

KRAS-Q

Real-Time PCR Kit

REF

G610021

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
KRAS-Q Real-Time PCR Kit	G610021-1	25T

Předchozí REF č.: G2M708421

Toto je neautorizovaný pracovní překlad anglického originálu návodu k použití (IFU) do češtiny, vyhotovený pro interní referenční účely. Rozhodující je vždy anglický originální dokument výrobce; před použitím produktu si jej prosím ověřte.

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

Č.	Obsah	Číslo strany
1.	Účel použití	3
2.	Určený uživatel	3
3.	Princip testu	3
4	Souhrn	3
5.	Přístroje kompatibilní se soupravou	4
6.	Dodávaný materiál	4
7.	Materiál potřebný, ale nedodávaný	4
8.	Pokyny pro uchovávání a stabilitu	4
9.	Postup testu	4
10.	Nastavení přístroje pro real-time PCR	6
11.	Interpretace výsledků testu	7
12.	Charakteristiky výkonu	8
13.	Varování a bezpečnostní opatření	9
14.	Omezení	10

Účel použití

KRAS-Q Real-Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený k detekci somatických mutací genu KRAS v DNA extrahované z klinických vzorků (čerstvé a FFPE vzorky).

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

KRAS-Q Real-Time PCR Kit je diagnostický test *in vitro* určený k detekci somatických mutací genu KRAS v genomové DNA extrahované z čerstvých, zmrazených nebo formalínem fixovaných tkání zalitých v parafínu (FFPE). Souprava je založena na specifické blokační technice pro sekvenci divokého typu (wild-type), která umožňuje alelově specifickou amplifikaci pouze mutantních specifických sekvencí ve vzorku. Souprava umožňuje detekci osmi mutací exonu 2 genu KRAS, přičemž nejčastější mutace se nacházejí v kodonech 12 a 13. Detekce je dosažena pomocí fluorescenčních Taqman sond značených reportérem FAM a zhášecem BHQ2, který potlačuje signál v nepřítomnosti vazby na cíl. Během amplifikačního kroku PCR vede hybridizace sondy se specifickou jednovláknovou templátovou DNA k rozštěpení sondy díky 5' až 3' exonukleázové aktivitě DNA polymerázy, což způsobí oddělení reportérového a zhášecího barviva a vznik fluorescenčního signálu, který je snímán na platformě pro real-time PCR. Interní kontrola (IC) je zaměřena na relativně konzervovaný úsek genu KRAS jako kontrola kvality reagensů, kvality DNA a samotné operace.

Souhrn

Bodové mutace genu KRAS byly zjištěny u řady typů lidských nádorů, s mírou mutace přibližně 17–25 % u nádorů obecně, 15–30 % u pacientů s karcinomem plic a 20–50 % u pacientů s kolorektálním karcinomem. Protože protein P21 kódovaný genem KRAS se nachází downstream od signální dráhy EGFR, je po mutaci genu KRAS downstream signální dráha neustále aktivována a není ovlivněna léky cíleně působícími na EGFR upstream, což vede k trvalé maligní proliferaci buněk. Mutace genu KRAS obecně způsobují rezistenci vůči inhibitorům tyrosinkinázy EGFR u pacientů s karcinomem plic a rezistenci vůči anti-EGFR protilátkovým lékům u pacientů s kolorektálním karcinomem. V roce 2008 vydala National Comprehensive Cancer Network (NCCN) klinické doporučení pro kolorektální karcinom, ve kterém uvedla, že místa mutací způsobující aktivaci K-ras se nacházejí především v kodonech 12 a 13 exonu 2, a doporučila, aby všichni pacienti s pokročilým metastatickým kolorektálním karcinomem mohli být před léčbou testováni na mutaci KRAS. Rychlá a přesná detekce mutace genu KRAS má proto velký význam pro klinické vedení léčby (Tabulka 1). Tato souprava využívá DNA jako vzorek pro detekci a poskytuje kvalitativní hodnocení stavu mutace, což může pomoci klinickým lékařům při screeningu pacientů s kolorektálním karcinomem, karcinomem plic a dalšími nádorovými onemocněními, kteří mohou mít prospěch z cílené léčby.

Tabulka 1.

Mutace	Kodon	Změna báze	Frekvence
Gly12Ala	12	GGT>GCT	1,12 %
Gly12Asp	12	GGT>GAT	7,02 %
Gly12Arg	12	GGT>CGT	0,67 %
Gly12Cys	12	GGT>TGT	2,33 %
Gly12Ser	12	GGT>AGT	0,94 %
Gly12Val	12	GGT>GTT	4,75 %
Gly13Asp	12	GGT>GAC	2,53 %
Gly13Cys	12	GGT>TGC	0,17 %

Přístroje kompatibilní se soupravou

△ Zajistěte, aby všechny používané přístroje byly instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics)
- RapiCycler 96 Real Time PCR System (Genes 2Me Private Limited)

Dodávaný materiál

Tabulka 2. (Pro 25 testů)

Obsah soupravy	Kód obsahu soupravy	Množství (G610021-1)
K-ras IC Reaction Buffer	G2MA3-0653-1	1 X 440 µl
K-ras Reaction Buffer A	G2MA3-0654-1	1 X 440 µl
K-ras Reaction Buffer B	G2MA3-0655-1	1 X 440 µl
K-ras Positive Control	G2MA3-0656-1	1 X 40 µl
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-3	1 X 1,2 ml

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- MagNXT FFPE DNA Extraction Kit (G2M810007) nebo SpNXT FFPE DNA Extraction kit (G2M232121) Genes 2Me Private Limited, nebo QIAamp DNA FFPE Extraction Kit (Qiagen), nebo Paraffin-embedded Tissue DNA Rapid Extraction Kit (Qiagen)
- Stolní centrifuga
- Vortexer
- Mikropipety (nastavitelné)
- Jednorázové špičky s bariérovým filtrem
- Jednorázové bezpudrové rukavice
- Systém pro real-time PCR

Pokyny pro uchovávání a stabilitu

- Souprava má dobu použitelnosti 12 měsíců od data výroby. Testovací souprava je stabilní do data expirace uvedeného na krabici soupravy a/nebo na obalu jednotlivých komponent, pokud je uchovávána podle specifikace.
- Souprava a její komponenty jsou expedovány a uchovávány při teplotě -30 °C až -10 °C.
- Provádějte experiment při pokojové teplotě (15 °C až 30 °C) a během testování uchovávejte činidla v chladicím zařízení (2 °C až 8 °C).
- Opakovanému zmrazování a rozmrazování (více než 6krát) je třeba se vyhnout.

☀️ Chraňte před přímým slunečním zářením.

Postup testu

Odběr vzorku

- Pro optimální výkon odeberte čerstvě zmrazenou nebo formalínem fixovanou tkáň zalitou v parafínu (FFPE) nebo řezy obsahující >50 % nádorových buněk.
- KRAS-Q Real-Time PCR Kit vyžaduje získání parafínem zalitých patologických tkání nebo řezů obsahujících nádorové buňky. Je nezbytné zajistit, aby byl vybraný úsek tkáně umístěn co nejbližší středu parafínového bloku. Dále by měly být odebrány alespoň tři parafínové řezy, každý o tloušťce 5 až 10 mikrometrů.
- Během procesu odběru je nezbytné zamezit kontaminaci vzorků. To zahrnuje dodržování opatření při přenosu, uchovávání a manipulaci se vzorky, aby se zabránilo jakékoli neúmyslné kontaminaci.

- Se vzorky by se mělo zacházet s maximální opatrností, v souladu se zavedenými protokoly a pokyny. Dodržování správných postupů manipulace pomáhá udržet integritu vzorků a zajišťuje přesné výsledky testu.
- Doporučuje se nahlédnout do bezpečnostních listů ohledně konkrétních předpisů nebo pokynů týkajících se manipulace a likvidace výzkumných vzorků. Tyto listy obsahují důležité informace o bezpečnostních opatřeních a regulačních požadavcích souvisejících s postupy odběru a manipulace se vzorky.

Příprava vzorku

- Extrakce specifické DNA by měla probíhat podle doporučených pokynů uvedených na příbalovém letáku soupravy.
- Aby se zabránilo kontaminaci, extrahujte vzorky a uchovávejte je oddělené od všech ostatních reagentů.
- Optimální rozsah koncentrace vzorku DNA detekovatelné touto soupravou je následující: pro vzorky zalité v parafínu je optimální rozsah koncentrace 0,5 až 10 ng/μl. Pokud koncentrace překročí 10 ng/μl, naředěte vzorek vodou DNase/RNase Free Water tak, aby bylo dosaženo koncentrace v rozsahu 0,5 až 10 ng/μl. Ředící poměry jsou uvedeny v tabulce 3 níže.

Tabulka 3.

Koncentrace vzorku	Ředící poměr (vzorek : DNase/RNase Free Water)
10-20 ng/μl	1:1
21-30 ng/μl	1:4
31-40 ng/μl	1:5
41-50 ng/μl	1:7
51-100 ng/μl	1:9
101-200 ng/μl	1:19

Příprava činidel

- Vyjměte a vyrovnejte všechny složky činidel této soupravy na okolní teplotu (2 °C -8 °C) a před použitím krátce vortexujte po dobu 20 sekund.

Příprava reakční směsi

- Připravte směs podle následující tabulky (Tabulka 4).

Tabulka 4.

Obsah soupravy	Zkumavka-1 (Objem na reakci)	Zkumavka-2 (Objem na reakci)	Zkumavka-3 (Objem na reakci)
K-ras IC Reaction Buffer	17,5 μl	-	-
K-ras Reaction Buffer A	-	17,5 μl	-
K-ras Reaction Buffer B	-	-	17,5 μl
Vzorek DNA	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl
Konečný objem	20 μl	20 μl	20 μl

⚠ Zkumavku s qPCR reakcí připravte na ledu a rychle přejděte k amplifikačnímu kroku. Prodloužená inkubace reakční směsi, zejména při pokojové teplotě citlivost testu. Zkumavky před vložením do termocyklu krátce zcentrifugujte. Je třeba zabránit vzniku bublin v reakční směsi, protože interferují s detekcí fluorescence.

- Pro reakci No Template Control (NTC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek DNA nahradíte vodou RNase/DNase Free Water.
- Pro reakci Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek DNA nahradíte cílově specifickou pozitivní kontrolou.

Nastavení přístroje pro real-time PCR

- Před nastavením programu na jakémkoli přístroji pro real-time PCR se řiďte uživatelskou příručkou příslušného přístroje.
- Níže je uveden příklad nastavení přístroje BioRad CFX96.

Nastavení PCR přístroje

- Vložte zkumavku/destičku s PCR reakcí do přístroje. Nastavte No Template Control (NTC), Positive Control a testovaný vzorek v pořadí.

Nastavení kanálů fluorescence

- Definujte následující nastavení pro výběr kanálu detekce fluorescence (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cíl	Reportér	Zhášec
KRAS	Kanál FAM	BHQ2
Interní kontrola	Kanál FAM	BHQ2

Nastavení teploty a cyklů PCR

- Definujte následující nastavení pro teplotní profil a PCR cykly. Uložte soubor a spusťte reakci (Tabulka 6).

Tabulka 6.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min:sec)
Denaturace	1	50	02:00
	1	95	10:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	5	95	00:15
		53	01:00
		75	02:00
	40	95	00:15
		65	00:20
		55*	00:35
		75	01:00

*Data amplifikace jsou sbírána při 55 °C po dobu 40 cyklů pro cílové kanály – FAM. Po nastavení uložte soubor a spusťte program reakce.

- Po nastavení uložte soubor a spusťte program reakce.

Interpretace výsledků testu

- Mezní hodnota (cut-off) byla analyzována pomocí analýzy ROC křivky. Referenční hodnota ΔCt pro K-ras Reaction Buffer A je stanovena jako $\Delta Ct \leq 10$, přičemž $10 < \Delta Ct \leq 14$ představuje šedou zónu; referenční hodnota ΔCt pro K-ras Reaction Buffer B je $\Delta Ct \leq 12$, přičemž $12 < \Delta Ct \leq 14$ představuje šedou zónu.

Validace interní kontroly

- Pro analýzu interní kontroly vybírejte pouze „testované vzorky“. Vyberte barvivo FAM a zobrazte graf amplifikace interní kontroly. Interní kontrola by neměla být amplifikována v negativních a pozitivních kontrolách. Pozdní šumový amplifikační graf FAM v jamkách NTC a PC ignorujte.

Validace Positive Control a No Template Control

- Pro PC platí, že existuje zřetelná amplifikační křivka a hodnota $Ct \leq 30$ v kanálu FAM. Pro NTC platí, že v kanálu FAM činidla K-ras IC Reaction Buffer není žádná hodnota Ct nebo je hodnota $Ct > 35$, a kanál FAM zbývajících reakčních pufrů nemá žádnou hodnotu Ct .

Kvalitativní interpretace výsledků

- V kanálu FAM postupně vyberte jamky testovaného vzorku a analyzujte amplifikační grafy pro kvalitativní interpretaci výsledků (Tabulka 7).
- Uřčete, zda kvalita vzorku splňuje požadavky.

Tabulka 7.

Typ vzorku	Výsledek	KRAS Internal Control Reaction Buffer
Vzorek FFPE / Vzorek DNA	Hodnota Ct mezi 19-27	Pokud je hodnota Ct nižší než stanovený rozsah, znamená to, že přidaný vzorek je nadměrný, a vzorek by měl být naředěn na požadovanou koncentraci a znovu testován; pokud je hodnota Ct vyšší než stanovený rozsah nebo nedochází k amplifikaci, znamená to, že extrakce DNA selhala nebo je množství extrahované DNA příliš nízké, případně vzorek obsahuje inhibitory PCR, a měl by být znovu extrahován.

⚠ Poznámka: Pro diagnostické účely by měly být výsledky vždy porovnávány s dalšími lékařskými nálezy, jako jsou symptomy, výsledky jiných diagnostických testů, výzkumné závěry apod. Pokud jsou výsledky v rozporu s dostupnými výzkumnými důkazy, doporučuje se provést doplňující testování k potvrzení výsledků.

Interpretace výsledku

- Pokud není u Reaction Buffer A a Reaction Buffer B žádná hodnota Ct nebo je hodnota $Ct > 38$, nebo pokud není zřetelná amplifikační křivka, výsledek může být hodnocen jako KRAS mutace negativní.
- Pokud existuje alespoň jedna zřetelná amplifikační křivka u Reaction Buffer A a Reaction Buffer B a hodnota Ct je < 38 , lze výsledek mutace analyzovat podle ΔCt ($\Delta Ct = CtA/B - CtIC$) (Tabulka 8).
- Pokud $\Delta Ct >$ mezní hodnota Delta Ct a hodnota se nachází mimo šedou zónu detekce ΔCt , jde o KRAS mutaci negativní nebo o hodnotu mimo detekční rozsah.
- Pokud $\Delta Ct \leq$ mezní hodnota ΔCt , jde o KRAS mutaci pozitivní.
- Pokud $\Delta Ct >$ mezní hodnota ΔCt a hodnota se nachází v šedé zóně detekce, znamená to, že vzorek může obsahovat mutace, avšak jejich koncentrace je nízká, nebo je obsah nádorových buněk v extrahovaném vzorku příliš malý; doporučuje se vzorek znovu testovat nebo znovu extrahovat. Pokud je výsledek opakovaného testu stále v šedé zóně, je hodnocen jako slabě pozitivní.

Tabulka 8.

Interpretace	Reaction Buffer A	Reaction Buffer B
Pozitivní	$\Delta Ct \leq 10$	$\Delta Ct \leq 12$
Negativní	$\Delta Ct \leq 14$	$\Delta Ct \leq 14$
Šedá zóna	$10 < \Delta Ct \leq 14$	$12 < \Delta Ct \leq 14$

- **Positive Control:** Existuje zřetelná amplifikační křivka a hodnota $Ct \leq 30$ v kanálu FAM.
- **No Template Control (NTC):** V kanálu FAM činidla K-ras IC Reaction Buffer není žádná hodnota Ct nebo je hodnota $Ct > 35$, a kanál FAM zbývajících reakčních pufrů nemá žádnou hodnotu Ct .
- **Positive samples:** Vzorky pozitivní na patogen vykazují charakteristickou „sigmoidální“ amplifikační křivku.

Charakteristiky výkonu

Tabulka 6.

Č.	Parametr	Pozorování
1	Analytická citlivost	100 %
2	Analytická specifita	100 %
3	Pravdivost (bias)	98 %
4	Přesnost (opakovatelnost)	CV < 3 %
5	Přesnost (reprodukovatelnost)	CV < 3 %
6	Přesnost (výsledek pravdivosti a přesnosti)	99 %
7	Meze detekce a kvantifikace	LOD: 1 % frekvence genové mutace
8	Rozsah měření	$10 - 10^9$ kopií/reakce
9	Linearita	$R^2 = 0,998$
10	Mezní hodnoty (cut-off)	Hodnota $Ct: \leq 38$
11	Kritéria pro odběr a manipulaci se vzorky	Řádné pokyny pro manipulaci
12	Identifikace a kontrola známých relevantních endogenních a exogenních interferujících látek [parafrinový vosk (v xylenu) a hemoglobin]	Dobře kontrolováno
13	Křížové reakce (gen KRAS, gen BRAF, gen PIK3CA, genomová DNA divokého typu lidského původu)	Žádná křížová reaktivita
14	Klinická citlivost	99 %
15	Klinická specifita	99 %

Varování a bezpečnostní opatření

- Před použitím si pečlivě přečtete tento návod k použití (IFU) a seznamte se s postupy obsluhy a bezpečnostními opatřeními.
- Pracovní plocha by měla být pravidelně dezinfikována 1 % roztokem chlornanu sodného nebo 75 % etanolem.
- Nepoužívejte komponenty soupravy po datu jejich expirace.
- Při provádění testu používejte jednorázovou zástěru, rukavice a masku.
- Vzorky by měly být zcela dávkovány do reakční směsi a žádný vzorek by neměl ulpívat na stěně zkumavky.
- Dodržujte nezbytná opatření v souladu s bezpečnými laboratorními postupy při manipulaci se vzorky a přístroji, protože testované vzorky jsou klasifikovány jako nebezpečné.
- Bylo prokázáno, že heparin inhibuje PCR. Nepoužívejte s tímto postupem heparinizované vzorky. Spolehlivost výsledků závisí na řádném odběru vzorků a správných postupech přepravy.
- Používejte běžná laboratorní bezpečnostní opatření. Při manipulaci se vzorky a činidly soupravy používejte jednorázové rukavice a laboratorní plášť.
- Po manipulaci se vzorky a činidly soupravy si důkladně umyjte ruce.
- Činidlo s enzymem a primery/sondami obsahuje v pufru syntetický oligonukleotid. Zabraňte styku činidla s kůží, očima a sliznicemi, což by mohlo způsobit kožní podráždění. Při styku s těmito činidly omyjte postižené místo vodou. Při rozlití těchto činidel postupujte podle vhodných postupů pro zvládnutí rozlití.
- NEZAMĚŇUJTE, NEMÍCHEJTE ani nekombinujte činidla ze souprav s různými čísly šarží.
- Zabraňte mikrobiální a nukleázové kontaminaci činidel a zajistěte, aby byly případné sraženiny rozpuštěny.
- Všechny testované vzorky musí být považovány za potenciálně infekční nebo biologicky nebezpečné a při manipulaci se vzorky a přístroji musí být dodržována všechna nezbytná opatření v souladu s bezpečnými laboratorními postupy.
- Podmínky uchovávání činidel musí být striktně dodržovány, aby byla zajištěna deklarovaná funkčnost soupravy.
- Zlikvidujte veškerý biologicky nebezpečný odpad v souladu s místními předpisy.

Omezení

- Pro dosažení optimálních výsledků je nezbytné důsledně dodržovat příbalový leták soupravy neboli návod k použití (IFU). Výsledky tohoto testu jsou citlivé na způsob odběru, transportu, uchovávání a zpracování vzorku a jakékoli nesrovnalosti mohou vést k nepřesným výsledkům. Například křížová kontaminace, pokud není během zpracování vzorku řádně kontrolována, může vést k falešně pozitivním výsledkům.
- Test je omezen na specifikovaná extrakční činidla, typy vzorků a příslušné přístroje.
- Pro optimální provedení tohoto testu je nezbytné důsledné dodržování správné laboratorní praxe (GLP).
- Případné mutace v cílových oblastech genomu, na které se váží primery/sondy použité při návrhu soupravy, mohou vést k nekonzistentním výsledkům.
- Stejně jako u jakéhokoli diagnostického testu musí být výsledky testu této soupravy interpretovány podle části „interpretace výsledku“ tohoto návodu, s ohledem na všechny klinické a laboratorní nálezy.

Symboly použité na označení	
Symboly	Definice
	CHRAŇTE PŘED SLUNEČNÍM ZÁŘENÍM
	TEPLOTNÍ OMEZENÍ
	DIAGNOSTICKÝ ZDRAVOTNICKÝ PROSTŘEDEK IN VITRO
	TOUTO STRANOU NAHORU
	ŘÍDTE SE NÁVODEM K POUŽITÍ
	KÓD ŠARŽE
	KATALOGOVÉ ČÍSLO
	DATUM POUŽITELNOSTI
	DATUM VÝROBY
	VÝROBCE
	OBSAH DOSTAČUJÍCÍ PRO <n> TESTŮ
	UPOZORNĚNÍ
	NEPOUŽÍVEJTE, POKUD JE OBAL POŠKOZEN
	ZPLNOMOCNĚNÝ ZÁSTUPCE PRO EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ / EVROPSKOU UNII
	EVROPSKÁ SHODA



Genes 2Me Private Limited Plot No - 33 Sector-5, IMT Manesar, Gurugram, Haryana - 122052 (India), Telefonní čísla: +91 18001 214030 / +91 88000 23600 / +91 8800821778, E-mail: contact@genes2me.com



OBELIS S.A. Bd General Wahis 53 B-1030 Brussels Belgium, Tel: +3227325954, Fax: +3227326003, E-mail: mail@obelis.net