



IntelliPlex™ KRAS Mutation Plus Kit Manuale dell'utente

REF 82022 **24 reazioni**

CE IVD Per uso diagnostico in vitro



PlexBio Co., Ltd.
6F-1, No. 351, Yangguang St., Neihu Dist.
Taipei City, 11491, Taiwan
TEL: + 886-2-2627-5878
<http://www.plexbio.com>

Rappresentante autorizzato per l'Europa:



Medical Device Safety Services GmbH (MDSS)
Schiffgraben 41, 30175, Hannover, Germania



IMPORTANTE:
Leggere attentamente le istruzioni prima dell'uso

1. USO PREVISTO

Il kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus, basato sulla tecnologia π Code™ e sulla piattaforma dello strumento PlexBio, è un test molecolare in vitro destinato all'identificazione qualitativa di 25 cambiamenti a singolo nucleotide nei esoni 2, 3 e 4 del gene KRAS utilizzando campioni di DNA derivati da formalina-tessuti fissi fissati con paraffina (FFPE) di tumore del colon-retto (CRC). I risultati sono destinati ad essere usati come ausilio da parte dei medici nell'identificazione dei pazienti con CRC che potrebbero ottenere benefici dal trattamento con cetuximab o panitumumab, efficaci nei pazienti in cui non è stata rilevata la mutazione del KRAS.

2. INTRODUZIONE

Numerosi tumori presentano un'elevata attività del recettore del fattore di crescita epidermica (EGFR) e l'EGFR e la via di segnalazione dell'EGFR sono obiettivi per i trattamenti di tumori come il carcinoma del colon-retto metastatico (mCRC) e il carcinoma polmonare non

a piccole cellule (NSCLC). KRAS è una GTPase, legata alle membrane cellulari e funge da molecola effettrice della cascata di segnalazione EGFR. L'attivazione delle mutazioni nel KRAS provoca l'upregolazione della via di segnalazione mediata dall'EGFR, portando a una proliferazione cellulare incontrollata.

Cetuximab e panitumumab sono anticorpi monoclonali mirati a EGFR approvati per l'uso in pazienti con mCRC. Tuttavia, è improbabile che i pazienti con CRC che presentano mutazioni del KRAS traggano beneficio dalla terapia con cetuximab o panitumumab. La valutazione dello stato di mutazione KRAS è quindi cruciale per la valutazione del trattamento di pazienti con CRC. La tecnologia SelectAmp e π Code consente il rilevamento multiplex, a pozzetto singolo di mutazioni a singolo nucleotide del gene KRAS da campioni contenenti grandi quantità di DNA genomico wild-type con requisiti di campione significativamente ridotti rispetto ai metodi convenzionali. Il kit di mutazione KRAS IntelliPlex plus identifica 25 cambiamenti nucleotidici negli esoni 2, 3 e 4 del gene KRAS (Tabella 1).

Tabella 1. Mutazioni rilevate

Gene	Esone Codone	Alterazione dell'aminoacido	Alterazione del nucleotide	COSMIC ID
KRAS	Esone 2 Codone 12	p.G12A	c.35G>C	522
		p.G12D	c.35G>A	521
		p.G12V	c.35G>T	520
		p.G12C	c.34G>T	516
		p.G12R	c.34G>C	518
		p.G12S	c.34G>A	517
	Esone 2 Codone 13	p.G13A	c.38G>C	533
		p.G13D	c.38G>A	532
		p.G13V	c.38G>T	534
		p.G13C	c.37G>T	527
		p.G13R	c.37G>C	529
		p.G13S	c.37G>A	528
	Esone 3 Codone 59	p.A59T	c.175G>A	546
		p.A59E	c.176C>A	547
		p.A59G	c.176C>G	28518
	Esone 3 Codone 61	p.Q61K	c.181C>A	549
		p.Q61E	c.181C>G	550
		p.Q61P	c.182A>C	551

Gene	Esone Codone	Alterazione dell'aminoacido	Alterazione del nucleotide	COSMIC ID
		p.Q61H	c.183A>C	554
		p.Q61H	c.183A>T	555
	Esone 4 Codone 117	p.K117N	c.351A>C	19940
		p.K117N	c.351A>T	28519
	Esone 4 Codone 146	p.A146T	c.436G>A	19404
		p.A146P	c.436G>C	19905
p.A146V		c.437C>T	19900	

3. PRINCIPI DELLE TECNOLOGIE UTILIZZATE

Il kit di mutazione IntelliPlex™MKRAS plus utilizza due tecnologie, SelectAmp e π Code, per ottenere il rilevamento di mutazioni multiplex ad alta sensibilità.

Tecnologia SelectAmp

La tecnologia SelectAmp consente l'amplificazione PCR multiplex specifica per mutazione bloccando l'amplificazione di sequenze wild-type con acido nucleico bloccato (LNA). La successiva amplificazione selettiva della PCR delle sequenze mutate aumenta la sensibilità e la specificità del dosaggio.

MicroDisc π Code

Il MicroDisc π Code è progettato per generare fino a 16.000 diversi pattern circolari di immagini per applicazioni multiplex. Ogni MicroDisc π Code ha un modello di immagine circolare distinto, che corrisponde a uno specifico agente di acquisizione coniugato alla superficie del disco π Code etichettato con diversi agenti di cattura sono raggruppati, consentendo il rilevamento specifico di più analiti in una reazione a un pozzetto.

Principio di rilevazione

Il test si basa su cinque processi:

1. Estrazione del DNA da campioni
2. amplificazione PCR multiplex specifica per la mutazione;
3. L'ibridazione degli ampliconi PCR con sonda specifica per mutazione ha etichettato π Code in una reazione a un pozzetto
4. Etichettatura fluorescente con streptavidina-ficoeritrina
5. Decodifica del modello di immagine e rilevamento del segnale fluorescente mediante l'analizzatore fluorescente PlexBio™ 100

4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico in vitro.
- Questo kit di analisi deve essere utilizzato solo da personale di laboratorio qualificato.
- Sono necessari spazi e attrezzature separati e dedicati per il processo pre e post-PCR con modalità unidirezionale per evitare contaminazioni.
- La preparazione del processo pre-PCR deve essere eseguita in una cappa a flusso laminare per evitare contaminazioni.
- Il kit o il reagente non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza.
- Si noti che i campioni tumorali non sono omogenei in termini di genotipo e possono contenere sezioni non tumorali, che possono causare risultati falsi negativi.
- I componenti del reagente sono stati diluiti in modo ottimale. L'ulteriore diluizione dei reagenti della soluzione è sconsigliata.
- I campioni devono essere gestiti come materiale infettivo. Seguire le precauzioni universali per un uso sicuro.
- Conservare i kit di analisi e i reagenti attenendosi all'etichetta e alle istruzioni del prodotto.
- Non mescolare reagenti provenienti da lotti differenti.
- Smaltire i reagenti inutilizzati, i campioni e i rifiuti attenendosi alle normative federali, nazionali e locali vigenti.
- Indossare guanti senza polvere e non toccare e fare segni sulla parte inferiore della piastra in qualsiasi momento, poiché impronte digitali e segni interferirebbero con la decodifica e l'acquisizione del segnale.
- Seguire le precauzioni generali per il lavoro in laboratorio:
 - Non pipettare con la bocca.
 - Indossare indumenti di protezione (ad esempio, guanti senza polvere monouso e camici da laboratorio) e protezioni per gli occhi.
 - Non mangiare, bere o fumare all'interno del laboratorio.
 - Lavare accuratamente le mani dopo aver manipolato i campioni e i reagenti.
- Pulire accuratamente con una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% e quindi con una soluzione di etanolo al 70% lo spazio di lavoro, compresi i supporti e le pipette. Diluire candeggina per uso domestico con un rapporto 1:10 per realizzare la soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%.

- Eventuali incidenti gravi verificatisi in relazione al dispositivo devono essere segnalati al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utente e/o il paziente.
- Le schede di sicurezza dei materiali (MSDS) sono disponibili su richiesta da presentare all'Assistenza clienti di PlexBio.

5. COMPONENTI DEL KIT

Il kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus contiene reagenti sufficienti per un massimo di 24 test. I componenti del kit includono:

- 1. KRAS Plus KIT Reaction Mix**
Num. rif.: 20188
Quantità e volume: 1 fiala, 264 µL/fiala
Descrizione: Per l'amplificazione della PCR
Contenuto: 36.4% MyFi 5X Reaction Buffer, Cloruro di magnesio dNTP e potenziatore, DNA polimerasi MyFi 3,6% (microbica)
- 2. KRAS Plus KIT Primer Mix**
Num. rif.: 20187
Quantità e volume: 1 fiala, 120 µL/fiala
Descrizione: Per l'amplificazione della PCR
Contenuto: <0.01% di primer forward, <0,01% di primer reverse (marcato con biotina) <0,1% di acido nucleico bloccato
- 3. KRAS Plus KIT πCode MicroDisc**
Rif. rif.: 20191
Quantità e volume: 1 fiala, 480 µL/fiala
Descrizione: Per acquisizione amplicon PCR
Contenuto: MicroDisc πCode, Glicerina Tampone fosfato salino Albumina 0,1% di origine bovina (biologica), <0,1% di EDTA e <0,1% di azoturo di sodio
- 4. KRAS Plus KIT POS Control**
Num. rif.: 20189
Quantità e volume: 1 fiala, 20 µL/fiala
Descrizione: Controllo positivo del dosaggio
Contenuto: DNA plasmidico contenente KRAS esone 2 Sequenze G12A (microbiche), Tampone Tris-EDTA
- 5. NEG Control**
Num. rif.: 20549
Quantità e volume: 1 fiala, 120 µL/fiala

Descrizione: Controllo negativo del dosaggio

Contenuto: ddH₂O

6. SA-PE Solution

Rif. rif.: 20007

Quantità e volume: 1 bottiglia, 7 ml/bottiglia

Descrizione: Streptavidina-ficoeritrina per l'acquisizione del segnale fluorescente

Contenuto: Tampone fosfato salino 0,5% streptavidina-ficoeritrina, 1% Albumina di bovino (biologica), <0,1% di sodio azide

7. Hy Buffer

Num. rif.: 20547

Quantità e volume: 1 bottiglia, 2.4 mL/bottiglia

Descrizione: Per ibridazione

Contenuto: Salina-Fosfato di sodio-EDTA

8. 10X Wash Buffer

Num. rif.: 20546

Quantità e volume: 1 bottiglia, 50 mL/bottiglia

Descrizione: Per lavaggio πCode

Contenuto: Tampone fosfato salino 1% di Tween-20 e <0,1% di sodio azide

NOTA: Controllo POS, Controllo NEG e tampone Hy indicano rispettivamente controllo positivo, controllo negativo e tampone di ibridazione.

6. MATERIALI E APPARECCHIATURE NECESSARI MA NON INCLUSI

Prodotti richiesti per la compatibilità con i kit IntelliPlex:

- Piastra da 96 pozzetti (PlexBio; Cat. No. 80025 o Greiner Bio-one; Cat. No. 655101)
- Processatore IntelliPlex™ 1000 πCode (PlexBio; Cat. No. 80033)
- Analizzatore di fluorescenza PlexBio 100 (PlexBio; Cat. No. 80000)
- Vasca U-tray (PlexBio; Cat. No. 80023)
- Vasca V-tray (PlexBio; Cat. No. 80024)
- DeXipher™ MD (necessario: PlexBio; Cat. No. 80051)

Componenti richiesti:

- Fluorometro Qubit™ con reagenti quantitativi dedicati (Invitrogen; qualsiasi modello) o equivalente
- Tubi puliti per reazione PCR (Gunster; Cat. No. MB-P08A o equivalente)
- Micropipetta dedicata
- Filtro per micropipetta
- ddH₂O per diluizione del tampone di lavaggio 10x

- Kit di estrazione del DNA FFPE (consigliato: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen; Cat. No. 56404 o equivalente)
- Miscelatore Vortex
- Microcentrifuga
- Termociclatore (Consigliato: Termociclatore DigiPlex™ (PlexBio; Cat. No. 80018/ MiniAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems™; Cat. No. A37834 o equivalente)
- Computer industriale (Consigliato: PlexBio; Cat. No. 80002)

7. CONSERVAZIONE, STABILITÀ E TRASPORTO

Conservazione

Tutti i componenti del kit devono essere conservati a 2- 8°C.

Stabilità

Non utilizzare alcun kit scaduto. Tutti i componenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, se manipolati e conservati alle condizioni raccomandate.

Trasporto

La temperatura di spedizione per il kit è di 2-8°C. Se il pacchetto o i componenti del kit sono incompleti, contattare l'assistenza clienti PlexBio (service@plexbio.com).

8. STRUMENTAZIONE E SOFTWARE

Strumentazione

Fare riferimento al manuale dell'utente della strumentazione per le istruzioni operative complete (Termociclatore, processore IntelliPlex 1000 πCode e analizzatore fluorescente PlexBio 100).

Installazione del software

Il kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus ha un'App del kit e un file ENC designati. L'App del kit contiene le assegnazioni target πCode e il file ENC include il numero di lotto e la data di scadenza. Assicurati di aver installato l'App del Kit e di importare il file ENC in DeXipher prima della prima esecuzione del test.

Installazione dell'app del kit

1. Accedi a www.plexbio.com e scarica l'App del kit KRAS plus.
2. Fai clic su "Installer" nella cartella APP e segui le istruzioni per completare l'installazione dell'App del kit.

NOTA:

L'app del kit deve essere installata una sola volta. Gli aggiornamenti della versione verranno notificati dal servizio clienti.

Installazione del file ENC

1. Accedi a www.plexbio.com e scarica il file ENC del kit di mutazione KRAS plus. Ogni numero di lotto del kit avrà un file ENC univoco, quindi sarà necessario scaricare un nuovo file ENC ogni volta che si acquista un kit con un numero di lotto diverso. Assicurati di selezionare il file ENC con il numero di lotto corrispondente al tuo kit.
2. Salva il file ENC sul tuo computer.
3. Seguire il Manuale dell'utente dell'analizzatore fluorescente PlexBio 100 per importare il file ENC.

9. CAMPIONI

Raccolta dei campioni

Il kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus è stato validato per essere utilizzato per tessuti con paraffina fissata in formalina (FFPE) di carcinoma del colon-retto.

NOTA:

- I campioni FFPE possono essere conservati ≤ 30°C per un massimo di 12 mesi dopo la data di raccolta e trattamento dei tessuti. Il tempo ottimale di fissazione dei tessuti per il test deve essere inferiore a 72 ore.
- Nel test di mutazione KRAS devono essere utilizzate solo sezioni FFPE di spessore di 10 μm contenenti almeno il 10% di contenuto tumorale. Qualsiasi campione con contenuto tumorale inferiore al 10% deve essere sottoposto a dissezione macro prima della deparaffinizzazione.
- Non utilizzare campioni di FFPE colorati che potrebbero generare risultati non validi e/o errati.

Trasporto e conservazione dei campioni

I campioni FFPE possono essere trasportati a temperatura ambiente.

Conservazione del DNA estratto

Il DNA estratto può essere conservato a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C per l'uso immediato (≤ 24 ore), o tra -15°C e -25°C per una conservazione a lungo termine (> 24 ore). Non sottoporre il DNA estratto a ripetuti cicli di congelamento/scongelo.

10. PRIMA DI INIZIARE

1. Verificare che l'app del kit sia stata installata e che il file ENC specifico del lotto sia stato importato in DeXipher.
2. Verificare di avere 4 µL di DNA estratto ($\geq 2,5$ ng/µL) pronto per l'analisi.

11. PROCEDURA DI ANALISI

Avvertenza:

Leggere attentamente le istruzioni ed attenersi fedelmente a tutti i passaggi del protocollo di analisi.

11.1 Quantificazione del DNA

1. Quantificare il DNA estratto usando un fluorometro Qubit con reagenti quantitativi dedicati (o equivalenti) secondo il protocollo del produttore.
2. La concentrazione di stock di DNA deve essere $\geq 2,5$ ng/µL per garantire prestazioni ottimali del dosaggio. Ogni reazione di PCR utilizza 4 µL di un campione di DNA da 2,5 ng/µL (input di DNA da 10 ng). Preparare il materiale di lavoro per i campioni prima di preparare la PCR. Si sconsigliano quantità di input di DNA inferiori o superiori a 10 ng per pozzetto di reazione.

11.2 Amplificazione PCR multiplex

1. Miscelare con il miscelatore Vortex ogni campione prima dell'uso.
2. Centrifugare e conservare i campioni su ghiaccio.
3. Preparare la reazione PCR:

Per ogni reazione di PCR:

Miscela di reazione KRAS Plus	11 µL
Miscela di primer KRAS Plus	5 µL
Campione/Controllo POS/Controllo NEG	4 µL
Volume totale	20 µL

NOTA:

- La quantità di miscela di reazione e miscela di primer richiesta per una Master Mix dipende dal numero di reazioni. Prepara sempre un surplus.
- Sia il controllo POS che il controllo NEG sono necessari per la validità del test e la generazione del report e devono essere inclusi in ogni analisi.

4. Mescolare picchiando i tubi e centrifugarli prima di collocarli sul termociclatore. Impostare le condizioni del programma PCR come di seguito:

Condizioni del programma PCR*

Temp. (°C)	Durata	Cicli
95	5 min	-
95	20 sec	36
70	20 sec	
60	60 sec	
4	Mantenere	-

NOTA: Velocità di rampa: 20% (PlexBio; Cat. No. 80018). 3°C/sec (ABI MiniAmp™; Cat. No. A37834).

11.3 Ibridazione del DNA e reazione SA-PE

1. **Preparare il tampone di lavaggio 1X:** Trasferire 50 ml del tampone di lavaggio 10X nel flacone del tampone di lavaggio da 1 litro del processore IntelliPlex 1000 πCode e aggiungere 450 ml ddH₂O. Mescolare agitando.

NOTA: il 1X Wash Buffer preparato può essere utilizzato per un massimo di una settimana.

Consumo di IntelliPlex 1000 πCode Processor Wash Buffer:

Procedura	Wash Buffer Consumo (mL)
Self-test	50 mL
Programma DNA e RNA (1 corsia, fino a 8 test)	150 mL
Programma DNA e RNA (3 corsie, fino a 24 test)	220 mL

2. **Aggiungi 20 µL MicroDisc πCode alla piastra a 96 pozzetti:** Miscelare agitando il πCode KRAS Plus per 10 secondi, quindi, pipettando, aggiungere direttamente 20 µL del πCode a ciascun pozzetto. Miscelare il tubo di πCode ogni quattro pozzetti tra l'erogazione per garantire una sospensione omogenea.

NOTA : Ogni prodotto di PCR amplificato (inclusi campioni, controllo POS e controllo NEG) deve essere aggiunto in corsia di pozzo, in ordine di A1, B1 ... H1 e seguito da A2, B2 ... H2 e così via.
3. **Aggiungere 100 µL di Hy Buffer** in ciascun pozzetto.

4. Centrifugare i prodotti PCR.
5. **Denaturare i prodotti PCR** sul termociclatore riscaldando a 95°C per 5 minuti, immediatamente raffreddato su ghiaccio/ refrigeratore o termociclatore per garantire lo stato denaturato. Spin down prima dell'uso. Utilizzare immediatamente (entro 1 ora dalla denaturazione). **NOTA:** Prestare attenzione alla temperatura del coperchio del termociclatore mentre si rimuovono i prodotti PCR denaturati.
6. **Aggiungere 10 µL di prodotti PCR** denaturati in ciascun pozzetto.
7. **Pipettare il volume desiderato di soluzione SA-PE** nel V-tray. Si noti che il V-tray presenta un volume morto pari a **500 µL** e l'utilizzo. Per un massimo di 6 corsie selezionate o 800µL se sono selezionate più di 6 corsie. L'uso minimo di SA-PE è di una corsia (900 µL).

Esempio di calcolo:

Per una reazione a 3 corsie, il volume della SA-PE solution richiesto è almeno:

$$400 \mu\text{L} \times 3 \text{ corsie} + 500 \mu\text{L}(\text{volume morto}) = 1.7 \text{ mL}$$

Si consiglia di aggiungere ulteriore volume di soluzione nel V-tray per garantire un volume di erogazione sufficiente.

NOTA:

SA-PE Solution richiesta da Lane :

Numero di corsia elaborata	Richiesta SA-PE Solution (µL)
1	900
2	1300
3	1700
4	2100
5	2500
6	2900
7	3600
8	4000
9	4400
10	4800
11	5200
12	5600

- La SA-PE solution deve essere mantenuta al buio.
- Non riutilizzare la SA-PE solution e il V-tray tank rimanenti. Sostituire un nuovo V-tray con ogni analisi.

8. **Eseguire l'ibridazione e lavare:** Fare riferimento al manuale dell'utente del processore πCode IntelliPlex 1000 e seguire le istruzioni per impostare il programma di analisi integrato (Pagina iniziale/ Saggio molecolare/ Selezione pozzetto/ DNA/RNA/Confermare condizioni procedura/Avvio in corso). La lastra sarà pronta per la decodifica al termine del programma.

NOTA:

- Il IntelliPlex 1000 πCode Processor deve essere mantenuto correttamente e regolarmente.
- **Non** aprire lo sportello mentre la strumentazione è in funzione.
- Il kit contiene reagenti sufficienti per 5 serie di test (inclusi controlli POS e NEG) per un massimo di 24 test. Si noti che il Wash Buffer incluso è sufficiente solo per un massimo di due cicli indipendenti. Il Wash Buffer aggiuntivo può essere ordinato da PlexBio (Ref. No: 80210).

11.4 Decodifica delle immagini e rilevazione della fluorescenza

1. Seguire il Manuale dell'utente dell'analizzatore fluorescente PlexBio 100 per impostare la lettura.

NOTA:

- L'analizzatore fluorescente PlexBio 100 deve essere calibrato regolarmente (una volta al mese).
 - Verificare che sia stato importato il file ENC corretto.
2. Avviare DeXipher per eseguire il Test Qualitativo.
 3. Contrassegnare i pozzetti per i controlli campione, positivi e negativi.
 4. Immettere le informazioni di esempio e il nome del dosaggio. Posizionare la piastra nel dispositivo con l'orientamento corretto, come mostrato sullo schermo.
 5. I dati grezzi verranno analizzati tramite il kit ENC per generare il rapporto di chiamata di mutazione.

NOTA:

- Una singola serie può includere da 2 a 96 test (compresi i controlli POS e NEG) per micropiastra da 96 pozzetti. Quando si eseguono più di 24 campioni, saranno richiesti più kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus dello stesso lotto.
- La procedura sopra descritta deve essere seguita per rilevare sequenze mutanti $\geq 0,36 \sim 1,83\%$ in una base di DNA wild-type per le mutazioni KRAS nella Tabella 1.

12. ESCLUSIONE DI RESPONSABILITÀ

Risultato del Test Negativo

Un risultato negativo del test indica che la mutazione target non è stata rilevata dal kit. Errori sperimentali o altre cause possono portare a risultati falsi negativi. L'interpretazione dei risultati dovrebbe prendere in considerazione queste possibilità ed essere fatta in combinazione con altri risultati clinici.

Risultato del Test Positivo

Un risultato positivo del test indica che la mutazione target è stata rilevata dal kit. Errori sperimentali o altre cause possono portare a risultati falsi positivi. L'interpretazione dei risultati dovrebbe prendere in considerazione queste possibilità ed essere fatta in combinazione con altri risultati clinici.

13. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Tabella 2. Interpretazione del risultato

Risultati dell'analisi	Risultati nel referto	Interpretazione
Mutazione Non rilevato	Es. A59T (Fare riferimento alla Tabella 1 per i dettagli)	Rilevata mutazione mirata
Mutazione non rilevata	Nessuno	Mutazione mirata non rilevata
Analisi non valida	Non valido	<p>Possibili cause:</p> <ol style="list-style-type: none"> Inibizione della PCR (presenza di inibitore nel campione) Reagenti conservati impropri Input o qualità di DNA del campione bassi Conteggio del disco πCode basso (la provetta con πCode non era ben miscelata prima del pipettaggio) Reagente non aggiunto Controllo πCode vuoto non riuscito

Risultati dell'analisi	Risultati nel referto	Interpretazione
		7. Qualità del campione dovuta a processo di fissazione o condizioni di conservazione impropri

NOTA:

- La validazione di tutti i test e dei campioni viene eseguita dall'APP KIT dedicata insieme al processore IntelliPlex 1000 π Code e all'analizzatore fluorescente PlexBio 100..
- In caso di eterogeneità di campioni o mutazioni multiple, viene riportata solo la mutazione rilevata in modo dominante. "Mutazione rilevata" indica che il segnale per almeno un sito di mutazione è maggiore del valore di taglio del bersaglio corrispondente. Quando vengono rilevate più mutazioni in un campione, viene segnalato solo quello che mostra il segnale più alto.

14. PRESTAZIONE ANALITICA

Limite del bianco (LoB)

Il limite dei valori in bianco (LoB) è stato determinato da due operatori che eseguivano 12 replicati della linea cellulare KRAS wild-type (K562) per tre giorni e quattro replicati di 12 campioni KRAS wild-type FFPE per tre giorni su due lotti di reagenti. Sono stati testati anche duplicati di altri 43 campioni FFPE wild-type provenienti da diverse biobanche e anni di approvvigionamento. In questi campioni wild-type sono stati osservati solo i risultati "Nessun mutamento rilevato".

I valori di taglio di ciascuna mutazione bersaglio sono stati quindi determinati dai valori di intensità massima del segnale analitico misurati, rispettivamente.

Limite di rilevazione (LoD)

Il limite di rilevazione (LoD) è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni (compresa tra 0,05 e 5%) contenente diversi livelli di DNA mutante (sia da linee cellulari che da plasmide mutante) miscelato in una base di DNA di linee cellulari wild-type (K562). Ogni diluizione è stata testata con 21 replicati in tre giorni per lotto di reagente in cinque operatori e due lotti di reagente. I LoD sono stati determinati sulla base di un tasso di successo positivo al 95% nell'analisi PriProbit (Tabella 3). I LoD variavano dallo 0,36 all'1,83%.

Tabella 3. Limite di rilevazione (LoD)

Alterazione dell'aminoacido	Alterazione del nucleotide	LoD (% Mutazione)
p.G12A	c.35G>C	0,82
p.G12D	c.35G>A	1.0
p.G12V	c.35G>T	1.5
p.G12C	c.34G>T	1,83
p.G12R	c.34G>C	0,49
p.G12S	c.34G>A	0,73
p.G13A	c.38G>C	1,29
p.G13D	c.38G>A	1,14
p.G13V	c.38G>T	1,58
p.G13C	c.37G>T	0,92
p.G13R	c.37G>C	1,71
p.G13S	c.37G>A	1,0
p.A59G	c.176C>G	1,56
p.A59T	c.175G>A	1,63
p.A59E	c.176C>A	1,4
p.Q61H	c.183A>C	1,02
p.Q61H	c.183A>T	1,44
p.Q61K	c.181C>A	1,1
p.Q61P	c.182A>C	0,48
p.Q61E	c.181C>G	0,64
p.K117N	c.351A>T	0,61
p.K117N	c.351A>C	0,57
p.A146T	c.436G>A	1,5
p.A146P	c.436G>C	0,36
p.A146V	c.437C>T	1,0

Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità e la riproducibilità sono state determinate da due operatori utilizzando tre lotti di reagenti e due serie di strumenti in due siti per cinque giorni consecutivi per sito. Sono state effettuate quattro analisi replicate per lotto di reagente al giorno, per un totale di 40 analisi valide presso lo stesso centro. La ripetibilità è stata dimostrata con mutanti di basso livello (2x LOD) e mutanti di alto livello (6x LOD). L'accuratezza del kit in tutti i campioni testati è stata almeno del 98% (39/40) su tutte le varianti combinate (Tabella 4).

Tabella 4. Precisione

Alterazione dell'aminoacido	Mutazione (%)	Mutazione non rilevata/rilevata	Precisione (%)
p.G12A	1,64	0/40	100
	4,92	1/39	98
p.G12D	1,18	0/40	100
	3,54	1/39	98
p.G12V	2,04	0/40	100
	6,12	0/40	100
p.G12C	3,66	0/40	100
	10,98	0/40	100
p.G12R	0,98	0/40	100
	2,94	0/40	100
p.G12S	1,46	0/40	100
	4,38	0/40	100
p.G13A	2,58	1/39	98
	7,74	0/40	100
p.G13D	2,28	0/40	100
	6,84	0/40	100
p.G13V	3,16	0/40	100
	9,48	0/40	100
p.G13C	1,84	0/40	100
	5,52	0/40	100
p.G13R	3,42	0/40	100
	10,26	1/39	98
p.G13S	1	0/40	100
	3	0/40	100
p.A59T	3,12	0/40	100
	9,36	1/39	98
p.A59E	3,26	0/40	100
	9,78	1/39	98

Alterazione dell'aminoacido	Mutazione (%)	Mutazione non rilevata/rilevata	Precisione (%)
p.A59G	2,8	0/40	100
	8,4	0/40	100
p.Q61H (A>C)	2,04	0/40	100
	6,12	0/40	100
p.Q61H (A>T)	2,88	0/40	100
	8,64	0/40	100
p.Q61K	2,2	0/40	100
	6,6	0/40	100
p.Q61P	0,96	0/40	100
	2,88	0/40	100
p.Q61E	1,28	0/40	100
	3,84	0/40	100
p.K117N (A>C)	1,22	0/40	100
	3,66	0/40	100
p.K117N (A>T)	1,14	0/40	100
	3,42	0/40	100
p.A146T	2,34	0/40	100
	7,02	0/40	100
p.A146P	0,72	0/40	100
	2,16	0/40	100
p.A146V	1,28	0/40	100
	3,84	0/40	100
Wild-Type	-	77/3	96

Reattività incrociata

La reattività incrociata è stata valutata testando i plasmidi omologhi KRAS (NRAS exon2, exon3 ed exon4). I plasmidi analizzati sono stati miscelati con il 5% di codone 12, di codone 13, di codone 59, di codone 61, di codone 117 e di codone 146 NRAS in una base di DNA con linee cellulari wild type. I risultati non hanno mostrato reattività incrociata.

Contaminazione incrociata

Questo test è progettato per valutare la contaminazione incrociata durante le fasi di lavaggio, che può portare a risultati falsi positivi. I campioni FFPE di mutazione wild-type e KRAS p.G12D sono stati disposti in ordine alternato durante la reazione di PCR e l'ibridazione del campione per testare il trasferimento dei segnali di

mutazione in pozzetti wild-type. Non è stata osservata alcuna contaminazione incrociata.

Interferenza di riporto

Questo test è progettato per valutare l'impatto di potenziali sostanze trasportate dal kit tissutale QIAamp DNA FFPE. KRAS p.G12C è stato selezionato come mutazione rappresentativa. Test triplici di campioni FFPE di mutazione KRAS p.G12C con ogni potenziale sostanza interferente (come elencato nella Tabella 5), aggiunti prima della fase di PCR, non hanno mostrato interferenze sulle prestazioni del kit.

Tabella 5. Sostanze interferenti testate

Sostanza interferente	Volume residuo interferente assunto (μ l / 20ul DNA)
Xilene	$4 \cdot 10^{-5}$
Etanolo	$2.7 \cdot 10^{-4}$
Tampone ATL	$1,08 \cdot 10^{-4}$
Proteinasi K	$2,64 \cdot 10^{-6}$
Tampone AL	$2,66 \cdot 10^{-4}$
Tampone di lavaggio AW1	0,1
Tampone di lavaggio AW2	1

Confronto tra metodi

Le prestazioni del kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus sono state confrontate con il sequenziamento Sanger, che è considerato lo standard di riferimento. Sono stati analizzati un totale di 43 campioni di carcinoma del colon-retto FFPE; i risultati sono riassunti nella Tabella 6. La concordanza tra il kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus e il sequenziamento Sanger è stata dell'88% di accordo positivo (sensibilità) e del 96% di accordo negativo (specificità). La percentuale totale di concordanza era del 93%.

Tabella 6. Confronto tra il kit di mutazione IntelliPlex KRAS plus e il sequenziamento Sanger

		Sequenziamento di Sanger	
		Mutazione rilevata	Mutazione non rilevata
Kit di mutazione KIntelliPlex KRAS plus	Mutazione rilevata	15	1
	Mutazione non rilevata	2	25

	Sequenziamento di Sanger	
	Mutazione rilevata	Mutazione non rilevata
Concordanza positiva = 88%		
Concordanza negativa = 96%		
Concordanza complessiva = 93%		

15. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

La risoluzione dei problemi elencata di seguito risolve possibili cause e soluzioni fornite durante le procedure di analisi.

Problema	Possibili cause	Raccomandazioni
Nessun dosaggio valido assegnato	<ol style="list-style-type: none"> Nessuna piastra inserita. Piastra inserita con orientamento errato. Nessuna APP di dosaggio installata. Nessun file ENC importato. Due o più lotti di reagente utilizzati. 	<ol style="list-style-type: none"> Verificare che la piastra sia inserita e ripetere la lettura. Confermare l'orientamento della piastra e ripetere la lettura. Installare l'APP del test e ripetere la lettura. Importare il file ENC e ripetere la lettura. Un lotto di reagente utilizzato alla volta.













Problema	Possibili cause	Raccomandazioni
Controllo negativo non riuscito / Controllo positivo non riuscito	1. Nessun controllo POS o controllo NEG aggiunto.	1. Assicurarsi che siano aggiunti il controllo POS e il controllo NEG.
	2. Contaminazione da DNasi.	2. Assicurarsi che tutte le procedure operative siano seguite correttamente. Assicurarsi che l'ambiente di lavoro sia privo di DNase.
	3. Il test non ha funzionato.	3. Assicurarsi che tutte le procedure di analisi siano seguite correttamente.
	4. Contaminazione crociata tra i campioni.	4. Pulire tutte le superfici e le attrezzature. Utilizzare la pre-PCR e la post-PCR nell'area dedicata e separare l'attrezzatura per l'uso.
	5. Scelti pozzi PC/NC sbagliati.	5. Scegliere i pozzetti PC/NC corretti e ripetere la lettura.
Conteggio MicroDisc π Code non riuscito	DeXipher non è in grado di rilevare sufficienti numeri MicroDiscs π Code per la determinazione della mutazione.	
	1. MicroDiscs π Code non correttamente dispersi nel pozzetto.	1. Ri-disperso la micropiastra con IntelliPlex 1000 processor e ripetere la lettura.
	2. MicroDiscs π Code non sufficientemente aggiunto al pozzetto.	2. Accertarsi che i MicroDiscs π Code siano ben miscelati con la giusta quantità aggiunta.
	3. I microbi esistono nei tamponi.	3. Utilizzare tampone di lavaggio appena preparato e ddH ₂ O per l'ibridazione per ridurre il tasso di perdita di MicroDiscs π Code.
	4. Errore o malfunzionamento degli strumenti.	4. Contattare il servizio clienti PlexBio.
Controllo	Le prestazioni di SA-PE sono valutate dal controllo monitor SAPE.	

Problema	Possibili cause	Raccomandazioni
	<ol style="list-style-type: none"> Non è stata aggiunta SA-PE o soluzione SA-PE insufficiente per l'erogazione. Inattivazione della soluzione SA-PE. File di micropiastre testate non corrette selezionate per l'erogazione della soluzione SA-PE. 	<ol style="list-style-type: none"> Assicurarsi che tutte le procedure di analisi siano seguite correttamente. Calcolare il volume di soluzione SA-PE sufficiente per l'erogazione. Ripetere il test. Garantire la corretta condizione di conservazione e ridurre al minimo l'esposizione alla luce. Non utilizzare SA-PE oltre la data di scadenza. Ripetere il test e assicurarsi che le file siano selezionate correttamente.
	La "base" è determinata misurando l'IFM di un controllo interno che non dovrebbe dare un segnale.	
Controllo vuoto non riuscito	<ol style="list-style-type: none"> Condizioni di ibridazione sbagliate. Residui della soluzione SA-PE nei pozzetti dopo l'ibridazione. L'analizzatore fluorescente PlexBio 100 non è calibrato. Marchature su piastre. 	<ol style="list-style-type: none"> Verificare che sia selezionato il programma di ibridazione corretto. Accertarsi che tutti i tamponi (tampone di lavaggio e ddH₂O) sul processore IntelliPlex 1000 siano freschi e sufficienti per le procedure di lavaggio. Eeguire la calibrazione sull'analizzatore fluorescente PlexBio 100. Non lasciare segni sulla piastra.

Problema	Possibili cause	Raccomandazioni
	Il controllo interno monitora tutti i passaggi della procedura e deve essere positivo.	
Controllo interno non riuscito	1. Esiste l'inibizione della PCR.	1. Seguire attentamente le istruzioni per l'estrazione del campione. Accertarsi che siano rispettati gli intervalli di temperatura richiesti e le esigenze di centrifugazione. Garantire la completa rimozione dell'etanolo.
	2. Le procedure PCR non sono eseguite correttamente.	2. Assicurarsi che tutte le procedure PCR siano seguite correttamente. Non utilizzare materiali scaduti o lotti misti di reagenti. Assicurarsi che le condizioni di conservazione siano corrette.
	3. Contaminazione da DNasi.	3. Assicurarsi che tutte le procedure operative siano seguite correttamente. Assicurarsi che l'ambiente di lavoro sia privo di DNase.
	4. L'ibridazione non ha funzionato.	4. Assicurarsi che tutte le procedure di analisi siano seguite correttamente. Assicurarsi che i campioni siano appena denaturati a caldo.

Problema	Possibili cause	Raccomandazioni
Gene di riferimento fallito	Il gene di riferimento monitora la qualità del campione testato e deve essere positivo.	
	1. Nessun campione aggiunto o assenza di DNA di origine umana.	1. Assicurarsi che vengano aggiunti campioni di DNA di origine umana. Non utilizzare DNA artificiale come campioni che potrebbero generare risultati non validi.
	2. Input campione insufficiente per test o scarsa qualità del campione.	2. Quantificare i campioni e controllare l'input e la qualità del campione. Se il problema persiste, assicurarsi che i campioni raccolti soddisfino i requisiti dei campioni. Ripetere il test con nuovi campioni, se necessario.
	3. Esiste l'inibizione della PCR.	3. Seguire attentamente le istruzioni di estrazione del campione. Accertarsi che siano rispettati gli intervalli di temperatura richiesti e le esigenze di centrifugazione. Garantire la completa rimozione dell'etanolo.
4. Le procedure PCR non sono eseguite correttamente.	4. Assicurarsi che tutte le procedure PCR siano seguite correttamente. Non utilizzare materiali scaduti o lotti misti di reagenti. Assicurarsi che le condizioni di conservazione siano corrette.	

16. SIMBOLI

Simbolo	Spiegazione	Simbolo	Spiegazione
	Uso diagnostico in vitro		Numero di catalogo
	Numero di lotto		Consultare le istruzioni per l'uso
	Fabbricante		Data di scadenza
	Limite di temperatura		Attenzione
	Contenuto sufficiente per <n> test		Data di fabbricazione
	Conformità nell'Unione europea		Rappresentante autorizzato per l'Europa

17. BIBLIOGRAFIA

- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. (2004) Le mutazioni del gene del recettore EGFR sono comuni nei tumori polmonari di "non fumatori" e sono associate alla sensibilità dei tumori a gefitinib ed erlotinib. Proc Natl Acad Sci USA. 101(36):13306-11
- Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côte JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. (2006) Lo stato di mutazione del KRAS è predittivo della risposta alla terapia con cetuximab nel carcinoma del colon-retto. Cancer Res. 66(8):3992-5
- <http://www.uniprot.org/uniprot/P01116>
- Baynes RD, Gansert J. (2009) Lo stato mutazionale del KRAS come predittore dell'efficacia dell'inibitore del recettore del fattore di crescita epidermico nel carcinoma del colon-retto. Am J Ther. 16(6):554-61
- Sakuma, M. (2000) PriProbit, ver. 1.63. Disponibile su James E. Throne USDA-ARS GMPCR, Manhattan, KS (<http://bru.usgml.ksu.edu/throne/>)
- Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. (2009) Frequenza e tipo di mutazioni KRAS nell'analisi diagnostica di routine del carcinoma del colon-retto metastatico. Pathol Res Pract. 2009; 205:858–862.

Avviso per l'utente

L'uso di questo prodotto e la relativa strumentazione PlexBio sono coperti da uno o più titoli emessi (US10302640B2, US10436778B2, US10436776B2, US9063044B2, US10019815B2) e in attesa di brevetti statunitensi e stranieri di proprietà di PlexBio Co., Ltd. L'acquisto di questo prodotto include diritti non trasferibili di utilizzare questa quantità del prodotto per esercitarsi nei metodi ivi descritti. Non è concesso alcun brevetto generale né altra licenza di qualsiasi tipo che non sia questo specifico diritto d'utilizzo derivante dall'acquisto. Per ulteriori informazioni sull'acquisto di licenze per altre applicazioni, rivolgersi a PlexBio Co., Ltd. 6F-1, No. 351, Yangguang St., Neihu District, Taipei City 11491, Taiwan.

Marchi commerciali

 , π Code™ , DeXipher™, IntelliPlex™, DigiPlex™, π Code™, PlexBio™, sono marchi o marchi registrati di PlexBio Co., Ltd. Tutti gli altri nomi di prodotti e tutti i marchi registrati e non registrati citati sono utilizzati solo a scopo identificativo e rimangono di proprietà esclusiva dei rispettivi proprietari.

Copyright

©2020 PlexBio Co., Ltd. Tutti i diritti riservati