (Vložit za) a vyberte „New Hold at Temperature“ (Nové pozastavení při teplotě) (obrázek 24).



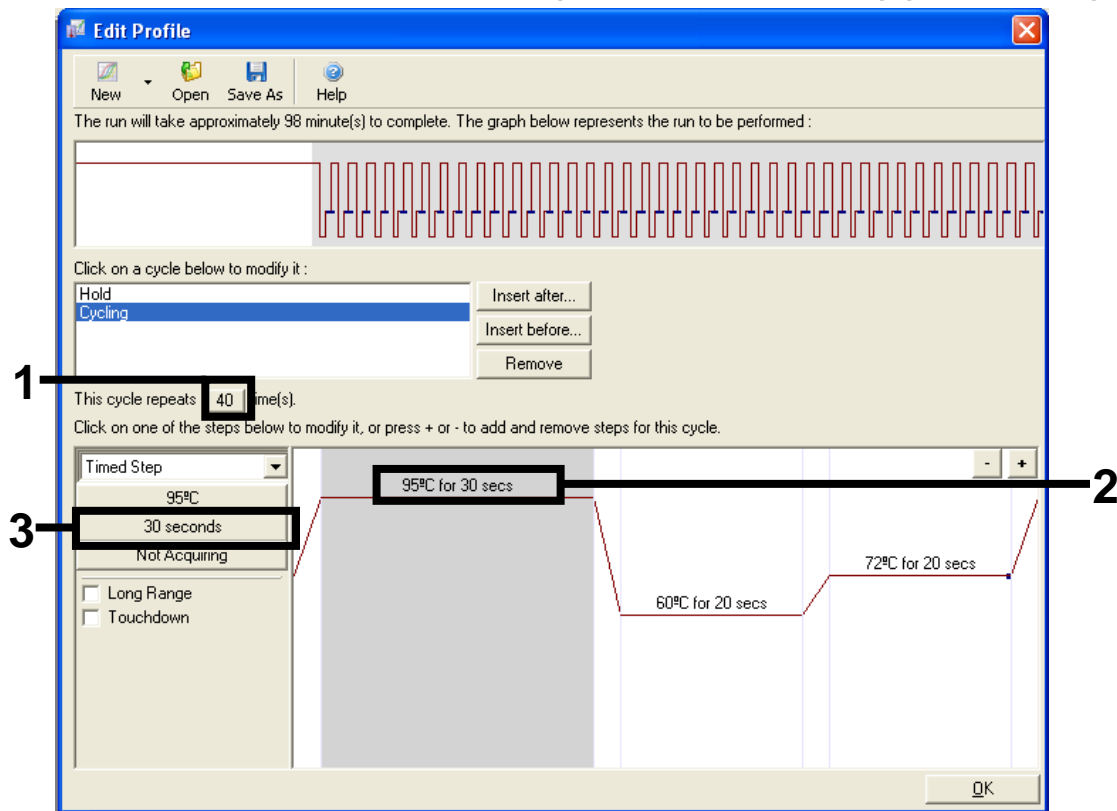
Obrázek 24. Vložení kroku počáteční inkubace. 1 = „Insert after“ (Vložit za); 2 = „New Hold at Temperature“ (Nové pozastavení při teplotě).

7. U položky „Hold Temperature“ (Teplota pozastavení) změňte nastavení na 95 °C a u položky „Hold Time“ (Doba pozastavení) na 15 minut 0 sekund. Klikněte na „Insert after“ (Vložit za) a poté vyberte „New Cycling“ (Nové cyklování) (obrázek 25).



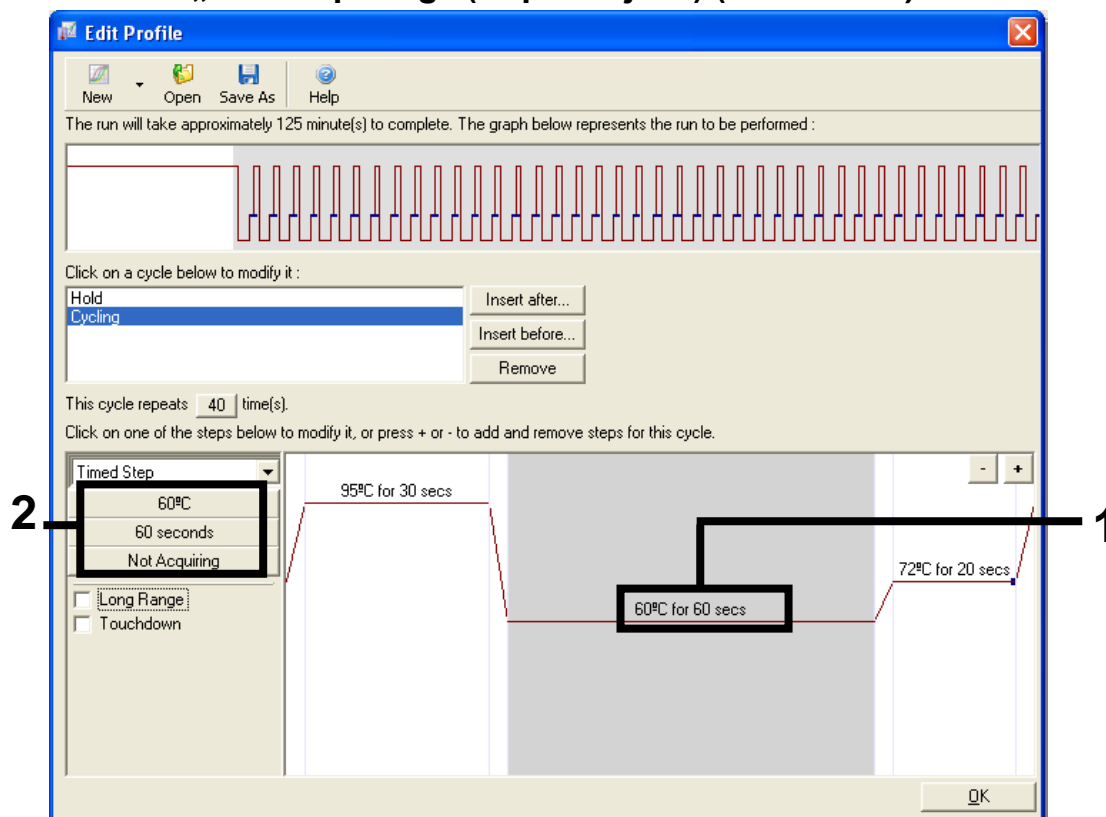
Obrázek 25. Krok počáteční inkubace při teplotě 95 °C. 1 = „Hold Temperature“ (Teplota pozastavení) a „Hold Time“ (Doba pozastavení); 2 = „Insert after“ (Vložit za); 3 = „New Cycling“ (Nové cyklování).

8. Změňte počet opakování cyklování na 40. Vyberte první krok a nastavte „95°C for 30 secs“ (95 °C na 30 sekund) (obrázek 26).



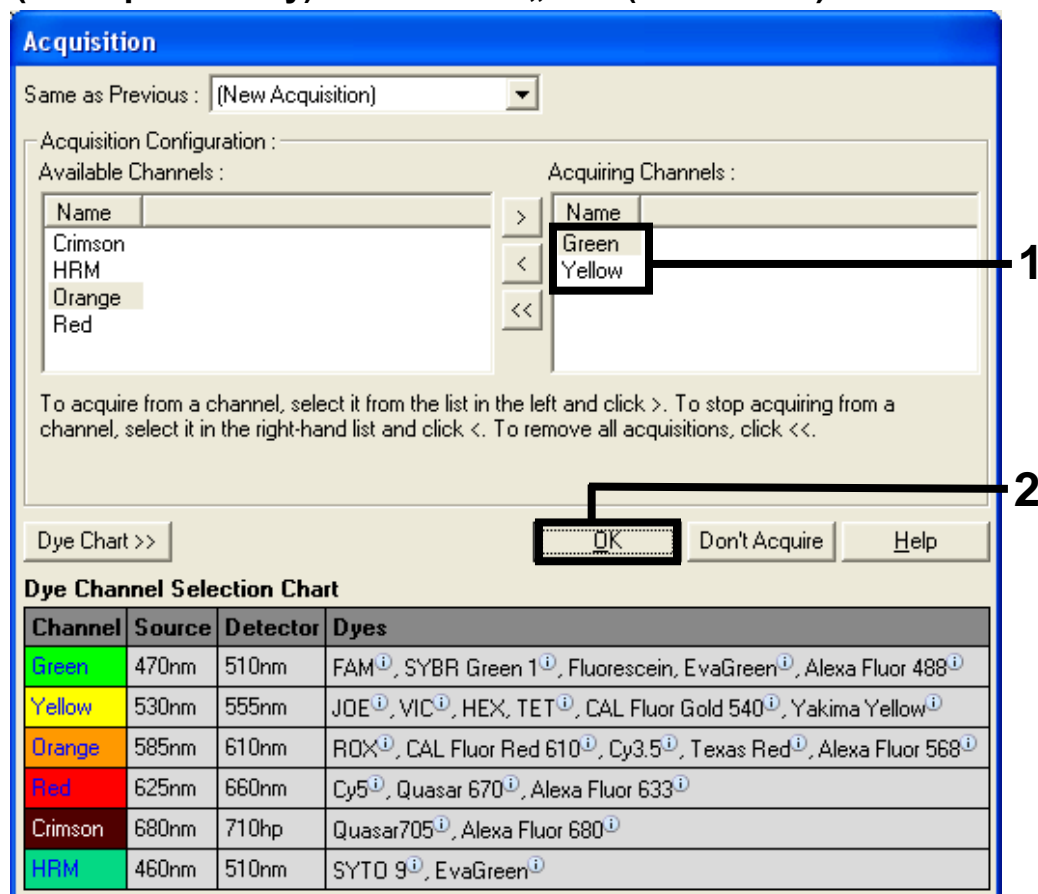
Obrázek 26. Krok cyklování při teplotě 95 °C. 1 = pole „Cycle repeats“ (Opakování cyklu); 2 = krok jedna: nastavení teploty; 3 = krok jedna: nastavení času.

9. Zvýrazněte druhý krok a nastavte na „60°C for 60 secs“ (60 °C na 60 sekund). Aktivujte pořizování dat v průběhu tohoto kroku stiskem „Not Acquiring“ (Nepořizují se) (obrázek 27).



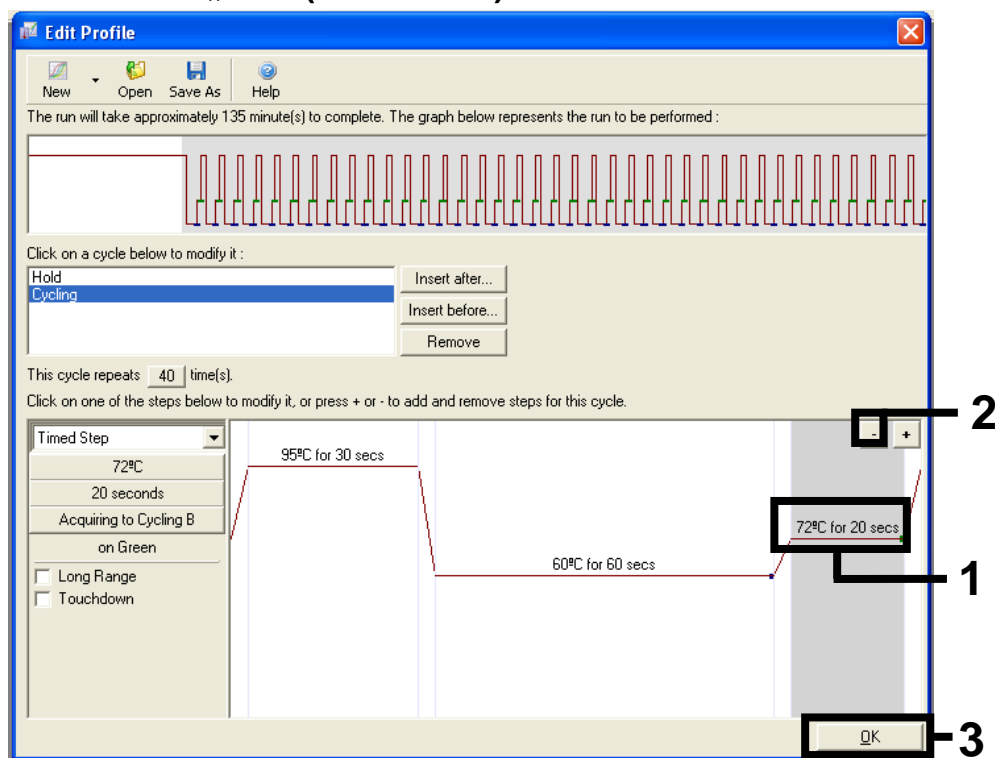
Obrázek 27. Krok cyklování při teplotě 60 °C. 1 = krok dvě: nastavení teploty a času; 2 = „Not Acquiring“ (Nepořizují se).

Nastavte „Green“ (Zelený) a „Yellow“ (Žlutý) jako pořizující kanály stisknutím „>“ a přeneste je ze seznamu „Available Channels“ (Dostupné kanály). Klikněte na „OK“ (obrázek 28).



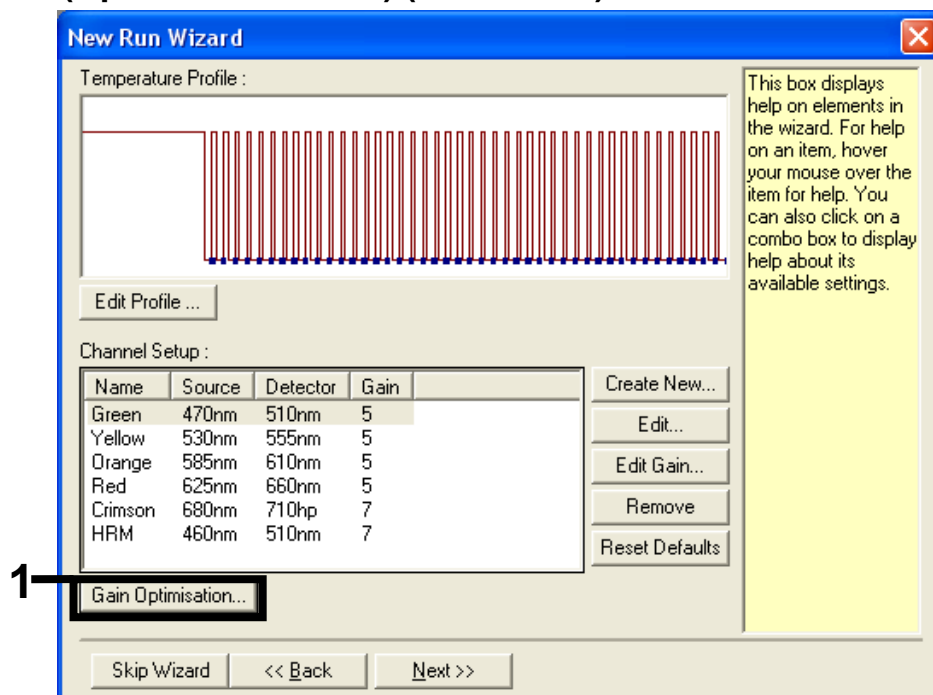
Obrázek 28. Pořizování při kroku cyklování 60 °C.

10. Zvýrazněte třetí krok a proveďte smazání kliknutím na „-“. Klikněte na „OK“ (obrázek 29).



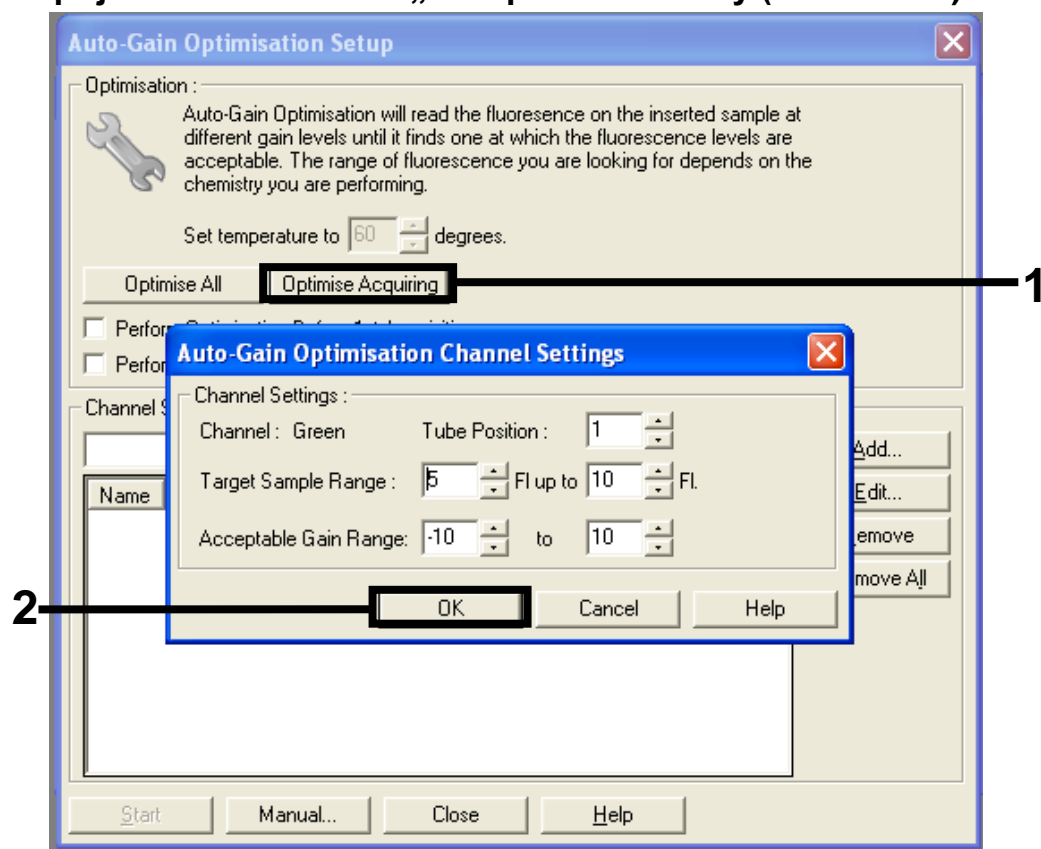
Obrázek 29. Odstranění rozšiřujícího kroku.

11. V dalším dialogovém okně klikněte na „Gain Optimisation“ (Optimalizace zisku) (obrázek 30).



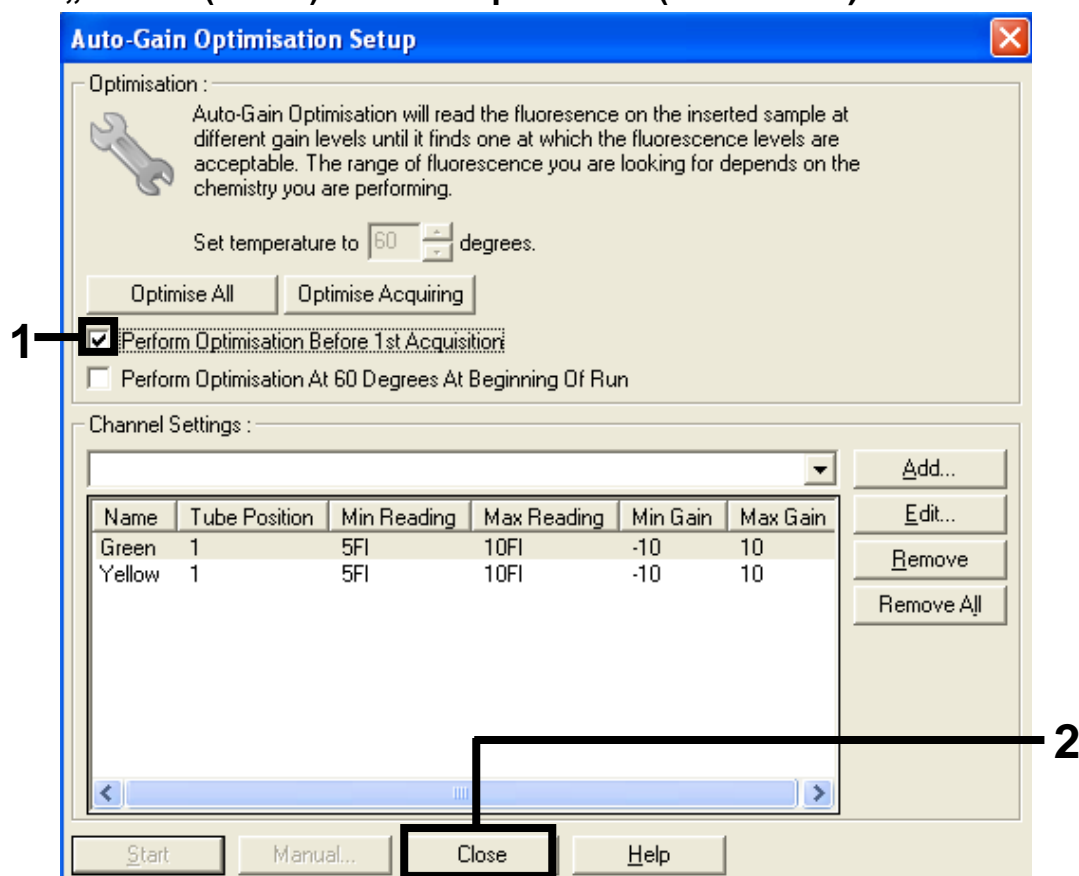
Obrázek 30. „Gain Optimisation“ (Optimalizace zisku).

12. Klikněte na „Optimise Acquiring“ (Optimalizovat pořizování). Pro každý kanál se zobrazí jeho nastavení. Tyto výchozí hodnoty přijmete kliknutím na „OK“ pro oba kanály (obrázek 31).



Obrázek 31. Optimalizace automatického zvyšování citlivosti pro zelený kanál.

13. Zaškrtněte políčko „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Provést optimalizaci před 1. pořízením) a poté se kliknutím na „Close“ (Zavřít) vraťte do průvodce (obrázek 32).



Obrázek 32. Výběr zeleného a žlutého kanálu.

14. Kliknutím na tlačítko „Next“ (Další) uložte templát do příslušného místa výběrem možnosti „Save Template“ (Uložit templát).

Protokol: Stanovení vzorků (manuální)

Tento protokol se používá pro stanovení celkové amplifikovatelné DNA ve vzorcích a musí být proveden před analýzou mutace KRAS.

- Připravte vzorky dle popisu v „Protokol: Vyhodnocení vzorku DNA“ na straně 16.
- Připravte cyklus PCR na zařízení Rotor-Gene Q MDx dle popisu v „Protokol: Nastavení soupravy *therascreen* KRAS PCR RGQ“ na straně 76.
- Po dokončení cyklu analyzujte data dle postupu v „Analýza dat hodnocení vzorku“ na straně 80.

Protokol: Detekce mutací KRAS (manuální)

Jakmile vzorek projde stanovením, lze jej testovat k detekci mutací KRAS.

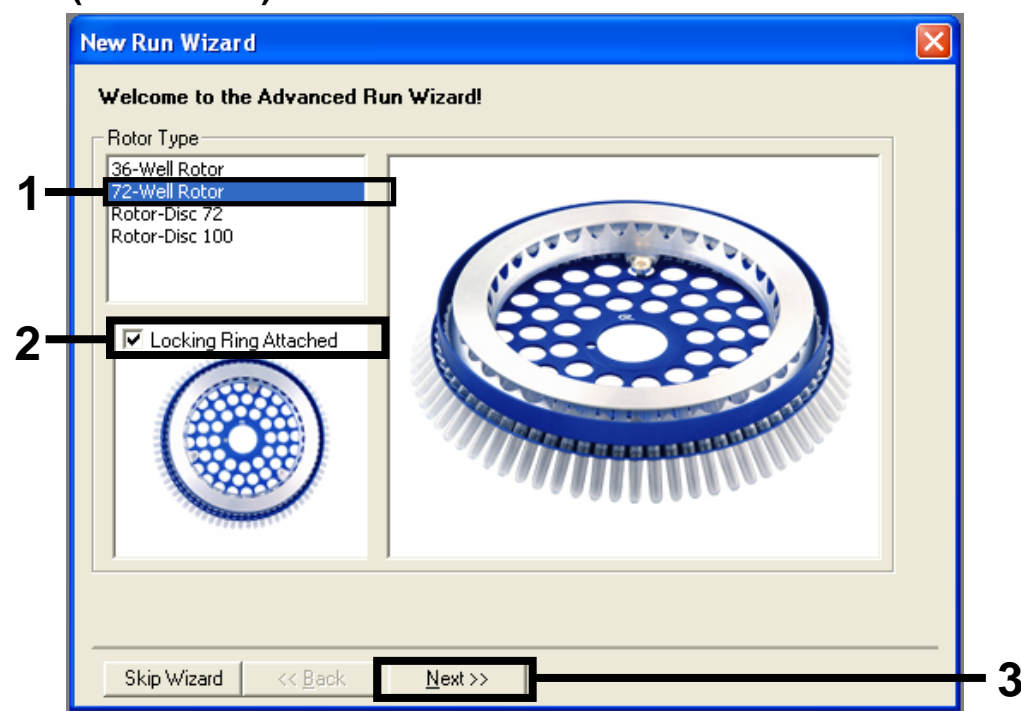
- Připravte vzorky dle popisu v „Protokol: Detekce mutací KRAS“ na straně 28.
- Připravte cyklus PCR na zařízení Rotor-Gene Q MDx dle popisu v „Protokol: Nastavení soupravy *therascreen* KRAS PCR RGQ“ na straně 76.
- Po dokončení cyklu analyzujte data dle postupu v části „Analýza detekce mutace KRAS“ na straně 81.

Protokol: Nastavení soupravy *therascreen* KRAS PCR RGQ

1. Otevřete software přístroje řady Rotor-Gene Q verze 2.3 a odpovídající vytvořený teplotní profil

Teplotní profil vytvoříte podle „Protokol: Vytvoření nového teplotního profilu“, strana 67.

2. Zajistěte výběr správného rotoru a zaškrtnutím příslušného políčka potvrďte, že je nasazen pojistný kroužek. Klikněte na „Next“ (Další) (obrázek 33).



Obrázek 33. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem) a uvítací obrazovka. 1 = „Rotor type“ (Typ rotoru); 2 = pole „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen); 3 = „Next“ (Další).

3. Zadejte jméno obsluhy. Doplňte případné poznámky a zkontrolujte, zda je reakční objem nastaven na 25 a pole „Sample Layout“ (Rozvržení vzorku) obsahuje hodnoty „1, 2, 3...“. Klikněte na „Next“ (Další) (obrázek 34).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. It has a title bar with a close button. The main area contains instructions: 'This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.' Below this are fields for 'Operator :', 'Notes :', 'Reaction Volume (μL):', and 'Sample Layout :'. The 'Operator' field contains 'NAME'. The 'Notes' field is empty. The 'Reaction Volume' field contains '25'. The 'Sample Layout' field contains '1, 2, 3...'. At the bottom are buttons: 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'. A yellow help box on the right contains text about help functionality. Three numbered callouts point to specific elements: 1 points to the 'Operator' and 'Notes' fields; 2 points to the 'Reaction Volume' and 'Sample Layout' fields; 3 points to the 'Next >>' button.

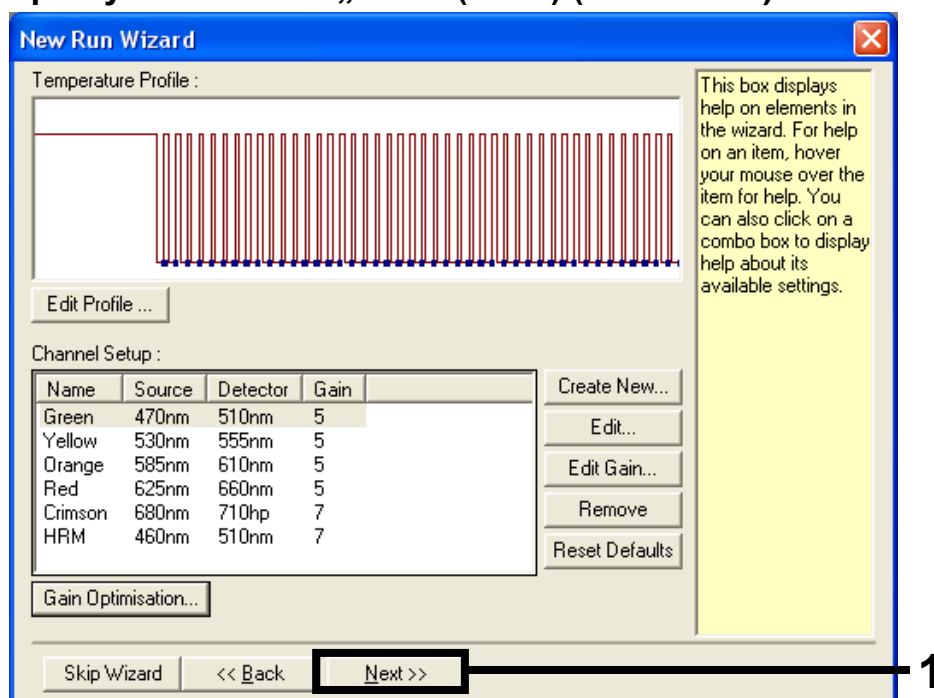
1

2

3

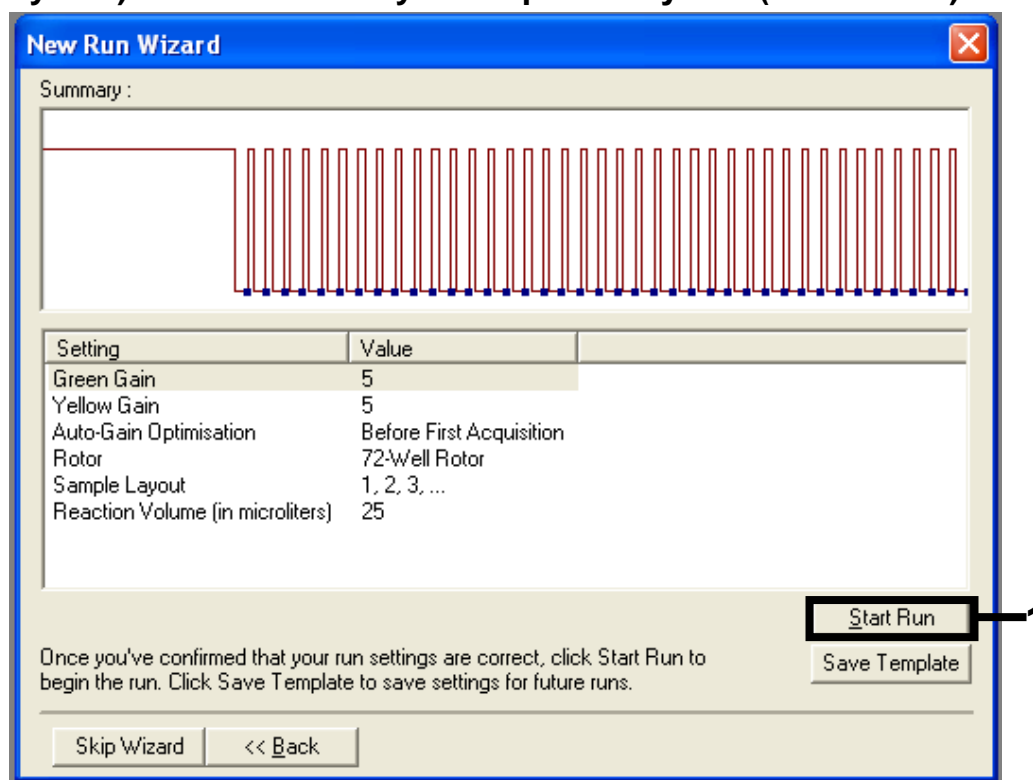
Obrázek 34. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem).
1 = dialogové pole „Operator“ (Obsluha) a „Notes“ (Poznámky); 2 = pole „Reaction Volume“ (Reakční objem) a „Sample Layout“ (Rozvržení vzorků); 3 = „Next“ (Další).

4. Další okno umožňuje provést úpravy teplotního profilu. Jestliže byl teplotní profil vytvořen podle návodu v části „Protokol: Vytvoření nového teplotního profilu“ na straně 67, není třeba provádět žádné úpravy. Klikněte na „Next“ (Další) (obrázek 35).



Obrázek 35. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem) a obrazovka na úpravu teplot. 1 = „Next“ (Další).

5. Zkontrolujte souhrn a poté kliknutím na tlačítko „Start Run“ (Spustit cyklus) uložte soubor cyklu a spusťte cyklus (obrázek 36).



Obrázek 36. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem).
1 = „Start Run“ (Spustit cyklus).

6. Po spuštění zpracování se zobrazí nové okno, ve kterém lze zadat názvy vzorků nebo kliknout na tlačítko „Finish“ (Dokončit) a zadat je později výběrem tlačítka „Sample“ (Vzorek) v průběhu zpracování nebo po jeho skončení.

Kliknutím na tlačítko „Finish and Lock Samples“ (Dokončit a uzamknout vzorky) lze zabránit změnám názvů vzorků. V zájmu zajištění správného testování a analyzování vzorků by měl uživatel věnovat zvláštní pozornost zadávání názvů vzorků.

Poznámka: Při přidělování názvu vzorků musí být pole pro prázdné jamky ve sloupci „Name“ (Název) ponechána prázdná.

7. Po dokončení cyklu analyzujte data dle postupu v částech „Analýza dat hodnocení vzorku“, strana 80, nebo „Analýza detekce mutace KRAS“, strana 81, podle toho, co se hodí.
8. Jestliže jsou zapotřebí kvantifikační zprávy, klikněte na ikonu „Reports“ (Zprávy) na nástrojové liště v souboru cyklu Rotor-Gene Q.

Interpretace výsledků (manuální)

Po dokončení cyklu analýzy vzorku nebo mutační analýzy analyzujte data následujícím postupem.

Nastavení softwarové analýzy

1. Otevřete odpovídající soubor pomocí softwaru přístroje Rotor-Gene Q (verze 2.3).
2. Jestliže vzorky dosud nebyly pojmenovány před provedením cyklu, klikněte na „Edit Samples“ (Upravit vzorky).
3. Zadejte názvy vzorků do sloupce „Name“ (Název).
4. Klikněte na „Analysis“ (Analýza). Na straně analýzy klikněte na položku „Cycling A. Yellow“ (Cyklování A. Žlutá) a zkontrolujte kanál HEX.
5. Klikněte na „Named On“ (Pojmenované zapnuty).
Poznámka: Tím se zajistí, že prázdné jamky nebudou figurovat v analýze.
6. Zvolte „Dynamic Tube“ (Dynamická zkumavka).
7. Zvolte „Linear Scale“ (Lineární stupnice).
8. Klikněte na položku „Outlier Removal“ (Odstranění zkreslení) a u položky „NTC Threshold“ (Prahová hodnota NTC) zadejte „10%“.
9. Nastavte prahovou hodnotu na 0,05 a zkontrolujte hodnoty HEX C_T.
10. Na straně analýzy klikněte na položku „Cycling A. Green“ (Cyklování A. Zelená), aby se zobrazil kanál FAM.
11. Musí být zvýrazněna položka „Dynamic Tube“ (Dynamická zkumavka). Klikněte na „Linear Scale“ (Lineární stupnice).
12. Klikněte na položku „Outlier Removal“ (Odstranění zkreslení) a u položky „NTC Threshold“ (Prahová hodnota NTC) zadejte „10%“.
13. Nastavte prahovou hodnotu na 0,05 a zkontrolujte hodnoty FAM C_T.

Analýza dat hodnocení vzorku

Analýza kontrol cyklu

Viz schematické znázornění analýzy kontroly cyklu na obrázku 37, strana 82.

- **Negativní kontrola:** Aby bylo jisté, že nedošlo ke kontaminaci reakční směsi, kontrola bez templátu nesmí vytvořit hodnotu C_T v zeleném kanálu nižší než 40. Aby bylo zajištěno správné nastavení destičky, nesmí kontrola bez templátu zobrazovat zesílení v rozsahu 31,91–35,16 ve žlutém kanálu. Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot.
- **Pozitivní kontrola:** Pozitivní kontrola KRAS (PC) musí vykazovat hodnotu C_T v rozsahu 23,5–29,5 v zeleném kanálu ve všech 8 analýzách.

Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot. Hodnota mimo uvedený rozsah indikuje problém s nastavením analýzy a znamená tedy selhání cyklu.

Poznámka: Data vzorku nelze použít, jestliže kterákoliv z těchto dvou kontrol cyklu selhala.

Za předpokladu, že oba výsledky kontrolních cyklů jsou platné, všechny hodnoty vzorků C_T musí být v rozsahu 21,92–32,00 v zeleném kanálu. Je-li vzorek mimo tento rozsah, platí následující pokyn.

Analýza vzorku – analýza kontrolního vzorku

- **Kontrolní analýza vzorku C_T je < 21,92:** Vzorky vykazující u kontroly hodnotu $C_T < 21,92$ je nutno zředit. Představují dolní část validovaného rozsahu analýzy. Aby bylo možné zachytit každou mutaci při nízké úrovni, nadměrně koncentrované vzorky musí být ředěny tak, aby spadaly do výše uvedeného rozsahu za předpokladu, že rozředění vzorku o polovinu zvýší hodnotu C_T o 1. Jestliže se vzorek blíží hodnotě 21,92, doporučuje se provést ředění tak, aby byl zajištěn výsledek získaný z testovacího cyklu vzorku (detekce mutace KRAS). Vzorky musí být ředěny vodou dodanou v soupravě (vodou bez obsahu nukleázy k ředění [Dil.]).
- **Kontrolní analýza vzorku C_T je > 32:** Doporučuje se opětovná extrakce vzorku, protože k detekci všech mutací při stanovených mezních hodnotách pro danou analýzu nebude k dispozici dostatečné počáteční množství templátu DNA.

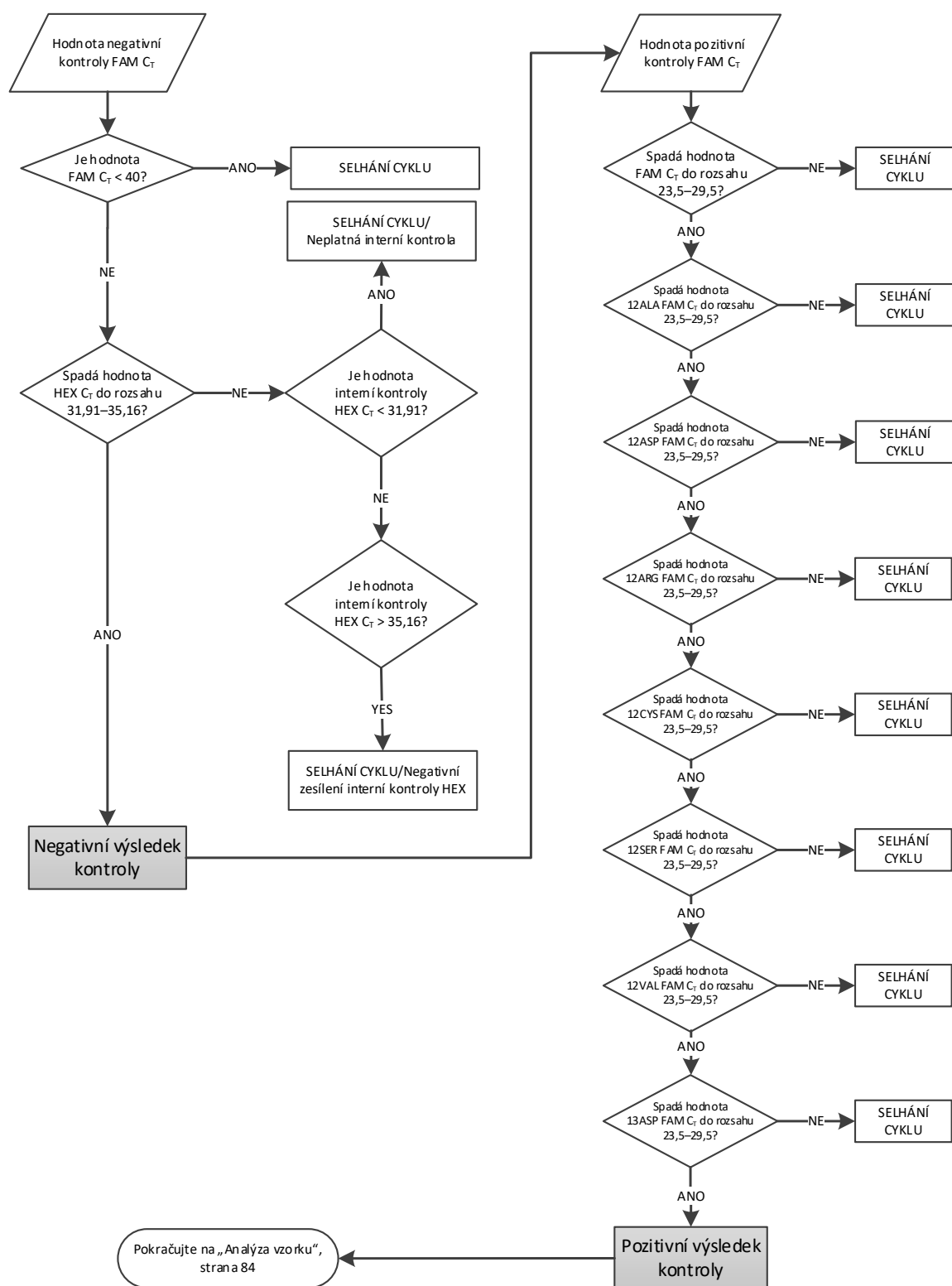
Analýza detekce mutace KRAS

Analýza kontrol cyklu

Viz schematické znázornění analýzy kontroly cyklu (obrázek 37, strana 82).

- **Negativní kontrola:** Aby bylo jisté, že nedošlo ke kontaminaci reakční směsi, kontrola bez templátu nesmí vytvořit hodnotu C_T v zeleném kanálu nižší než 40. Aby bylo zajištěno správné nastavení destičky, nesmí kontrola bez templátu zobrazovat zesílení v rozsahu 31,91–35,16 ve žlutém kanálu. Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot.
- **Pozitivní kontrola:** Pozitivní kontrola KRAS (PC) musí vykazovat hodnotu C_T v rozsahu 23,5–29,5 v zeleném kanálu ve všech 8 analýzách. Specifikované hodnoty jsou v rámci těchto hodnot včetně mezních hodnot. Hodnota mimo uvedený rozsah indikuje problém s nastavením analýzy a znamená tedy selhání cyklu.

Poznámka: Data vzorku nelze použít, jestliže kterákoliv z těchto dvou kontrol cyklu selhala.



Obrázek 37. Vývojový diagram kontrolní analýzy.

Analýza vzorků

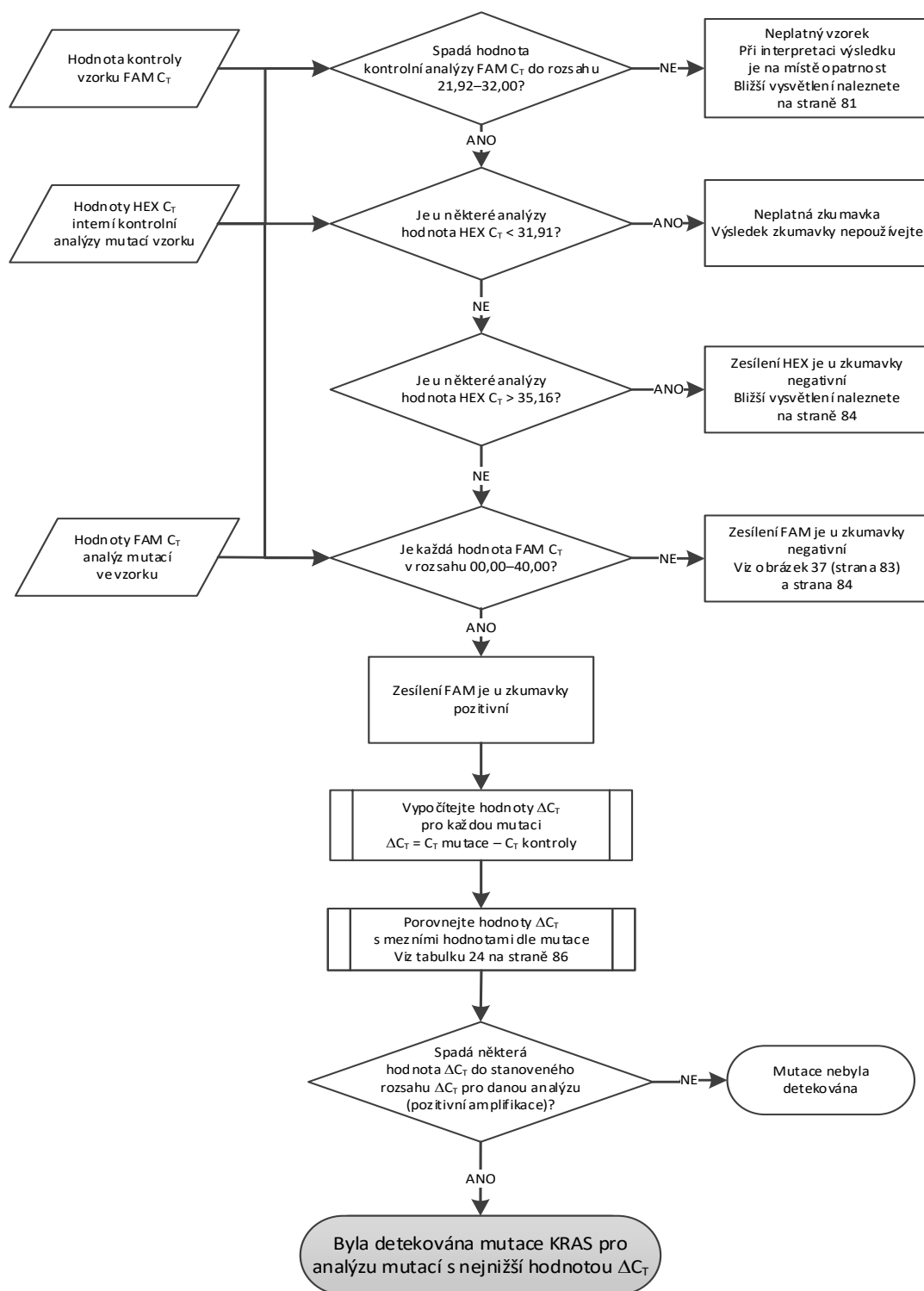
Viz schematické znázornění analýzy vzorků na obrázku 38, strana 84.

Hodnota kontroly vzorku FAM C_T

Za předpokladu, že oba výsledky kontrolních cyklů pro kontrolní analýzy jsou platné, všechny kontroly vzorků C_T musí být v rozsahu 21,92–32,00 v zeleném kanálu.

Je-li vzorek mimo tento rozsah, platí následující pokyn.

- **Kontrolní analýza vzorku C_T je < 21,92:** Vzorky vykazující u kontroly hodnotu $C_T < 21,92$ nadměrně zatěžují analýzy mutace a musí se proto zředit. Aby bylo možné zachytit každou mutaci při nízké úrovni, nadměrně koncentrované vzorky musí být ředěny tak, aby spadaly do výše uvedeného rozsahu za předpokladu, že rozředění vzorku o polovinu zvýší hodnotu C_T o 1. Vzorky musí být ředěny vodou dodanou v soupravě (vodou bez obsahu nukleázy k ředění [Dil.]).
- **Kontrolní analýza vzorku C_T je > 32:** Výsledek interpretujte opatrně, protože mutace s nízkou hladinou nemusí být detekovány.



Obrázek 38. Vývojový diagram analýzy vzorků.

Hodnota HEX C_T interní kontrolní analýzy mutací vzorku

Viz schematické znázornění analýzy vzorků na obrázku 38, strana 84.

Musí být analyzovány všechny jamky každého vzorku. Zkontrolujte, zda každá jamka generuje signál HEX z interní kontroly. Mohou nastat 3 možné případy.

- Spadá-li hodnota C_T interní kontroly do specifikovaného rozsahu (31,91–35,16), je amplifikace HEX pozitivní.
- Je-li hodnota C_T interní kontroly vyšší než stanovený rozsah (> 35,16), je amplifikace HEX negativní.
- Je-li hodnota C_T interní kontroly nižší než stanovený rozsah (< 31,91), je neplatná.

Jestliže k selhání interní kontroly dojde v důsledku PCR inhibice, zředění vzorku může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění cílové DNA. Souprava obsahuje zkumavku vody pro ředění vzorku (Dil.).

Hodnota FAM C_T analýz mutace vzorků

Hodnoty FAM všech 7 reakčních směsí je třeba zkontrolovat s využitím hodnot uvedených v tabulce 24.

Tabulka 24. Přijatelné hodnoty reakce mutací vzorků (FAM)*

Analýza	Přijatelný rozsah C _T	Rozsah ΔC _T
12ALA	0,00–40,00	≤ 8,00
12ASP	0,00–40,00	≤ 6,60
12ARG	0,00–40,00	≤ 8,00
12CYS	0,00–40,00	≤ 8,00
12SER	0,00–40,00	≤ 8,00
12VAL	0,00–40,00	≤ 7,50
13ASP	0,00–40,00	≤ 7,50

* Přijatelné hodnoty jsou v mezích uvedených hodnot včetně mezních hodnot.

- Jestliže hodnota FAM C_T spadá do stanoveného rozsahu, je zesílení FAM pozitivní.
- Jestliže hodnota FAM C_T přesahuje uvedený rozsah nebo nedošlo k žádnému zesílení, je zesílení FAM negativní.

Následujícím způsobem vypočítejte hodnotu ΔC_T pro každou zkumavku s mutací, u níž je zesílení FAM pozitivní. Zajistěte, aby hodnoty mutace a kontrolní hodnoty C_T pocházely ze stejného vzorku.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutace} - C_T \text{ kontroly}$$

Porovnejte hodnotu ΔC_T vzorku s hraniční hodnotou pro zkoumanou analýzu (tabulka 24) a zkontrolujte, že se pro každou analýzu používá správná hraniční hodnota analýzy.

Hraniční hodnota je bod, nad kterým může docházet k pozitivnímu signálu v důsledku signálu pozadí primeru ARMS na DNA „divokého“ typu. Je-li hodnota ΔC_T vzorku vyšší než hraniční hodnota, vyhodnotí se jako negativní nebo ležící pod detekčními limity soupravy.

Pro všechny vzorky musí být na základě následujících kritérií každá reakce mutace vyhodnocena jako detekovaná mutace, nedetekovaná mutace nebo neplatná.

Detekovaná mutace:

- Pozitivní zesílení FAM a hodnota ΔC_T odpovídají mezní hodnotě nebo jsou nižší. V případě detekce více mutací by měla být vykázána mutace s nejnižší hodnotou ΔC_T .

Mutace nebyla detekována:

- Pozitivní amplifikace FAM a hodnota ΔC_T jsou nad mezní hodnotou.
- Zesílení FAM je negativní a zesílení HEX (interní kontrola) je pozitivní.

Neplatné:

- HEX (interní kontrola) je neplatná.
- Zesílení FAM je negativní a zesílení HEX je negativní.

Pokud má vzorek ve zkumavce negativní amplifikaci HEX, ale amplifikace FAM je v jiné zkumavce pozitivní, lze stále považovat výsledek „detekována mutace“ za platný, ale konkrétní identifikovaná mutace nemusí být spolehlivě přiřazena.

- Má-li vzorek negativní výsledek amplifikaci HEX a amplifikace FAM je ve stejné zkumavce pozitivní, měl by být považován za platný výsledek „detekována mutace“.
- Pokud je (interní kontrola) HEX neplatná, nesmí se výsledek příslušné zkumavky použít.

Přiřazování stavu mutace vzorku

Po vyhodnocení všech reakčních zkumavek se následujícím způsobem určí stav mutace vzorku:

- **Detekovaná mutace:** Jedna nebo více ze 7 reakcí mutace je pozitivní. V případě detekce více mutací by měla být vykázána mutace s nejnižší hodnotou ΔC_T .
- **Mutace nebyla detekována:** Všechny 7 reakcí mutace jsou negativní.
- **Neplatné:** Žádná z reakcí mutací není pozitivní a jedna či více reakcí mutací je neplatných.

Poznámka: Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je určena k detekci mutací genu KRAS ve vzorku DNA. Když je u vzorku detekována mutace KRAS, měla by se vykazovat pouze jedna specifická mutace. V případě detekce více mutací by měla být vykázána mutace s nejnižší hodnotou ΔC_T .

Mezi reakcemi detekce mutací může docházet k určitým zkříženým reakcím. Pokud je například pozorována vysoká hladina mutace 12ALA, mohou vykazovat pozitivní výsledek i některé z jiných typů mutací. To je důsledkem skutečnosti, že primery ARMS detekují jiné mutace podobné sekvence. Pokud druhý analýza mutace dává pozitivní výsledek, jedná se patrně o zkříženou reakci. Byly pozorovány i dvojité mutace, jedná se však o vzácný jev.

Jestliže je jedna nebo několik reakcí mutací neplatných, ale jedna nebo více je pozitivních, lze vzorek stále považovat za detekovanou mutaci KRAS, protože je přítomna mutace. Specifická ohlášená mutace však nemusí být přesná a může být výsledkem zkřížené reakce. Proto je třeba daný vzorek označovat pouze jako vzorek s detekovanou mutací KRAS.

Příloha 2: Instalace softwaru *therascreen* KRAS Assay Package

Souprava *therascreen* KRAS RGQ PCR je navržena pro použití s přístrojem Rotor-Gene Q MDx a s rotorem se 72 jamkami. Software *therascreen* KRAS Assay Package je k dispozici samostatně na CD (kat. č. 9022641).

Balíček *therascreen* KRAS Assay Package lze stáhnout na příslušných webových stránkách výrobku *therascreen* KRAS RGQ PCR na **www.qiagen.com**. Informace ke stažení lze najít v části „Product Resources“ (Zdroje týkající se výrobků) pod záložkou „Supplementary Protocols“ (Dodatečné protokoly). Balíček analýz lze také objednat na CD.

Softwarový balíček obsahuje „*therascreen* KRAS CE QC Locked Template“ a „*therascreen* KRAS CE Locked Template“.

Poznámka: Balíček *therascreen* KRAS Assay Package verze 3.1.1 (QIAGEN, kat. č. 9023675) bude fungovat pouze s odpovídající verzí 2.3 software Rotor-Gene Q. Ujistěte se, že máte nainstalovanou správnou verzi softwaru Rotor-Gene Q než začnete instalovat software *therascreen* KRAS Assay Package.

Postup (stahování)

1. Balíček *therascreen* KRAS RCQ Assay Package stáhněte na příslušných webových stránkách výrobku *therascreen* KRAS RGQ PCR na **www.qiagen.com**.
2. Stažený zip soubor otevřete dvojkliknutím na soubor a vyjmete soubory z archívu.
3. Instalaci zahájíte dvojkliknutím na extrahovaný soubor „*therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe*“.

Postup (CD)

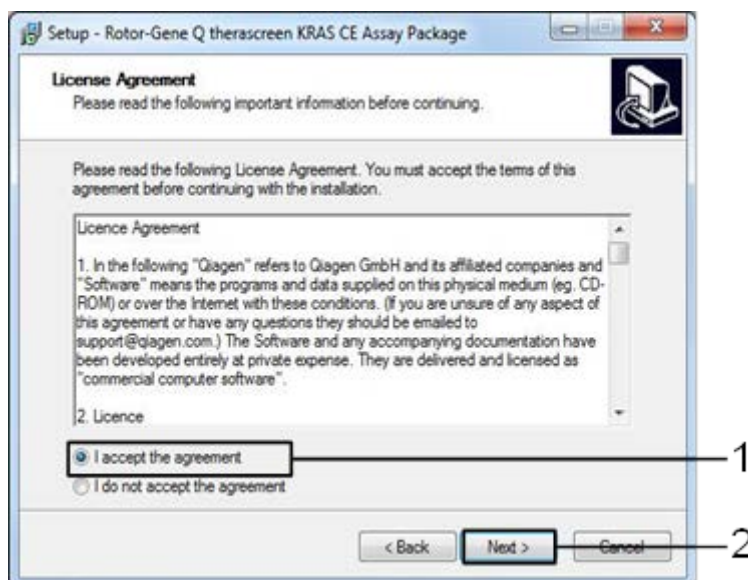
1. Objednejte si CD *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE kompatibilní s nainstalovaným softwarem Rotor-Gene Q; je dostupné zvlášť od společnosti QIAGEN.
Verze 3.1.1. Kat. č. 9023675.
2. Vložte CD do CD mechaniky notebooku připojeného k přístroji Rotor-Gene Q MDx.
3. Spustěte instalaci poklepáním na soubor *therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe*
NEBO
therascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe.

4. Zobrazí se průvodce instalací. Klikněte na „Next“ (Další) (obrázek 39).



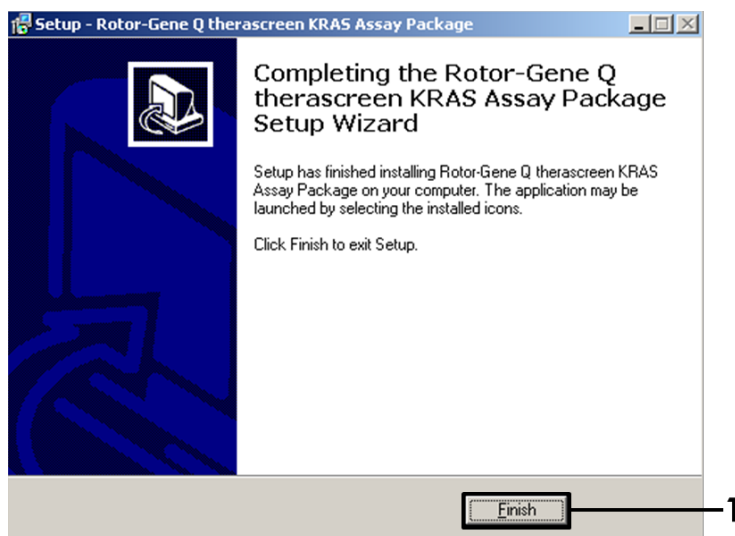
Obrázek 39. Dialogové okno „Setup“ (Instalace). 1 = „Next“ (Další).

5. Přečtěte si Licenční ujednání v dialogovém okně „License Agreement“ (Licenční ujednání) a potvrďte ujednání zaškrtnutím políčka u vyjádření „I accept the agreement“ (Přijímám podmínky tohoto ujednání). Klikněte na „Next“ (Další) (obrázek 40).



Obrázek 40. Dialogové okno „License Agreement“ (Licenční ujednání). 1 = „I accept the agreement“ (Přijímám podmínky tohoto ujednání); 2 = „Next“ (Další).

6. Instalace šablony se spustí automaticky a objeví se dokončovací dialogové okno „Setup“ (Instalace). Klikněte na „Finish“ (Dokončit) pro ukončení průvodce instalací (obrázek 41).



Obrázek 41. Dokončení průvodce instalací.

7. Restartujte počítač. Zástupci k šabloně „therascreen KRAS QC Locked Template“ i „therascreen KRAS Locked Template“ budou vytvořeni automaticky a objeví se pracovní ploše.

Informace pro objednávky

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: 1 kontrolní analýza, 7 analýz mutací, pozitivní kontrola, voda, <i>Taq</i> DNA polymeráza	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (verze 3.1.1)	Softwarový balíček protokolu pro použití se soupravou <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR a přístrojem QIAGEN Rotor-Gene Q MDx s rotorem se 72 jamkami	9023675
Přístroj Rotor-Gene Q a příslušenství		
Rotor-Gene Q MDx	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok k ruční přípravě reakce pomocí jednokanálové pipety ve zkumavkách 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách a víčka na 1000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripů po 4 zkumavkách a víčka na 10 000 reakcí	981106

Výrobek	Obsah	Kat. č.
Souprava QIAamp DNA FFPE Tissue – pro čištění genomové DNA z tkání zalitých v parafinu		56404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Souprava na přípravu 50 vzorků DNA: Kolonky QIAamp MinElute®, proteináza K, pufrý a sběrné zkumavky (2 ml)	

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušná příručka soupravy QIAGEN nebo uživatelská příručka. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com** nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Historie revizí

Historie revizí dokumentu	
R4 01/2019	Doplnění autorizovaného zástupce (titulní strana). Aktualizace části „Symboly“. Aktualizace templátu.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

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

Registrované názvy, ochranné známky, atd. použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmí být považovány za nechráněné zákonem.

Není určeno k použití se vzorky stolice.

Není určeno k použití se vzorky moči.

Není určeno k použití se vzorky extracelulární nukleové kyseliny ze vzorků krve.

Není určeno k použití se vzorky kostní dřeně bez obsahu buněk.

Není určeno k použití se vzorky slin.

ZAKOUPENÍM TOHOTO PRODUKTU JE KUPUJÍCÍ OPRÁVNĚN NA ZÁKLADĚ KONKRÉTNÍCH PATENTŮ SPOLEČNOSTI ROCHE TENTO PRODUKT POUŽÍVAT VÝHRADNĚ K VÝKONU DIAGNOSTICKÝCH ÚKONŮ SPOJENÝCH S LIDSKOU DIAGNOSTIKOU IN VITRO. TÍMTO SE NEUDĚLUJE ŽÁDNÝ VŠEOBECNÝ PATENT ANI LICENCE JAKÉKOLI POVAHY, KROMĚ PRÁVA POUŽÍVAT TENTO VÝROBEK, KTERÉ JE DÁNO JEHO NÁKUPEM.

Omezená licenční smlouva pro soupravu *therascreen* KRAS RGQ PCR

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmkoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách **www.qiagen.com**. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava či její užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoliv jiné licence, výslovné nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz **www.qiagen.com**.

HB-1861-004 1116068 01-2019 © 2019 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky www.qiagen.com/contact | Technická podpora support.qiagen.com |
Webová stránka www.qiagen.com

