

# ***therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR Kiti**

## **El Kitabı**



### Sürüm 1

**IVD**

Kalitatif in vitro tanı amaçlı

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx ile birlikte kullanım içindir



**REF** 874011



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

**EC REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden, ALMANYA

**R4 MAT** 1116068TR



## QIAGEN rnek ve Test Teknolojileri

QIAGEN herhangi bir biyolojik örneğin içeriğinin izolasyonunu ve tespitini sağlayan yenilikçi örnek ve test teknolojilerinin nc sağlayıcısıdır. Gelişmiş yüksek kaliteli ürünlerimiz ve hizmetlerimiz örnekten sonuca başarı sağlar.

### QIAGEN řu standartları belirler:

- DNA, RNA ve proteinlerin saflaştırılması
- Nükleik asit ve protein ölçümleri
- mikroRNA araştırması ve RNAi
- rnek ve test teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz, stn başarı ve önemli buluşlar elde etmenizi sağlamaktır. Daha fazla bilgi için, **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)** adresini ziyaret edin.

# İçindekiler

<b>Kullanım Amacı</b>	<b>5</b>
<b>Özet ve Açıklama</b>	<b>5</b>
<b>Prosedür Prensipleri</b>	<b>7</b>
<b>Sağlanan Malzemeler</b>	<b>10</b>
Kit içeriği	10
<b>Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler</b>	<b>11</b>
<b>Uyarılar ve Önlemler</b>	<b>12</b>
Güvenlik Bilgileri	12
Genel önlemler	12
<b>Reaktifin Saklama ve Kullanma</b>	<b>13</b>
<b>Numune Alma, Analize Hazırlama ve Saklama</b>	<b>13</b>
<b>Prosedür</b>	<b>14</b>
DNA ekstraksiyonu	14
Protokol: DNA örneğinin incelenmesi	15
Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti	27
<b>Sonuçların Yorumlanması</b>	<b>35</b>
Sorun giderme kılavuzu	36
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package tarafından oluşturulan işaretler	37
<b>Kalite Kontrol</b>	<b>42</b>
<b>Sınırlamalar</b>	<b>43</b>
<b>Performans Özellikleri</b>	<b>44</b>
Analitik Performans	44
Tespit Sınırı (LOD)	48
DNA girişi ve doğrusalılık	49
Engelleyici maddeler	54
Çapraz kontaminasyon	54
Münhasırlık/çapraz reaktivite	55
Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik	57
Örnek kullanım değişkenliği	59
Örnek alma yöntemlerinin eşdeğerliği (yalnızca NSCLC)	60
<b>Referanslar</b>	<b>60</b>
<b>Semboller</b>	<b>63</b>

<b>İletişim Bilgileri</b>	<b>64</b>
<b>Ek 1: <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokol</b>	<b>65</b>
<b>Sonuçların Yorumlanması (Manuel)</b>	<b>78</b>
Yazılım analiz ayarları	78
Örnek değerlendirme veri analizi	78
KRAS mutasyon tespiti analizi	79
Örnek analizi	81
<b>Ek 2: <i>therascreen</i> KRAS Assay Package'ın kurulumu</b>	<b>86</b>
<b>Sipariş Bilgileri</b>	<b>89</b>
<b>Revizyon Geçmişi</b>	<b>90</b>

## Kullanım Amacı

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti, insan KRAS onkojeninin kodon 12 ve 13'ünde 7 somatik mutasyonun Rotor-Gene Q MDx cihazı kullanılarak tespit edilmesine yönelik gerçek zamanlı kalitatif bir PCR testidir. Kit, formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (FFPE) kolorektal kanser (CRC) dokusu veya küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) örneklerinden kazıma, kalın iğne biyopsisi (CNB) ya da ince iğne aspirasyonu (FNA) yöntemi ile alınan ekstrakte edilmiş DNA ile kullanım içindir.

KRAS genindeki somatik mutasyonlar, CRC tedavisinde kullanılan panitumumab ve setuksimab gibi epidermal büyüme faktörüne (EGFR) yönelik tedavilerin potansiyel belirleyici direnç biyobelirteçleridir. KRAS genindeki somatik mutasyonlar aynı zamanda, bazı NSCLC tedavileri için karar almada kullanılan potansiyel belirleyici biyobelirteçler olarak da karşımıza çıkabilir.

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

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

## Özet ve Açıklama

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

**Tablo 1. Mutasyon listesi ve COSMIC tanımları**

Mutasyon	Baz değışimi	COSMIC ID*
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

\* COSMIC ID'ler *Kanserdeki Somatik Mutasyonların Katalođu*'ndan (7) ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)) alınabilir.

Test, yüksek oranda spesifik ve hassastır; yabancı tip DNA arka planına kıyasla görülen mutant DNA oranının düşük yüzdeli olsa bile tespit edilmesini sağlar. Yeterli sayıda DNA kopyası olduğu takdirde, yabancı tip DNA arka planına kıyasla %0,8 mutant DNA tespit edilmesi mümkündür (her bir mutasyona yönelik tespit limiti bilgileri için bkz. “Performans Özellikleri”, sayfa 44).

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti, polimeraz zincirleme reaksiyon (PCR) prosedüründe kullanılır. Bu kitin avantajı, hedefe yönelik olarak yüksek oranda spesifik olmasının yanı sıra, sonuçların belirlenmesinde öznellikten uzak bir şekilde hızlı ve verimli olmasıdır.

## Prosedür Prensibi

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti, gerçek zamanlı PCR'da mutasyonların tespiti için 2 teknoloji – ARMS ve Scorpions – kullanır.

### Mutasyon reaksiyon karışımları

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

### ARMS

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

### Scorpions

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

### Kit formatı

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti 8 test içerir:

- 1 kontrol testi (Kontrol Reaksiyon Karışımı, CTRL)
- 7 mutasyon testi (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

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

## Testler

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

## Kontrol reaksiyonu

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

## Kontrol testi

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

## Mutasyon testleri

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

## Kontroller

**Not:** Tüm deneysel çalışmalar pozitif ve negatif kontrolleri içermelidir.

## İnternal kontrol

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

## Pozitif kontrol

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



## Negatif kontrol

Her bir çalışma 9–13 tüplerindeki pozitif bir kontrolü (“şablonsuz kontrol”) içermelidir. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti şablonsuz kontrol için “şablon” olarak kullanılacak NTC suyu içerir. Şablonsuz kontrol, çalışma hazırlığı sırasında herhangi bir potansiyel kontaminasyonu belirlemek ve internal kontrol reaksiyon performansını değerlendirmek için kullanılır.

## Örnek değerlendirilmesi

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

## Platform ve yazılım

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti, Rotor-Gene Q MDx cihazı ile birlikte kullanım için özel olarak tasarlanmıştır. Rotor-Gene Q Yazılımı ve *therascreen* KRAS Assay Package, internetten indirilebilir veya CD'de ayrı olarak bulunabilir.

Rotor-Gene Q MDx cihazlarına, kullanım kılavuzundaki gereklilikler uyarınca bakım yapılmalıdır. Cihazla ilgili bilgiler için cihazın kullanım kılavuzuna başvurun.

Kurulum talimatları için, bkz. “Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu”, sayfa 86.

## Sağlanan Malzemeler

### Kit içeriği

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

## Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

### Reaktifler

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Doku Kiti) (kat. no. 56404; bkz. “DNA ekstraksiyonu”, sayfa 14)
- Ksilen
- Etanol (%96–100)\*

### Sarf Malzemeleri

- Filtreli steril pipet uçları (çapraz kontaminasyonu önlemek için aerosol bariyerli pipet uçlarını öneriyoruz)
- Ana karışımları hazırlamak için steril mikrosantrifüj tüpleri
- 72 kuyulu rotorla birlikte kullanım için 0.1 ml Strip Tubes and Caps (0,1 ml Şerit Tüpler ve Kapakları) (kat. no. 981103 veya 981106)

### Ekipman

- Yeşil ve sarı döngü (sırasıyla FAM ve HEX tespiti) için floresan kanallı Rotor-Gene Q MDx cihazı
- Otomatik mutasyon tespiti için KRAS Assay Package yüklü Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.3 (sürüm 3.1.1) (bkz. “Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu”, sayfa 86)  
**Not:** Manuel mutasyon tespiti için Rotor-Gene Q yazılımı, KRAS Assay Package olmadan kullanılabilir. Bkz. “Ek 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokol”, sayfa 65.
- Termomikser†, ısıtmalı orbital inkübatör, ısıtma bloğu veya 56°C ve 90°C dahilinde inkübasyon sağlayabilen su banyosu
- 1,5 ml tüp için rotora sahip masaüstü santrifüj†
- Masaüstü tüp karıştırıcı†
- Örnek hazırlığı için özel pipetler (ayarlanabilir)†
- PCR ana karışımı için özel pipetler (ayarlanabilir)†
- Şablon DNA'nın dağıtımı için özel pipetler (ayarlanabilir)†

\* Metanol veya metiletilketon gibi diğer kimyasal maddeleri içeren denatüre alkol kullanmayın.

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

# Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım için

## Güvenlik Bilgileri

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

## Genel önlemler

Kullanıcı her zaman aşağıdakilere dikkat etmelidir:

- Pozitif materyalleri (numuneler ve pozitif kontrol) diğer reaktiflerden ayrı olarak saklayın ve çıkartın, bunları reaksiyon karışımına mekansal olarak ayrı bir yerde ekleyin.
- PCR tüplerinin sentetik kontrol materyali ile kontaminasyonunun önlenmesine çok dikkat edin. Reaksiyon karışımının hazırlanması ve DNA şablonunun eklenmesi için ayrı, özel pipetlerin kullanılması önerilir. Reaksiyon karışımının hazırlanması ve dağıtılması şablonun eklendiği farklı bir alanda yapılmalıdır. Rotor-Gene Q tüpleri PCR çalışması bittikten sonra açılmamalıdır. Bu PCR sonrası ürünler ile laboratuvar kontaminasyonunu engellemek içindir.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti için reaktifler en uygun şekilde seyreltilmiştir. Performans kaybıyla sonuçlanabileceğinden reaktiflerin fazla seyreltilmesini önermiyoruz. Yanlış negatif sonuç riskini artıracığı için 25 µl'den az reaksiyon hacmi kullanımını önermiyoruz.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitindeki tüm reaktifler en iyi performans için özel olarak formüle edilmiştir. Kitteki tüm reaktifler, yalnızca aynı *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinde verilen reaktiflerle birlikte kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Optimal performansın elde edilmesi için kitin içindeki reaktiflerde değişim yapılmamalıdır.
- Yalnızca kit içinde verilen *Taq* DNA polimerazı (*Taq*) kullanın. Aynı veya başka tipte bir kitten alınan *Taq* DNA polimerazla veya başka bir sağlayıcıdan alınan *Taq* DNA polimerazla değiştirmeyin.

## Reaktif Saklama ve Kullanma

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti kuru buz üzerinde taşınır ve teslim edilir. Teslimat esnasında *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin herhangi bir bileşeninin donmuş olmadığını, dış ambalajın nakliye esnasında açılmış olduğunu veya paket içinde ambalaj notu, el kitabı veya reaktiflerin bulunmadığını fark ederseniz, lütfen QIAGEN Teknik Servis Departmanı ile veya yerel dağıtım şirketleri ile iletişime geçin (arka kapağa bakın veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret edin).

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

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

## Numune Alma, Analize Hazırlama ve Saklama

**Not:** Tüm örnekler potansiyel enfeksiyöz madde olarak bakılmalıdır.

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

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

### Doku örneklerinin hazırlanması

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

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

### Doku örneklerinin DNA alımına hazırlanması (CRC)

- Standart malzemeler ve yöntemler kullanarak, doku numunesini %10 renksiz tamponlu formalin (NBF) içine yerleştirin ve parafine gömün. Mikrotom kullanarak parafin blokundan 5 µm'lik seri kesitler kesin ve bunları cam slaytlar üzerine yerleştirin.

- Eğitimli bir görevli (örn. bir patolog), Hematoksilin ve Eozin (H&E) ile boyanmış kesiti tümör içeriği ve alan tespiti açısından değerlendirmelidir. Tümörün normal dokudan ayırt edilebilmesi için, boyanmış slaytı işaretleyin. DNA alımı için seri kesitler kullanın.
- Alana göre > %20 tümör içeriğine sahip kesitleri, makrodiseksiyon yapmaksızın işlem için kullanın (aşağıya bakın).
- Alana göre < %20 tümör içeriğine sahip olan kesitlere makrodiseksiyon yapın ve bunları bir veya daha fazla kesite ayırın. Tümörsüz dokuyu atın.
- Alanı < 4 mm<sup>2</sup> olan kesitler için, toplam tümör alanını en az 4 mm<sup>2</sup> olarak artırmak için iki veya daha fazla kesit daha işleyin (makrodiseksiyon yapılmış ve yapılmamış örnekler için geçerlidir). Tümörsüz dokuyu atın.
- Yeni, steril bir neşter kullanarak doku etrafındaki fazla parafini kazıyarak ortadan kaldırın.

### **Doku örneklerinin DNA alımına hazırlanması (NSCLC)**

- Standart malzemeler ve yöntemler kullanarak, doku numunesini %10 NBF içine yerleştirin ve parafine gömün. Mikrotom kullanarak parafin blokundan 5 µm'lik seri kesitler kesin ve bunları cam slaytlar üzerine yerleştirin.
- Eğitimli bir görevli (örn. bir patolog), tümör varlığı açısından H&E ile boyanmış bir kesiti değerlendirmelidir. DNA alımı için seri kesitler kullanın.
- Yeni, steril bir neşter kullanarak doku etrafındaki fazla parafini kazıyarak ortadan kaldırın.

### **Saklama**

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

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

## **Prosedür**

### **DNA ekstraksiyonu**

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin performans özellikleri, QIAamp DNA FFPE Doku Kiti (kat. no. 56404) ile alınmış DNA örnekleri kullanılarak belirlenmiştir. QIAamp DNA FFPE Doku Kiti kullanıyorsanız, DNA alma işlemini el kitabındaki talimatlara uygun şekilde ve aşağıdakileri dikkate alarak gerçekleştirin.

### DNA alınması (CRC örnekleri)

- QIAamp DNA FFPE Doku Kiti yalnızca elle kullanım içindir.
- *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*'ta (QIAamp DNA FFPE Doku Kiti El Kitabı) açıklanan RNase adımını kullanmayın.
- QIAGEN parafin temizleme solüsyonunu kullanmayın. Yalnızca, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*'ta açıklanan ksilen/etanol parafin temizleme yöntemini kullanın.
- Proteinaz K sindirimi (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*'ta yer alan 11. adım) 1 saat süreyle gerçekleştirilmelidir.
- Örnekler, QIAamp DNA FFPE Doku Kitindeki 200 µl elüsyon tamponu (ATE Tamponu) kullanılarak ayrıştırılmalıdır.

### DNA alınması (NSCLC örnekleri)

- İşlem başına bir 2 x 5 µm kesit kullanın.
- QIAamp DNA FFPE Doku Kiti yalnızca elle kullanım içindir.
- *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*'ta (QIAamp DNA FFPE Doku Kiti El Kitabı) açıklanan RNase adımını kullanmayın.
- QIAamp DNA FFPE Doku Kiti içindeki QIAGEN parafin temizleme solüsyonunu kullanmayın. Yalnızca, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*'ta açıklanan ksilen/etanol parafin temizleme yöntemini kullanın.
- Proteinaz K sindirimi (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*'ta yer alan 11. adım) 1 saat süreyle gerçekleştirilmelidir.
- QIAamp DNA FFPE Doku Kitinden 60 µl elüsyon tamponu (ATE) ekleyin ve 2,5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Son hızda 1 dakika santrifüj edin.
- QIAamp DNA FFPE Doku Kitinden ikinci bir 60 µl elüsyon tamponu (ATE) ekleyin ve 2,5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Son hızda 1 dakika santrifüj edin.

### Protokol: DNA örneğinin incelenmesi

Bu protokol, otomatik örnek değerlendirmesi için KRAS CE Örnek Değerlendirme Kilitli Şablonu (Assay Package) kullanılarak örneklerdeki total çoğaltılabilir DNA'yı değerlendirmek amacıyla kullanılır.

**Not:** Manuel örnek değerlendirmesi için, bkz. "Ek 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokol", sayfa 65.

## Başlamadan önce önemli noktalar

- Mevcut Kontrol Reaksiyon Karışımı (CTRL) kullanılarak 24'e kadar örnek incelenebilir.
- DNA'yı test öncesinde incelemek için Kontrol Reaksiyon Karışımını (CTRL) kullanın.
- **Not:** Bu inceleme için spektrofotometre veya diğer alternatif yöntemleri kullanmamak, aşağıda açıklandığı şekilde Kontrol Reaksiyon Karışımını (CTRL) kullanmak önemlidir. Büyük oranda bozulmuş DNA, primerler kısa DNA parçaları oluştursa bile çoğaltılamayabilir.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitindeki reaktiflerin etkin kullanılabilmesi için, tam çalışma döngüleri oluşturmak amacıyla DNA örneklerini mümkün olduğunca büyük sayıda gruplara ayırın. Örnekleri kendi başına veya küçük sayıda gruplar halinde test etmek, daha fazla reaktif kullanılmasına, dolayısıyla *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile test edilebilecek örnek sayısının azalmasına neden olur.
- Rotor-Gene Q MDx cihazının ilk kullanımından önce, Rotor-Gene Q yazılım sürümüne karşılık gelen doğru *therascreen* KRAS Assay Package yazılımının yüklendiğinden emin olun (bkz. “Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu”, sayfa 86).

## Prosedür

1. **Kontrol Reaksiyon Karışımını (CTRL), Şablonsuz Kontrol (NTC) için nükleaz içermeyen suyu ve KRAS Pozitif Kontrolü (PC) oda sıcaklığında (15–30°C) en az 1 saat boyunca bekleterek tamamen çözündürün.**

- **Not:** *Taq* DNA polimerazını (*Taq*) diğer reaktiflerle aynı anda oda sıcaklığına (15–30°C) getirin (bkz. “Reaktifi Saklama ve Kullanma”, sayfa 13). Enzimi tüpün altında toplamak için tüpü kısa süre santrifüj edin.

Reaktifi çözündürme, PCR kurulumu ve çalışmayı başlatmadan önce saklama süreleri Tablo 2'de verilmiştir.

**Not:** PCR kurulumunu oda sıcaklığında gerçekleştirin.



**Tablo 2. Çözdürme süresi, PCR kurulum süresi ve saklama sıcaklığı**

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

\* “Saklama” ifadesi, PCR kurulumunun tamamlanması ile Rotor-Gene Q MDx cihazında PCR çalıştırılmasının başlangıcı arasında geçen süredir.

1. Bölgesel tuz konsantrasyonlarını engellemek için çözünen reaktifleri 10 kez ters yüz ederek karıştırın ve ardından içeriği tüpün altında toplamak için kısa süreli santrifüj edin.

**Not:** *Taq* DNA polimerazı (*Taq*) veya *Taq* içeren herhangi bir karışımı enzimi etkisizleştirebileceği için vorteksle karıştırmayın.

2. Tablo 3 içindeki hacimlere uygun olarak aşağıdakiler için yeterli miktarda ana karışım (Kontrol Reaksiyon Karışımı [CTRL] artı *Taq* DNA polimerazı [*Taq*]) hazırlayın:

- tüm DNA örnekleri
  - 1 KRAS Pozitif Kontrol (PC) reaksiyonu
  - 1 Şablonsuz Kontrol (NTC) için nükleaz içermeyen su reaksiyonu
  - PCR kurulumu için yeterli farkı sağlamak amacıyla 1 fazla örnek
- Ana karışım örnek hariç PCR için gerekli bileşenlerin tümünü içerir.

**Tablo 3. Kontrol testi ana karışımının hazırlanması**

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

\* n = Reaksiyon sayısı (örnekler artı kontroller).

PCR kurulumu için yeterli farkı sağlamak amacıyla fazladan bir örnek (n+1) için yeterli miktarda ana karışım hazırlayın.

n değeri 24'ü aşmamalıdır (kontroller hariç), çünkü bir çalışmada kullanılabilecek en fazla örnek sayısı 24'tür.

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

**Not:** Ucun aşırı enzimle kaplanmasını engellemek için *Taq* DNA polimerazını, pipet ucunu sıvı yüzeyin hemen altına dikkatlice yerleştirerek pipetle çekin.

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

**Not:** Kapakları, gerekinceye kadar plastik kap içinde tutun.

**Tablo 4. DNA örneği incelemesi için yükleme bloğundaki çalıştırma düzeni**

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

\* Sayılar, yükleme bloğu içinde konumları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

4. **Reaksiyon ana karışımının toplam hacminden daha az bir hacme bir pipet koyun ve 10 defa çekip iterek tamamen karıştırın.**
5. **Hemen 20 µl ana karışımı her bir PCR şerit tüpüne ekleyin.**  
**Not:** Tüp düzeni için Tablo 4'e bakın. DNA örneği incelemesi için, Kontrol testi ana karışımı, bir PC tüpüne, bir NTC tüpüne ve her bir örnek için birer tüpe eklenmelidir.
6. **NTC tüpüne (tüp konumu 2) hemen 5 µl Şablonsuz Kontrol (NTC) için nükleaz içermeyen su ekleyin ve tüpü kapatın.**
7. **Örnek tüplerine (tüp konumları 3–26) her bir DNA örneğinden 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın.**

8. **PC tüpüne (tüp konumu 1) KRAS Pozitif Kontrolde (PC) 5 µl ekleyin ve tüpü kapatın.**

Her bir tüpün toplam reaksiyon hacmi 25 µl olmalıdır (Tablo 3 uyarınca hazırlanmış 20 µl ana karışım, artı 5 µl NTC/örnek/PC).

9. **Her bir PCR 4 şeritli tüp içindeki en düşük numaralı konumda bulunan ilk tüpün kapağını kalıcı markır ile işaretleyerek (örn. 1, 5 ve 9 numaralı konumlar), tüplerin Rotor-Gene Q MDx cihazındaki 72 kuyulu rotor içine yükleneceği yönü belirtin.**
10. **Kapatılmış tüpleri 4 kere ters çevirerek örnek ve reaksiyon karışımını karıştırın.**
11. **Tüm PCR 4 şeritli tüpleri, yön işaretlerinden yararlanarak çalıştırma düzenine göre (Tablo 4) 72 kuyulu rotor içinde uygun konumlara yerleştirin.**

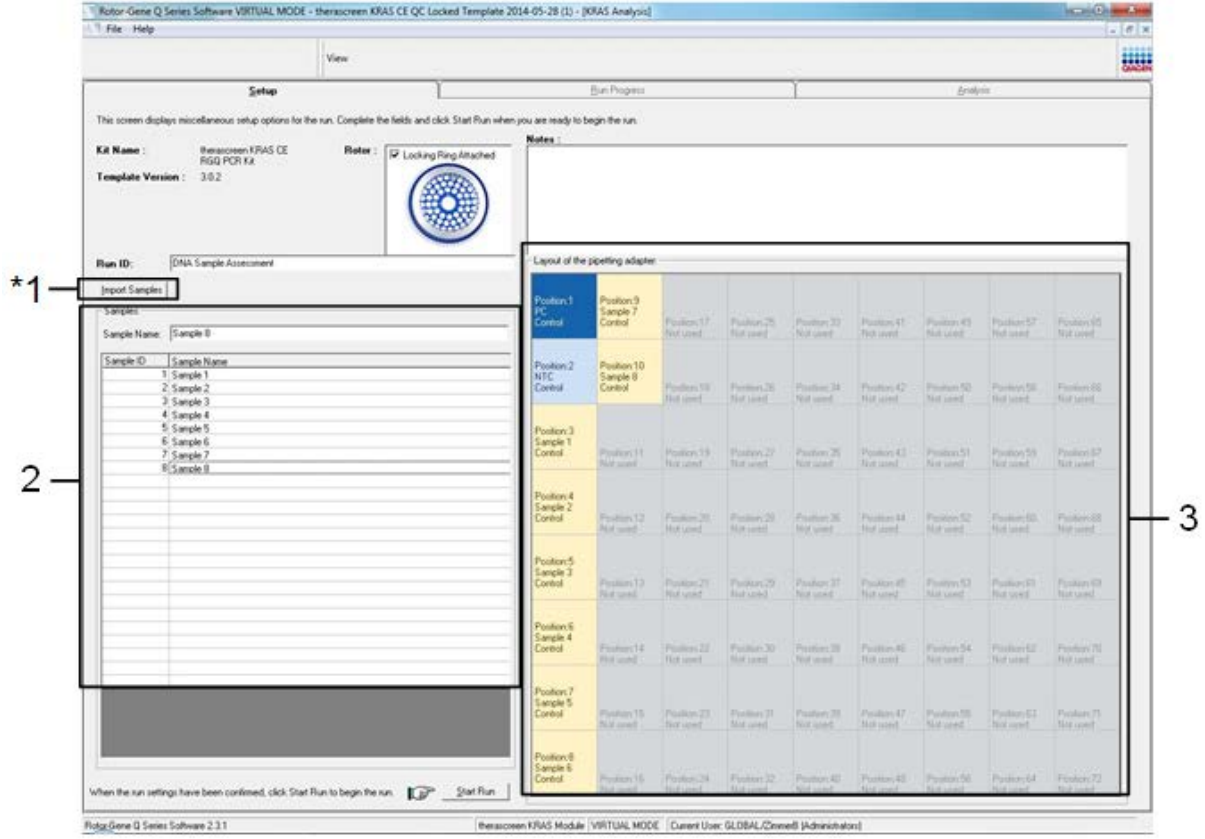
**Not:** Rotor tamamen dolmamışsa, tüm kullanılmayan pozisyonlar kapatılmış boş bir tüple doldurulmalıdır. Bu, Rotor-Gene Q MDx cihazının termal verimliliğinin korunmasını sağlar.

12. **72 kuyulu rotoru Rotor-Gene Q MDx cihazına yerleştirin. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q MDx cihazıyla birlikte verilir) çalışma sırasında tüpleri sabitlemek için rotorun üstüne yerleştikten emin olun.**
13. **Rotor-Gene Q MDx yazılımını çalıştırın ve aynı anda Rotor-Gene Q cihazına bağlı dizüstü bilgisayarın masaüstündeki “therascreen KRAS QC Locked Template” (*therascreen* KRAS QC Kilitli Şablon) simgesine (Şekil 1) çift tıklayarak şablonu açın.**



**Şekil 1. “therascreen KRAS QC Locked Template” (*therascreen* KRAS QC Kilitli Şablon) simgesi.**

14. Varsayılan olarak “Setup” (Kurulum) sekmesi görünür (Şekil 2). Kilitleme halkasının uygun şekilde takıldığını doğrulayın ve “Locking Ring Attached” (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. Rotor-Gene Q MDx cihazının kapağını kapatın.



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

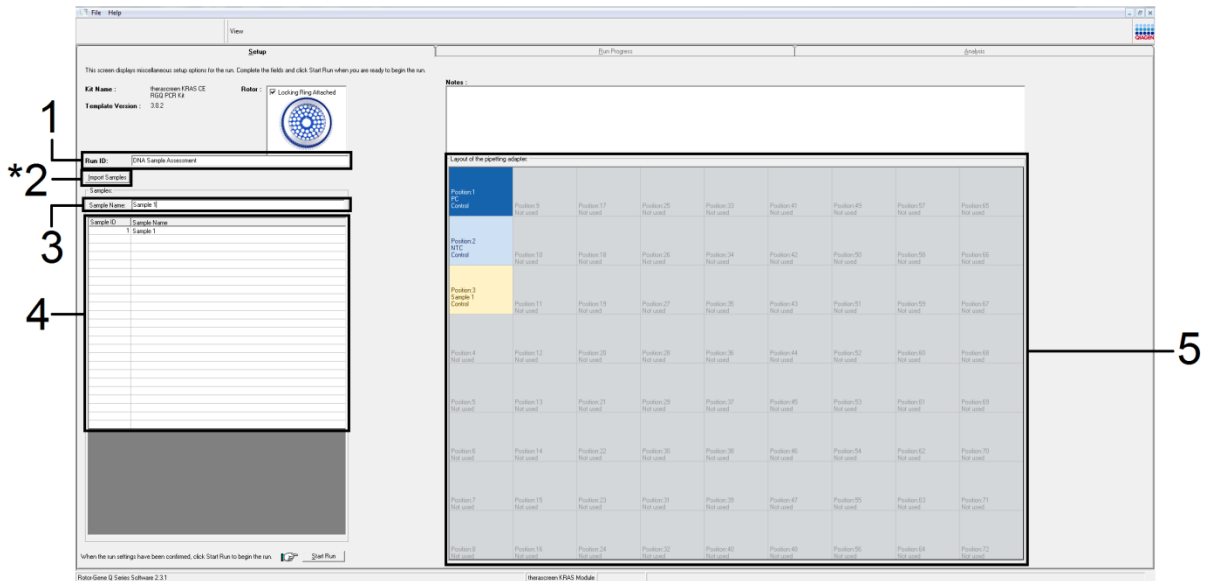
**15. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre “Run ID” (Çalıştırma Kimliği) diyalog alanına çalıştırma kimliğini girin. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanına örnek adını girin ve Enter tuşuna basın.**

Bunu yapmak, örnek adını aşağıdaki örnek listesine ekler ve örneğe bir “Sample ID” (Örnek Kimliği) (1, 2, 3, vb.) verir. Ek olarak, sağ taraftaki “Layout of the pipetting adapter” (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli, örnek adını içerecek şekilde güncellenir (Şekil 3).

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

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

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

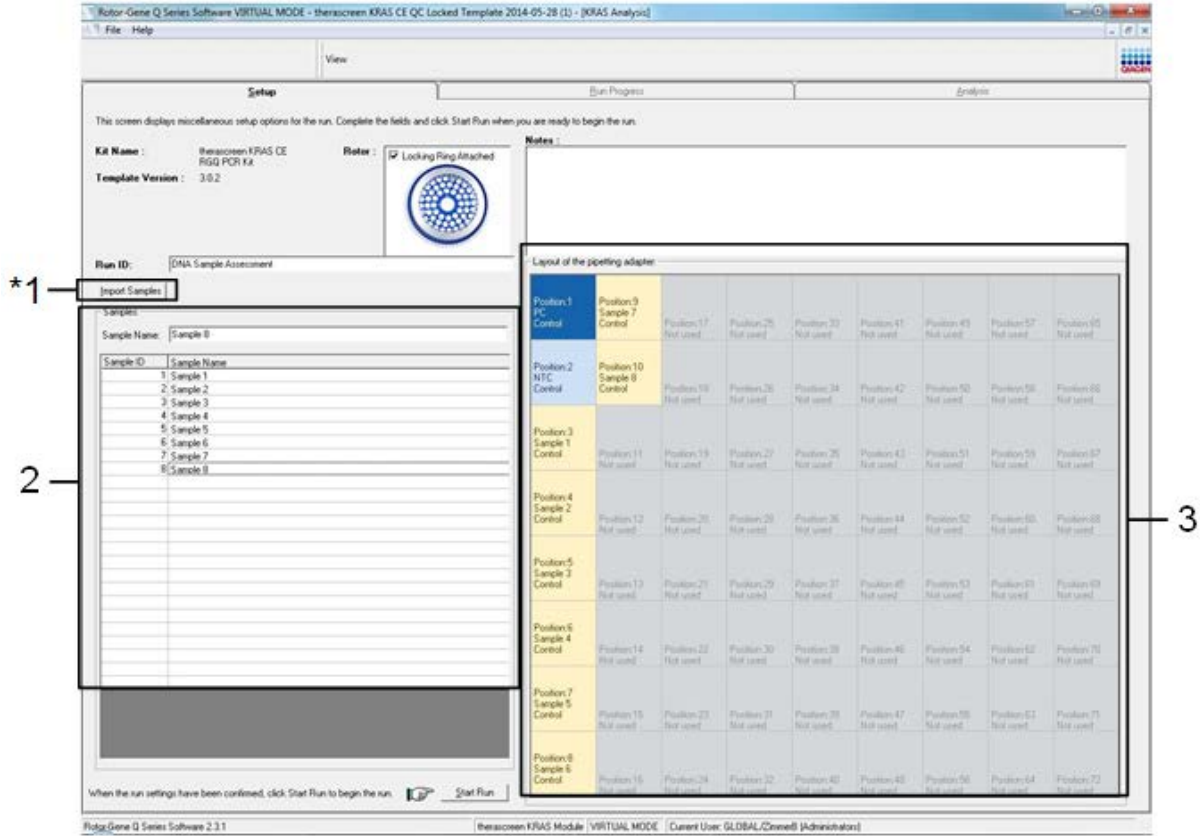


**Şekil 3. “Run ID” (Çalıştırma Kimliği) ve “Sample Name” (Örnek Adı) girilmesi.**

1 = “Run ID” (Çalıştırma Kimliği) diyalog alanı; 2 = “Import Samples” (Örnekleri Al) düğmesi; 3 = “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanı; 4 = örnek listesi; 5 = “Layout of the pipetting adapter” (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli.

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

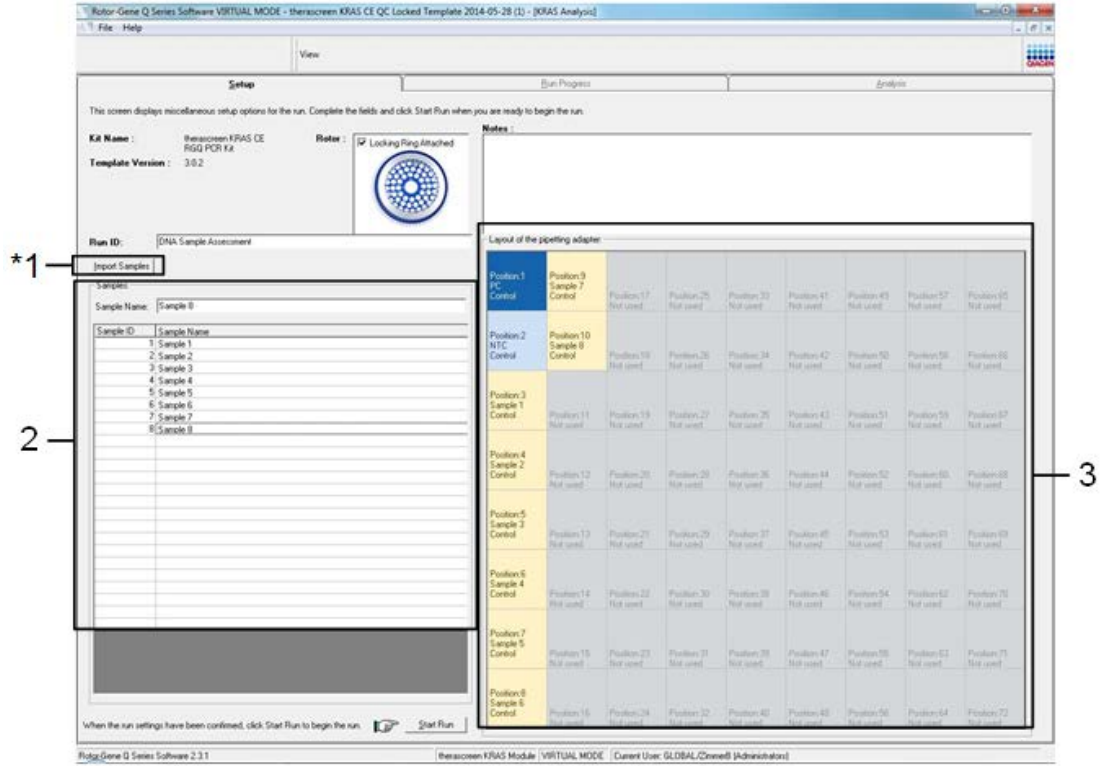
**Not:** Bir örnek adını düzenlemek için, örnek listesinden “Sample Name” (Örnek Adı) seçeneğine tıklayın; seçilen örnek yukarıdaki “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanında görünür. Örnek adını, lokal isimlendirme mevzuatınıza göre düzenleyin ve güncellemek için Enter tuşuna basın.



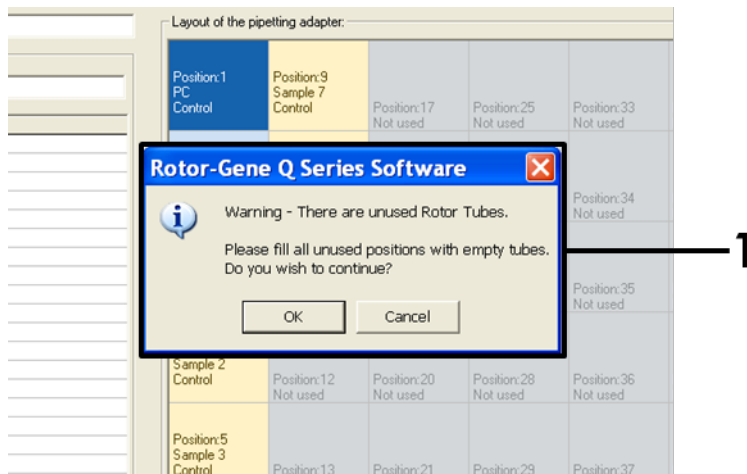
### Şekil 4. “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanına ilave örnek adları girme.

\*1 = “Import Sample” (Örnekleri Al) düğmesi, 2 = “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanı ve Sample List (Örnek Listesi), 3 = ek örnek adı olan “Layout of the pipetting adapter” (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli.

17. Tüm örnek adları girildiğinde doğru olduklarını kontrol edin. Gerekliyse “Notes” (Notlar) diyalog alanına ilave bilgiler girin ve “Start Run” (Çalışmayı Başlat) düğmesine tıklayın (Şekil 5).  
**Not:** Kullanılmayan bir rotor pozisyonu varsa bir “Warning” (Uyarı) belirir (Şekil 5 ve 6) ve kullanıcıya, tüm kullanılmayan pozisyonların kapatılmış boş bir tüple doldurulması gerektiğini hatırlatır. Kullanılmayan rotor pozisyonlarının kapatılmış boş bir tüple doldurulmuş olduğunu kontrol edin ve ilerlemek için “OK” (Tamam) seçeneğine tıklayın.

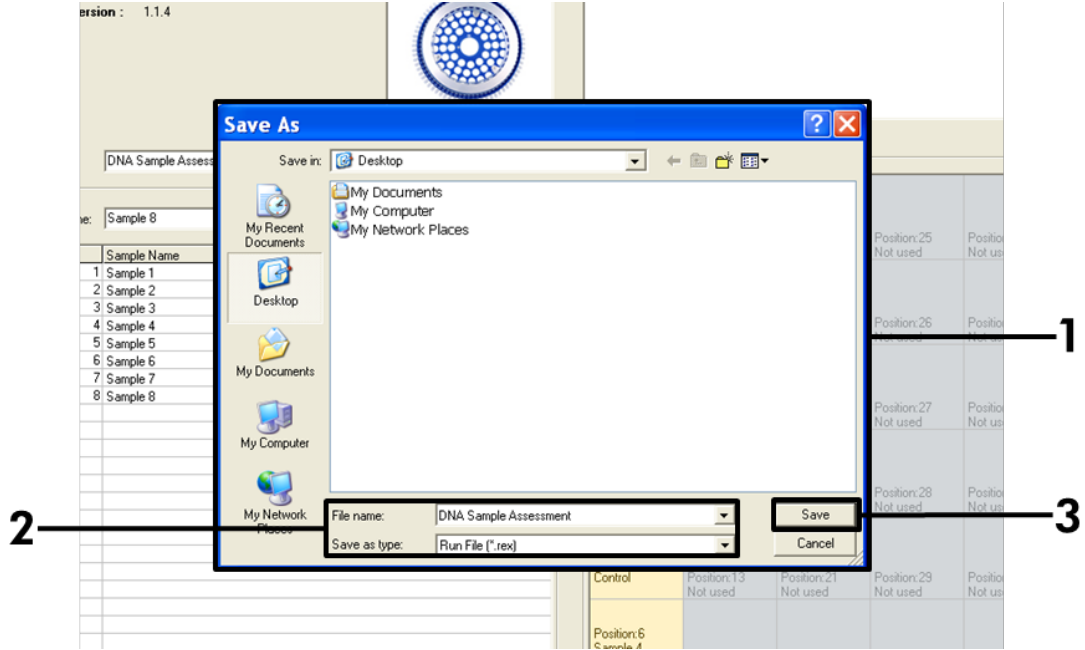


Şekil 5. “Notes” (Notlar) diyalog alanı, “Start Run” (Çalışmayı Başlat) ve kullanılmayan rotor pozisyonlarını bildiren “Warning” (Uyarı).



Şekil 6. 1 = kullanılmayan rotor pozisyonları hakkında “Warning” (Uyarı).

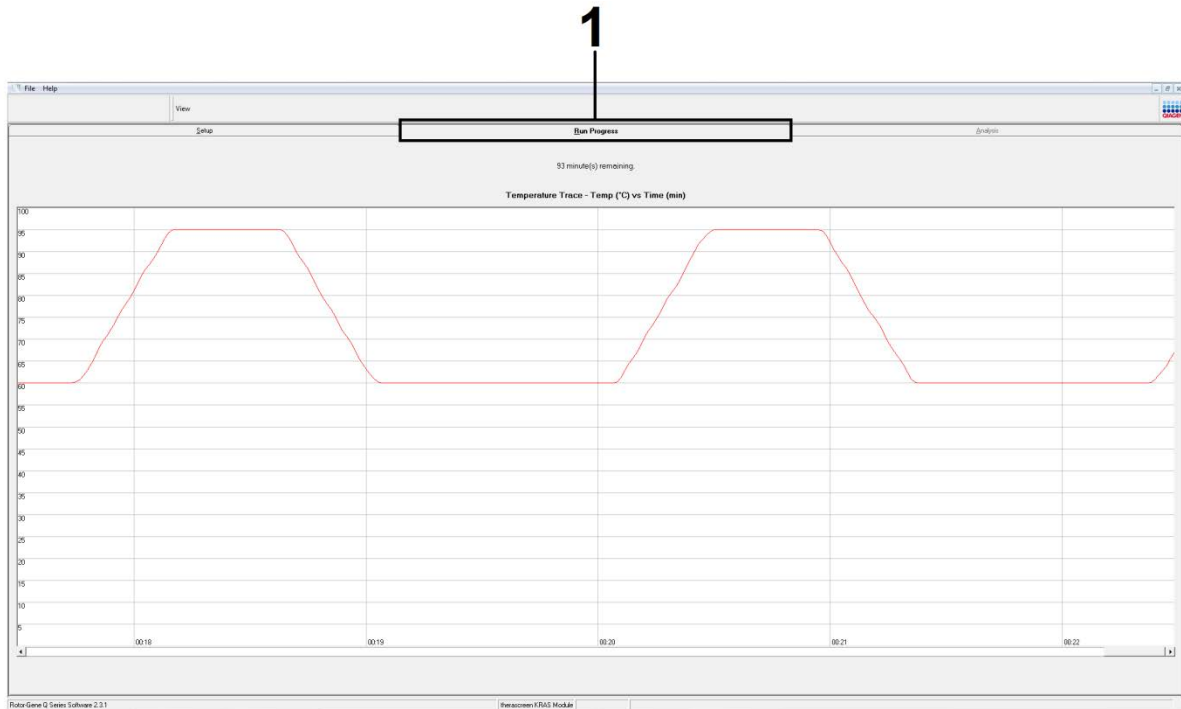
18. Bir “Save As” (Farklı Kaydet) penceresi açılır. Uygun dosya adını seçin ve PCR çalışmasını seçili konuma \*.rex çalışma dosyası olarak kaydedin. “Save” (Kaydet) düğmesine tıklayın (Şekil 7).



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

19. PCR çalışması başlar.

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



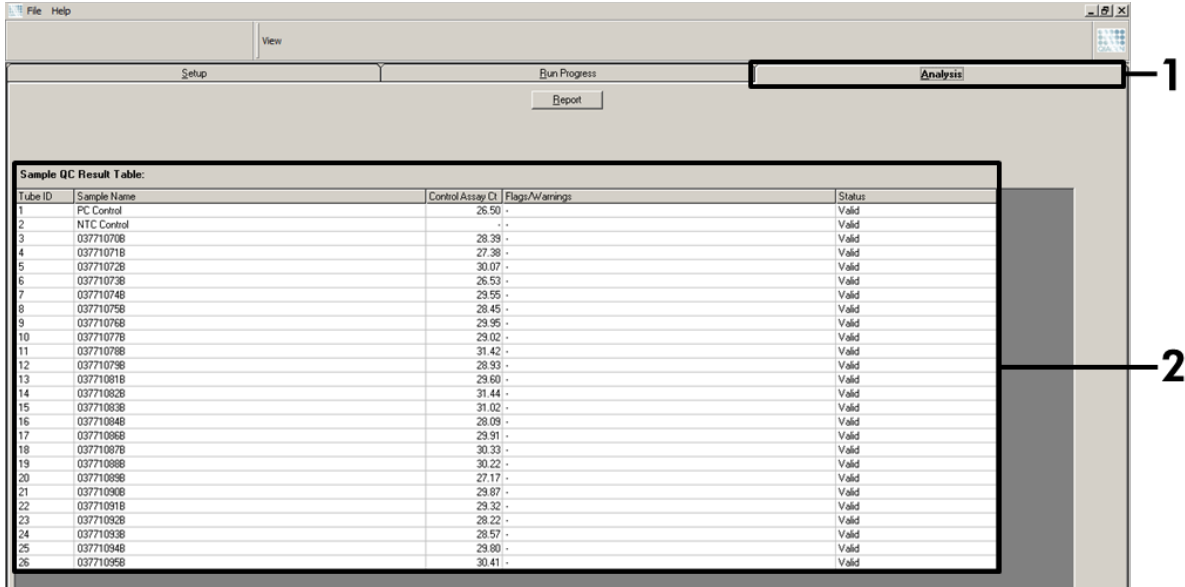
Şekil 8. “Run Progress” (Çalışma İlerlemesi) sekmesi.



## 20. Çalışma bittiğinde, “Analysis” (Analiz) sekmesi otomatik olarak açılır.

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

**Not:** Hesaplama yönteminin bir açıklaması “Sonuçların Yorumlanması” kısmında, sayfa 35 içinde sunulmuştur.



Şekil 9. “Analysis” (Analiz) sekmesi ve sonuç raporu. 1 = “Analysis” (Analiz) sekmesi; 2 = “Sample QC Result Table” (Örnek QC Sonuç Tablosu).

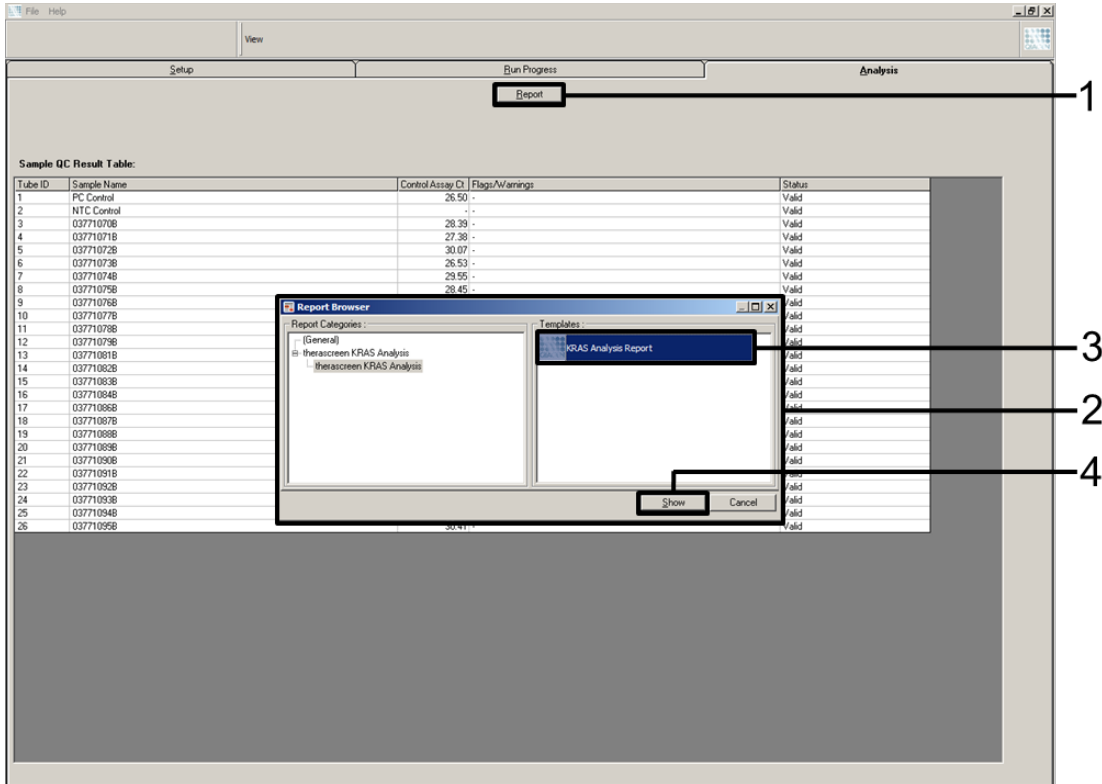
## 21. Kontrol sonuçları, “Sample QC Result Table” (Örnek QC Sonuç Tablosu) içinde aşağıdaki gibi raporlanır (Şekil 9'daki 2. resim).

- **Çalışma kontrolleri** (PC ve NTC, sırasıyla 1 ve 2 numaralı tüp pozisyonları): Sonuçlar kabul edilebilir aralıklar dahilindeyse “Valid” (Geçerli) ifadesi görüntülenir. Aksi halde “Invalid” (Geçersiz) şeklinde bir sonuç görülür.
- **Örnek kontrol reaksiyonu  $C_T > 32,00$ :** “Invalid” (Geçersiz) ifadesi görüntülenir. DNA miktarı mutasyon analizi için yeterli değil. Örneği yeniden test edin. DNA miktarı halen yetersizse, mümkünse daha fazla tümör dokusu alın (bkz. “Sorun giderme kılavuzu”, sayfa 36).
- **Örnek kontrol reaksiyonu  $C_T < 21,92$ :** “Invalid” (Geçersiz) ifadesi görüntülenir. DNA yoğunluğu mutasyon analizi için fazla yüksek. Seyreltme Amaçlı Nükleaz İçermeyen Su (Dil.) ile seyreltin ve yeniden test edin.  $C_T$  değeri 21,92 ila 32,00 olacak şekilde seyreltme yapın. 1:1 oranında seyreltme yapılması,  $C_T$  değerini yaklaşık 1,0 oranında artırır.
- **Örnek kontrol reaksiyonu  $C_T$  21,92–32,00 ( $21,92 \leq \text{Kontrol } C_T \leq 32,00$ ):** “Valid” (Geçerli) ifadesi görüntülenir. DNA yoğunluğu mutasyon analizi için uygun.

**Not:** Yeniden örnek alma veya seyreltme gerekirse, DNA yoğunluğunun kullanıma uygun olduğundan emin olmak için kontrol reaksiyonunu tekrarlayın.

22. “Report” (Raporla) seçeneğine tıklayarak rapor dosyaları oluşturulabilir. Bunu yaptığınızda “Report Browser” (Rapor Tarayıcısı) penceresi açılır. “Templates” (Şablonlar) altından “KRAS Analysis Report” (KRAS Analiz Raporu) seçeneğini seçin ve “Show” (Göster) seçeneğine tıklayın (Şekil 10).

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



**Şekil 10. “KRAS Analysis Report” (KRAS Analiz Raporu) seçeneğinin seçilmesi.**

1 = “Report” (Rapor); 2 = “Report Browser” (Rapor Tarayıcısı) penceresi; 3 = “KRAS Analysis Report” (KRAS Analiz Raporu); 4 = “Show” (Göster).

## Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti

Bu protokol KRAS mutasyonlarının tespiti içindir.

### Başlamadan önce önemli noktalar

- Bir örnek, örnek incelemesinde başarılı olduğu zaman KRAS mutasyon testi kullanılarak test edilebilir.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin etkili kullanımı için örnekler 72 kuyulu rotoru doldurmak için 7'li gruplar halinde gruplandırılmalıdır. Daha küçük gruplar, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile daha az örneğin test edilebileceği anlamına gelir.
- Rotor-Gene Q MDx cihazının ilk kullanımından önce, Rotor-Gene Q yazılım sürümüne karşılık gelen doğru *therascreen* KRAS Assay Package yazılımının yüklendiğinden emin olun (bkz. “Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu”, sayfa 86).

### Prosedür

1. Tuzların belirli noktalarda toplanmasını önlemek amacıyla, her bir tüpü 10 kez ters yüz ederek çözdürülmüş reaktifleri karıştırın. Karışım içeriğini tüpün altında toplamak için kısa süre santrifüj edin.
  2. Reaksiyon karışımının toplam hacminden daha az bir hacme bir pipet koyun ve 10 defa çekip iterek ana karışımları tamamen karıştırın.
  3. Hemen 20 µl ana karışımı her bir uygun PCR şerit tüpüne ekleyin.
- Not:** Reaksiyon karışımlarını hazırlarken tüp düzeni için Tablo 5'e bakın. KRAS mutasyonlarının tespiti için, ana karışımlar her bir DNA örneği için 8 PC tüpüne, 8 NTC tüpüne ve 8 tüpe eklenmelidir.

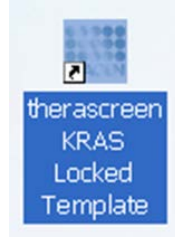
**Tablo 5. KRAS mutasyonlarının tespit edilmesi için yükleme bloğundaki çalıştırma düzeni**

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

\* Sayılar, yükleme bloğu içinde konumları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.

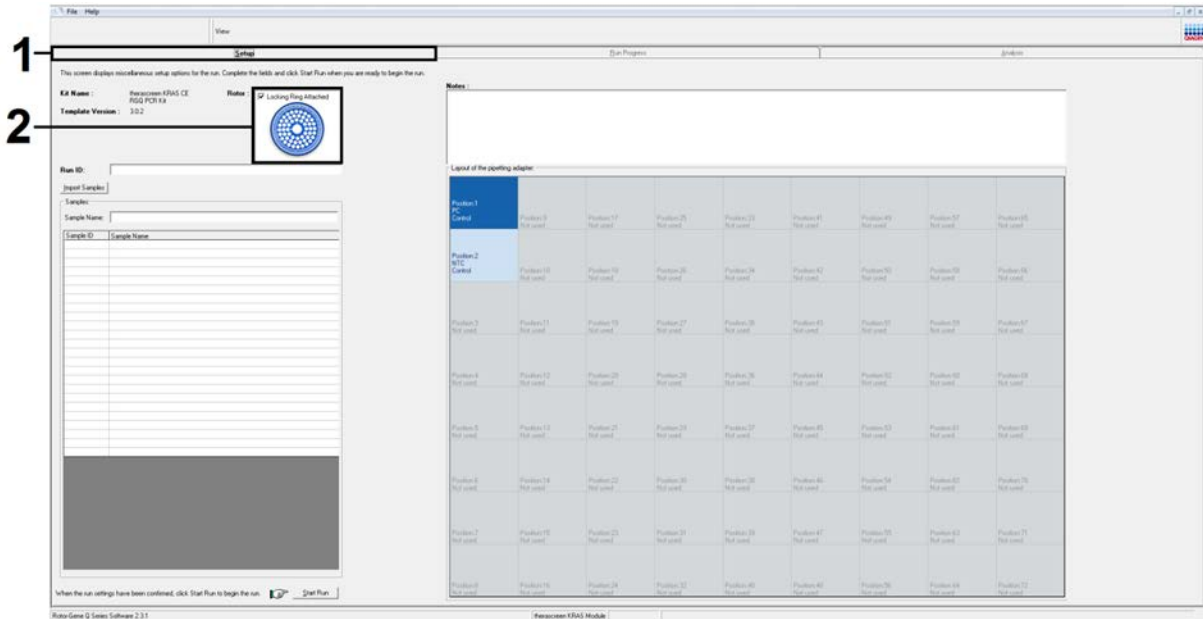
4. NTC tüplerine (tüp konumu 9 ila 16) hemen 5 µl Şablonsuz Kontrol (NTC) için nükleaz içermeyen su ekleyin ve tüpleri kapatın.
5. Örnek tüplerine (tüp konumları 17 ila 72) her bir DNA örneğinden 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın.
6. PC tüplerine (tüp konumu 1 ila 8) KRAS Pozitif Kontrol (PC) 5 µl ekleyin ve tüpleri kapatın.
7. Her bir PCR 4 şeritli tüp içindeki en düşük numaralı konumda bulunan ilk tüpün kapağını kalıcı markır ile işaretleyerek (örn. 1, 5 ve 9 numaralı konumlar), tüplerin Rotor-Gene Q MDx cihazındaki 72 kuyulu rotor içine yükleneceği yönü belirtin.
8. Kapatılmış tüpleri 4 kere ters çevirerek örnek ve reaksiyon karışımını karıştırın.
9. Tüm PCR 4 şeritli tüpleri, yön işaretlerinden yararlanarak çalıştırma düzenine göre (Tablo 5) 72 kuyulu rotor içinde uygun konumlara yerleştirin.  
**Not:** Her PCR çalışmasında en fazla 7 örnek kullanılabilir. Rotor tamamen dolmamışsa, tüm kullanılmayan pozisyonlar kapatılmış boş bir tüple doldurulmalıdır. Bu, Rotor-Gene Q MDx cihazının termal verimliliğinin korunmasını sağlar.
10. 72 kuyulu rotoru Rotor-Gene Q MDx cihazına yerleştirin. Kilitleme halkasının (Rotor-Gene Q MDx cihazıyla birlikte verilir) çalışma sırasında tüpleri sabitlemek için rotorun üstüne yerleştikten emin olun.

11. Rotor-Gene Q MDx yazılımını çalıştırın ve aynı anda Rotor-Gene Q cihazına bağlı dizüstü bilgisayarın masaüstündeki “therascreen KRAS Locked Template” (*therascreen* KRAS Kilitli Şablon) simgesine (Şekil 11) çift tıklayarak şablonu açın.



Şekil 11. “therascreen KRAS Locked Template” (*therascreen* KRAS Kilitli Şablon) simgesi.

12. Varsayılan olarak “Setup” (Kurulum) sekmesi görünür (Şekil 12). Kilitleme halkasının uygun şekilde takıldığını doğrulayın ve “Locking Ring Attached” (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. Rotor-Gene Q MDx cihazının kapağını kapatın.



Şekil 12. 1 = “Setup” (Kurulum) sekmesi; 2 = “Locking Ring Attached” (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu.

13. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre “Run ID” (Çalıştırma Kimliği) diyalog alanına çalıştırma kimliğini girin.
14. Lokal isimlendirme mevzuatınıza göre “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanına örnek adını girin ve Enter tuşuna basın.

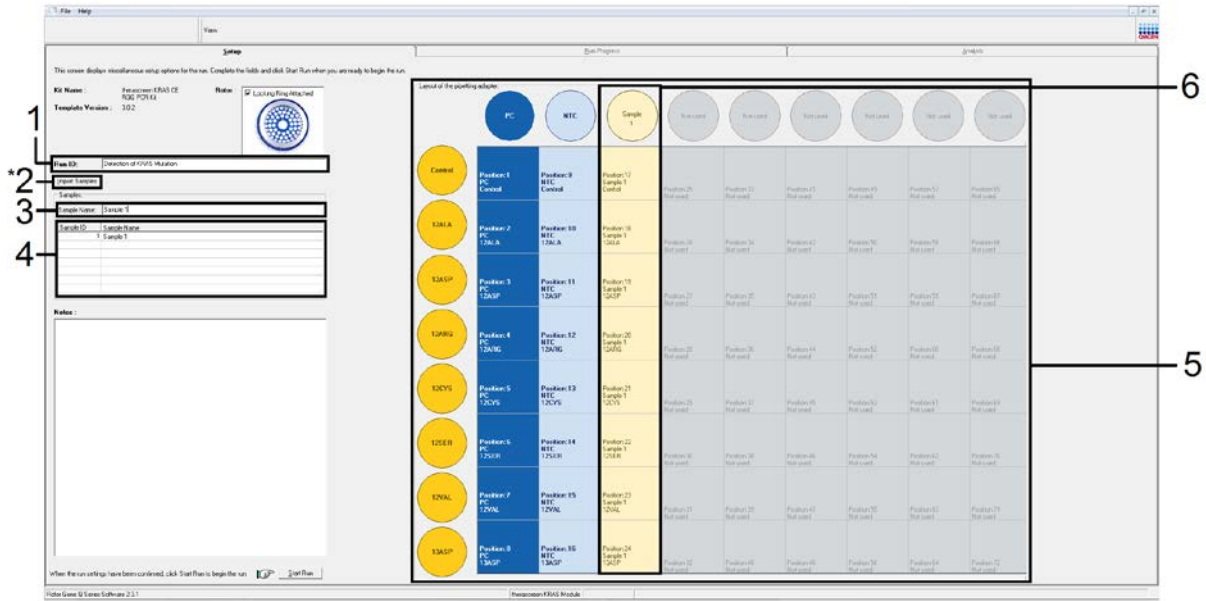
Bunu yapmak, örnek adını aşağıdaki örnek listesine ekler ve örneğe bir “Sample ID” (Örnek Kimliği) (1, 2, 3, vb.) verir. Ek olarak, sağ taraftaki “Layout of the pipetting adapter” (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli, örnek adını içerecek şekilde güncellenir (Şekil 13).

**Not:** “Layout of the pipetting adapter” (Pipetleme adaptörü düzeni) paneline örnek adının eklendiğinden ve bu adın renk değişimi ile vurgulandığından, ayrıca örnek döngüsü altındaki sütunda bulunan 8 testin de vurgulandığından emin olun (Şekil 13).

**Not:** En fazla 7 örnek eklenebilir. Örnek döngülerindeki örnek kimliklerine, 1 ile 7 arasında bir sayı otomatik olarak atanacaktır.

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

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

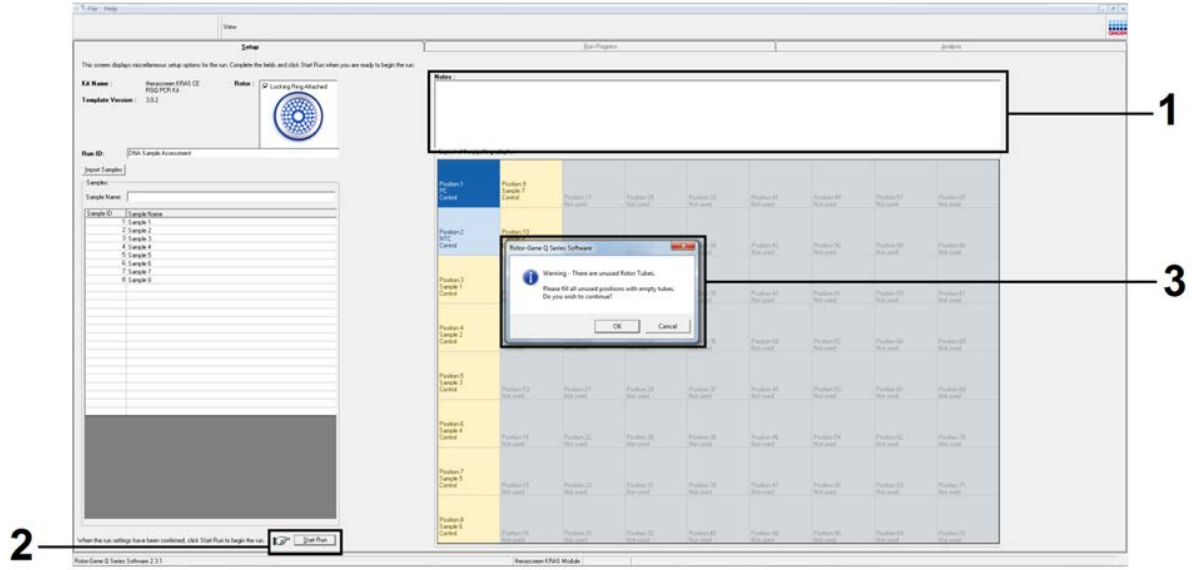


**Şekil 13. “Run ID” (Çalıştırma Kimliği) ve “Sample Name” (Örnek Adı) girilmesi.**

1 = “Run ID” (Çalıştırma Kimliği) diyalog alanı, 2 = “Import Sample” (Örneği Al) diyalog alanı (yazılımı sürümü 2.1 ile kullanılamaz), 3 = “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanı, 4 = örnek listesi, 5 = “Layout of the pipetting adapter” (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli, 6 = alttaki 8 testin vurgulanmış örnek döngüsü ve sütunu.

## 15. Tüm ilave örneklerin adını girmek için 14. adımı tekrarlayın (Şekil 14).

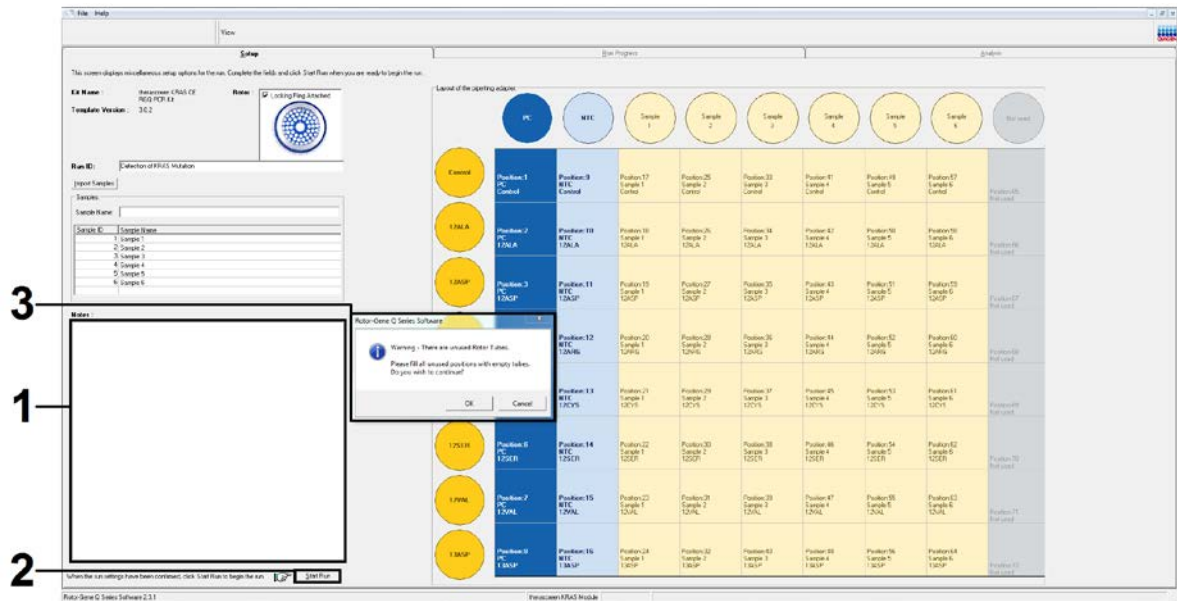
**Not:** Bir örnek adını düzenlemek için, örnek listesinden “Sample Name” (Örnek Adı) seçeneğine tıklayın; seçilen örnek yukarıdaki “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanında görünür. Örnek adını, lokal isimlendirme mevzuatınıza göre düzenleyin ve güncellemek için Enter tuşuna basın.



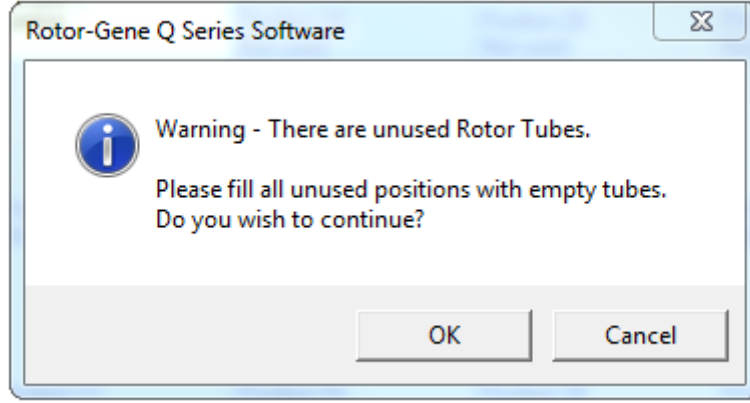
**Şekil 14. “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanına ilave örnek adları girme.**  
1 = “Sample Name” (Örnek Adı) diyalog alanı, 2 = örnek listesi, 3 = ek örnek adları olan “Layout of the pipetting adapter” (Pipetleme adaptörü düzeni) paneli.

## 16. Tüm örnek adları girildiğinde doğru olduklarını kontrol edin. Gerekliyse “Notes” (Notlar) diyalog alanına ilave bilgiler girin ve “Start Run” (Çalışmayı Başlat) düğmesine tıklayın (Şekil 15).

**Not:** Kullanılmayan bir rotor pozisyonu varsa bir “Warning” (Uyarı) belirir (Şekil 15 ve 16) ve kullanıcıya, tüm kullanılmayan pozisyonların kapatılmış boş bir tüple doldurulması gerektiğini hatırlatır. Kullanılmayan rotor pozisyonlarının kapatılmış boş bir tüple doldurulmuş olduğunu kontrol edin ve ilerlemek için “OK” (Tamam) seçeneğine tıklayın.

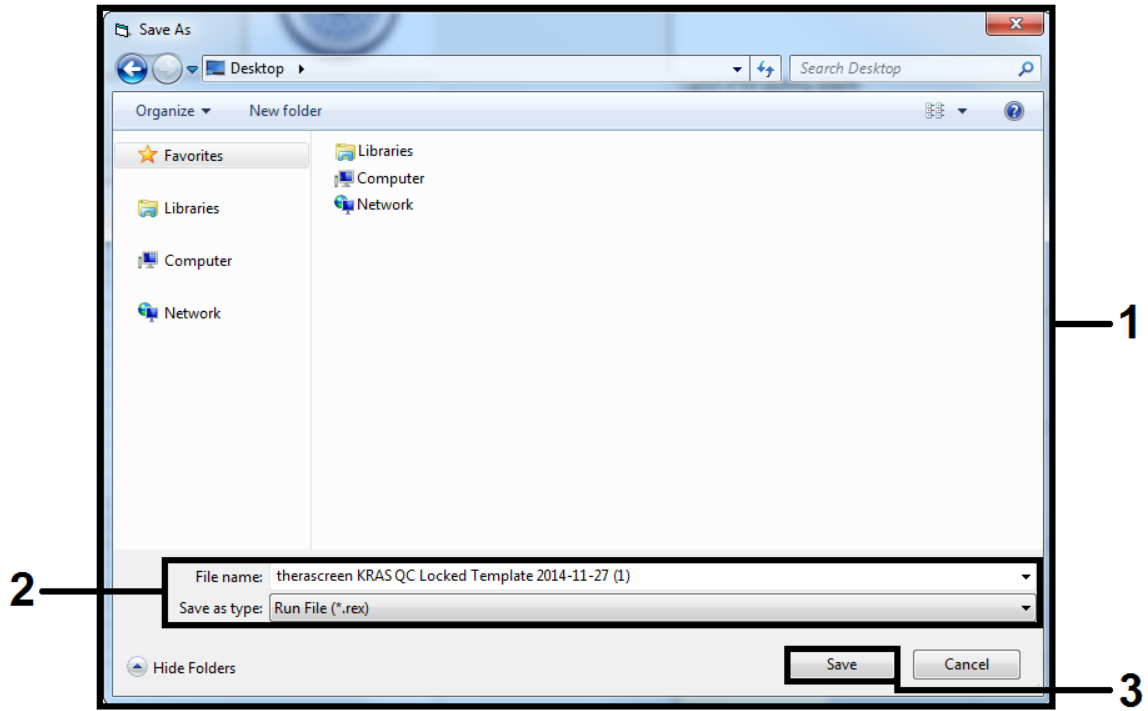


**Şekil 15. 1 = “Notes” (Notlar) diyalog alanı; 2 = “Start Run” (Çalışmayı Başlat); 3 = kullanılmayan rotor pozisyonlarını bildiren “Warning” (Uyarı).**



Şekil 16. Kullanılmayan rotor pozisyonları hakkında “Warning” (Uyarı).

17. Bir “Save As” (Farklı Kaydet) penceresi açılır. Uygun dosya adını seçin ve PCR çalışmasını seçili konuma \*.rex çalışma dosyası olarak kaydedin (Şekil 17).

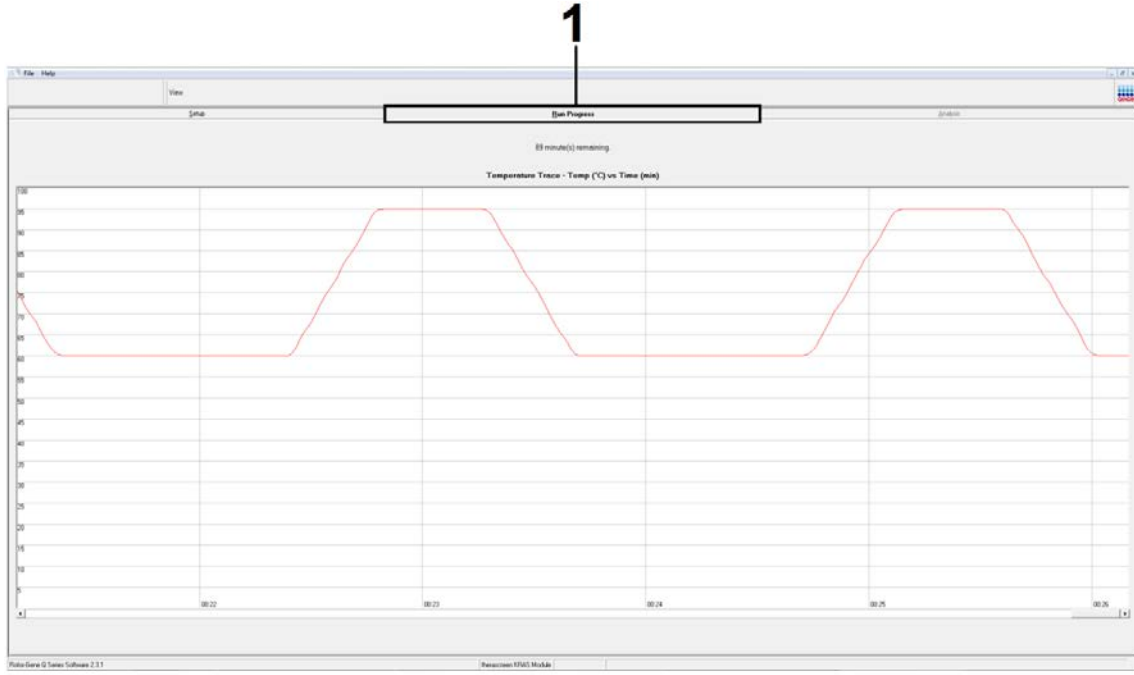


Şekil 17. Çalışma dosyası kaydediliyor.

18. PCR çalışması başlar.

**Not:** Çalışma başladığında, “Run Progress” (Çalışma İlerlemesi) sekmesi otomatik olarak açılarak sıcaklık takibi ve kalan çalışma süresi konusunda bilgi verir (Şekil 18).



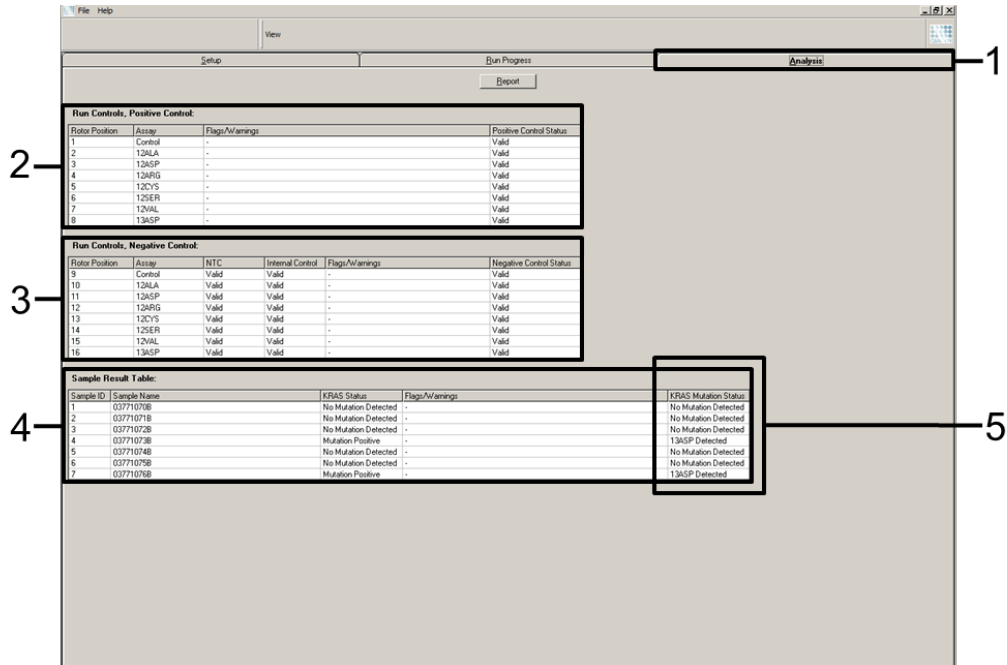


Şekil 18. 1 = “Run Progress” (Çalışma İlerlemesi) sekmesi.

## 19. Çalışma bittiğinde, “Analysis” (Analiz) sekmesi otomatik olarak açılır.

**Not:** “Analysis” (Analiz) sekmesi açılmazsa, bu sekmeye tıklamalısınız (Şekil 19).

**Not:** Hesaplama yönteminin bir açıklaması “Sonuçların Yorumlanması” kısmında, sayfa 35 içinde sunulmuştur.



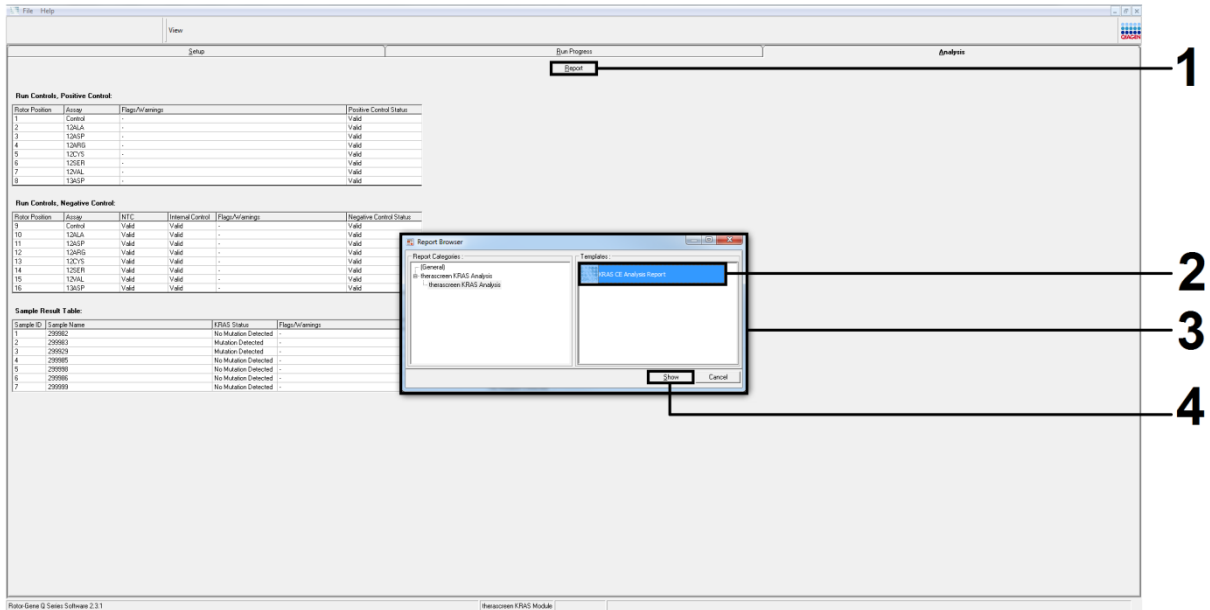
Şekil 19. “Analysis” (Analiz) sekmesi ve sonuç raporu. 1 = “Analysis” (Analiz) sekmesi; 2 = “Run Controls, Positive Control” (Çalışma Kontrolleri, Pozitif Kontrol) paneli; 3 = “Run Controls, Negative Control” (Çalışma Kontrolleri, Negatif Kontrol) paneli; 4 = “Sample Result Table” (Örnek Sonuç Tablosu); 5 = “KRAS Mutation Status” (KRAS Mutasyon Durumu) sütununa.

## 20. Test sonuçları aşağıdaki gibi raporlanır (Şekil 19):

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

## 21. “Report” (Raporla) seçeneğine tıklayarak rapor dosyaları oluşturulabilir. Bunu yaptığınızda “Report Browser” (Rapor Tarayıcısı) penceresi açılır. “Templates” (Şablonlar) altından “KRAS Analysis Report” (KRAS Analiz Raporu) seçeneğini seçin ve “Show” (Göster) seçeneğine tıklayın (Şekil 20).

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



**Şekil 20. “KRAS Analysis Report” (KRAS Analiz Raporu) seçeneğinin seçilmesi.**

1 = “Report” (Rapor); 2 = “Report Browser” (Rapor Tarayıcısı) penceresi; 3 = “KRAS Analysis Report” (KRAS Analiz Raporu); 4 = “Show” (Göster).

## Sonuçların Yorumlanması

Analiz ve mutasyon sonuçları, çalışma tamamlandıktan sonra *therascreen* KRAS Assay Package tarafından otomatik olarak çıkarılır. Aşağıdaki bilgiler, *therascreen* KRAS Assay Package'ın analiz ve mutasyon sonuçlarını nasıl çıkardığını açıklamaktadır.

**Not:** Manuel analiz için, bkz. “Ek 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokol”, sayfa 65.

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

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

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti için eşik değeri 0,05 göreceli floresan birim olarak ayarlanır. Bu değer, hem Yeşil hem Sarı renk floresan kanalları için *therascreen* KRAS Assay Package'da yapılandırılır. Eşik değeri, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin geliştirilmesi sırasında tanımlanmıştır.

Aşağıdaki denklemi kullanarak  $\Delta C_T$  değerini belirlemek için bir hesaplama yapılır:

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

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

Örnek  $\Delta C_T$  değerleri aynı örnekten elde edilen mutasyon testi  $C_T$  değeri ve kontrol testi  $C_T$  değeri arasındaki fark olarak hesaplanır. Örnekler bu teste ait eşik  $\Delta C_T$  değerine eşit veya bundan daha düşük  $\Delta C_T$  değeri verirse mutasyon pozitif olarak sınıflandırılır. Bu değer üzerinde, örnek ya *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti tarafından tespit edilebilecek mutasyon yüzdesinden (test limitinin dışında) daha az içerir ya da mutasyon negatiftir, bu ikinci durum “No Mutation Detected” (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) olarak raporlanır.

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

Test sonuçları “Mutation Positive” (Mutasyon Pozitif), “No Mutation Detected” (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi), “Invalid” (Geçersiz) veya çalışma kontrolü

başarısız olursa “Run Control Failed” (Çalışma Kontrolü Başarısız) şeklinde görüntülenir. Mutasyon pozitif örnekler için spesifik mutasyonlar raporlanır.

Görüntülenebilecek diğer olası sonuçlar, bu el kitabının 15. sayfasında “Protokol: DNA örneğinin incelenmesi” bölümünde ele alınmıştır.

Nadir de olsa, bir tümör birden fazla mutasyona sahip olabilir. Bu gibi durumlarda, en düşük  $\Delta C_T$  değerini veren mutasyon saptanır.

## Sorun giderme kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için ayrıca Teknik Destek Merkezimizdeki Sık Sorulan Sorular sayfasına da bakın: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN Teknik Servislerindeki uzmanlar her zaman bu el kitabındaki bilgiler ve protokoller ya da örnek ve test teknolojileriyle ilgili tüm sorularınızı yanıtlamaktan mutluluk duyar (iletişim bilgileri için arka kapağa bakın veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret edin).

### Yorum ve öneriler

#### Geçersiz sonuçlar

- |   |  |
|---|--|
| a) Bir veya daha fazla kit bileşenine ait saklama koşulları “Reaktif Saklama ve Kullanma” (sayfa 13) bölümünde verilen talimatlara uymadı | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |
| b) <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kitinin süresi dolmuş  | Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (bkz. kit etiketi) kontrol edin ve gerekirse yeni bir kit kullanın. |

#### NTC örnekleri FAM kanalında pozitif sonuç veriyor

- |   |  |
|---|--|
| PCR hazırlığı sırasında kontaminasyon meydana geldi | Tekrarlardaki yeni reaktiflerle PCR'ı tekrarlayın.<br>Mümkünse, test edilecek örneğin eklenmesinden sonra PCR tüplerini doğrudan kapatın.<br>Çalışma alanının ve cihazların düzenli aralıklarla dezenfekte edildiğinden emin olun. |
|---|--|

## ***therascreen* KRAS Assay Package tarafından oluşturulan işaretler**

Tablo 6'da *therascreen* KRAS Assay Package tarafından oluşturulabilecek olası işaretler, anlamları ve yapılması gereken eylemler verilmiştir.

**Tablo 6. *therascreen* KRAS Assay Package işaretleri**

<b>İşaret</b>	<b>Anlamı</b>	<b>Yapılacak Eylem</b>
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR çalışması geçersiz – kontrol reaksiyonunda FAM C <sub>T</sub> pozitif kontrol için aralık dışında.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR çalışması geçersiz – FAM C <sub>T</sub> bir veya daha fazla mutasyon kontrol reaksiyonu için aralık dışında.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR çalışması geçersiz — Pozitif kontrol (kontrol reaksiyon karışımı) içindeki floresan ışıma verileri yorumlanamıyor.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR çalışması geçersiz — Pozitif kontrol (mutasyon reaksiyon karışımı) içindeki floresan ışıma verileri yorumlanamıyor.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR çalışması geçersiz – internal kontrol, negatif kontrol için aralığın üstünde.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR çalışması geçersiz – internal kontrol, negatif kontrol için aralığın altında.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.

<b>İşaret</b>	<b>Anlamı</b>	<b>Yapılacak Eylem</b>
NTC_INVALID_CT	PCR çalışması geçersiz – FAM (limitten küçük), negatif kontrol için geçersiz.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
NTC_INVALID_DATA	PCR çalışması geçersiz – Negatif kontrol içindeki floresan ışıma verileri yorumlanamıyor.	Tüm PCR çalışmasını tekrarlayın.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Örnek geçersiz – Örnek kontrolü içindeki floresan ışıma verileri yorumlanamıyor.	İlgili örneği/örnekleri tekrar işlemek için yeni PCR kurun.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Örnek Geçersiz – örnek kontrolündeki FAM C <sub>T</sub> çok düşük.	C <sub>T</sub> değerini artırmak için örneği seyreltin. Bu seyreltme işlemi, kit içinde verilen suyla 1:1 oranında seyreltme yapmanın C <sub>T</sub> değerini 1,0 kadar yükselteceği varsayımına göre hesaplanmalıdır. Örnek seyreltildiğinde, örneği tekrar işlemek için yeni PCR kurun.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Örnek geçersiz – örnek kontrol reaksiyonundaki FAM C <sub>T</sub> çok yüksek.	Örneği tekrar işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.

<b>İşaret</b>	<b>Anlamı</b>	<b>Yapılacak Eylem</b>
SAMPLE_INT _CTRL_FAIL	İnternal kontrol (HEX) için C <sub>T</sub> çok yüksek (veya C <sub>T</sub> yok), FAM kanalı mutasyon negatif.	<p>Örnek geçerli durumda ise – eylem yok.</p> <p>CRC örnekleri: Örnek geçersiz durumda ise, örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınır, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.</p>

<b>İşaret</b>	<b>Anlamı</b>	<b>Yapılacak Eylem</b>
SAMPLE_INT _CTRL_FAIL (devam)		<p>NSCLC örnekleri: Örnek geçersiz durumda ise, son hacmi 40 µl'den yüksek olacak şekilde kalan örneği DIL işaretli tüpten alınan su ile 8'de 1 oranında seyreltin (yani örneğin 10 µl DNA ile DIL işaretli tüpten alınan 70 µl suyu karıştırın); örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınır, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Sonuç geçersizse, son hacmi 40 µl'den yüksek olacak şekilde kalan örneği DIL işaretli tüpten alınan su ile 8'de 1 oranında seyreltin ve bunu test edin. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.</p>



<b>İşaret</b>	<b>Anlamı</b>	<b>Yapılacak Eylem</b>
SAMPLE_INT_CTRL _EARLY_CT	Mutasyon tüpü geçersiz – C <sub>T</sub> HEX örnek (internal kontrol) için çok düşük	<p>Örnek geçerli durumda ise – eylem yok.</p> <p>Örnek geçersiz durumda ise, örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun.</p> <p>Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.</p>
SAMPLE_INVALID _DATA	Mutasyon tüpü geçersiz – internal kontrol içindeki floresan ışıma verileri yorumlanamıyor.	<p>Örnek geçerli durumda ise – eylem yok.</p> <p>Örnek geçersiz durumda ise, örneği yeniden işlemek için yeni PCR kurun. Tekrarlanan PCR çalışmasında da geçersiz sonuç alınırsa, yeni bir FFPE kesitinden örnek alın. Yeni alınan kesiti incelemek için yeni PCR kurun. Geçersizse, bu ikinci kesit için aynı işlemi tekrarlayın. Örnek bu çalışmadan sonra da geçerli sonuç vermiyorsa, örneğe belirsiz mutasyon durumu atanır ve daha fazla test yapılmaz.</p>

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

## Kalite Kontrol

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

## Sınırlamalar

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

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

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

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti yalnızca yabani tip ve mutant ayrımını yapmada kullanılabilir. Test, her bir mutant reaksiyonun, ölçülen spesifik mutant reaksiyon için en hassas olacağı şekilde tasarlanmıştır. Fakat, mutasyonun tespit edildiği örneklerde, diğer mutasyon reaksiyonlarıyla çapraz reaktivite görülebilir. Birden fazla mutant reaksiyon pozitifse, sonuç, en düşük  $\Delta C_T$  sonucuna sahip olandır.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti yalnızca FFPE CRC ve NSCLC dokusu için doğrulanmıştır.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti yalnızca, QIAamp DNA FFPE Doku Kiti ile birlikte kullanım için doğrulanmıştır. Yalnızca Rotor-Gene Q MDx, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile kullanım için doğrulanmıştır.

# Performans Özellikleri

## Analitik Performans

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

## Eşik Değer

Testin eşik değerlerini belirlemek için, CLSI EP17-A (2004) (8) içindeki yönergelerle uygun bir yöntem kullanılarak, 225 FFPE örneği test edilmiştir. Kontrol reaksiyonu  $C_T$  aralığı 21,92 ila 32,00 olarak saptanmıştır.  $C_T$  mutant reaksiyonlardan elde edilen, kontrol reaksiyonunun  $C_T$  değerine dayanan eşik değerleri ( $\Delta C_T$ ), Tablo 7'de gösterilmektedir.

**Tablo 7. Her mutasyon testi için belirlenen eşik değerleri**

	Mutasyon testi						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
<b>Eşik değeri</b> ( $\leq \Delta C_T$ )	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

## Boş örnek sınırı

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

### Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma: CRC

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

6 adet başarısız iki yönlü Sanger sıralama örneği hariç olmak üzere genel sonuçlar, aşağıdaki Tablo 8'de verilmektedir. Tablo 9'da, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile iki yönlü sıralama arasındaki uyumluluk analizi verilmektedir.

**Tablo 8. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile iki yönlü Sanger sıralamanın karşılaştırılması**

		İki yönlü sıralamadaki mutasyon sonucu							
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
therascreen KRAS RGQ PCR Kiti sonucu	Negatif	80	-	-	1	-	-	-	1
	Pozitif 12ALA	-	3	-	-	-	-	-	-
	Pozitif 12ARG	-	-	-	1	-	-	-	-
	Pozitif 12ASP	-	-	-	20	-	-	-	-
	Pozitif 12CYS	-	-	-	-	3	-	-	-
	Pozitif 12SER	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pozitif 12VAL	2	-	-	-	-	-	14	-
	Pozitif 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	11
	<b>Toplam</b>	<b>83</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>12</b>

**Tablo 9. Uyumluluk analizi**

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

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

Uyumluluk analizi, hem iki yönlü sıralamada hem de *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile incelemede geçerli sonuçlar veren 247 örnek üzerinden yürütülmüştür. 9 adet uyumsuz örnek bulunmuştur. Genel anlamda uyumluluk oranı %96,4'tür. Veriler, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin hassas performansını doğrulamaktadır (Tablo 10 ve 11).

**Tablo 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile iki yönlü Sanger sıralamanın karşılaştırılması (ikinci araştırma)**

therascreen KRAS RGQ PCR Kiti sonucu	İki yönlü sıralamadaki mutasyon sonucu									
	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Toplam	
	Negatif	132	-	-	-	-	1	-	-	133
	Pozitif 12ALA	-	10	-	-	-	-	-	-	10
	Pozitif 12ARG	5	-	5	-	-	-	-	-	10
	Pozitif 12ASP	-	-	-	31	-	-	-	-	31
	Pozitif 12CYS	1	-	-	-	11	-	-	-	12
	Pozitif 12SER	-	-	-	-	-	13	-	-	13
	Pozitif 12VAL	2	-	-	-	-	-	25	-	27
	Pozitif 13ASP	-	-	-	-	-	-	-	11	11
Toplam	140	10	5	31	11	14	25	11	247	

**Tablo 11. Uyumluluk analizi (ikinci araştırma)**

Uyumluluk ölçümü	Sıklık (%)	%95 Güven aralığı (CI)
Genel uyumluluk	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Pozitif uyumluluk oranı	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Negatif uyumluluk oranı	132/140 (94,29)	89,93–97,13

## Analitik referans yöntemi ile karşılaştırma: NSCLC

İki yönlü Sanger sıralama ile karşılaştırıldığında *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile test edilen NSCLC örneklerinin mutasyon durumundaki uyumluluğu ortaya koymak amacıyla klinik FFPE NSCLC örnekleri, kazıma, CNB veya FNA yoluyla alınmıştır. Test öncesinde, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti kullanılarak her örnekten DNA alınmıştır. Bu testin sonuçları, iki yönlü Sanger sıralamasından alınan sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

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

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile iki yönlü sıralama arasındaki uyumluluk, Tablo 12'de gösterilmiştir. İki yönlü Sanger sıralamada iki örnek çift mutasyon sonucu vermiştir. Bir mutasyon *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit sonucu ile aynı olduğundan, bu örnekler genel uyumluluk, pozitif uyumluluk ve negatif uyumluluk analizi açısından uyumlu olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 13).

**Tablo 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile iki yönlü Sanger sıralamanın karşılaştırılması**

iki yönlü sıralamadaki mutasyon sonucu

therascreen KRAS RGQ PCR Kiti sonucu									
	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Toplam
Negatif	261	1	-	4	6	2	5	1	280
Pozitif 12ALA	-	4	-	-	-	-	-	-	4
Pozitif 12ALA_12CYS	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Pozitif 12ARG	-	-	3	-	-	-	-	-	3
Pozitif 12ASP	-	-	-	14	-	-	-	-	14
Pozitif 12CYS	-	-	-	-	35	-	-	-	35
Pozitif 12SER	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Pozitif 12VAL	2	-	-	-	-	-	17	-	17
Pozitif 13ASP	1	-	-	-	-	-	-	4	5
Toplam	262	6	3	18	41	2	23	5	360

**Tablo 13. Uyumluluk analizi**

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

## Tespit Sınırı (LOD)

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin çalışma aralığı, örnekte bulunan ve kontrol reaksiyonu  $C_T$  değeri ile belirlenen çoğaltılabilir toplam DNA miktarına bağlıdır. Belirtilen test giriş aralığı, önceden belirlenen kontrol  $C_T$  aralığı olan 21,92–32,00 arasındır. Toplam çoğaltılabilir DNA belirlenen giriş aralığı dahilinde ve halen eşik  $\Delta C_T$  değerinin altında iken LOD, yabancı tür arka planında tespit edilen minimum mutant DNA yüzdesidir.

## CRC

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

Düşük ve yüksek girişli DNA veri setleri için her bir teste ayrı ayrı lojistik regresyon modelleri uygulanmıştır. Bu modellerde tepki değişkeni, saptanan mutasyonun (tespit = 1) ve saptanmayan mutasyonun (tespit = 0) ikili çıktısıdır; devamlı açıklayıcı değişken ise mutasyon seyreltmesinin  $\log_2$  yüzdesidir. LOD'ler, tahmini tespit olasılığı 0,95 olan mutasyon seyreltme oranı olarak hesaplanmıştır (Tablo 14).



**Tablo 14. FFPE hücre hatları kullanan her mutasyon testi için LOD değerleri**

Test	LOD C <sub>95</sub> (yabani tip DNA içinde mutant DNA yüzdesi)
12ALA	0,8
12ARG	2,6
12ASP	6,4
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

## NSCLC

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile yapılan testler için LOD, CRC dokusu kullanılarak belirlenmiş ve doğrulanmıştır. Bu LOD sonuçları NSCLC dokusu için tekrar doğrulanmıştır.

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

2. Kısımda ise, klinik FFPE NSCLC örneklerinin 3 numune alma yöntemi (kazıma, CNB ve FNA) için her bir mutasyonu temsil eden 96 kopyası, ilgili testin LOD'sine kadar seyreltilmiş ve incelenmiştir.

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

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

## DNA girişi ve doğrusalılık

### DNA giriş düzeyinin $\Delta C_T$ değerlerine etkisi

Farklı toplam DNA düzeylerine sahip örnekler aynı oranda mutant DNA içeriyorsa, ölçülen  $\Delta C_T$  değerlerinin sabit kalması beklenir. 8 adet FFPE hücre hattından alınan DNA kullanılarak, elde edilebilen en düşük kontrol reaksiyon  $C_T$  değerine sahip DNA havuzları oluşturulmuştur.

Her mutasyon reaksiyonu için seyreltme aralığı ve sonuçlardan alınan ortalama  $\Delta C_T$  değeri, Tablo 15 ve 16'de verilmektedir. Genel  $\Delta C_T$  değerleri, tüm testler için *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin çalışma aralığı boyunca tutarlıdır, bu durum DNA düzeyinin örnek mutasyonu sonucunun doğruluğunu etkilemediğini gösterir.

**Tablo 15. Giriş kontrol reaksiyon  $C_T$  aralığı boyunca DNA girişinin  $\Delta C_T$  değerlerine etkisi – CRC FFPE hücre hatları**

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

\* 12ASP için toplam kopya sayısı 27'dir.

**Tablo 16. Giriş kontrol reaksiyon  $C_T$  aralığı boyunca DNA girişinin  $\Delta C_T$  değerlerine etkisi – NSCLC FFPE örnekleri**

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

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

## **DNA girişinin bir fonksiyonu olarak doğrusallık/amplifikasyon**

Her bir mutasyon reaksiyonu için, kontrol reaksiyonuna kıyasla *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin çalışma aralığı boyunca PCR doğrusallığı ve amplifikasyon verimliliği gösterilmiştir. Amplifikasyon verimliliği, her mutasyon reaksiyonu ve kontrol reaksiyonu için  $[2(-1/eğim)] - 1$  olarak hesaplanmıştır.

Kontrolün mutant reaksiyona kıyasla amplifikasyon verimliliği;  $\Delta C_T$  değerinin, dolayısıyla da mutasyon sonucunun, testin çalışma aralığı boyunca tutarlı olduğunu gösterir. Verilerin bir özeti Tablo 17 ve 18'de görülebilir.

## **Mutasyon yüzdesinin bir fonksiyonu olarak doğrusallık/amplifikasyon**

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

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

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

**Tablo 17. Kontrol ve mutasyon reaksiyonlarında amplifikasyon verimliliği: CRC hücre hatları**

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

Örnek

**Tablo 18. Kontrol ve mutasyon reaksiyonlarında amplifikasyon verimliliği: NSCLC örnekleri**

		Kesişme noktasındaki standart yanılma		Hesaplanan eğitim	Standart yanılma (eğim)	İki taraflı alt güven limiti %95 (eğim)	İki taraflı üst güven limiti %95 (eğim)	Amplifikasyon verimliliği	Amplifikasyon verimliliklerinin farkı
		Kesişme noktası	standart yanılma						
<b>12ALA</b>	Kontrol C <sub>T</sub>	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	<b>0,94</b>	0,069
	12ALA C <sub>T</sub>	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	<b>1,01</b>	
<b>12ARG</b>	Kontrol C <sub>T</sub>	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	<b>0,94</b>	0,093
	12ARG C <sub>T</sub>	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	<b>1,04</b>	
<b>12ASP</b>	Kontrol C <sub>T</sub>	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	<b>0,96</b>	-0,001
	12ASP C <sub>T</sub>	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	<b>0,96</b>	
<b>12CYS</b>	Kontrol C <sub>T</sub>	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	<b>0,98</b>	0,019
	12CYS C <sub>T</sub>	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	<b>1,00</b>	
<b>12SER</b>	Kontrol C <sub>T</sub>	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	<b>0,97</b>	0,127
	12SER C <sub>T</sub>	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	<b>1,09</b>	
<b>12VAL</b>	Kontrol C <sub>T</sub>	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	<b>0,92</b>	0,011
	12VAL C <sub>T</sub>	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	<b>0,91</b>	
<b>13ASP</b>	Kontrol C <sub>T</sub>	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	<b>0,94</b>	0,066
	13ASPC <sub>T</sub>	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	<b>1,01</b>	

Örnek

## Engelleyici maddeler

Bu araştırmanın amacı, potansiyel olarak birbirini engelleyen maddelerin *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin performansı üzerine olan etkisini değerlendirmektir. Araştırma, test örneklerinin  $\Delta C_T$  değerleri ve mutasyon durumları üzerine çeşitli konsantrasyon düzeylerinde pik deneyleri yapılarak her bir maddenin etkisini analiz etme yoluyla yürütülmüştür. Test edilen DNA numunesi alma işlemindeki potansiyel olarak engelleyici maddeler: AL Tamponu, ATL Tamponu, etanol, parafin mumu, Proteinaz K, AW1 Yıkama Tamponu, AW2 Yıkama Tamponu ve ksilen. Kitten gelen son elüsyon tamponu olan ATE Tamponu da boş kontrol olarak teste sokulmuştur.

Normal kullanım esnasında karşılaşılabilecek beklenen konsantrasyonlarda, potansiyel engelleyici maddelerin hiçbirisi için, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin mutasyon pozitif örneklerle mutasyon negatif örnekleri ayırt etme kapasitesi üzerinde bir etki gözlenmemiştir.

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

## Çapraz kontaminasyon

Bu araştırmanın amacı, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti kullanılarak incelenen DNA örnekleri arasında görülen ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilen çapraz kontaminasyonun kapsamını belirlemektir. Potansiyel çapraz kontaminasyon kaynakları:

- Örnek alımı (yani slaytların kazınması)
- Örneklerin pipetlenmesi
- Örnek tüplerinin kapağının kapatılması
- Kullanım esnasında kit reaktiflerinin kontamine olması
- Test tüplerinin Rotor-Gene Q MDx cihazına yüklenmesi

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

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

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

## **Münhasırlık/çapraz reaktivite**

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti, 8 ayrı reaksiyondan oluşmaktadır. Bunlar, KRAS geninde polimorf olmayan bir bölgeyi tespit eden bir kontrol reaksiyonu ve 7 adet mutasyon spesifik reaksiyondur. 12 ve 13 kodonlarındaki yabancı tip KRAS sırasını özel olarak ölçen bir reaksiyon yoktur. 7 mutasyonun pozitif mutasyon sonucu vermemesi durumunda KRAS'tan “No Mutation Detected” (Hiçbir Mutasyon Tespit Edilmedi) sonucu alınır (örn. yabancı tip).

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

## **Spesifik olmayan amplifikasyon/çapraz reaktivite: yabancı tip KRAS DNA**

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

Kontrol  $C_T$  değerleri yaklaşık 22–23 olmuştur. Sonuçlar,  $\Delta C_T$  değerlerinin belirlenen eşikleri aştığını göstermiştir ve yabancı tip kopyaların en az %95'inin doğru sonucu verdiği görülmüştür.

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

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

Tablo 19 ve 20'de verilen ortalama  $\Delta C_T$  değerleri, mutant reaksiyonlar arasında çapraz reaktivite olduğunu göstermektedir. Her durumda sonuçlar, eşleşen mutasyon reaksiyonu ile birlikte doğru mutasyon sonucunun alındığını

göstermektedir (örn. en düşük  $\Delta C_T$  değeri doğru mutasyon sonucudur). Diğer tüm test işlemleri, saptanmamış veya  $\Delta C_T$  eşliğinin dışında sonuç vermiştir.

**Tablo 19. Yüksek giriş düzeyinde CRC FFPE hücre hattı DNA'sı kullanan mutasyon reaksiyonları arasındaki çapraz reaktivite ( $\Delta C_T$ )**

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

NA: Çapraz reaksiyon yok.

\* Eşleşen reaksiyonlardan gelen  $\Delta C_T$  değerleri.

† Eşik değeri altındaki çapraz reaktif reaksiyonlardan gelen  $\Delta C_T$ .

**Tablo 20. Yüksek giriş düzeyinde NSCLC FFPE hücre hattı DNA'sı kullanan mutasyon reaksiyonları arasındaki çapraz reaktivite ( $\Delta C_T$ )**

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

NA: Çapraz reaksiyon yok.

\* Eşleşen reaksiyonlardan gelen  $\Delta C_T$  değerleri.

† Eşik değeri altındaki çapraz reaktif reaksiyonlardan gelen  $\Delta C_T$ .



## Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

Bu araştırmanın amacı, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin laboratuvar içindeki (tekrarlanabilirlik) ve laboratuvarlar arasındaki (yeniden üretilebilirlik) hassasiyetini göstermektir. Hem mutasyon sonuçlarının doğruluğu hem de  $\Delta C_T$  değerlerinin hassasiyeti (Mutasyon Reaksiyonu ve Kontrol Reaksiyonu arasındaki  $C_T$  değeri farkı) raporlanmıştır.

### CRC

Bu incelemede klinik CRC örnekleri kullanılmıştır. Her bir mutasyon için bir adet yabani tip ve bir adet örnek, tüm örnekleri ve kontrolleri *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin 3 lotunda test eden 3 sahadaki 2 kullanıcı tarafından, 5 gün boyunca her gün, günde 2 kez, her çalışma için her bir örneğin 2 kopyası kullanılarak *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ile test edilmiştir. Her örnekteki her bir reaksiyon için elde edilen  $C_T$  ve  $\Delta C_T$  değerleri de değişim bileşeni analizi ile analiz edilmiştir.

Birçok lot, platform ve kullanıcı arasında, laboratuvar içinde ve arasında yapılan tüm testlerde, en az 39/40 doğru mutasyon sonucu alınmış ve düşük düzey mutant ( $3 \times \text{LOD}$ ) ve yabani tip örnekler için *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin yeniden üretilebilirliği ortaya koyulmuştur. Mutant ve yabani tip örnekler halinde  $3 \times \text{LOD}$  örneklerinin tahmini oranı, genel olarak ve alanların her biri için raporlanmıştır. Tüm testler ve örnek kombinasyonları için, 80 kopyanın en az 79'u doğru mutasyon sonucunu vermiştir (Tablo 21).

**Tablo 21. Genel doğru sonuç oranı**

Örnek	Mutasyon testi doğru sonuçları						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
<b>Mutant 3 x LOD</b>	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
<b>Yabani tip (düşük)</b>	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

### NSCLC

7 adet KRAS NSCLC mutasyonunun her biri için, 3 örnek alma yöntemini (kazıma, CNB ve FNA) temsil eden 3 örnek kullanılmıştır. 6 adet ilave yabani tip klinik örnek (3 örnek alma yöntemini temsil eden 2'şer) kullanılarak yabani tip DNA seyreltici havuzları oluşturulmuştur.

Çoklu numuneler, her bir mutasyon örneği için havuzlanmış ve her mutasyon için tek bir örnek havuzu hazırlanmıştır. Her mutasyon örneği havuzu,  $1 \times \text{LOD}$

ve 3 x LOD mutasyon düzeylerinde test örnekleri oluşturmak üzere seyreltilmiştir.

Bu araştırmada 3 ayrı sahadaki laboratuvarlar kullanılmıştır. 2 adet Rotor-Gene Q MDx cihazı, 2 kullanıcı, 2 adet *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti lotu ve günde 2 adet çalışma döngüsü (kullanıcı başına) ile birlikte art arda 16 gün boyunca elde edilen laboratuvar koşulları her sahada farklılık göstermektedir.

Tüm testler ve örnek kombinasyonları için, 288 kopyanın en az 284'ü doğru mutasyon sonucunu vermiştir. Tüm testler dahil olmak üzere doğru sonuçların genel oranı 1 x LOD grubu için %100'dür. Tüm testler dahil olmak üzere doğru sonuçların genel oranı 3 x LOD grubu için %99,6'dır. Mutasyon tespit edilmeyen (yabani tip) örnekler için doğru sonuçların genel oranı %100'dür (Tablo 22).

**Tablo 22. 1 x LOD, 3 x LOD ve yabani tip için doğru sonuçlar**

Mutasyon seviyesi	Test	Doğru sonuçlar	Doğru sonuçlar, %	İki taraflı %90 CI alt limiti
1 x 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 x 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
Yabani tip		285/285	100	98,95

## Örnek kullanım değişkenliği

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

### CRC

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

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

### NSCLC

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

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

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

## Örnek alma yöntemlerinin eşdeğerliği (yalnızca NSCLC)

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

Bu araştırma için, cerrahi kazıma ile alınmış örnekten “hastayla eşleştirilen” CNB ve FNA örnekleri alınarak, her 3 yöntemle de aynı tümörün elde edilebilmesi sağlanmak istenmiştir. Bu araştırmada, toplamda 169 kazıma, 169 CNB ve 169 FNA örneği kullanılmıştır.

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

Ek olarak, klinik FFPE NSCLC örneklerinin her birinde, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti analizi için kullanılan DNA numunesi, aynı zamanda iki yönlü Sanger sıralaması ile incelenerek *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti ve iki yönlü Sanger sıralaması arasındaki uyumluluk düzeyi belirlenmiştir. Tüm örnek türlerinde, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti mutasyon durumunu iki yönlü Sanger sıralamasına kıyasla doğru şekilde vermiştir ve genel uyumluluk oranı %96,96'dır.

Bu araştırmanın sonuçları, çift halindeki genel uyumluluk yüzdesi tarafından belirtildiği şekilde, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kitinin 3 numune alma yönteminde eşdeğer sonuçlar verdiğini göstermektedir:

- CNB ile FNA karşılaştırması 97,52 (güven limitleri 94,41–99,15)
- CNB ile kazıma karşılaştırması 96,39 (güven limitleri 92,99–98,41)
- FNA ile kazıma karşılaştırması 98,76 (güven limitleri 96,14–99,78)

## Referanslar

### Alıntı yapılan referanslar

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

### Faydalı referanslar

- Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.
- Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.
- Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).
- Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.
- De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.
- Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.

- Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage 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).

## Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:



<N>

<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Son kullanma



İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



İçerik



Numara



Yetkili Temsilci

Rn

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



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanım talimatlarına bakın



Dikkat

## İletişim Bilgileri

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



# Ek 1: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit Manuel Protokol

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

## Genel bilgiler

- Gereken malzemeler için, bkz. “Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler”, sayfa 11.
- Örnek hazırlama ve örnek düzeni ile ilgili tüm talimatlar için, “Protokol: DNA örneğinin incelenmesi”, sayfa 15 ve “Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti”, sayfa 27.

## Protokol: Sıcaklık profili oluşturma

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

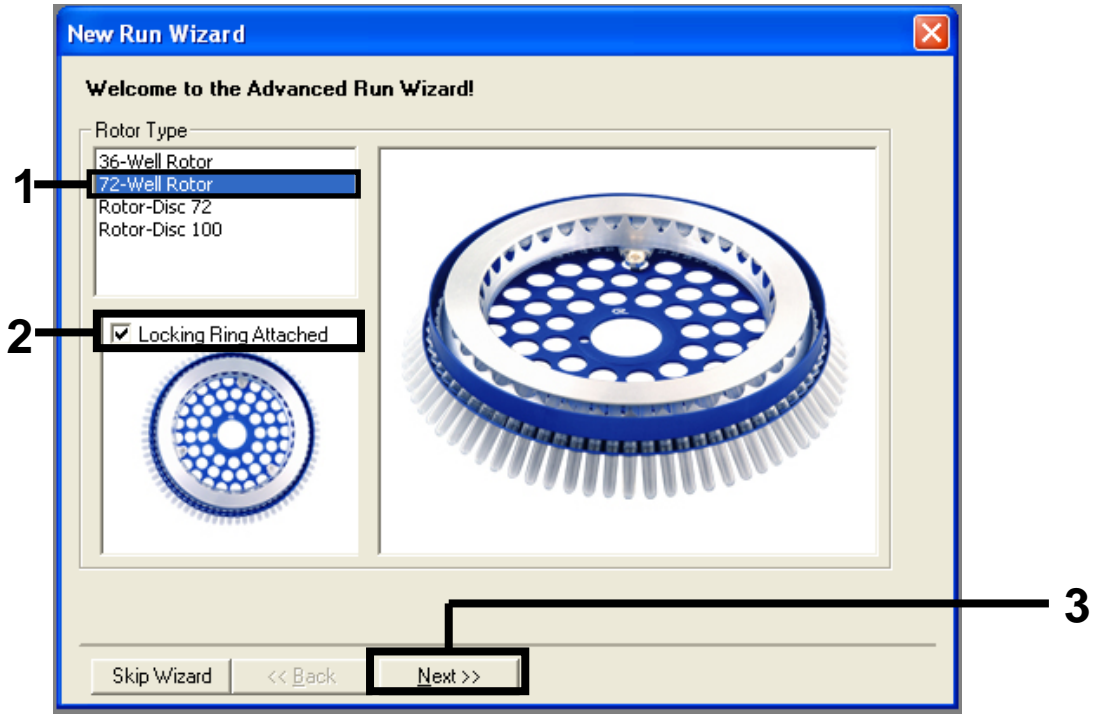
## Prosedür

Döngü parametreleri Tablo 23'te gösterilmiştir.

**Tablo 23. Döngü parametreleri**

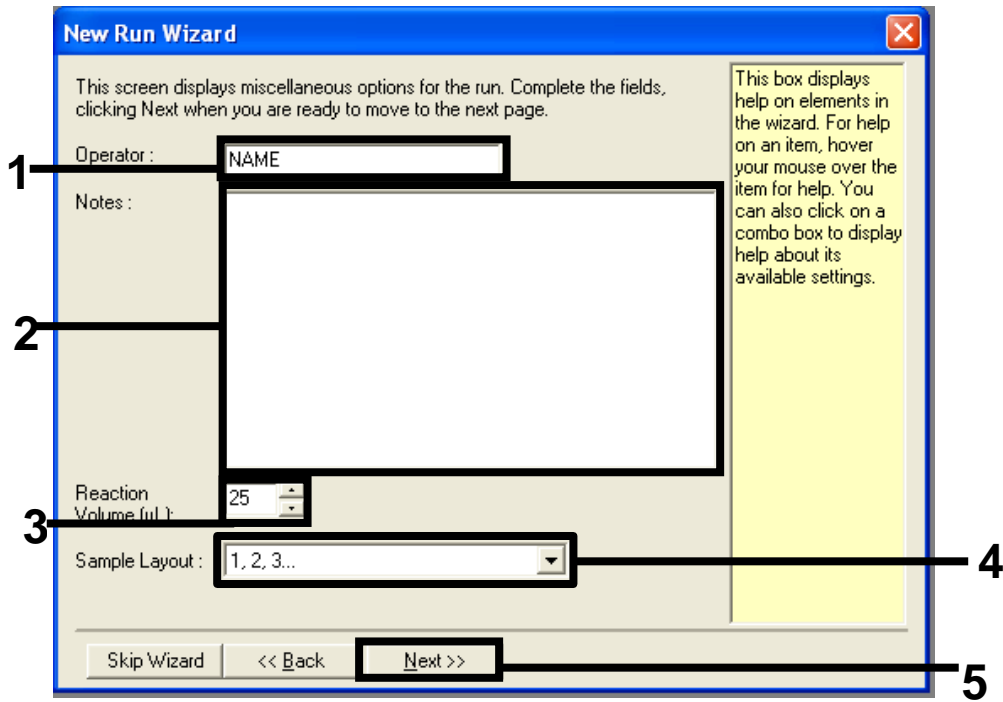
Döngü	Sıcaklık	Süre	Veri taraması
1	95°C	15 dakika	Yok
40	95°C	30 saniye	Yok
	60°C	60 saniye	Yeşil ve sarı

1. Rotor-Gene Q MDx cihazına bağlı olan dizüstü bilgisayarın masaüstündeki Rotor-Gene Q Series Software 2.3 yazılımı simgesine çift tıklayın. Görüntülenen “New Run” (Yeni çalışma) iletişim kutusunda “Advanced” (Gelişmiş) sekmesini seçin.
2. Yeni şablon oluşturmak için “Empty Run” (Boş Çalışma) seçimini yapın ve ardından “New Run Wizard”a (Yeni Çalışma Sihirbazı) girmek için “New” (Yeni) seçeneğine tıklayın.
3. Rotor tipi olarak “72-Well Rotor” (72 Kuyulu Rotor) seçimini yapın. Kilitleme halkasının takıldığını doğrulayın ve “Locking Ring Attached” (Kilitleme Halkası Takılı) kutusunu işaretleyin. “Next” (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 21).



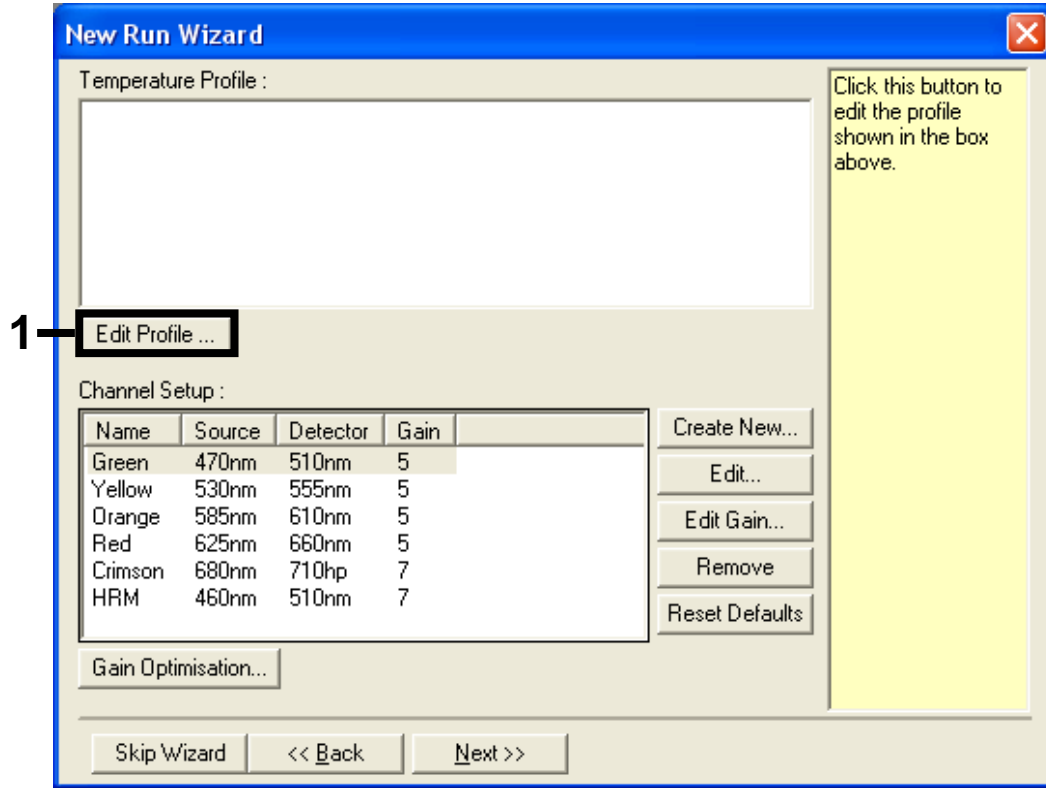
**Şekil 21. “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu.** 1 = “Rotor Type” (Rotor tipi); 2 = “Locking Ring Attached” (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu; 3 = “Next” (İleri).

4. Operatörün adını girin. Herhangi bir not ekleyin ve reaction volume (reaksiyon hacmi) değerini 25 olarak girin. “Sample Layout” (Örnek Düzeni) kısmının “1, 2, 3...” olarak okunduğundan emin olun. “Next” (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 22).



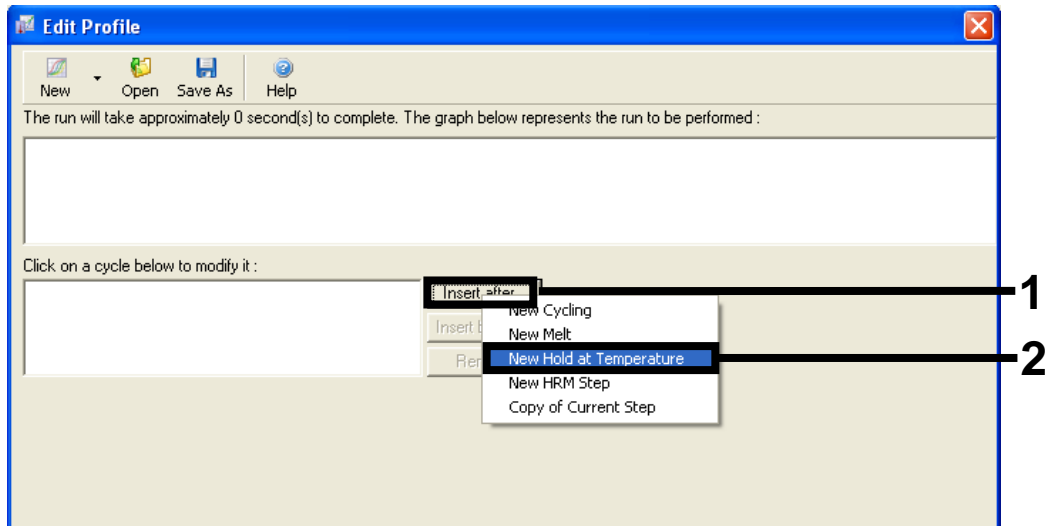
**Şekil 22. Operatör adı ve reaksiyon hacimlerini girme.** 1 = “Operator” (Operatör) diyalog alanı; 2 = “Notes” (Notlar) diyalog alanı; 3 = “Reaction Volume” (Reaksiyon Hacmi) alanı; 4 = “Sample Layout” (Örnek Düzeni); 5 = “Next” (İleri).

5. Bir sonraki “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusundaki “Edit Profile” (Profili düzenle) düğmesine tıklayın (Şekil 23) ve sıcaklık profilini aşağıdaki adımda yer alan bilgilere göre programlayın.



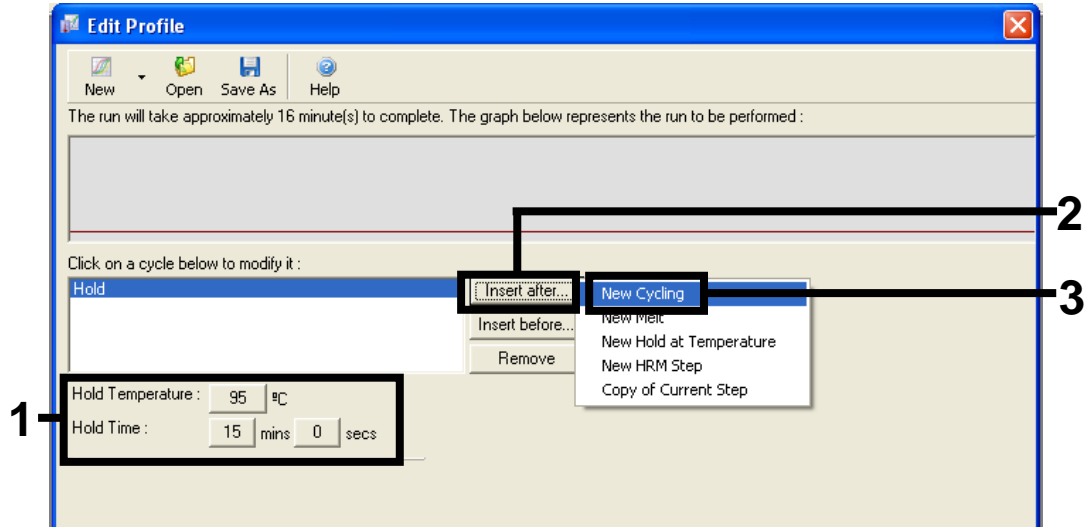
Şekil 23. Profilin düzenlenmesi.

6. “Insert after” (Sonra Ekle) düğmesine tıklayın ve “New Hold at Temperature” (Yeni Sıcaklık Tutma) seçimini yapın (Şekil 24).



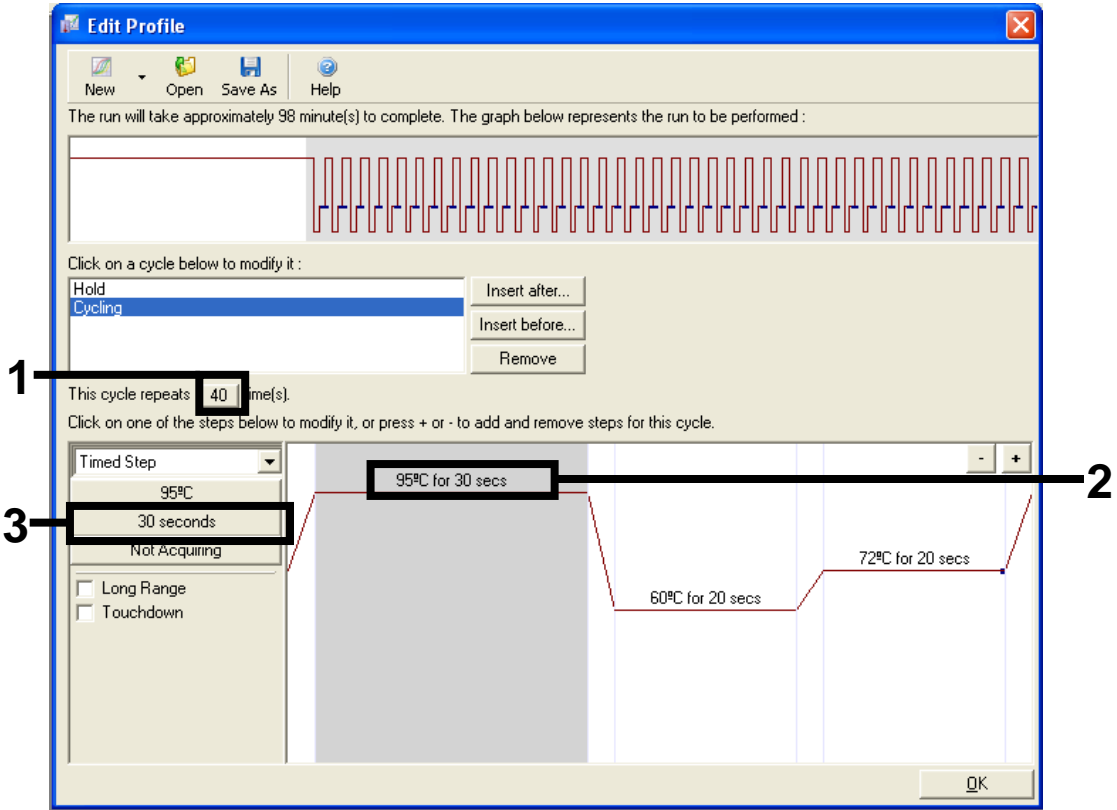
Şekil 24. Başlangıç inkübasyon adımı ekleme. 1 = “Insert after” (Sonra Ekle); 2 = “New Hold at Temperature” (Yeni Sıcaklık Tutma).

7. “Hold Temperature” (Tutma Sıcaklığı) seçeneğini 95°C ve “Hold Time” (Tutma Süresi) seçeneğini “15 mins 0 secs” (15 dak. 0 sn.) olarak değiştirin. “Insert After” (Sonra Ekle) düğmesine tıklayın ve ardından “New Cycling” (Yeni Döngü) seçimini yapın (Şekil 25.).



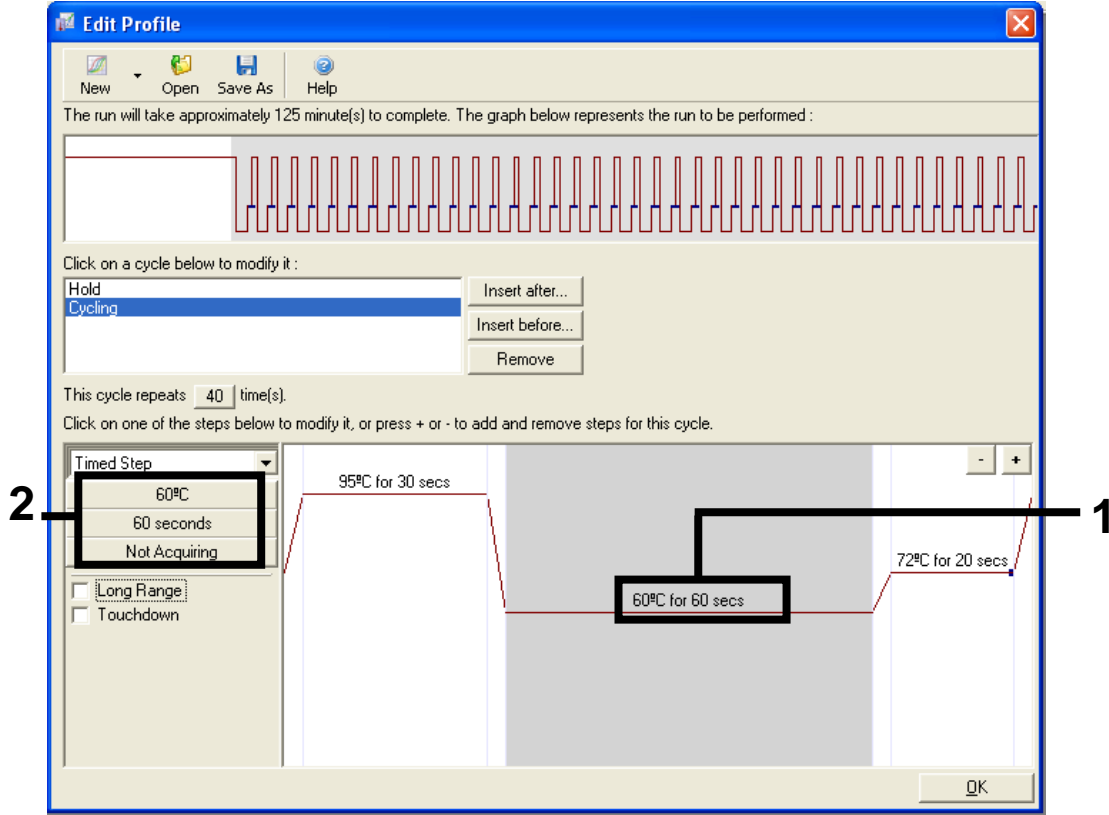
Şekil 25. 95°C'de başlangıç inkübasyon adımı. 1 = “Hold Temperature” (Tutma Sıcaklığı) ve “Hold Time” (Tutma Süresi); 2 = “Insert after” (Sonra Ekle); 3 = “New Cycling” (Yeni Döngü).

8. “Cycle repeats” (Döngü tekrarları) sayısını 40 olarak değiştirin. İlk adımı seçin ve “95°C for 30 secs” (30 sn. süreyle 95°C) olarak ayarlayın (Şekil 26).



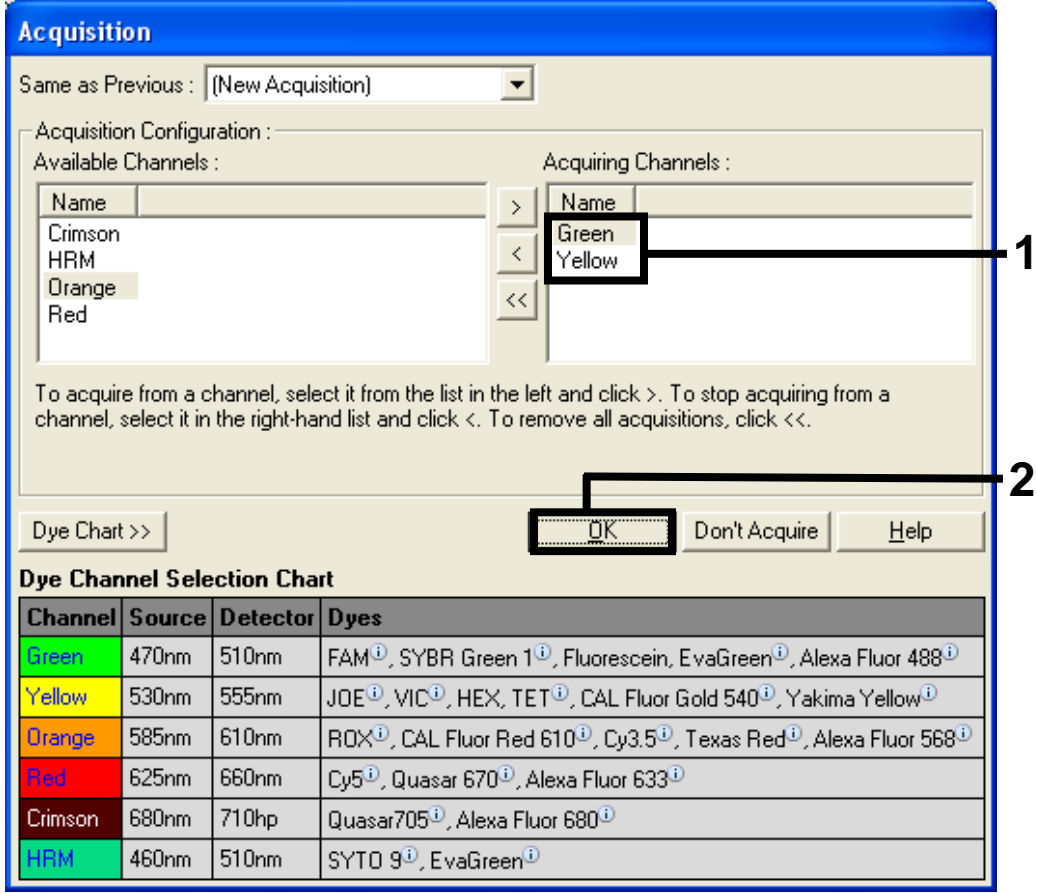
Şekil 26. 95°C'de döngü adımı. 1 = “Cycle repeats” (Döngü tekrarları) kutusu; 2 = Adım bir: sıcaklık ayarı; 3 = Adım bir: süre ayarı.

9. İkinci adımı vurgulayın ve “60°C for 60 secs” (60 sn. süreyle 60°C) olarak ayarlayın. “Not Acquiring” (Alınmıyor) düğmesini seçerek bu adım sırasında veri alımını etkinleştirin (Şekil 27).



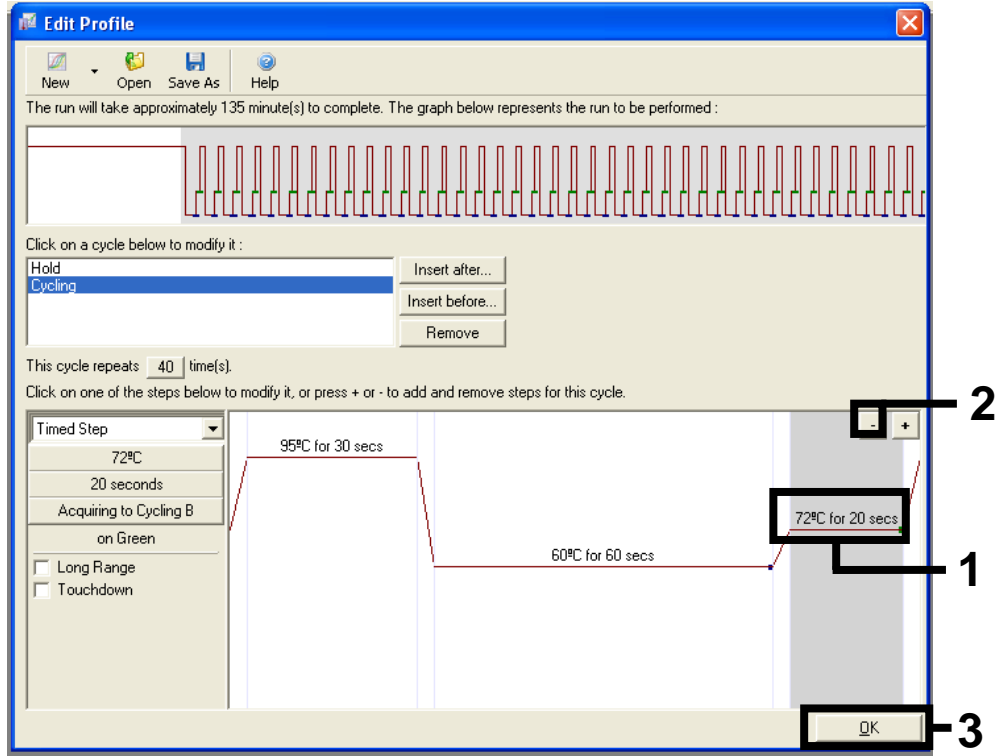
Şekil 27. 60°C'de döngü adımı. 1 = Adım iki: sıcaklık ve süre ayarı; 2 = “Not Acquiring” (Alınmıyor).

Kanalları “Available Channels” (Kullanılabilir Kanallar) listesinden aktarmak için “>” düğmesini seçerek tarama kanallarını Green (Yeşil) ve Yellow (Sarı) olarak ayarlayın. “OK” (Tamam) düğmesine tıklayın (Şekil 28).



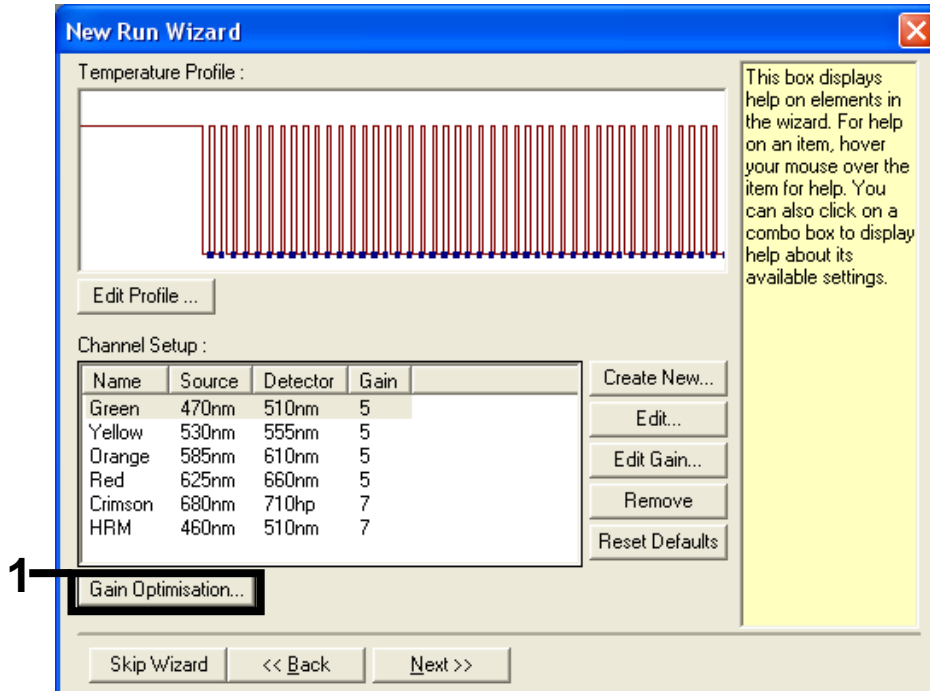
Şekil 28. 60°C döngü adımıdaki tarama.

10. Üçüncü adımı vurgulayın ve “-” düğmesine tıklayarak silin. “OK” (Tamam) düğmesine tıklayın (Şekil 29).



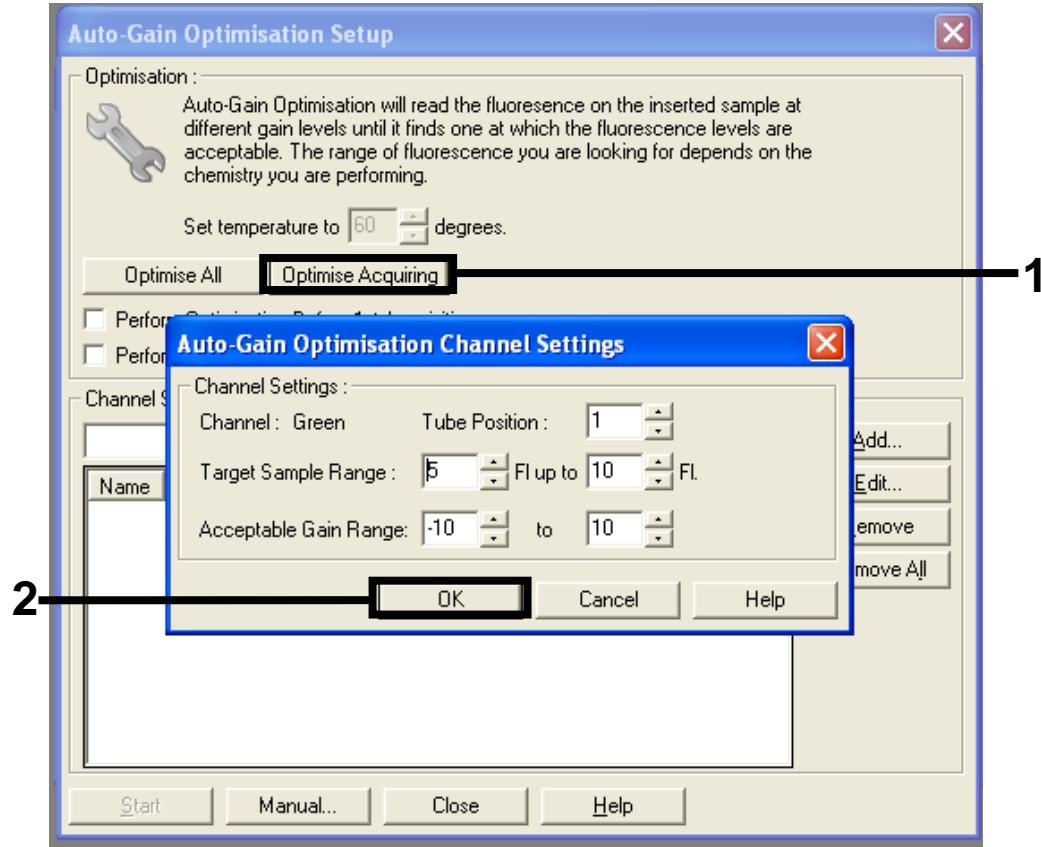
Şekil 29. Uzama adımının kaldırılması.

11. Bir sonraki iletişim kutusunda, “Gain Optimisation” (Optimizasyon Sağlama) seçeneğine tıklayın (Şekil 30).



Şekil 30. Optimizasyon sağlama.

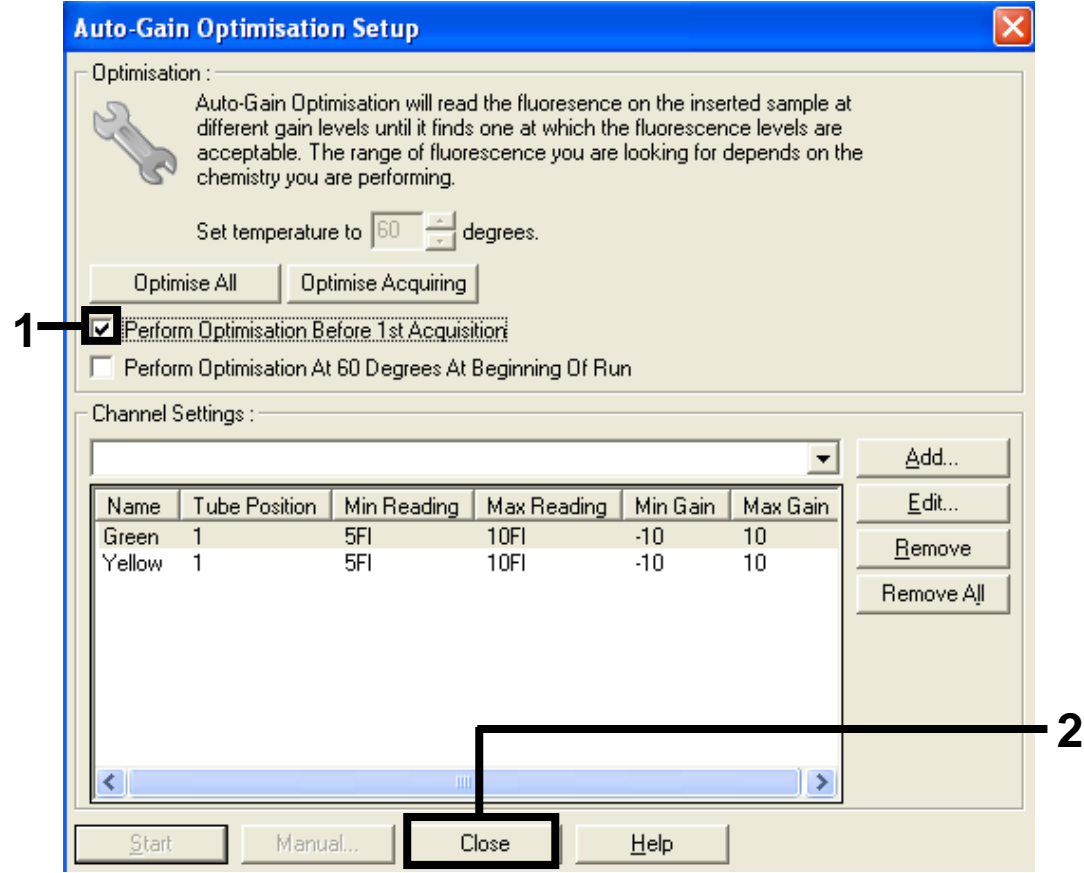
12. “Optimise Acquiring” (Taramayı Optimize Et) düğmesine tıklayın. Her bir kanal için kanal ayarları görüntülenir. İki kanal için de “OK” (TAMAM) düğmesine tıklayarak varsayılan bu değerleri kabul edin (Şekil 31).



Şekil 31. Yeşil kanal için otomatik optimizasyon sağlama.



13. “Perform Optimisation before 1st Acquisition” (Optimizasyonu İlk Taramadan Önce Gerçekleştir) kutusunu işaretleyin ve ardından sihirbaza dönmek için “Close” (Kapat) düğmesine tıklayın (Şekil 32).



Şekil 32. Yeşil ve sarı kanalların seçimi.

14. “Save Template” (Şablonu Kaydet) seçimini yaparak şablonu uygun konuma kaydetmek için “Next” (Sonraki) düğmesine tıklayın.

#### Protokol: Örnek değerlendirme (manuel)

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

- Örnekleri, sayfa 15, “Protokol: DNA örneğinin incelenmesi” bölümünde açıklandığı şekilde hazırlayın.
- Rotor-Gene Q MDx cihazındaki PCR çalışmasını, sayfa 74, “Protokol: *therascreen* KRAS PCR RGQ kurulumu” kısmında açıklandığı şekilde düzenleyin.
- Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri sayfa 78, “Örnek değerlendirme veri analizi” kısmındaki talimatlara göre analiz edin.

### Protokol: KRAS mutasyon tespiti (manuel)

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

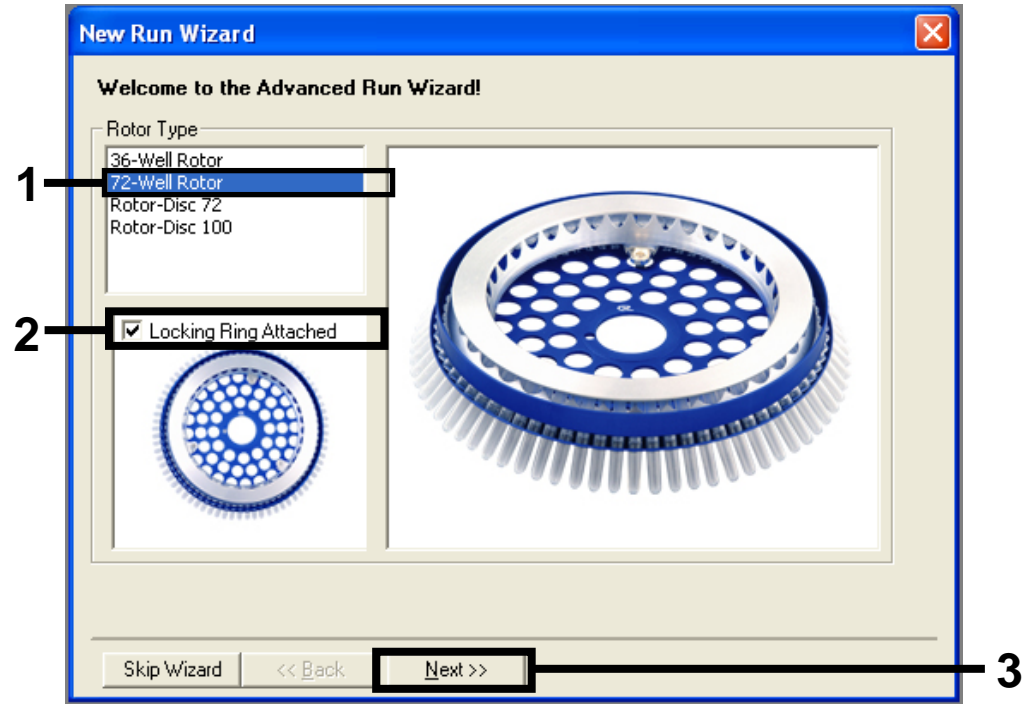
- Örnekleri, sayfa 27, “Protokol: KRAS mutasyonlarının tespiti” bölümünde açıklandığı şekilde hazırlayın.
- Rotor-Gene Q MDx cihazındaki PCR çalışmasını, sayfa 74, “Protokol: *therascreen* KRAS PCR RGQ kurulumu” kısmında açıklandığı şekilde düzenleyin.
- Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri sayfa 79, “KRAS mutasyon tespiti analizi” kısmındaki talimatlara göre analiz edin.

### Protokol: *therascreen* KRAS PCR RGQ kurulumu

#### 1. Rotor-Gene Q series software 2.3'ü ve oluşturulan uygun sıcaklık profilini açın

Sıcaklık profilini sayfa 65, “Protokol: Sıcaklık profili oluşturma” bölümüne uygun şekilde oluşturun.

#### 2. Doğru rotorun seçildiğinden emin olun ve kilitleme halkasının takıldığını doğrulamak için kutuyu işaretleyin. “Next” (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 33).



**Şekil 33. “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu ve hoş geldiniz ekranı.** 1 = “Rotor Type” (Rotor tipi); 2 = “Locking Ring Attached” (Kilitleme Halkası Takılı) kutusu; 3 = “Next” (İleri).

3. Operatörün adını girin. Notlar ekleyin, reaksiyon hacminin 25'e ve “Sample Layout” (Örnek Düzeni) alanının “1, 2, 3...” değerlerini okuduğunu kontrol edin. “Next” (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 34).

**New Run Wizard**

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

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

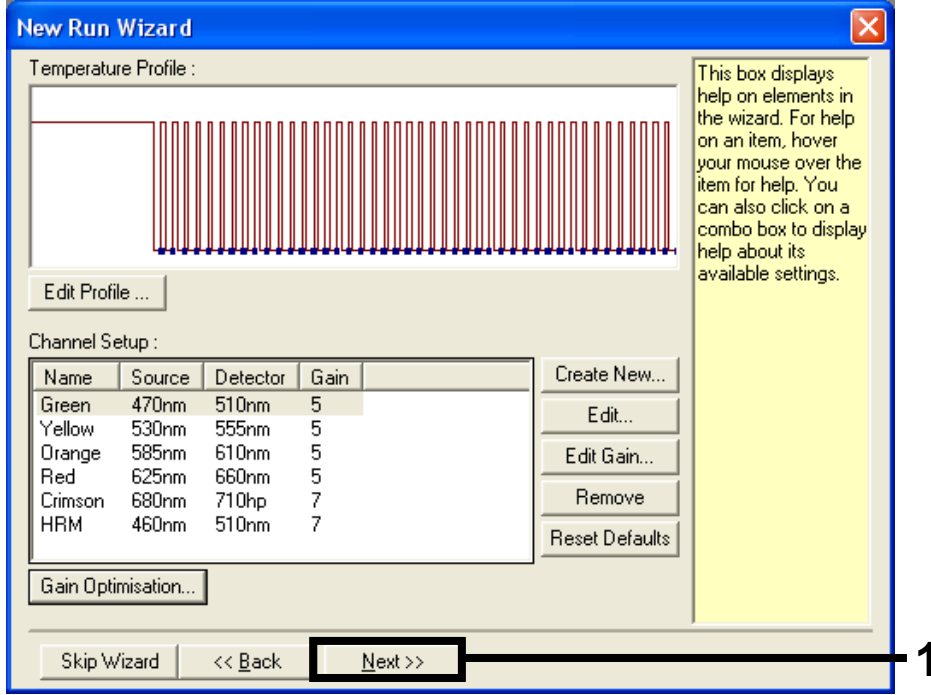
Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

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

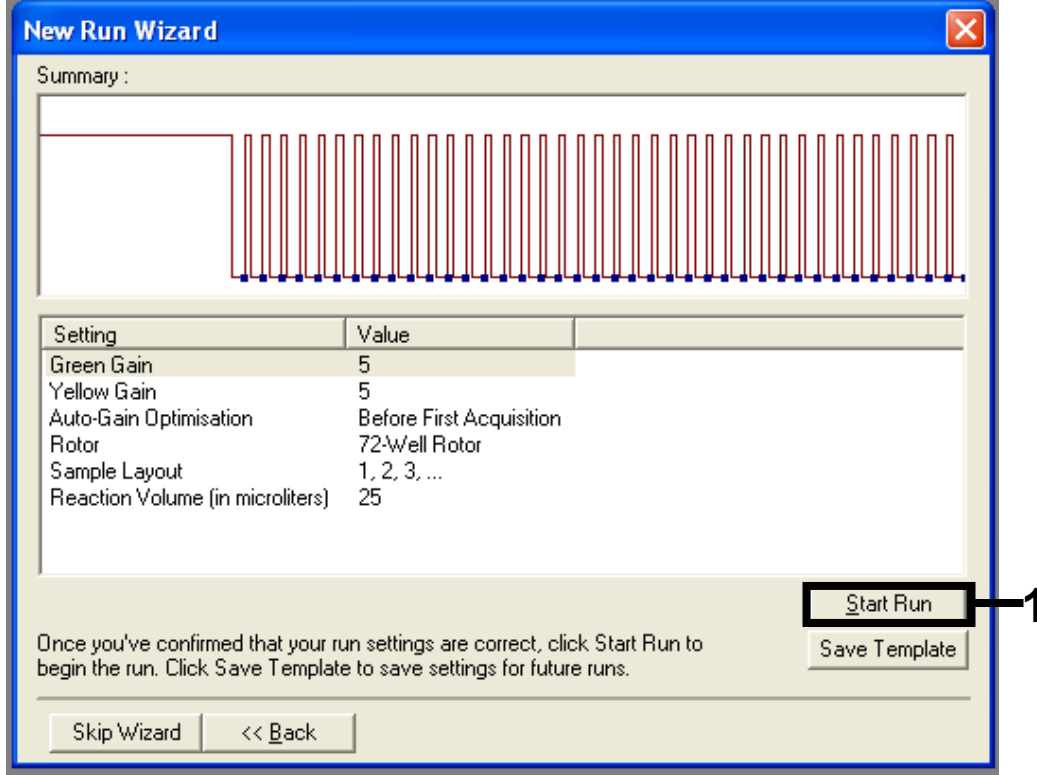
**Şekil 34. “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu.** 1 = “Operator” (Operatör) ve “Notes” (Notlar) diyalog alanı, 2 = “Reaction Volume” (Reaksiyon Hacmi) ve “Sample Layout” (Örnek Düzeni) alanları, 3 = “Next” (İleri).

4. İleri penceresi, sıcaklık profilinin düzenlenmesini sağlar. “Protokol: Sıcaklık profili oluşturma”, sayfa 65'teki talimatlara göre, sıcaklık profili oluşturulduğundan düzenlemeye gerek yoktur. “Next” (İleri) düğmesine tıklayın (Şekil 35).



Şekil 35. “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) diyalog kutusu ve sıcaklık düzenleme ekranı. 1 = “Next” (İleri).

5. Özeti kontrol edin ve çalışma dosyasını kaydederek çalışmayı başlatmak için “Start Run” (Çalışmayı Başlat) düğmesine tıklayın (Şekil 36).



Şekil 36. “New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı) iletişim kutusu. 1 = “Start Run” (Çalışmayı Başlat).

6. Çalışma başladıktan sonra, örnek adlarını o anda girebilirsiniz ya da çalışma sırasında veya çalışma tamamlandığında “Finish” (Bitti) düğmesine tıklayıp “Sample” (Örnek) düğmesini seçerek sonradan da girebilirsiniz.

“Finish and Lock Samples” (Bitir ve Örnekleri Kilitler) düğmesinin tıklanması, örnek adlarını düzenlemenizi engelleyecektir. Kullanıcı, doğru örnek test ve analizini sağlamak için örnek adlarını girerken özellikle dikkat etmelidir.

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

7. Çalışma tamamlandıktan sonra, verileri “Örnek değerlendirme veri analizi”, sayfa 78 veya “KRAS mutasyon tespiti analizi”, sayfa 79, kısımlarına göre uygun görüldüğü şekilde analiz edin.
8. Miktar tayini raporları gerekirse, Rotor-Gene Q çalışma dosyasındaki araç çubuğunda yer alan “Reports” (Raporlar) simgesine tıklayın.

## Sonuçların Yorumlanması (Manuel)

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

### Yazılım analiz ayarları

1. Rotor-Gene Q serisi yazılım 2.3'ü kullanarak uygun dosyayı açın.
2. Çalışmayı gerçekleştirmeden önce örneklerinizi adlandırmadıysanız, “Edit Samples” (Örnekleri Düzenle) düğmesine tıklayın.
3. “Name” (Ad) sütununa örnek adlarınızı girin.
4. “Analysis” (Analiz) seçeneğine tıklayın. Analiz sayfasında, HEX kanalını görüntülemek için “Cycling A. Yellow” (Döngü A. Sarı) seçeneğine tıklayın.
5. “Named On” (Adlandırıldı) düğmesine tıklayın.  
**Not:** Bu, analizin boş kuyuları içermemesini sağlar.
6. “Dynamic Tube” (Dinamik tüp) ögesini seçin.
7. “Linear scale” (Doğrusal ölçek) ögesini seçin.
8. “Outlier Removal” (Aykırı Değer Çıkarma) seçeneğine tıklayın ve “NTC Threshold” (NTC Eşiği) için “10%” değerini girin.
9. Threshold (Eşik) değerini 0.05 olarak ayarlayın ve HEX C<sub>T</sub> değerlerini kontrol edin.
10. Analiz sayfasında, FAM kanalını görüntülemek için “Cycling A. Green” (Döngü A. Yeşil) seçeneğine tıklayın.
11. “Dynamic Tube” (dinamik tüp) seçeneğinin vurgulanmış olup olmadığını doğrulayın. “Linear Scale” (Doğrusal ölçek) düğmesine tıklayın.
12. “Outlier Removal” (Aykırı Değer Çıkarma) seçeneğine tıklayın ve “NTC Threshold” (NTC Eşiği) için “10%” değerini girin.
13. Threshold (Eşik) değerini 0.05 olarak ayarlayın ve FAM C<sub>T</sub> değerlerini kontrol edin.

### Örnek değerlendirme veri analizi

#### Çalışma kontrol analizi

Sayfa 80, Şekil 37'deki “Çalışma kontrol analizi” akış şemasına bakın.

- **Negatif kontrol:** Reaksiyon karışımı kontaminasyonu olmadığından emin olmak için, Şablonsuz Kontrol yeşil kanalda 40'ın altında bir C<sub>T</sub> değeri oluşturmamalıdır. Plakanın doğru olarak kurulduğundan emin olmak için NTC, sarı kanalda 31,91–35,16 arası amplifikasyon göstermelidir. Belirtilen değerler aralık dahilindedir ve bu değerleri içerir.

- **Pozitif kontrol:** KRAS Pozitif Kontrol (PC), yeşil kanalda 8 testin her birinde 23,5–29,5 arası bir  $C_T$  değeri vermelidir. Belirtilen değerler aralık dahilindedir ve bu değerleri içerir. Bu aralığın dışındaki bir değer, test kurulum sorunu ve bu nedenle oluşan bir çalışma hatası olduğunu gösterir.

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

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

### Örnek analizi — kontrol testi

- **Örnek kontrol testi  $C_T$  değeri < 21,92:** Kontrol  $C_T$  değeri < 21,92 olan örnekler seyreltilmelidir; çünkü bu durum onaylanmış test aralığının düşük değerini temsil etmektedir. Düşük seviyedeki her bir mutasyonu saptamak için yüksek konsantrasyonlu örnekler yarım ölçek seyreltildiğinde  $C_T$ 'nin 1 arttığı düşünülerek yukarıdaki aralığın içinde olacak şekilde seyreltilmelidir. Örnek 21,92 değerine yakınsa, örnek test (KRAS mutasyon tespiti) çalışmasından sonuç elde edilmesini sağlamak için seyreltme önerilir. Örnekler kit içinde verilen su kullanılarak seyreltilmelidir (Seyreltme Suyu [Dil.] için Nükleaz İçermeyen Su).
- **Örnek kontrol testi  $C_T$  değeri > 32:** Test için belirtilen eşik değerlerindeki tüm mutasyonları tespit etmek amacıyla başlangıç DNA şablonu yetersiz olacağı için örneğin yeniden alınması önerilir.

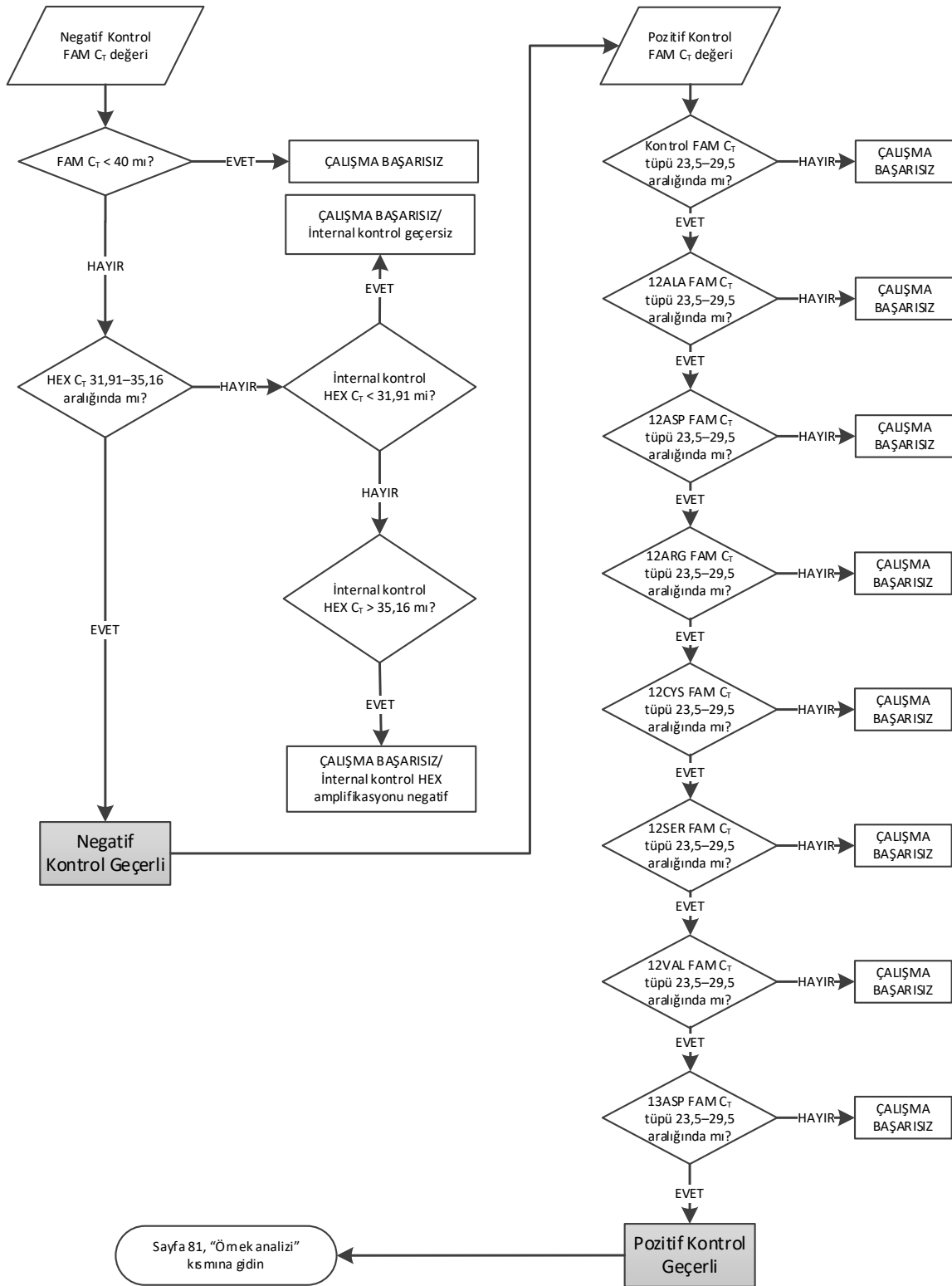
## KRAS mutasyon tespiti analizi

### Çalışma kontrol analizi

“Çalışma kontrol analizi” akış şemasına bakın (Sayfa 80, Şekil 37).

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

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



**Şekil 37. Çalışma kontrol analizi akış şeması.**



## Örnek analizi

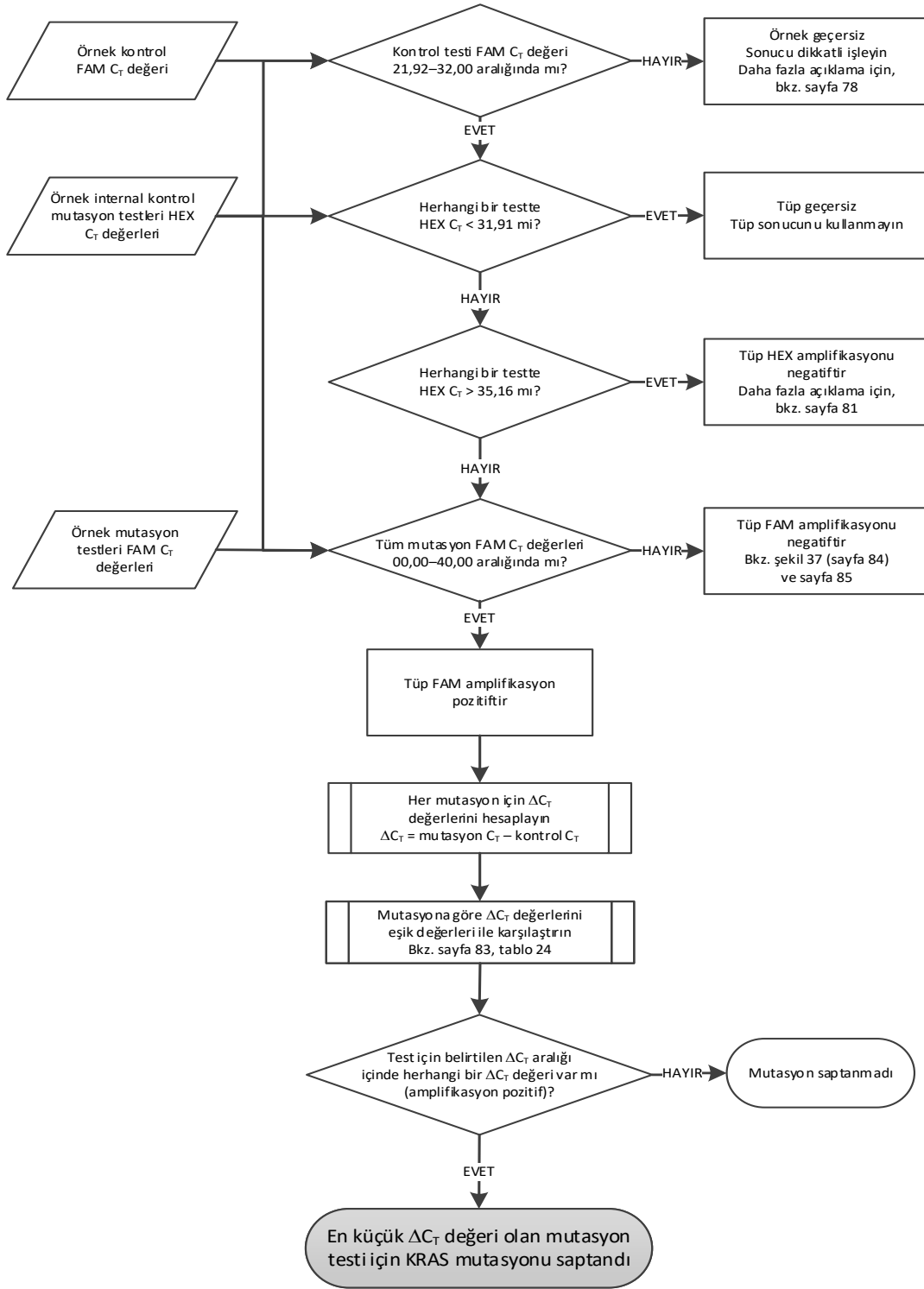
Sayfa 82, Şekil 38'deki "Örnek analizi" akış şemasına bakın.

### Örnek kontrol FAM C<sub>T</sub> değeri

Kontrol testi için her iki çalışma kontrolünün de geçerli olması durumunda, her bir örnek C<sub>T</sub> değeri yeşil kanalda 21,92–32,00 aralığı içinde olmalıdır.

Örnek bu aralığın dışındaysa, aşağıdaki talimatlar verilmiştir.

- **Örnek kontrol testi C<sub>T</sub> değeri < 21,92:** Kontrol C<sub>T</sub> değeri < 21,92 olan örnekler mutasyon testlerine aşırı yüklenmiştir ve seyreltilmelidir. Düşük seviyedeki her bir mutasyonu saptamak için yüksek konsantrasyonlu örnekler yarım ölçek seyreltildiğinde C<sub>T</sub>'nin 1 arttığı düşünülerek yukarıdaki aralığın içinde olacak şekilde seyreltilmelidir. Örnekler kit içinde verilen su kullanılarak seyreltilmelidir (Seyreltme Suyu [Dil.] için Nükleaz İçermeyen Su).
- **Örnek kontrol testi C<sub>T</sub> değeri > 32:** Çok düşük seviyeli mutasyonlar tespit edilemeyebilir bu yüzden dikkatli yorumlayın.



Şekil 38. Örnek analizi akış şeması.

### Örnek internal kontrol mutasyon testleri HEX C<sub>T</sub> değeri

Sayfa 82, Şekil 38'deki "Örnek analizi" akış şemasına bakın.

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

- Internal kontrol C<sub>T</sub> değeri belirtilen aralığın (31,91–35,16) içindeyse, bu HEX amplifikasyonu pozitifdir.
- Internal kontrol C<sub>T</sub> değeri belirtilen aralığın (> 35,16) üstündeyse, bu HEX amplifikasyonu negatiftir.
- Internal kontrol C<sub>T</sub> değeri belirtilen aralığın (< 31,91) altındaysa, bu geçersizdir.

Internal kontrol hatası PCR inhibisyonuna bağlıysa, örneğin seyreltilmesi inhibitörlerin etkisini azaltabilir fakat bunun hedef DNA'yı da seyrelteceği ayrıca dikkate alınmalıdır. Kite bir tüp Örnek Seyreltme Suyu (Dil.) dahil edilmiştir.

### Örnek mutasyon testleri FAM C<sub>T</sub> değeri

7 reaksiyon karışımının tümü için FAM değerleri, Tablo 24'te listelenen değerlerle karşılaştırılmalıdır.

**Tablo 24. Kabul edilebilir örnek mutasyon reaksiyon değerleri (FAM)\***

Test	Kabul edilebilir C <sub>T</sub> aralığı	ΔC <sub>T</sub> aralığı
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

\* Kabul edilebilir değerler gösterilen değerlerin arasında ve kapsamındadır.

- FAM C<sub>T</sub> değeri belirtilen aralık içindeyse, bu FAM amplifikasyonu pozitifdir.
- FAM C<sub>T</sub> değeri belirtilen aralığın üzerindeyse veya hiç amplifikasyon yoksa, bu FAM amplifikasyon negatiftir.

Mutasyon ve kontrol  $C_T$  değerlerinin aynı örnekten olduğundan emin olarak, FAM amplifikasyonu pozitif olan her mutasyon tüpü için  $\Delta C_T$  değerini aşağıdaki şekilde hesaplayın.

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

Her bir teste doğru kesim noktasının uygulandığından emin olarak söz konusu test için kesim noktalı örneklerle ait  $\Delta C_T$  değerini hesaplayın (Tablo 24).

Kesim noktası, üzerindeki noktalarda pozitif sinyalin potansiyel olarak yabancı tip DNA'daki ARMS primerinin arkaplan sinyalinden kaynaklandığı noktadır.

Örnek  $\Delta C_T$  değeri eşik noktasından daha yüksekse, negatif olarak sınıflandırılır veya kitin tespit limitlerinin dışındadır.

Her örnek için, her bir mutasyon reaksiyonu aşağıdaki kriterler kullanılarak “mutasyon saptandı”, “mutasyon saptanmadı” veya “geçersiz” durumunu belirtecektir.

Mutasyon saptandı:

- FAM amplifikasyonu pozitif ve  $\Delta C_T$  değerleri eşik değerinde veya eşik değerinin altındadır. Çoklu mutasyonlar saptanırsa, bildirilen mutasyon en küçük  $\Delta C_T$  değerine sahip mutasyon olmalıdır

Mutasyon saptanmadı:

- FAM amplifikasyonu pozitif ve  $\Delta C_T$  değerleri eşik değerinin üzerindedir.
- FAM amplifikasyonu negatif ve HEX (internal kontrol) amplifikasyonu pozitif.

Geçersiz:

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

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

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

## Örnek mutasyon durumu atama

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

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

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

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

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

## Ek 2: *therascreen* KRAS Assay Package'in kurulumu

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kiti, 72 kuyulu rotora sahip Rotor-Gene Q MDx cihazı ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır. *therascreen* KRAS Assay Package, CD halinde (kat. no. 9022641) ayrıca satılır.

*therascreen* KRAS Assay Package, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) web sitesindeki ilgili *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ürünü web sayfasında indirilmek için bulunabilir. İndirme bilgileri "Supplementary Protocols" (Ek Protokoller) sekmesi altındaki "Product Resources" (Ürün Kaynakları) bölümünde bulunabilir. Ayrıca, Assay Package'lar bir CD'de de sipariş edilebilir.

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

**Not:** *therascreen* KRAS Assay Package sürüm 3.1.1 (QIAGEN, kat. no. 9023675) yalnızca ilgili Rotor-Gene Q yazılım sürümü 2.3 ile çalışır. *therascreen* KRAS Assay Package kurulumuna devam etmeden önce, Rotor-Gene Q yazılımının doğru sürümünü yüklediğinizden emin olun.

### Prosedür (indirme)

1. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) web sitesindeki ilgili *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ürünü web sayfasında bulunan *therascreen* KRAS RGQ Assay Package'ı indirin.
2. Dosyaya çift tıklayarak ve arşiv içindeki dosyayı çıkarak indirilen sıkıştırılmış dosyayı açın.
3. Çıkarılan "*therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.1.1.exe*" dosyaya çift tıklayarak kurulumu başlatın.

### Prosedür (CD)

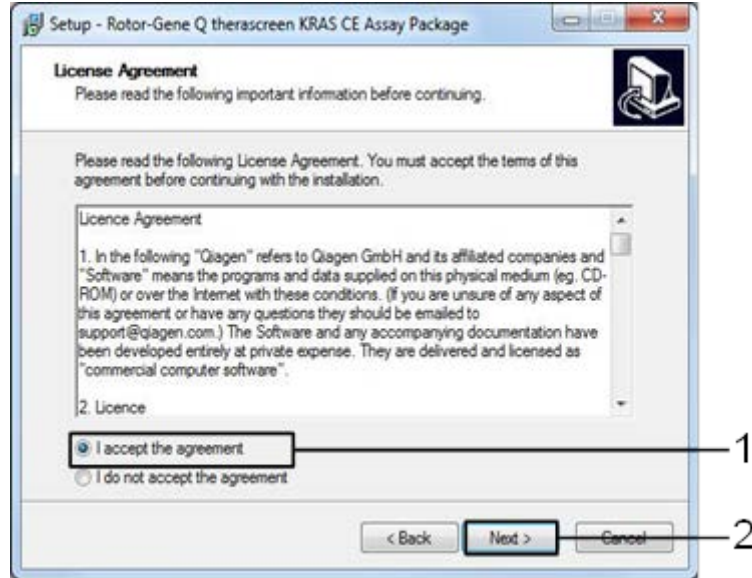
1. QIAGEN'den ayrı olarak alınabilen, yüklü Rotor-Gene Q Yazılımı (yukarıya bakın) ile uyumlu *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE CD'yi sipariş edin.  
Sürüm 3.1.1. Kat. no. 9023675.
2. CD'yi, Rotor-Gene Q MDx cihazına bağlı dizüstü bilgisayara takın.
3. Dosyasına çift tıklayarak kurulumu başlatın:  
*therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.1.1.exe*  
VEYA  
*therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_1.0.12.exe*.

4. Kurulum sihirbazı açılır. İlerlemek için “Next” (İleri) seçeneğine tıklayın (Şekil 39).



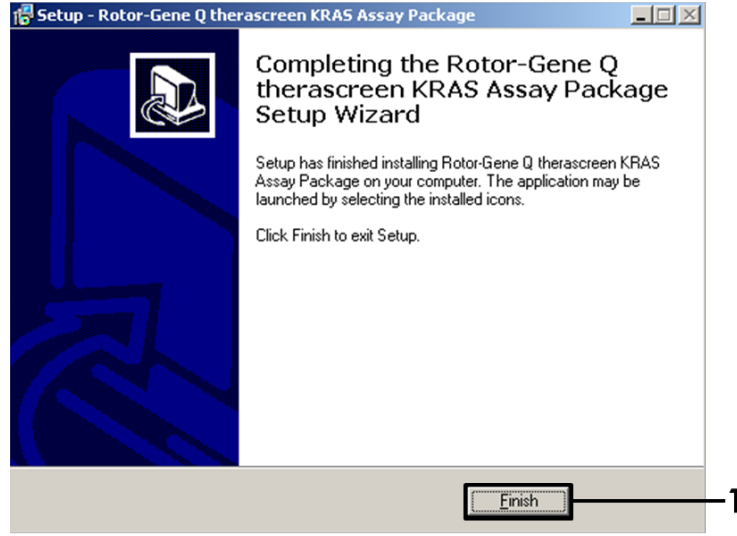
Şekil 39. “Setup” (Kurulum) diyalog kutusu. 1 = “Next” (İleri).

5. “License Agreement” (Lisans Sözleşmesi) diyalog kutusundan Lisans Sözleşmesini okuyun ve “I accept the agreement” (Sözleşmeyi kabul ediyorum) seçeneğini işaretleyerek sözleşmeyi kabul edin. İlerlemek için “Next” (İleri) seçeneğine tıklayın (Şekil 40).



Şekil 40. “License Agreement” (Lisans Sözleşmesi) diyalog kutusu. 1 = “I accept the agreement” (Sözleşmeyi kabul ediyorum); 2 = “Next” (İleri).

6. Şablon kurulumu otomatik olarak başlar ve son bir “Setup” (Kurulum) diyalog kutusu açılır. Kurulum sihirbazından çıkmak için “Finish” (Bitti) seçeneğine tıklayın (Şekil 41).



Şekil 41. Kurulum sihirbazı tamamlanıyor.

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



## Sipariş Bilgileri

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: 1 Kontrol Testi, 7 Mutasyon Testi, Pozitif Kontrol, Su, <i>Taq</i> DNA Polimeraz	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (sürüm 3.1.1)	<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kiti ve 72 kuyulu QIAGEN Rotor-Gene Q MDx ile kullanım için yazılım protokol paketi	9023675
<b>Rotor-Gene Q ve aksesuarları</b>		
Rotor-Gene Q MDx	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı Yüksek Çözünürlüklü Erime analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Real-time PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı Yüksek Çözünürlüklü Erime analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipet ile manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüplü ve kapaklı 250 şerit	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüplü ve kapaklı 10 x 250 şerit	981106
<b>QIAamp DNA FFPE Doku Kiti — parafine gömülmüş dokulardan genomik DNA temizlemek için</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNA örneği için: QIAamp MinElute® Sütunları, Proteinaz K, Tamponlar ve Toplama Tüpleri (2 ml)	56404

Güncel lisans bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabına veya kullanıcı kılavuzuna bakın. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı kılavuzları **www.qiagen.com** adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri ve yerel dağıtıcınızdan istenebilir.

## Revizyon Geçmişi

Belge revizyon geçmişi	
R4 01/2019	Yetkili Temsilcinin Eklenmesi (ön kapak). “Semboller” bölümü güncellenmiştir. Şablon güncellenmiştir.

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

Bu belgede geçen kayıtlı isimler, ticari markalar, vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarca korunmaktadır.

*Dışkı örnekleriyle kullanmayın.*

*İdrar örnekleriyle kullanmayın.*

*Kan örneğinden alınan hücre dışı nükleik asitle kullanmayın.*

*Hücre dışı kemik iliği örnekleriyle kullanmayın.*

*Tükürük örnekleriyle kullanmayın.*

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

#### ***therascreer* KRAS RGQ PCR Kiti için Sınırlı Lisans Sözleşmesi**

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

1. Ürün yalnızca ürünle ve el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN, bu kit ile birlikte verilen bileşenlerin el kitabında ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinden ulaşılabilen ek protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde denenmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN bu protokollerin üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Bu kitin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans koşulları için bkz. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1861-004 1116068 01-2019 © 2019 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.



Sipariş verme [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Teknik Destek [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | Web sitesi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)