

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

cobas [®] DNA Sample Preparation Kit	DNA SP	24 Tests	P/N: 05985536190
cobas [®] KRAS Mutation Test	KRAS	24 Tests	P/N: 05852170190

POZNÁMKA: Díky koupi tohoto produktu může zákazník provádět amplifikaci a detekci sekvencí nukleové kyseliny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a příbuzných procesů využívaných v *in vitro* humánní diagnostice. Tímto se neudílí žádný obecný patent ani jiná licence jakéhokoliv typu mimo toto konkrétní právo použití.

ÚČEL POUŽITÍ

Test mutace genu KRAS cobas[®], určený pro použití se systémem cobas[®] 4800, je test PCR v reálném čase určený pro identifikaci mutací v kodonech 12, 13 a 61 genu KRAS v DNA pocházející z lidské tkáně s kolorektálním karcinomem (CRC) fixované ve formalínu a zalité v parafínu.

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Cetuximab a panitumumab jsou monoklonální protilátky, jejichž cílem je receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) a jsou schválené pro léčbu pacientů s metastázujícím kolorektálním karcinomem. Přestože 50 % až 80 % kolorektálních nádorů exprimuje EGFR, exprese proteinu EGFR a amplifikace genu mají pouze omezenou prediktivní hodnotu při stanovení pravděpodobnosti odpovědi na cetuximab nebo panitumumab.¹ Nicméně nyní existuje silný důkaz, který ukazuje, že přítomnost mutací genu KRAS koreluje s nedostatečnou odpovědí na léčbu protilátkou zaměřenou proti EGFR u pacientů s metastázujícím kolorektálním karcinomem a že, v některých situacích, použití léčby protilátkou zaměřenou proti EGFR u této podskupiny pacientů může být škodlivé.^{2,3} Podpůrné důkazy pro tato zjištění pocházejí z:

- Retrospektivní analýzy jednoramenných studií^{4,5}
- Retrospektivní analýzy randomizovaných studií^{6,7}
- Prospektivní randomizované studie.⁸

V důsledku těchto studií nejvýznamnější onkologické organizace v USA (ASCO, NCCN)⁹⁻¹⁰ a v Evropě (ESMO)¹¹ doporučují testování mutace genu KRAS při výběru pacientů pro léčbu protilátkou zaměřenou proti EGFR. Navíc americké a evropské regulační úřady omezily použití těchto látek na pacienty s nádory vykazující divoký typ genu KRAS.^{12,13}

Protein KRAS je členem superrodiny malých G-proteinů. KRAS funguje jako přepínač ovládaný pomocí GDP/GTP, který přenese mimobuněčné signály, jež mají vliv na proliferaci a apoptózu buněk a přestavbu aktinového cytoskeletu. Mutace ovlivňující aminokyseliny 12, 13 nebo 61, které se objevují u různých lidských zhoubných nádorů, včetně kolorektálního karcinomu (CRC) a nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), uzamknou enzym ve vazbě na GTP, v jeho aktivované formě, což má za následek konstitutivní signalizaci a přispívání k procesu tvorby nádoru.¹⁴

Mutace genu KRAS jsou pozorovány u 24 %-43 % kolorektálních nádorů.¹⁵⁻¹⁶ Přestože bylo identifikováno přes 3000 bodových mutací genu KRAS, většinou se objevují v kodonu 12 nebo 13 (~82 % v kodonu 12 a ~17 % v kodonu 13); mutace genu KRAS v jiných kodonech (např. v kodonu 61) jsou méně časté (1 %-4 % mutací). Přestože mutace v kodonu 61 nejsou časté, ukázalo se, že mají za následek konstitutivní aktivaci genu KRAS stejně jako mutace kodonů 12 a 13¹⁷ a publikované údaje ukazují, že mutace v kodonu 61 předpovídají nepřítomnost odpovědi na léčbu monoklonální protilátkou zaměřenou proti EGFR.¹⁸⁻¹⁹

Test mutace genu KRAS cobas[®] je test založený na PCR, jehož cílem je identifikace přítomnosti somatických mutací v kodonech 12, 13 a 61 protoonkogenu KRAS, tudíž identifikace pacientů s pokročilým CRC, u kterých se nepředpokládá přínos z léčby pomocí monoklonálních protilátek proti EGFR.

PRINCIPY POSTUPU

Test mutace genu KRAS **cobas**[®] je založen na dvou základních postupech: (1) manuální příprava vzorku za účelem získání genomické DNA z tkání fixovaných ve formalínu a archivovaných v parafinových blocích (FFPET) a (2) PCR amplifikace cílové DNA pomocí komplementárního páru primerů a dvou oligonukleotidových sond značených fluorescenčním barvivem. Jedna sonda je určena k detekci sekvence kodonu 12/13 genu KRAS v exonu 2 a druhá sonda je určena k detekci sekvence kodonu 61 genu KRAS v exonu 3. Analyzátor **cobas z 480** provádí detekci mutace analýzou křivky tání. V každém cyklu je zařazena kontrola mutace, negativní kontrola a kalibrátor pro potvrzení platnosti cyklu.

Příprava vzorku

Pomocí soupravy pro přípravu vzorků DNA **cobas**[®], což je generická manuální příprava vzorků založená na vazbě nukleové kyseliny na skelná vlákna, se zpracují vzorky FFPET a izoluje se genomická DNA. 5µm řez FFPET vzorku zbavený parafinu je rozštěpen inkubací při zvýšené teplotě pomocí proteázy a chaotropního lytického/vazebného pufru, který uvolňuje nukleové kyseliny a chrání uvolněnou genomickou DNA před působením DNáz. Následně je k lytické směsi přidán isopropanol a tato směs je pak centrifugována ve sloupci s filtrační vložkou ze skelného vlákna. Při centrifugaci se genomická DNA naváže na povrch filtru ze skelného vlákna. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny centrifugací. Adsorbované nukleové kyseliny jsou vymyty a poté eluovány vodným roztokem. Množství genomické DNA je určeno spektrofotometricky a upraveno na pevnou koncentraci pro přidání k amplifikační/detekční směsi. V analyzátoru **cobas z 480** je amplifikována a detekována cílová DNA pomocí amplifikačních a detekčních činidel dodávaných v soupravě testu mutace genu KRAS **cobas**[®].

PCR amplifikace

Volba cílové sekvence

Test mutace genu KRAS **cobas**[®] využívá primery, které definují sekvence 85 párů bází v exonu 2 obsahující kodony 12 a 13 genu KRAS a sekvence 75 párů bází v exonu 3 obsahující kodon 61 genu KRAS v lidské genomické DNA. Amplifikace probíhá pouze v oblastech genu KRAS mezi primery; celý gen KRAS amplifikován není.

Amplifikace cíle

Pro amplifikaci cíle se používá derivát DNA polymerázy Z05 druhu *Thermus*. Nejdříve se PCR reakční směs zahřeje za účelem denaturace genomické DNA a tím se odhalí cílové sekvence pro primer. Během ochlazování směsi dochází k anelaci upstream a downstream primerů k sekvencím cílové DNA. Z05 DNA polymeráza za přítomnosti dvojmocných kovových iontů a nadbytku dNTP každý anelovaný primer prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se ukončuje první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou DNA kopii, která zahrnuje cílové oblasti 85 párů bází a 75 párů bází genu KRAS. Tento proces se několikrát opakuje a v každém cyklu se efektivně zdvojnásobuje množství amplikonové DNA. Amplifikace probíhá pouze v oblastech genu KRAS mezi páry primerů; celý gen KRAS amplifikován není.

Automatická detekce mutace v reálném čase

Analyzátor **cobas z 480** je schopen v reálném čase měřit množství fluorescence generované specifickými produkty PCR. Po amplifikaci každý vygenerovaný amplikon prochází v testu mutace genu KRAS **cobas**[®] programem tání, při kterém se teplota zvýší ze 40 °C na 95 °C (TaqMelt). Sonda specifická pro divoký typ se při nízkých teplotách naváže jak na amplikon genu divokého typu, tak genu mutace. V navázaném stavu je oznamovací barvivo fluorescein na 5' konci sondy dostatečně vzdáleno od 3' konce tlumicího barviva, což umožňuje fluorescenčnímu barvivo emitovat specifickou vlnovou délku světla. Při zvyšování teploty se sonda uvolňuje od amplikonu a umožňuje tak tlumicímu barvivo dostat se do těsné blízkosti fluorescenčního barviva, čímž se snižuje množství měřitelné fluorescence. Amplikony, které dokonale odpovídají sondě (divoký typ), tají při vyšší teplotě než amplikony s jedním nebo více nesoulady (mutantní). Měří se množství fluorescence při každém zvýšení teploty a vypočítá se teplota(y) tání. Když jsou teploty tání ve specifikovaných rozmezích, je možné detekovat přítomnost mutantní sekvence KRAS v exonu 2, kodonu 12 a 13 a v exonu 3, kodonu 61. Aby nedošlo k detekci tichých mutací kodonu 12 a kodonu 13 (bez změny aminokyseliny), slouží modifikovaná báze jako univerzální báze a vytváří teplotu tání v rozmezí divokého typu.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu mutace genu KRAS **cobas**[®] použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP)²⁰. Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin, ale nikoliv DNA obsahující thymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu, díky použití dUTP namísto thymidintrifosfátu jako jednoho z nukleotid trifosfátu v činidle Reaction Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Reaction Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku při alkalickém pH zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je při teplotách nad 55 °C, to je během fází tepelného cyklu, neaktivní, a proto terčový amplikon nerozkládá. Je prokázáno, že test mutace genu KRAS **cobas**[®] inaktivuje alespoň 10³ kopií mutantních amplikonů KRAS obsahujících deoxyuridin na PCR.

ČINIDLA

cobas® DNA Sample Preparation Kit
Souprava pro přípravu vzorků DNA cobas®
(P/N: 05985536190)

DNA SP

24 testů

DNA TLB

(DNA tkáňový lytický pufr)

1 x 10 ml

Pufr Tris-HCl
Chlorid draselný
0,04 % EDTA
0,1 % Triton X-100
0,09 % azid sodný

PK

(Proteináza K)

1 x 100 mg

Proteináza K (lyofilizovaná)

Xn  Proteináza K


Zdraví škodlivý

DNA PBB

(Vazebný pufr pro DNA v parafinových blocích)

1 x 10 ml

Pufr Tris-HCl
49,6 % Guanidinhydrochlorid
0,05 % Urea
17,3 % Triton X-100

Xn  49,6 % (hm) guanidin HCl


Zdraví škodlivý

WB I

(DNA promývací pufr I)

1 x 25 ml

Pufr Tris-HCl
64 % Guanidinhydrochlorid

Xn  64% (hm) guanidin HCl

Zdraví škodlivý

WB II

(DNA promývací pufr II)

1 x 12,5 ml

Pufr Tris-HCl
Chlorid sodný

DNA EB

(DNA eluční pufr)

1 x 6 ml

Pufr Tris-HCl
0,09 % azid sodný

FT

(Filtrační zkumavky s víčky)

1 x 25 ks

CT

(Odběrové zkumavky)

3 x 25 ks

KRAS MIX

(Reakční směs KRAS)

4 x 0,3 ml

Tricinový pufr
Octan draselný
Hydroxid draselný
Glycerol
4,76 % dimetylsulfoxid
0,1 % konzervantu ProClin 300
< 0,9 % dNTPs
< 0,1 % Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)
< 0,1 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)

MGAC

(Octan hořečnatý)

4 x 0,2 ml

Octan hořečnatý
0,09 % azid sodný

KRAS 12/13 OM

(Oligo směs pro kodon 12/13 genu KRAS)

2 x 0,3 ml

Pufr Tris-HCl
EDTA
Poly-rA RNA (syntetická)
0,1 % konzervantu ProClin 300
< 0,01 % Upstream a downstream KRAS primery
< 0,01 % fluorescenčně značené sondy KRAS

KRAS 61 OM

(Oligo směs pro kodon 61 genu KRAS)

2 x 0,3 ml

Pufr Tris-HCl
EDTA
Poly-rA RNA (syntetická)
0,1 % konzervantu ProClin 300
< 0,01 % Upstream a downstream KRAS primery
< 0,01 % fluorescenčně značené sondy KRAS

KRAS MC

(Kontrola mutace KRAS)

4 x 0,1 ml

Pufr Tris-HCl
EDTA
Poly-rA RNA (syntetická)
0,05 % azid sodný
< 0,001 % plazmid DNA obsahující exon 2 a 3 sekvence genu KRAS (mikrobiální)
< 0,001 % DNA divokého typu genu KRAS (buněčná kultura)

KRAS CAL

(Kalibrátor KRAS)

4 x 0,1 ml

Pufr Tris-HCl
EDTA
Poly-rA RNA (syntetická)
0,05 % azid sodný
< 0,001 % DNA divokého typu genu KRAS (buněčná kultura)

DNA SD

(Roztok pro ředění vzorků DNA)

2 x 3,5 ml

Pufr Tris-HCl
0,09 % azid sodný

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Tento test se používá pro vzorky tkáně s kolorektálním karcinomem (CRC) fixované ve formalínu a archivované v parafinových blocích.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte.
- E. Zamezte mikrobiální a DNA kontaminaci činidel.
- F. Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- G. Nepoužívejte soupravy po uplynutí data expirace.
- H. Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav nebo šarží.
- I. Je nutné nosit rukavice. Aby nedošlo ke kontaminaci, musí se rukavice vyměnit mezi manipulací se vzorky a manipulací s činidly.
- J. Aby nedošlo ke kontaminaci pracovního Master mixu (pracovní MMX) vzorky DNA, musí se amplifikace a detekce provádět v místě odděleném od izolace DNA. Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou MMX pečlivě vyčistit. Při pečlivém vyčištění je nutné všechny stojany a pipetory řádně ořít 0,5% roztokem chlornanu sodného* a poté ořít 70% roztokem etanolu.
- K. **DNA PBB a WB I** obsahuje guanidinydrochlorid. Pokud se kapalina obsahující tento pufr rozlije, postižené místo vyčistěte vodou s vhodným laboratorním detergentem. Jestliže dojde k rozlití potenciálně infekčních látek, vyčistěte místo nejprve vodou s vhodným laboratorním čisticím prostředkem a potom 0,5% chlornanem sodným. Dojde-li k rozlití na analyzátoru **cobas z 480**, postupujte podle pokynů v příručce obsluhy pro analyzátor **cobas z 480**.

***POZN.: Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný v koncentraci 5,25 %. Roztok o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.**

- L. Manipulace se vzorky se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²¹ a v dokumentu CLSI č. M29-A3.²²
- M. **DNA TLB a DNA PBB** obsahují Triton X-100, který dráždí sliznice. Zamezte styku s očima, pokožkou a sliznicemi.
- N. **DNA TLB, DNA EB, MGAC, KRAS MC, KRAS CAL a DNA SD** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím studené vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- O. Xylen je nebezpečná chemická látka, musí se používat pod digestoří. Likvidujte ho s chemickým odpadem v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- P. Při práci s jakýmkoliv činidly používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Pokud dojde k rozlití, zředte je před vytřením dosucha vodou.
- Q. Všechny položky k jednorázovému použití použijte jen jednou. Nepoužívejte je opakovaně.
- R. Položky k jednorázovému použití nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- S. Pro čištění analyzátoru **cobas z 480** nepoužívejte roztok chlornanu sodného (bělidlo). Dojde-li k rozlití na analyzátor **cobas z 480**, postupujte podle pokynů v příručce pro analyzátor **cobas z 480**.
- T. Další varování, upozornění a postupy pro snížení nebezpečí kontaminace analyzátoru **cobas z 480** najdete v příručce pro analyzátor **cobas z 480**.
- U. Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a špičky na pipety bez DNázy.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

- A. Činidla nezmrazujte.
- B. **DNA TLB, DNA PBB, WB I, WB II, DNA EB, PK, FT a CT** uchovávejte při teplotě 15-30 °C. Po otevření jsou **DNA TLB, DNA PBB, WB I, WB II, DNA EB a PK** stabilní až 8 použití po dobu 90 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.
- C. Po přidání sterilní vody bez nukleázy do **PK**, uchovávejte nespotřebovanou rekonstituovanou **PK** v 450µl alikvotních podílech při -20 °C. Po rekonstituci je nutné **PK** použít do 90 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.
- D. Po přidání absolutního etanolu uchovávejte **WB I a WB II** při 15-30 °C. Tyto pracovní roztoky jsou stabilní po dobu 90 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.
- E. **KRAS MIX, MGAC, KRAS 12/13 OM, KRAS 61 OM, KRAS MC, KRAS CAL a DNA SD** uchovávejte při 2-8 °C. Po otevření jsou tato činidla stabilní až 4 použití po dobu 60 dní nebo do data expirace, je-li tato doba kratší.
- F. **KRAS 12/13 OM, KRAS 61 OM** a pracovní MMX (připravený přidáním **KRAS 12/13 OM** nebo **KRAS 61 OM** a **MGAC** do **KRAS MIX**) musí být chráněny před delším vystavením světlu.
- G. Pracovní MMX je nutné uchovávat při teplotě 2-8 °C ve tmě. Připravené vzorky a kontroly musí být přidány během 1 hodiny od přípravy pracovního MMX.
- H. Zpracované vzorky (extrahovaná DNA) jsou stabilní maximálně 24 hodiny při teplotě 20-30 °C, 14 dní při teplotě 2-8 °C nebo 60 dní při -20 °C. Zpracované vzorky jsou také stabilní při teplotě -15 °C až -25 °C po 4 cyklech zmrazení/rozmrazení.
- I. Amplifikace musí začít do 1 hodiny od přidání zpracovaných vzorků a kontrol do pracovního MMX (připraveného přidáním **KRAS 12/13 OM** nebo **KRAS 61 OM** a **MGAC** do **KRAS MIX**).

DODÁVANÝ MATERIÁL

- A. **cobas® DNA Sample Preparation Kit**
Souprava pro přípravu vzorků DNA **cobas®**
(P/N: 05985536190)

DNA SP

24 testů

DNA TLB

(DNA tkáňový lytický pufr)

PK

(Proteináza K)

DNA PBB

(Vazebný pufr pro DNA v parafinových blocích)

WB I

(DNA promývací pufr I)

WB II

(DNA promývací pufr II)

DNA EB

(DNA eluční pufr)

FT

(Filtrační zkumavky s víčky)

CT

(Odběrové zkumavky)

KRAS MIX

(Reakční směs) (Víčko s bezbarvým tlačítkem)

MGAC

(Octan hořečnatý) (Víčko se žlutým tlačítkem)

KRAS 12/13 OM

(Oligo směs pro kodon 12/13 genu KRAS) (Víčko s bílým tlačítkem)

KRAS 61 OM

(Oligo směs pro kodon 61 genu KRAS) (Víčko se zlatým tlačítkem)

KRAS MC

(Kontrola mutace KRAS) (Víčko s červeným tlačítkem)

KRAS CAL

(Kalibrátor KRAS) (Víčko s purpurovým tlačítkem)

DNA SD

(Roztok pro ředění vzorků DNA)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Xylen (Sigma, kat. č. 247642 nebo Fisher Scientific, kat. č. X5-4)
- Absolutní etanol (Sigma, kat. č. E7023 nebo Fisher Scientific, kat. č. BP2818-500)
- Izopropanol (Sigma, kat. č. 190764 nebo Fisher Scientific, kat. č. A451-1)
- Sterilní voda, bez nukleázy (Voda čistoty pro PCR Applied Biosystems, kat. č. AM9937 nebo voda pro použití v molekulární biologii Thermo Scientific, kat. č. SH-3053801)
- Sterilní jednorázové sérologické pipety: 5 a 25 ml
- Mikrotitrační destička (AD-destička) a zalepovací fólie (Roche P/N 05232724001) pro systém **cobas**® 4800
- Nastavitelné pipetory* (objem 10 µl, 20 µl, 200 µl a 1000 µl) s aerosolovou bariérou nebo špičky s přímým vypuzováním bez DNázy
- Pipetovací pomůcka (Drummond P/N: 4-000-100 nebo ekvivalentní)
- Stolní mikrocentrifuga 8 000 x g a 16 000 x g až 20 000 x g (Eppendorf 5417C nebo ekvivalentní)**
- Dva (2) suché vyhřívací bloky schopné vyhřát zkumavky do mikrocentrifugy na 56 °C a 90 °C**
- 1,5ml zkumavky Safe-Lock pro mikrocentrifugu, sterilní, prosté RNázy/DNázy, čistoty PCR (Eppendorf, kat. č. 022363212)
- Spektrofotometr Nanodrop UV-Vis (Thermo Scientific ND-1000 nebo ND-2000)**
- Vířivý mixér (Vortex)**
- Stojany na zkumavky do mikrocentrifugy
- Rukavice na jedno použití bez pudru
- Kalibrované teploměry pro suchý vyhřívací blok**
- Vodní lázeň** schopná udržet teplotu 37 °C
- Čepel s jedním ostřím nebo podobná

* Pipetory je nutné udržovat podle pokynů výrobce a musí být přesné s 3% objemovou chybou. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky s přímým vypuzováním bez DNázy, aby se zabránilo degradaci vzorku a vzájemné kontaminaci.

** Veškeré vybavení je nutné řádně udržovat podle pokynů výrobce.

Vybavení a software

- Analyzátor **cobas z 480**
- Řídicí jednotka systému **cobas[®] 4800 SR2** s Windows XP
- Software systému **cobas[®] 4800 SR2** verze 2.0
- Softwarový balíček pro analýzu KRAS verze 1.0
- Čtečka čárového kódu s USB
- Tiskárna HP P2055d

ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

POZN.: *Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s infekčními.*

A. Odběr vzorků

Vzorky FFPET s kolorektálním karcinomem byly validovány pro použití s testem mutace KRAS **cobas[®]**.

B. Přeprava vzorků

Vzorky FFPET je možné přepravovat při teplotě 15 °C až 30 °C. Při přepravě vzorků FFPET je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy pro přepravu infekčních biologických materiálů.²³

C. Skladování vzorků

Vzorky FFPET s kolorektálním karcinomem je možné uchovávat při teplotě 15 °C až 30 °C po dobu až 12 měsíců od data odebrání tkáně. 5µm řezy na sklíčcích je možné uchovávat při teplotě 15 °C až 30 °C až 60 dnů.

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: *V testu mutace genu KRAS **cobas[®]** se používají pouze FFPET řezy o tloušťce 5 µm, které obsahují alespoň 10 % nádorových buněk. U vzorků, které obsahují méně než 10 % nádorových buněk, je nutné před deparafinizací provést makrodisekci.*

POZN.: *Viz uživatelská příručka pro analyzátor **cobas z 480**, kde najdete podrobné postupy pro analyzátor **cobas z 480**.*

POZN.: *Suché vyhřívací bloky, schopné zahřát zkumavky pro mikrocentrifugu, je nutné zapnout a nastavit na 56 °C a 90 °C.*

Velikost cyklu

Jeden cyklus může zahrnovat 1 až 45 vzorků (plus kontroly a kalibrátor) na mikrotitrační destičce s 96 jamkami. Při zpracování více než 24 vzorků bude nutné použít více testů mutace genu KRAS **cobas[®]**.

Test mutace genu KRAS **cobas[®]** obsahuje množství činidel dostatečné pro testování 3 vzorků v 8 cyklech (plus kontroly a kalibrátor), tj. maximálně 24 vzorků na soupravu.

Pracovní postup

Testování pomocí testu mutace genu KRAS **cobas[®]** se skládá z manuální přípravy vzorku pomocí soupravy pro přípravu vzorků DNA **cobas[®]** následované amplifikací/detekcí na analyzátoru **cobas z 480** pomocí soupravy testu mutace genu KRAS **cobas[®]**.

Příprava činidel

1. Rekonstituujte proteinázu K (**PK**) přidáním 4,5 ml sterilní (čistoty pro PCR) vody bez nukleázy do lahvičky pomocí sterilní 5ml sérologické pipety na jedno použití. Promíchejte tím, že lahvičku 5krát až 10krát otočíte. Oddělte alikvotní podíly 450 µl rekonstituované **PK** do 1,5ml zkumavek Safe-Lock pro mikrocentrifugu a uchovávejte je při -20 °C. Jestliže jste již proteinázu K rekonstruovali a zmrazili, rozmrazte před deparafinizací příslušný počet alikvotních podílů, které jsou nutné pro cyklus (pro každý vzorek je nutné 70 µl rekonstituované **PK**).
2. Všechny roztoky uchovávané při teplotě 15-30 °C by měly být čiré. Pokud v jakémkoli činidle zpozorujete sraženinu, zahřejte roztok na 37 °C ve vodní lázni, až se sraženina rozpustí. Činidla nepoužívejte, dokud se sraženina nerozpustí.
3. Připravte DNA promývací pufr I (**WB I**) přidáním 15 ml absolutního etanolu do láhve **WB I**. Promíchejte tím, že láhev 5krát až 10krát otočíte. Na lahvičku poznamenejte, že byl přidán ethanol a datum přidání. Uchovávejte pracovní **WB I** při teplotě 15 °C až 30 °C.
4. Připravte DNA promývací pufr II (**WB II**) přidáním 50 ml absolutního etanolu do láhve **WB II**. Promíchejte tím, že láhev 5krát až 10krát otočíte. Na lahvičku poznamenejte, že byl přidán ethanol a datum přidání. Uchovávejte pracovní **WB II** při teplotě 15 °C až 30 °C.

Deparafinizace FFPE řezů na sklíčkích

POZN.: Xylen je nebezpečná chemická látka. Všechny kroky pro odstranění parafinu musí být provedeny pod digestoří. Dbejte pokynů uvedených v části „Varování a bezpečnostní opatření“.

- A. Přidejte sklíčko s 5µm FFPE řezem do nádoby s dostatečným množstvím xylenu pro pokrytí tkání a nechte 5 minut působit.
- B. Přeneste sklíčko do nádoby s dostatečným množstvím absolutního etanolu pro pokrytí tkání a nechte 5 minut působit.
- C. Vyjměte sklíčko z etanolu a ponechte řez zcela vyschnout na vzduchu (5 až 10 minut).
- D. Jestliže vzorek obsahuje < 10 % nádorových buněk, proveďte makrodisekci.
- E. Pro každý vzorek označte jednu 1,5ml zkumavku Safe-Lock pro mikrocentrifugu identifikačními informacemi o vzorku.
- F. Přidejte 180 µl **DNA TLB** do označené 1,5ml zkumavky Safe-Lock pro mikrocentrifugu.
- G. Přidejte 70 µl rekonstituované **PK** do 1,5ml zkumavky Safe-Lock s obsahem **DNA TLB**.
- H. Seškrábejte tkáň ze sklíčka do zkumavky Safe-Lock. Tkáň ponořte do směsi **DNA TLB/PK**.
- I. Pokračujte krokem A postupu Izolace DNA.

Deparafinizace FFPE řezů neumístěných na sklíčkích

POZN.: Xylen je nebezpečná chemická látka. Všechny kroky pro odstranění parafinu musí být provedeny pod digestoří. Dbejte pokynů uvedených v části „Varování a bezpečnostní opatření“.

- A. Vložte jeden 5µm FFPE řez do 1,5ml zkumavky Safe-Lock pro mikrocentrifugu označené identifikačním informacemi každého vzorku.
- B. Přidejte 500 µl Xylenu do zkumavky Safe-Lock, která obsahuje FFPE řez.
- C. Dobře promíchejte vířením po dobu 10 sekund.
- D. Ponechte zkumavku stát 5 minut při teplotě 15 °C až 30 °C.
- E. Přidejte 500 µl absolutního etanolu a promíchejte vířením po dobu 10 sekund.
- F. Ponechte zkumavku stát 5 minut při teplotě 15 °C až 30 °C.
- G. Odstřed'ujte při 16 000 x g až 20 000 x g po dobu 2 minut. Odstraňte supernatant bez porušení pelety. Zlikvidujte supernatant do chemického odpadu.
- H. Přidejte 1 ml absolutního etanolu a smíchejte vířením po dobu 10 sekund.

I. Odstředíte při 16 000 x g až 20 000 x g po dobu 2 minut. Odstraňte supernatant bez porušení pelety. Zlikvidujte supernatant do chemického odpadu.

POZN.: Jestliže ve zbývajícím supernatantu peleta plave, opět odstředíte 1 minutu při 16 000 x g až 20 000 x g. Veškerý zbývajcí supernatant odstraňte.

J. Vysušte tkáňovou peletu s otevřenými zkumavkami ve vyhřívacím bloku 10 minut při 56 °C.

POZN.: Před dalším krokem se ujistěte, že se etanol zcela odpařil a peleta je suchá.

POZN.: V případě potřeby je možné vysušené pelety skladovat při teplotě 2 °C až 8 °C až 24 hodin.

K. Resuspendujte tkáňovou peletu ve 180 µl DNA tkáňového lytického pufru (DNA TLB).

L. Přidejte 70 µl rekonstituované PK.

M. Pokračujte krokem A postupu Izolace DNA.

PŘÍPRAVA VZORKU

Postup pro izolaci DNA

POZN.: Negativní kontrolu zpracujte souběžně se vzorkem/vzorky. Připravte negativní kontrolu smícháním 180 µl DNA tkáňového lytického pufru (DNA TLB) a 70 µl roztoku PK v 1,5ml zkumavce Safe-Lock pro mikrocentrifugu označené NEG CT. Negativní kontrolu je nutné zpracovat stejně jako vzorky.

A. Vířením po dobu 30 sekund promíchejte zkumavky obsahující směs vzorku/DNA TLB/PK a směs s negativní kontrolou (NEG CT).

POZN.: Tkáň musí být zcela ponořena ve směsi DNA TLB/PK.

B. Vložte zkumavky do suchého vyhřívacího bloku a inkubujte 60 minut při teplotě 56 °C.

C. Zkumavky míchejte vířením po dobu 10 sekund.

POZN.: Tkáň musí být zcela ponořena ve směsi DNA TLB/PK.

D. Vložte zkumavky do suchého vyhřívacího bloku a inkubujte 60 minut při teplotě 90 °C.

POZN.: Během inkubace si připravte požadovaný počet filtračních zkumavek (FT) s víčky. Vložte FT do odběrové zkumavky (CT) a každé víčko FT označte správnou identifikací vzorku nebo kontroly.

POZN.: Každý vzorek bude potřebovat 1 FT, 3 CT a jednu eluční zkumavku (1,5ml zkumavku pro mikrocentrifugu).

POZN.: Během inkubace označte požadovaný počet elučních zkumavek (1,5ml zkumavky pro mikrocentrifugu) příslušnou identifikací vzorku nebo kontroly.

E. Ponechte zkumavky vychladnout na teplotu 15 °C až 30 °C. Po ochlazení odstředíte zkumavky v centrifuze, aby se odstranil zbytek kapaliny z oblasti víček.

F. Přidejte do každé zkumavky 200 µl DNA PBB a pipetováním 3x nahoru a dolů smíchejte.

G. Inkubujte zkumavky 10 minut při teplotě 15 °C až 30 °C.

H. Přidejte do každé zkumavky 100 µl izopropanolu a pipetováním 3x nahoru a dolů lyzát smíchejte.

I. Přeneste lyzát do příslušně označené jednotky FT/CT.

J. Odstředíte jednotky FT/CT při 8 000 x g po dobu 1 minuty.

K. Vložte každou FT do nové CT. Použitou kapalinu ze starých CT zlikvidujte do chemického odpadu a řádně zlikvidujte použité zkumavky CT.

L. Přidejte 500 µl pracovního **WB I** do každé **FT**.

POZN.: Příprava pracovního WB I je popsána v části „Příprava činidel“.

M. Odstředte jednotky **FT/CT** při 8 000 x g po dobu 1 minuty.

N. Použitou kapalinu ze starých **CT** zlikvidujte do chemického odpadu. Vložte **FT** zpět do stejné **CT**.

O. Přidejte 500 µl pracovního **WB II** do každé **FT**.

POZN.: Příprava pracovního WB II je popsána v části „Příprava činidel“.

P. Odstředte jednotky **FT/CT** při 8 000 x g po dobu 1 minuty.

Q. Vložte každou **FT** do nové **CT**. Použitou kapalinu ze starých **CT** zlikvidujte do chemického odpadu a řádně zlikvidujte použité zkumavky **CT**.

R. Odstředte jednotky **FT/CT** při 16 000 až 20 000 x g po dobu 1 minuty, aby vyschly membrány filtrů.

S. Vložte každou zkumavku **FT** do eluční zkumavky (1,5ml zkumavka pro mikrocentrifugu) předem označenou identifikací vzorku nebo kontroly. Použitou kapalinu ze starých **CT** zlikvidujte do chemického odpadu a řádně zlikvidujte použité zkumavky **CT**.

T. Přidejte 100 µl **DNA EB** do středu každé membrány **FT** aniž byste se dotkli membrány **FT**.

U. Inkubujte **FT** s eluční zkumavkou při teplotě 15 °C až 30 °C po dobu 5 minut.

V. Odstředte **FT** s eluční zkumavkou při 8 000 x g po dobu 1 minuty, aby došlo k nahromadění eluátu do eluční zkumavky. Řádně zlikvidujte použitou **FT**.

W. Uzavřete víčko na eluční zkumavce. Eluční zkumavka obsahuje zásobní DNA. Pokračujte krokem A v části **Kvantifikace DNA**.

POZN.: Měření koncentrace DNA je nutné provést před uchováním okamžitě po izolaci DNA.

Kvantifikace DNA:

A. Každou zásobní DNA míchejte vířením po dobu 5 sekund.

B. Spektrofotometrem Nanodrop UV-Vis (ND-1000 nebo ND-2000) kvantifikujte DNA podle protokolu výrobce. **DNA EB** použijte pro zařízení jako slepou. Průměrně jsou nutná dvě konzistentní měření. Když jsou hodnoty koncentrace DNA $\geq 20,0$ ng/µl, tato dvě měření by měla být v rozsahu ± 10 % vůči svým hodnotám. Při koncentraci DNA $< 20,0$ ng/µl musí být tato dvě měření v rozmezí ± 2 ng/µl. Pokud hodnoty těchto dvou měření nejsou vůči sobě v rozsahu ± 10 %, když jsou koncentrace DNA $\geq 20,0$ ng/µl nebo v rozsahu ± 2 ng/µl, když jsou koncentrace DNA $< 20,0$ ng/µl, je nutné provést další dvě měření, až se dosáhne daných požadavků. Poté je nutné vypočítat průměr těchto dvou měření.

POZN.: Zásobní DNA ze zpracovaných negativních kontrol (NEG CT) není nutné měřit.

C. Aby bylo možné provést test mutace genu **KRAS cobas[®]**, musí být koncentrace zásobní DNA ze vzorků ≥ 4 ng/µl. Každý vzorek projde 2x amplifikací/detekcí. Pro každou amplifikaci/detekci se použije 25 µl roztoku zásobní DNA 2 ng/µl (celkem 50 ng DNA).

POZN.: Aby bylo možné provést test mutace genu **KRAS cobas[®], každá zásobní DNA musí mít minimální koncentraci 4 ng/µl. Pokud je koncentrace zásobní DNA < 4 ng/µl, je nutné deparafinizaci, izolaci DNA a kvantifikaci DNA pro tento vzorek opakovat s použitím dvou 5µm FFPET řezů. U vzorků na sklíčcích po deparafinizaci smíchejte tkáň z obou částí do jedné zkumavky, ponořte tkáň do DNA TLB + PK a proveďte izolaci DNA a kvantifikaci podle popisu výše. U vzorků bez sklíčček smíchejte tkáň z obou částí do jedné zkumavky, ponořte tkáň do DNA TLB + PK a proveďte izolaci DNA a kvantifikaci podle popisu výše. Pokud je koncentrace zásobní DNA stále < 4 ng/µl, požádejte dodávací klinické pracoviště o další FFPET vzorek.**

POZN.: Zásobní DNA (zpracovaný vzorek a negativní kontrolu) můžete uchovávat při teplotě 2-8 °C až 2 týdny nebo při teplotě -20 °C až 60 dní.

AMPLIFIKACE A DETEKCE

POZN.: Aby nedošlo ke kontaminaci pracovního MMX vzorky DNA, musí se amplifikace a detekce provádět v místě odděleném od izolace DNA. Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou MMX pečlivě vyčistit. Při pečlivém vyčištění je nutné všechny stojany a pipety řádně otřít 0,5% roztokem chlornanu sodného a poté otřít 70% roztokem etanolu. Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný v koncentraci 5,25 %. Roztok o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

Nastavení zařízení:

Viz uživatelská příručka pro analyzátor **cobas z 480**, kde najdete podrobné postupy pro analyzátor **cobas z 480**.

Nastavení kroků testu:

Podrobný pracovní postup při testu mutace genu KRAS najdete v provozní příručce k systému **cobas® 4800** verze softwaru 2.0 pro test mutace KRAS **cobas®** (Provozní příručka k testu KRAS **cobas®**).

Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku:

Výpočet ředění zásobní DNA při koncentracích od 4 ng/μl do 28 ng/μl

POZN.: Zásobní DNA ze vzorků je nutné ředit bezprostředně před amplifikací a detekcí.

POZN.: Každý vzorek projde dvakrát (2) amplifikací/detekcí. Pro každou amplifikaci/detekci se použije 50 μl (25 μl pro kodon 12/13 a 25 μl pro kodon 61) roztoku zásobní DNA 2 ng/μl (celkem 100 ng DNA).

A. Pro každý vzorek vypočtete objem (μl) potřebné zásobní DNA:

$$\text{Objem zásobní DNA v } \mu\text{l} = (70 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{koncentrace zásobní DNA [ng}/\mu\text{l]}$$

B. Pro každý vzorek vypočtete objem (μl) roztoku pro ředění vzorků DNA (**DNA SD**):

$$\mu\text{l DNA SD} = 70 \mu\text{l} - \mu\text{l zásobní DNA}$$

Příklad:

Koncentrace zásobní DNA = 6,5 ng/μl

A. $\mu\text{l zásobní DNA} = (70 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 21,5 \mu\text{l}$

B. $\mu\text{l DNA SD} = (70 \mu\text{l} - 21,5 \mu\text{l}) = 48,5 \mu\text{l}$

Výpočet ředění zásobní DNA při koncentracích > 28 ng/μl

POZN.: Zásobní DNA ze vzorků je nutné ředit bezprostředně před amplifikací a detekcí.

POZN.: Každý vzorek projde dvakrát (2) amplifikací/detekcí. Pro každou amplifikaci/detekci se použije 50 μl (25 μl pro kodon 12/13 a 25 μl pro kodon 61) roztoku zásobní DNA 2 ng/μl (celkem 100 ng DNA).

A. Při koncentraci zásobní DNA > 28 ng/μl použijte následující vzorec pro výpočet množství roztoku pro ředění DNA vzorků (**DNA SD**) požadovaného k přípravě alespoň 70 μl naředěné zásobní DNA. Díky tomu každý vzorek použije minimálně 5 μl zásobní DNA.

B. Pro každý vzorek vypočítejte objem (μL) **DNA SD** potřebné k ředění 5 μl zásobní DNA na 2 ng/μl:

$$\text{Objem potřebného DNA SD v } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l} \text{ zásobní DNA} \times \text{konc. zásobní DNA v ng}/\mu\text{l}) / (2 \text{ ng}/\mu\text{l})] - 5 \mu\text{l}$$

Příklad:

Koncentrace zásobní DNA = 31,7 ng/μl

A. $\text{Objem požadovaného DNA SD v } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l} \times 31,7 \text{ ng}/\mu\text{l}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 74,3 \mu\text{l}$

B. Použijte vypočtený objem **DNA SD** k ředění 5 μl zásobní DNA.

Ředění vzorků

- Připravte si příslušné množství 1,5ml zkumavek Safe-Lock pro mikrocentrifugu pro ředění zásobní DNA a označte je příslušnou identifikací vzorku.
- Pomocí pipetoru se špičkou bránící vzniku aerosolů napipetujte vypočtené objemy **DNA SD** do každé označené zkumavky. Napipetujte 35 µl **DNA SD** do zkumavky Safe-Lock označené **NEG CT**.
- Viřte každou zásobní DNA a negativní kontrolu po dobu 5 až 10 sekund.
- Pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou (pro každé pipetování použijte novou špičku) opatrně napipetujte vypočtený objem každé zásobní DNA do příslušně značené zkumavky obsahující **DNA SD**. Do zkumavky **NEG CT** napipetujte 35 µl negativní kontroly (extrahovaný eluát).
- Zkumavky uzavřete a každou nechte 5 až 10 sekund vířit.
- Vyměňte rukavice.

Příprava pracovních Master Mixů (MMX 12/13 a MMX 61)

POZN.: KRAS 12/13 OM, KRAS 61 OM a pracovní MMX jsou citlivé na světlo a je nutné je chránit před dlouhodobým působením světla.

POZN.: KRAS MIX a pracovní MMX pipetujte kvůli jejich viskozitě pomalu a ujistěte se, že je směs ze špičky zcela vytlačena.

POZN.: KRAS MIX, KRAS 12/13 OM a KRAS 61 OM mohou být čiré až žluté. To nemá vliv na účinnost činidel.

Do jednotlivých 1,5ml zkumavek Safe-Lock pro mikrocentrifugy připravte dva pracovní MMX. Jednu s obsahem **KRAS 12/13 OM** a druhou s obsahem **KRAS 61 OM**.

- Vypočtete objem potřebného **KRAS MIX** pro každý pracovní MMX pomocí následujícího vzorce:
Objem požadovaného **KRAS MIX** = (počet vzorků + 2 kontroly + 1 kalibrátor + 1) x 10 µl
- Vypočtete objem požadovaného **KRAS 12/13 OM** nebo **KRAS 61 OM** pro každý MMX pomocí následujícího vzorce:
Objem požadovaného **KRAS 12/13 OM** nebo **KRAS 61 OM** = (počet vzorků + 2 kontroly + 1 kalibrátor + 1) x 10 µl
- Vypočtete objem potřebného **MGAC** pro každý pracovní MMX pomocí následujícího vzorce:
Objem požadovaného **MGAC** = (počet vzorků + 2 kontroly + 1 kalibrátor + 1) x 6 µl

Tabulku 1 použijte ke stanovení objemu každého činidla potřebného pro přípravou pracovního MMX na základě počtu vzorků v cyklu.

Tabulka 1
Objemy činidel potřebných pro pracovní MMX 12/13 a pracovní MMX 61

		Objemy činidel potřebné pro pracovní MMX									
		Počet vzorků*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KRAS MIX	10 µl	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
KRAS 12/13 OM nebo KRAS 61 OM	10 µl	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
MGAC	6 µl	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84
Celkový objem µl		130	156	182	208	234	260	286	312	338	364

* Zahnuje dostatečný objem pro 1 zkumavku na vzorek, 2 kontrolní zkumavky, 1 zkumavku s kalibrátorem a 1 zkumavku navíc

- Vyjměte příslušný počet lahviček **KRAS MIX, KRAS 12/13 OM, KRAS 61 OM** a **MGAC** z místa skladování o teplotě 2-8 °C. Před použitím každé činidlo míchejte 5 sekund vířením, a shromážděte kapalinu ve spodní části zkumavky. Označte sterilní zkumavku pro mikrocentrifugu pro pracovní MMX 12/13 a pracovní MMX 61.
- Přidejte vypočtený objem **KRAS MIX** do zkumavek pro pracovní MMX.
- Přidejte vypočtený objem **KRAS 12/13 OM** nebo **KRAS 16 OM** do odpovídajících zkumavek pro pracovní MMX.

G. Přidejte vypočtený objem **MGAC** do zkumavek s pracovním MMX.

H. Zkumavky vířením po dobu 3 až 5 sekund promíchejte, aby došlo k dostatečnému promíchání.

POZN.: Vzorky, kontroly a kalibrátor je nutné dát na mikrotitrační destičku (AD-destičku) do jedné hodiny po přípravě pracovního MMX.

POZN.: Používejte pouze mikrotitrační destičku (AD-destičku) a zalepovací fólii (Roche P/N 05232724001) pro systém cobas® 4800.

Obrázek 1
Rozvržení destičky se vzorky

Rozvržení destičky se vzorky												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KRAS MC 12/13	KRAS MC 61	Vzorek 6 12/13	Vzorek 6 61	Vzorek 14 12/13	Vzorek 14 61	Vzorek 22 12/13	Vzorek 22 61				
B	NEG CTL 12/13	NEG CTL 61	Vzorek 7 12/13	Vzorek 7 61	Vzorek 15 12/13	Vzorek 15 61	Vzorek 23 12/13	Vzorek 23 61				
C	KRAS CAL 12/13	KRAS CAL 61	Vzorek 8 12/13	Vzorek 8 61	Vzorek 16 12/13	Vzorek 16 61	Vzorek 24 12/13	Vzorek 24 61				
D	Vzorek 1 12/13	Vzorek 1 61	Vzorek 9 12/13	Vzorek 9 61	Vzorek 17 12/13	Vzorek 17 61						
E	Vzorek 2 12/13	Vzorek 2 61	Vzorek 10 12/13	Vzorek 10 61	Vzorek 18 12/13	Vzorek 18 61						
F	Vzorek 3 12/13	Vzorek 3 61	Vzorek 11 12/13	Vzorek 11 61	Vzorek 19 12/13	Vzorek 19 61						
G	Vzorek 4 12/13	Vzorek 4 61	Vzorek 12 12/13	Vzorek 12 61	Vzorek 20 12/13	Vzorek 20 61						
H	Vzorek 5 12/13	Vzorek 5 61	Vzorek 13 12/13	Vzorek 13 61	Vzorek 21 12/13	Vzorek 21 61						

A. Do každé reakční jamky na mikrotitrační destičce (AD-destičce), která je potřebná pro cyklus, přidejte 25 µl pracovního MMX. Špička pipety se nesmí dotknout destičky mimo danou jamku.

- Do lichých sloupečků (1, 3, 5 atd.) s jamkami na mikrotitrační destičce (AD-destičce) přidejte pracovní MMX 12/13 (obsahující KRAS 12/13 OM)
- Do sudých sloupečků (2, 4, 6 atd.) s jamkami na mikrotitrační destičce (AD-destičce) přidejte pracovní MMX 61 (obsahující **KRAS 61 OM**).

B. Napipetujte 25 µl **KRAS MC** do jamek **A1** a **A2** mikrotitrační destičky (AD-destičky); pipetou dobře promíchejte - odsajte a dávkujte v jamce alespoň dvakrát.

C. Pomocí nové pipetovací špičky napipetujte 25 µl **NEG CT** do jamek **B1** a **B2** na mikrotitrační destičce (AD-destičce) a pomocí pipety dobře promíchejte - odsajte a dávkujte v jamce alespoň dvakrát.

D. Pomocí nové pipetovací špičky napipetujte 25 µl **KRAS CAL** do jamek **C1** a **C2** na mikrotitrační destičce (AD-destičce) a pomocí pipety dobře promíchejte - odsajte a dávkujte v jamce alespoň dvakrát.

POZN.: Každý cyklus musí obsahovat pozitivní kontrolu (KRAS MC) v jamkách A1 a A2, negativní kontrolu (NEG CT) v jamkách B1 a B2 a kalibrátor (KRAS CAL) v jamkách C1 a C2. V opačném případě analyzátor cobas z 480 cyklus zneplatní.

POZN.: Podle potřeby měňte rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci mezi vzorky a kontaminaci PCR reakční zkumavky zvnějšku.

E. Pomocí nových pipetovacích špiček pro každý nařaděný vzorek DNA přidejte 25 µl prvního vzorku DNA do jamek **D1** a **D2** na mikrotitrační destičce (AD-destičce); pomocí pipety dobře promíchejte - odsajte a dávkujte v jamce alespoň dvakrát. Opakujte tento postup i u nařaděné DNA druhého vzorku (jamky **E1** a **E2**). Postupujte podle vzoru na obrázku 1, až budou všechny nařaděné vzorky DNA na mikrotitrační destičce (AD-destičce). Ujistěte se, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamky.

F. Zalepte mikrotitrační destičku (AD-destičku) zalepovací fólií (dodanou s destičkou). Pomocí aplikátoru k zalepovací fólii přilepte zalepovací fólii pevně k mikrotitrační destičce (AD-destičce).

G. Před zahájením PCR se ujistěte, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamek.

POZN.: Amplifikace a detekce musí začít do 1 hodiny od okamžiku přidání prvního ředění vzorku DNA do pracovního MMX.

Zahájení PCR

Podrobné pokyny pracovního postupu KRAS najdete v provozní příručce k testu KRAS cobas®.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

POZN.: Veškerou validaci cyklů a vzorků provádí software cobas® 4800.

POZN.: Platný cyklus může zahrnovat jak platné tak i neplatné výsledky vzorků.

Jestliže je měření platné, lze výsledky vzorků interpretovat způsobem, který je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2
Interpretace výsledků testu mutace genu KRAS cobas®

Výsledky testu	Výsledek mutace	Interpretace
Mutation Detected	Kodon 12/13 nebo kodon 61 (přítomny mohou být oba)	Mutace detekována v kodonu KRAS 12/13 nebo 61 nebo v obou.
Mutation Not Detected*	N/A	Mutace nebyla detekována v kodonu 12/13 a 61 KRAS.
Invalid	N/A	Výsledek vzorku je neplatný. Opakujte testování vzorků s neplatnými výsledky podle pokynů v části níže Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky.
Failed	N/A	Neúspěšný cyklus způsobený poruchou hardwaru nebo softwaru. Vyžádejte si od místního zastoupení společnosti Roche technickou pomoc.

* Výsledek „Mutation Not Detected“ nevylučuje přítomnost mutace genu KRAS v kodonu 12/13 nebo 61, protože výsledky závisí na procentním množství mutantních sekvencí, integritě příslušného vzorku, nepřítomnosti inhibitorů a dostatečném množství detekované DNA.

Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky

- Opakujte ředění neplatné zásobní DNA ze vzorku od postupu **Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku a Ředění vzorků** v části **AMPLIFIKACE A DETEKCE**.
- Po naředění zásobní DNA na koncentraci 2 ng/μl, jak je uvedeno v **Ředění vzorků** pokračujte částí **Příprava pracovních Master Mixů (MMX 12/13 a MMX 61)** a zbývající částí amplifikace a detekce.

POZN.: Jestliže je vzorek po novém testování stále neplatný nebo nebylo dostatečné množství zásobní DNA pro přípravu dalšího ředění v kroku A, části „Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky“, opakujte celý test s daným vzorkem počínaje deparafinizací a izolací DNA s novým 5μm řezem FFPET.

KONTROLA KVALITY

V každém cyklu je zahrnuta jedna sada, která obsahuje kontrolu pro test mutace KRAS cobas® (**KRAS MC**), negativní kontrolu (**NEG CT**) a kalibrátor KRAS (**KRAS CAL**) pro pracovní MMX 12/13 a pracovní MMX 61. Cyklus je platný, jestliže jsou platné jamky s kontrolami mutace KRAS (**KRAS MC**) (**A1** a **A2**), jamky s negativními kontrolami (**NEG CT**) (**B1** a **B2**) a jamky s kalibrátorem KRAS (**KRAS CAL**) (**C1** a **C2**). Jestliže jsou kontrola mutace KRAS (**KRAS MC**), negativní kontrola (**NEG CT**) nebo kalibrátor KRAS (**KRAS CAL**) pro pracovní MMX 12/13 nebo pracovní MMX 61 neplatné, cyklus je neplatný celý a musí se opakovat. Čerstvě si naředte již dříve izolovanou zásobní DNA ze vzorku a připravte si novou mikrotitrační destičku (AD-destičku) s kontrolami pro amplifikaci a detekci.

Pozitivní kontrola

Výsledek kontroly mutace KRAS (**KRAS MC**) musí být „Valid“ jak pro pracovní MMX 12/13, tak pro pracovní MMX 61. Pokud jsou výsledky kontroly **KRAS MC** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Negativní kontrola

Výsledek negativní kontroly (**NEG CT**) musí být „Valid“ jak pro pracovní MMX 12/13, tak pro pracovní MMX 61. Pokud jsou výsledky kontroly **NEG CT** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Kalibrátor

Výsledek kalibrátoru KRAS (**KRAS CAL**) musí být „Valid“ jak pro pracovní MMX 12/13, tak pro pracovní MMX 61. Pokud jsou výsledky **KRAS CAL** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické citlivosti testu je třeba dbát opatrnosti, aby mezi činidly a amplifikačními směsmi nedošlo ke kontaminaci.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Testujte pouze indikované typy vzorků. Test mutace genu KRAS **cobas**[®] byl validován pro použití jen s FFPET vzorky kolorektálního karcinomu.
2. Test mutace genu KRAS **cobas**[®] byl validován jen se soupravou pro přípravu vzorků DNA **cobas**[®] (Roche P/N: 05985536190).
3. Detekce mutace závisí na tom, kolik kopií genu je ve vzorku přítomno, a vliv mohou mít i integrity vzorku, množství izolované DNA a přítomnost interferenčních látek.
4. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy fixace vzorků, transportu, skladování a zpracování vzorků. Postupujte dle kroků uvedených v příbalovém letáku a v příručce obsluhy pro KRAS **cobas**[®].
5. Přidání enzymu AmpErase k činidlu Master Mix testu mutace genu KRAS **cobas**[®] umožňuje selektivní amplifikaci cílové DNA. Aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy uvedené v tomto příbalovém letáku.
6. Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v technikách PCR a v používání systému **cobas**[®] 4800.
7. Pouze analyzátor **cobas z 480** byl validován pro použití s tímto produktem. S tímto produktem se nesmí používat žádný jiný termocykler s optickou detekcí v reálném čase.
8. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem od jedné technologie k druhé provedli ve své laboratoři studie pro stanovení rozdílů mezi těmito technologiemi.
9. Vlivy jiných proměnných, jako jsou proměnné fixace vzorku, hodnoceny nebyly.
10. I když vzácně, mutace v oblastech genomické DNA genu KRAS pokryté primery a/nebo sondami test mutace genu KRAS **cobas**[®] mohou vést k selhání detekce mutace.
11. Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.
12. Zřídka (< 0,2 %²⁴), test mutace genu KRAS **cobas**[®] vykazuje výsledek „Mutation Not Detected“ u některých komplexních a vícečetných mutací kodonu 12/13 a kodonu 61 a omezenou zkříženou reaktivitu (výsledky „Mutation Detected“ u mutací lemujících kodon 12/13 v exonu 2 a kodon 61 v exonu 3.

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

Analytická citlivost

Analytická citlivost testu mutace genu KRAS **cobas**[®] byla zjišťována pomocí dilučních panelů připravených ze čtyř typů vzorků:

- Směsi buněčné linie připravené smícháním zásobních DNA získaných z buněčné linie s mutací genu KRAS a z buněčné linie divokého typu genu KRAS.
- Plazmidové směsi připravené smícháním plazmidu obsahujícího mutaci KRAS a zásobní DNA z buněčné linie divokého typu KRAS.
- Směsi vzorků připravených smícháním zásobních DNA získaných z FFPET vzorků s mutací genu KRAS a FFPET vzorků divokého typu genu KRAS.
- Zásobní DNA extrahované z jednotlivých FFPET vzorků.

Všechny vzorky použité v této studii byly sekvenovány pomocí 454 genomického sekvenceru FLX Titanium (sekvenování 454), aby bylo možné stanovit procentuální mutaci každého vzorku.

Analytická citlivost testu mutace genu KRAS **cobas**[®] pomocí směsí buněčné linie nebo plazmidů

DNA z buněčných linií obsahujících mutaci v kodonu 12 nebo 13 exonu 2 genu KRAS byly extrahovány a smíchány s extrakty DNA z buněčné linie divokého typu genu KRAS a vznikl tak vzorek s 5% mutací ověřený 454 sekvenováním. Tři jednotlivé diluční panely obsahovaly následující ředění (50,0; 25,0; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8 a 0,4 ng/25 µl). Pomocí tří šarží testu mutace genu KRAS **cobas**[®] bylo testováno dvacet čtyři (24) replikátů každého člena panelu (n=72/replikátů celkem). Citlivost byla stanovena nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu mutace KRAS „Mutation Detected“ alespoň 95 %, viz tabulka 3.

Tabulka 3
Citlivost testu mutace genu KRAS **cobas[®] pomocí směsí buněčné linie nebo plazmidů**

Mutace KRAS	Typ vzorku	Procento mutace*	Množství DNA v členu panelu (ng/25 µl) nutné k dosažení míry pozitivitu „Mutation Detected“ ≥ 95% (N=72 replikátů)
Kodon 12 (Exon 2)	Směs buněčné linie	5,3 %	0,8
Kodon 13 (Exon 2)	Směs buněčné linie	4,9 %	1,6
Kodon 61 (Exon 3)	Směs plazmidů	5,8 %	6,3

* Průměrné procento mutace určené sekvenováním 454

Test měl míru pozitivitu „Mutation Detected“ 95% při 0,8 ng/25 µl, 1,6 ng/25 µl a 6,3 ng/25 µl, (ředění 1:64, 1:32 a 1:8 doporučené koncentraci DNA 50 ng/25 µl) pro mutace kodonu 12, 13 a 61 genu KRAS. To znamená, že tento test bude detekovat mutaci genu KRAS, když bude 87 % DNA degradováno nebo neamplifikovatelné kvůli procesu fixace, za předpokladu, že DNA směsi buněčné linie plazmidů obsahovaly 100 % neporušené a amplifikovatelné DNA.

Analytická citlivost stanovená pomocí FFPET vzorků a směsí vzorků

Extrakty DNA FFPET mutovaných vzorků s kodony 12, 13 a 61 genu KRAS byly smíchány s extrakty FFPET vzorků divokého typu genu KRAS, čímž vznikly vzorky s hladinou mutace 5 %. K testování mutace kodonu 12 genu KRAS byl použit jeden přirozený vzorek. Konečná hladina mutace všech vzorků byly ověřeny sekvenováním 454. Každý vzorek/směsi vzorků byly rozředěn(y), aby vznikl panel se členy (50,0; 25,0; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8 a 0,4 ng/25 µl). Člen panelu 50 ng/25 µl nebyl testován na směs #2 exon 3, kodon 61.

Pomocí tří šarží testu mutace genu KRAS **cobas**[®] bylo testováno osm (8) replikátů každého člena panelu (n=24/člena panelu). Citlivost každého vzorku byla stanovena nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu mutace KRAS „Mutation Detected“ alespoň 95 %, viz tabulka 4.

Tabulka 4
Citlivost testu mutace genu KRAS cobas® pomocí vzorku a směsí vzorků

Mutace KRAS	Typ vzorku	Procento mutace	Množství DNA v členu panelu (ng/25 µl) nutné k dosažení míry pozitivivity „Mutation Detected“ ≥ 95 % (N=24 replikátů)
Kodon 12 (Exon 2)	FFPET vzorek	4,3 %	3,1
	Směs FFPET	4,2 %	3,1
	Směs FFPET	4,7 %	3,1
Kodon 13 (Exon 2)	Směs FFPET	5,0 %	3,1
	Směs FFPET	4,6 %	1,6
	Směs FFPET	7,2 %	1,6
Kodon 61 (Exon 3)	Směs FFPET	4,4 %	3,1
	Směs FFPET	5,5 %	3,1
	Směs FFPET	3,8 %	6,3

Tato studie ukazuje, že test mutace genu KRAS **cobas®** dokáže detekovat mutace kodonu 12, 13 a 61 genu KRAS při hladině mutace 5 % při použití standardní koncentrace 50 ng/25 µl. Schopnost testu detekovat mutace při nižších vstupních hladinách koncentrace DNA ukazuje, že vzorky mohou obsahovat DNA degradovanou fixačním procesem nebo neamplifikovatelnou DNA a přesto bude mutace detekována.

Korelace s referenční metodou

Pomocí každé ze 2 šarží testu mutace genu KRAS **cobas®** bylo testováno 188 FFPET vzorků s kolorektálním karcinomem. U všech vzorků bylo provedeno srovnávací testování pomocí 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody. Neshodné výsledky mezi testem mutace genu KRAS **cobas®** a 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou byly dořešeny pomocí sekvenování 454.

Výsledky testu mutace genu KRAS cobas® a 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody

Informace o vzorcích a výsledky 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody u 188 vzorků jsou shrnuty v tabulce 5. Osmdesát jeden (81) ze 188 vzorků obsahoval mutaci v kodonu 12/13 genu KRAS a 7 mutací v kodonu 61 genu KRAS. 107 vzorků bylo buď divokého typu genu KRAS nebo s mutací jinou než kodonu 12/13 dle Sangerovy sekvenační metody a 181 vzorek byl buď divokého typu genu KRAS nebo s mutací jinou než kodonu 61 genu KRAS.

Tabulka 5
Stádium nádoru vs. Sangerova sekvenační metoda

Stádium nádoru	Výsledky 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody				Celkem	Celkem %
	Kodon 12	Kodon 13	Kodon 61	Divoký typ		
Stádium I	6	2	0	3	11	5,8 %
Stádium II	20	5	3	37	65	34,4 %
Stádium III	21	8	1	38	68	36,0 %
Stádium IV	17*	3*	3	20	43	22,8 %
Neznámé stádium	0	0	0	2	2	1,1 %
Celkem	64	18	7	100	189	100,0 %

* Jeden z 81 vzorků s mutací v kodonu 12/13 obsahoval mutace jak v kodonu 12, tak v kodonu 13.

V tabulce 6 jsou výsledky testování 188 vzorků kolorektálního karcinomu testované testem mutace genu KRAS **cobas**[®] ve srovnání s výsledky získanými 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou u mutací KRAS v kodonu 12/13 exonu 2 a mutací v kodonu 61 exonu 3.

Tabulka 6
Srovnání testu mutace genu KRAS cobas[®] a 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody

Kodon 12/13		2X dvousměrná Sangerova sekvenační metoda			Kodon 61		2X dvousměrná Sangerova sekvenační metoda		
		MD	MND	Celkem			MD	MND	Celkem
cobas [®] KRAS	MD	79	6*	85	cobas [®] KRAS	MD	6	1	7
	MND	2	101	103		MND	1	180	181
	Celkem	81	107	188		Celkem	7	181	188
Shoda pozitivních = 97,5% (95% CI = 91,4 až 99,3%)					Shoda pozitivních = 85,7% (95% CI = 48,7 až 97,4%)				
Shoda negativních = 94,4% (95% CI = 88,3 až 97,4%)					Shoda negativních = 99,4% (95% CI = 96,9 až 99,9%)				
Celková shoda = 95,7% (95% CI = 91,8 až 97,8%)					Celková shoda = 98,9% (95% CI = 96,2 až 99,7%)				

MD: Mutace detekována v kodonu 12/13

MND: Divoký typ nebo mutace v jiném kodonu než 12/13

MD: Mutace detekována v kodonu 61

MND: Divoký typ nebo mutace v jiném kodonu než 61

* Kromě dvou vzorků byly všechny výsledky jak pro kodony 12/13, tak pro kodon 61 u všech vzorků mezi dvěma samostatnými šaržemi testu mutace genu KRAS **cobas**[®] konzistentní. Oba vzorky vykázaly výsledky MD pomocí testu mutace genu KRAS **cobas**[®] a MND pomocí 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody pro kodon 12/13 – jeden vzorek pomocí jedné šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®] a druhý vzorek pomocí druhé šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®].

Celková shoda testu mutace genu KRAS **cobas**[®] ve srovnání s 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou mutací kodonu 12/13, exonu 2 genu KRAS byla 95,7 % (celkem 8 neshodných výsledků) pro obě (první i druhou) šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®]. Výsledky získané u obou vzorků pomocí testu mutace genu KRAS **cobas**[®] ve srovnání s výsledky získanými 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou u mutací v kodonu 61 exon 3 genu KRAS byly pro první i druhou šarži činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®] stejné. Celková shoda testu mutace genu KRAS **cobas**[®] ve srovnání s 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou mutací kodonu 61, exonu 3 genu KRAS byla 98,9 % (celkem 2 neshodné výsledky) pro obě (první i druhou) šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®]. Nesouhlasné výsledky byly dořešeny pomocí sekvenování 454.

Testování nesouhlasných výsledků sekvenováním 454

Neshodné výsledky mezi testem mutace genu KRAS **cobas**[®] a 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou kodonu 12/13, exon 2 a kodonu 61, exon 3 genu KRAS byly dořešeny pomocí sekvenování 454 a jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7
Test mutace genu KRAS cobas[®] ve srovnání s 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou a dořešení pomocí sekvenování 454

Kodon 12/13		Sangerova sekvenační metoda dořešena pomocí sekvenování 454			Kodon 61		Sangerova sekvenační metoda dořešena pomocí sekvenování 454		
		MD	MND	Celkem			MD	MND	Celkem
cobas [®] KRAS	MD	84	1*	85	cobas [®] KRAS	MD	7	0	7
	MND	0	103	103		MND	0	181	181
	Celkem	84	104	188		Celkem	7	181	188
Shoda pozitivních = 100 % (95% CI = 95,6 až 100 %)					Shoda pozitivních = 100 % (95% CI = 64,6 až 100 %)				
Shoda negativních = 99,0% (95% CI = 94,8 až 99,8%)					Shoda negativních = 100 % (95% CI = 97,9 až 100 %)				
Celková shoda = 99,5% (95% CI = 97,0 až 99,9%)					Celková shoda = 100 % (95% CI = 98,0 až 100 %)				

MD: Mutace detekována v kodonu 12/13

MND: Divoký typ nebo mutace v jiném kodonu než 12/13

MD: Mutace detekována v kodonu 61

MND: Divoký typ nebo mutace v jiném kodonu než 61

* Kromě dvou vzorků byly všechny výsledky jak pro kodony 12/13, tak pro kodon 61 u všech vzorků mezi dvěma samostatnými šaržemi testu mutace genu KRAS **cobas**[®] konzistentní. Oba vzorky vykázaly výsledky MD pomocí testu mutace genu KRAS **cobas**[®] a MND pomocí 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody a dořešeny byly pomocí sekvenování 454 – jeden vzorek pomocí jedné šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®] a druhý vzorek pomocí druhé šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®].

Poté, co byly sekvenováním 454 dořešeny neshodné výsledky testu mutace genu KRAS **cobas**[®] a 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody při testu mutace kodonu 12/13, exon 2 genu KRAS, celková shoda se zlepšila na 99,5 % u první i druhé šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®]. Poté, co byly sekvenováním 454 dořešeny neshodné výsledky testu mutace genu KRAS **cobas**[®] a 2X dvousměrné Sangerovy sekvenační metody při testu mutace kodonu 61, exon 3 genu KRAS, celková shoda se zlepšila na 100 % u první i druhé šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®].

Specifická

Specifická testu mutace genu KRAS **cobas**[®] byla stanovena pomocí testování 188 FFPET vzorků s kolorektálním karcinomem ve spojení se studií korelace vůči referenční metodě.

Sangerova sekvenační metoda

Specifická testu mutace genu KRAS **cobas**[®] byla vypočtena stanovením procenta FFPET vzorků identifikovaných 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou jako divoký typ genu KRAS a správně vyhodnocených jako divoký typ testem mutace genu KRAS **cobas**[®] (procentní shoda negativních vzorků).

Specifická (procentní shoda negativních vzorků) získaná při testování 188 vzorků nádoru na výskyt mutace v kodonu 12/13, exon 2 genu KRAS pomocí testu mutace genu KRAS **cobas**[®] ve srovnání s 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou činila 94,4 % (tabulka 6) u první i druhé šarže činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®]. Specifická získaná při testování stejných vzorků nádoru na výskyt mutace v kodonu 61, exon 3 genu KRAS pomocí testu mutace genu KRAS **cobas**[®] ve srovnání s 2X dvousměrnou Sangerovou sekvenační metodou byla 99,4 % (tabulka 6) při použití kterékoli ze 2 šarží činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®].

Testování nesouhlasných výsledků sekvenováním 454

Při testování mutací v kodonu 12/13, exon 2 genu KRAS se specifická zlepšila na 99,0 % u první i druhé šarže (tabulka 7) činidel testu mutace genu KRAS **cobas**[®] po použití sekvenování 454 pro dořešení neshodných výsledků mezi testem mutace genu KRAS **cobas**[®] a 2X dvousměrnou Sangerovou DNA sekvenační metodou. Při testování mutací v kodonu 61, exon 3 genu KRAS se specifická zlepšila na 100 % u obou šarží testu mutace genu KRAS **cobas**[®] (tabulka 7).

Ke zlepšení specifické testu mutace genu KRAS **cobas**[®] po provedení rozlišovacího sekvenování 454 došlo díky schopnosti sekvenování 454 detekovat mutace KRAS, které Sangerova sekvenační metoda nedetekovala kvůli nižší citlivosti Sangerovy sekvenační metoda ve srovnání se sekvenováním 454.

Zkřížená reaktivita

Zkřížená reaktivita testu mutace genu KRAS **cobas**[®] byla vyhodnocena následujícími studiemi:

- Testování plazmidů tiché mutace KRAS.
- Testování homologů plazmidů KRAS.
- Testování střevních mikroorganismů.

Zkřížená reaktivita byla vyhodnocena na základě toho, zda přítomnost plazmidů tiché mutace KRAS nebo homologů plazmidů KRAS nebo střevních mikroorganismů interferovala s detekcí mutací v kodonu 12, 13 a 61 genu KRAS.

Plazmidy s tichou mutací KRAS

Byly připraveny a testovány plazmidové vzorky na pozadí buněčné linie DNA divokého typu na následující tři tiché mutace v kodonu 12, exon 2 genu KRAS: GGA, GGC a GGG; tři tiché mutace v kodonu 13, exon 2 genu KRAS: GGA, GGT a GGG. Nebyla zjištěna žádná zkřížená reaktivita plazmidů s tichými mutacemi kodonu 12 nebo 13, exon 2 genu KRAS.

Byly připraveny směsi plazmidů s kodonem 12 nebo kodonem 13 KRAS při 5% mutaci na pozadí buněčné linie DNA divokého typu a testovány za přítomnosti jejich plazmidů s tichou mutací a nebyla detekována žádná interference plazmidů s tichou mutací.

Homology plazmidů KRAS

Byly připraveny vzorky obsahující každý ze šesti homologů plazmidů (kodon 12/13 pseudogenu KRAS, kodon 61 pseudogenu, NRAS exon 2, NRAS exon 3, HRAS exon 2 a HRAS exon 3) na pozadí buněčné linie divokého typu DNA a testovány ve třech kopiích pomocí testu mutace genu KRAS **cobas**[®]. U žádného plazmidového vzorku nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita.

Byly připraveny směsi plazmidů s kodonem 12, kodonem 13 nebo kodonem 61 KRAS při 5% mutaci na pozadí buněčné linie DNA divokého typu a testovány za přítomnosti jejich homologů plazmidů a nebyla detekována žádná interference homologů plazmidů.

Střevní mikroorganismy

Zjistilo se, že v testu mutace genu KRAS **cobas**[®] následující střevní mikroorganismy zkříženě nereagují, když jsou přidány do 5 vzorků divokého typu, kodony 12, 13 a 61 s 1×10^6 CFU během lýzy tkáně:

1. *Bacteroides caccae*
2. *Prevotella intermedia*
3. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Testované mikroorganismy rovněž neinterferovaly s detekcí mutací kodonu 12 KRAS (2 vzorky), kodonu 13 (1 vzorek) nebo kodonu 61 (2 vzorky), když bylo během lýzy tkáně přidáno 1×10^6 CFU vzorku obsahujícího mutaci genu KRAS v koncentracích uvedených v tabulce 8.

Tabulka 8
Procento mutace vzorků testovaných na interferenci způsobenou střevními mikroorganismy

Číslo vzorku	Stav mutace	Procento mutace určené sekvenováním 454
1	Kodon 12	15,9
2	Kodon 12	16,1
3	Kodon 13	42,8
4	Kodon 61	17,0
5	Kodon 61	19,8

Interference

Ukázalo se, že triglyceridy (≤ 37 mM, CLSI doporučené vysoké koncentrace²⁵), hemoglobin (≤ 2 mg/ml, CLSI doporučené vysoké koncentrace²⁵) a $\leq 50\%$ nekrotická tkáň neinterferují s testem mutace genu KRAS **cobas**[®], když potenciálně interferující látka byla přidána do lýzy během přípravy vzorku.

Odolnost testu

Odolnost testu mutace genu KRAS **cobas**[®] byla stanovena pomocí jednoho FFPET vzorku kolorektálního karcinomu s mutací v kodonu 12, exon 2 genu KRAS a jednoho FFPET vzorku kolorektálního karcinomu s mutací v kodonu 61, exon 3 genu KRAS s procentem mutace 13,1 % a 17 %. Pro provedení analýzy bylo u každého vzorku provedeno 100 5µm řezů.

Pomocí soupravy pro přípravu vzorků DNA **cobas**[®] byla z každého řezu extrahována genomická DNA. Z každého ze 100 řezů každého ze 2 vzorků byl testován jeden replikát extrahované genomické DNA. Testem mutace genu KRAS **cobas**[®] bylo vyhodnoceno deset jednotlivých cyklů, kde každý cyklus obsahoval 20 řezů. Test mutace genu KRAS **cobas**[®] vyhodnotil 100 % replikátů vzorku mutace v kodonu 12 genu KRAS a vzorku mutace v kodonu 61 genu KRAS jako „Mutation Detected“, což představuje falešnou negativitu 0 %.

Opakovatelnost

Opakovatelnost testu mutace genu KRAS **cobas**[®] byla vyhodnocena pomocí šesti FFPET vzorků kolorektálního karcinomu. Dva vzorky obsahovaly mutaci v kodonu 12 genu KRAS, dva vzorky obsahovaly mutaci v kodonu 61 genu KRAS a dva vzorky byly s genem KRAS divokého typu. Charakteristiky vzorků ukazuje tabulka 9.

Vzorky byly testovány v duplikátu dvěma obsluhami, pomocí dvou různých šarží činidel a na čtyřech analyzátorech **cobas z 480** v průběhu 4 dní (n=32/vzorek).

Tabulka 9
Opakovatelnost testu mutace genu KRAS cobas[®]

Číslo vzorku	Stav mutace genu KRAS	% mutace	Mutation Detected (n=32)	Mutation Not Detected	Procentní shoda
1	Kodon 12	11,2 %	32	0	100 %
2	Kodon 12	13,6 %	32	0	100 %
3	Kodon 61	18,9 %	32	0	100 %
4	Kodon 61	19,1 %	32	0	100 %
5	Divoký typ	-	0	32	100 %
6	Divoký typ	-	0	32	100 %

Test mutace genu KRAS **cobas**[®] měl korektní správnost 100 % (192/192) při všech kombinacích dní, vzorků, replikátů, obsluhy a šarží činidel.

LITERATURA

1. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
2. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 Feb 10;27(5):663-71.
3. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 Feb 5;360(6):563-72.
4. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
5. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. 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* 2007 Mar 15;67(6):2643-8.
6. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
7. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
8. Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J et al. randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovin, and Oxaliplatin (FOXFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME Study. *J Clin Oncol* 2010 28:4697-4705.
9. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009 Apr 20;27(12):2091-6.
10. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colon cancer, 2010, v.2.
11. Van Cutsem E, Oliveira J; ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009 May;20 Suppl 4:61-3.
12. Food and Drug Administration. Class labeling changes to anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix): KRAS mutations. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucml172905.htm>.
13. European Medicines Agency: Committee for Medicinal Products for Human Use post-authorisation summary of positive opinion for Erbix. http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/Erbix_28040208en.pdf.
14. Shankaran V, Obel J, Benson III AB. Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions. *The Oncologist* 2010 15:157-67.
15. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, et al. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Nov 9(11):1193-7.
16. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001 Sep 1;85(5):692-6.
17. Der CJ, Finkel T, Cooper GM. Biological and biochemical properties of human ras^H genes mutated at codon 61. *Cell* 1986 Jan 17; 44:167-176.
18. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009 Aug 18;101(4):715-21.
19. De Roock W, Claes B, Bernasconi D. et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncology*, 2010 Aug 11(8):753-62.
20. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 93:125-128.
21. Chosewood, L.C. and Wilson, D.E. *Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Fifth # edition.(CDC) 21-1112. 2009.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Villanova, PA:CLSI, 2005.
23. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
24. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2011, v.51, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guidelines – Second Edition, Appendix D 2005.

Informace k revizi dokumentu

Doc Rev. 1.0
05/2011

První publikace.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
Člen Roche Group



Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Distributed by

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguaré, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

ROCHE, COBAS, COBAS Z, TAQMELT a AMPERASE jsou obchodní známky společnosti Roche.

Technika prevence přenosu v enzymu AmpErase je kryta patentem USA č. 5,035,996 a jeho zahraničními protějšky, jež jsou vlastnictvím společnosti Invitrogen Corporation, a je licencována společností Roche Molecular Systems, Inc.

EPPENDORF je obchodní známka společnosti Eppendorf AG.

PIPET-AID je obchodní známka společnosti Drummond Scientific.

NANODROP je obchodní známka společnosti Thermo Scientific.

© 2011 Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

05/2011
Doc Rev. 1.0

06322379001-01



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

