

cobas[®]

Rx Only

cobas[®] **PIK3CA Mutation Test**

In vitro diagnostik kullanım içindir

IVD

cobas[®] **PIK3CA Mutation Test**

24 Tests

P/N: 07003986190

FFPET numunelerinin hazırlanması için **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit'e (M/N 05985536190) bakın.

İÇİNDEKİLER

Kullanım amacı

Test özeti ve açıklaması

Temel bilgiler	4
Prosedür prensipleri.....	5
Referans sekanslar	5
Numunenin hazırlanması	6
PCR yoluyla amplifikasyon.....	6
Hedefin seçilmesi.....	6
Hedef amplifikasyon	6
Otomatik gerçek zamanlı mutasyon saptaması	6
Selektif amplifikasyon.....	6

Reaktifler ve materyaller

cobas® PIK3CA Mutation Test, 24 Test için sağlanan reaktifler (P/N: 07003986190).....	7
Reaktif saklama ve kullanma koşulları	8
Diğer gerekli malzemeler	8
Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar	8

Önlemler ve taşıma gereklilikleri

Uyarılar ve önlemler	9
İyi laboratuvar uygulamaları.....	9
Kontaminasyon	9
Bütünlük	10
İmha	10
Dökülme ve temizleme	10
Numune toplama, taşıma ve saklama.....	10
Numune toplama	10
Numunelerin taşınması, saklanması ve stabilitesi	10
İşlenmiş numunelerin saklanması ve stabilitesi.....	11

Test prosedürü

Testin çalıştırılması	11
Kullanım talimatları.....	12
Tam işlem kontrolü.....	12
Amplifikasyon ve saptama	13
Reaksiyon düzeneği.....	15
Plakanın hazırlanması	16
PCR'nin başlatılması	17

Sonuçlar

Sonuçların yorumlanması.....	17
Sonuçları geçersiz numunelerin yeniden test edilmesi.....	17
Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği.....	18
Mutant kontrolü.....	18
Negatif kontrol.....	18
Prosedür ile ilgili sınırlamalar	18

Klinik olmayan performans değerlendirmesi

Temel performans özellikleri.....	19
Analitik hassasiyet – boş sınırı (LoB).....	19
FFPET numune karışımlarını kullanarak Saptama Limiti	19
Plazmidler kullanılarak nadir genotiplerin saptanması.....	21
Tekrarlanabilirlik.....	21
Referans yöntem ile korelasyon.....	21
Çapraz reaktivite.....	24
Potansiyel etkileşimde bulunan maddelerin değerlendirilmesi.....	25

Klinik performans değerlendirmesi

Klinik tekrar üretilebilirlik çalışması	26
---	----

Sonuç işaretleri

Sonuç işaretlerinin açıklaması	27
--------------------------------------	----

Ek bilgiler

Temel test özellikleri	29
Semboller.....	30
Teknik destek.....	31
Üretici	31
Ticari markalar ve patentler.....	31
Telif hakkı.....	31
Referanslar.....	32
Belge revizyonu.....	33

Kullanım amacı

cobas® PIK3CA Mutation Test, formalinle sabitlenmiş parafine gömülü tümör dokusundan (FFPET) izole edilmiş DNA'daki fosfoinositid 3-kinazın (PIK3CA) katalitik alt birimini kodlayan gende 2, 5, 8, 10 ve 21 ekzonlarındaki 17 mutasyonun kalitatif olarak saptanması ve tayini için gerçek zamanlı bir PCR testidir. **cobas® PIK3CA Mutation Test**, tümörlerinde bu mutasyonları barındıran metastatik meme kanserli hastaları belirlemek için kullanılması amaçlanan **cobas® 4800** Sisteminde kullanım için gerçek zamanlı bir PCR testidir.

Test özeti ve açıklaması

Temel bilgiler

Fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) sinyal yolağı, büyüme, hayatta kalma, hareketlilik ve çoğalma dahil olmak üzere normal hücre davranışının birçok özelliğinin ana düzenleyicisidir.¹⁻³ PI3K yolağının aktivasyonu ve düzensizliğinin, çok çeşitli insan kanseriyle bağlantılı olduğu görülmüştür.⁴ Kanserde, yolak aktivasyonunun önemli bir mekanizması, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) veya epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi reseptör tirozin kinazlar (RTK) olarak bilinen reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. PI3K, Akt ve mTOR, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağındaki 3 ana bağlantıdan oluşur.⁵ PI3K yolağının aktivasyonu, fosfatidilinositol (4,5)-bifosfatın (PIP2), Akt ve mTOR dahil olmak üzere çok çeşitli aşağı yönlü efektör yolağı uyaran önemli bir ikincil haberci olan fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfata (PIP3) dönüştürülmesine yol açar. PI3K/Akt/mTOR yolağının aktivasyonu, hücre büyümesi, çoğalması ve hayatta kalması dahil olmak üzere birçok hücresel işleme yol açar.⁶

PIK3CA, insan kanserlerinde tanımlanan en yüksek oranda mutasyona uğramış onkogenlerden biridir. Ayrıca, bildirilen mutasyonların çoğu proteindeki birkaç sıcak noktada meydana gelir (kodonlar 1047 [%40], 545 [%25] ve 542 [%13]).⁷ Mutasyonların çoğu, öncelikle PIK3CA'nın 10. ve 21. ekzonlarında meydana gelir. Ancak 2., 5. ve 8. ekzonlarda da aktive edici mutasyonlar bulunmuştur. *COSMIC* veri tabanında, PIK3CA'nın tüm tümör tiplerinde olguların %12'sinde mutasyona uğradığı gösterilmiştir. Meme kanserinde (BC), test edilen tümörlerin %26'sında PIK3CA mutasyonları bulunmuştur. PIK3CA mutasyonlarının, hormon reseptörü pozitif (~%40) ve HER-2 pozitif (~%25) BC'de daha yaygın olduğu gösterilmiştir.^{8,9}

Kadınlarda BC, en sık teşhis edilen kanserdir ve kanser ölümlerinin başlıca nedenidir. 2017 yılında BC, dünya çapındaki toplam kanser vakalarının %25'inden ve kadınlardaki kanser ölümlerinin %15'inden sorumlu olmuştur.¹⁰ BC vakalarının yaklaşık yarısının ve ölümlerin %60'ının ekonomik olarak gelişmiş olan ülkelerde meydana geldiği tahmin edilmektedir. Genel olarak, insidans oranları Batı ve Kuzey Avrupa, Avustralya/Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika'da yüksektir. İnsidans oranlarındaki uluslararası değişkenliğe katkıda bulunan faktörler, büyük ölçüde üreme ve hormonal faktörlerdeki farklılıklardan ve erken saptama hizmetlerinin ulaşılabilirliğinden kaynaklanmaktadır.¹¹ Genel olarak yüksek BC insidansı ve BC'ye bağlı çok sayıda kanser ölümüyle mücadele etmek için daha yeni tedavilere ihtiyaç vardır. PIK3CA'nın mutasyon durumunun bilinmesi, PIK3CA yolağının aktivitesini hedefleyen tedavilerin kullanılmasında önemlidir.

cobas® PIK3CA Mutation Test (cobas PIK3CA Test) tarafından saptanan mutasyonlar Tablo 1 kısmında listelenmiştir.

Tablo 1: cobas® PIK3CA Test ile saptanan mutasyonlar

Mevcut PIK3CA Ekzon numarası	Önceki PIK3CA Ekzon numarası*	PIK3CA Mutasyonu	PIK3CA Nükleik Asit Sekansı	HGVS** Protein Terimleri	HGVS** Nükleotid Terimleri	COSMIC ID ¹²
2	1	R88Q	263G>A	NM_006218.2:p.(Arg88Gln)	NM_006218.2:c.263G>A	746
5	4	N345K	1035T>A	NM_006218.2:p.(Asn345Lys)	NM_006218.2:c.1035T>A	754
8	7	C420R	1258T>C	NM_006218.2:p.(Cys420Arg)	NM_006218.2:c.1258T>C	757
10	9	E542K	1624G>A	NM_006218.2:p.(Glu542Lys)	NM_006218.2:c.1624G>A	760
10	9	E545A	1634A>C	NM_006218.2:p.(Glu545Ala)	NM_006218.2:c.1634A>C	12458
10	9	E545D	1635G>T	NM_006218.2:p.(Glu545Asp)	NM_006218.2:c.1635G>T	765
10	9	E545G	1634A>G	NM_006218.2:p.(Glu545Gly)	NM_006218.2:c.1634A>G	764
10	9	E545K	1633G>A	NM_006218.2:p.(Glu545Lys)	NM_006218.2:c.1633G>A	763
10	9	Q546E	1636C>G	NM_006218.2:p.(Gln546Glu)	NM_006218.2:c.1636C>G	6147
10	9	Q546K	1636C>A	NM_006218.2:p.(Gln546Lys)	NM_006218.2:c.1636C>A	766
10	9	Q546L	1637A>T	NM_006218.2:p.(Glu546Leu)	NM_006218.2:c.1637A>T	25041
10	9	Q546R	1637A>G	NM_006218.2:p.(Gln546Arg)	NM_006218.2:c.1637A>G	12459
21	20	H1047L	3140A>T	NM_006218.2:p.(His1047Leu)	NM_006218.2:c.3140A>T	776
21	20	H1047R	3140A>G	NM_006218.2:p.(His1047Arg)	NM_006218.2:c.3140A>G	775
21	20	H1047Y	3139C>T	NM_006218.2:p.(His1047Tyr)	NM_006218.2:c.3139C>T	774
21	20	G1049R	3145G>C	NM_006218.2:p.(Gly1049Arg)	NM_006218.2:c.3145G>C	12597
21	20	M1043I	3129G>T	NM_006218.2:p.(Met1043Ile)	NM_006218.2:c.3129G>T	773

* Önceki PIK3CA ekzon numaralandırmasında, ilk translasyon geçirmemiş ekzon hariç tutulmuştur

** HGVS - Human Genome Variation Society

Prosedür prensipleri

cobas PIK3CA Test, iki temel işleme dayanır: (1) FFPET'ten genomik DNA elde etmek için manuel numune hazırlama ve (2) tamamlayıcı primer çiftleri ve floresan boyalarla etiketlenmiş oligonükleotid problemlerini kullanılarak hedef DNA'nın PCR amplifikasyonu ve saptaması. Test, ekzon 2'de R88Q, ekzon 5'te N345K, ekzon 8'de C420R, ekzon 10'da E542K, E545X (E545A, E545D*, E545G ve E545K), Q546X (Q546E, Q546K, Q546L ve Q546R) ve ekzon 21'de M1043I**, H1047X (H1047L, H1047R ve H1047Y) ve G1049R'yi saptamak için tasarlanmıştır. Mutasyon saptaması, cobas z 480 analizöründe PCR analizi yoluyla edilir. Çalışmanın geçerliliğini doğrulamak için her çalışmaya bir mutant kontrol ve bir negatif kontrol dahil edilir.

* E545D amino asit değişikliği için, test tarafından yalnızca nükleotid değişikliği c.1635G>T mutasyonu saptanır.

** M1043I amino asit değişikliği için, test tarafından yalnızca nükleotid değişikliği c.3129G>T mutasyonu saptanır.

Referans sekanslar

PIK3CA'nın referans sekansı için lütfen aşağıdaki kaynağa bakın.¹³

PIK3CA: LRG_310t1

Numunenin hazırlanması

Cam fiberlere bağlanan nükleik aside dayalı genel bir manuel numune preparatı olan **cobas**® DNA Sample Preparation Kit kullanılarak FFPET numuneleri işlenir ve genomik DNA izole edilir. FFPET numunesinin parafinden ayrılmış 5 µm'lik kısmı, nükleik asit açığa çıkaran ve açığa çıkarılan genomik DNA'yı DNazlardan koruyan bir proteaz ve kaotropik lizis/bağlayıcı tampon ile yüksek bir sıcaklıkta inkübasyon ile lizlenir. Sonrasında, lizis karışımına izopropanol eklenir ve karışım, cam fiber filtre eki ile birlikte bir kolondan santrifüjlenir. Santrifüj işlemi sırasında, genomik DNA, cam fiber filtrenin yüzeyine bağlanır. Tuzlar, proteinler ve diğer hücresel safsızlıklar gibi bağlanmayan maddeler, santrifüj işlemi ile giderilir. Adsorbe edilen nükleik asitler yıkanır ve sonrasında, sulu çözelti ile elüte edilir. Genomik DNA miktarı, spektrofotometrik olarak belirlenir ve amplifikasyon ve saptama karışımına eklenmek üzere sabit bir konsantrasyona ayarlanır. Daha sonra hedef DNA'ya amplifikasyon uygulanır ve **cobas** PIK3CA Test kitinde verilen amplifikasyon ve saptama reaktifleri kullanılarak **cobas z 480** analizöründe saptanır.

PCR yoluyla amplifikasyon

Hedefin seçilmesi

cobas PIK3CA Test kit, PIK3CA ekzonları 2, 5, 8, 10 ve 21'de 85 ila 155 baz çifti arasında değişen spesifik baz çifti sekanslarını tanımlayan bir primer havuzu kullanır. Ek bir primer çifti, numune yeterliliği, ekstraksiyon ve amplifikasyonda tam bir işlem kontrolü sağlamak amacıyla PIK3CA geninin 4. ekzonunda korunmuş 167 baz çifti bölgesini hedefler. Amplifikasyon, yalnızca primerler arasındaki PIK3CA geni bölgelerinde meydana gelir; tüm PIK3CA geni amplifikasyona tabi tutulmaz.

Hedef amplifikasyon

Hedef amplifikasyon için *Thermus* türü Z05-AS1 DNA polimeraz türevidir. İlk olarak, PCR reaksiyon karışımı, genomik DNA'yı denatüre etmek ve primer hedef sekanslarını açığa çıkarmak için ısıtılır. Karışım soğudukça, ileri ve geri primerler hedef DNA sekanslarında yeniden birleşir. Z05-AS1 DNA polimeraz, divalent metal iyon ve fazlalık dNTP'lerin varlığında, yeniden birleşen her bir primeri uzatarak ikinci bir DNA zincirini sentezler. Bu durum PCR'nin birinci döngüsünü tamamlayarak PIK3CA geninin hedeflenen baz çifti bölgelerini içeren çift zincirli bir DNA kopyası üretir. Bu işlem, belli sayıda döngü için tekrarlanır, her döngüde amplikon DNA'nın miktarını etkili bir şekilde iki katına çıkarır.

Otomatik gerçek zamanlı mutasyon saptaması

cobas PIK3CA Test, gerçek zamanlı PCR teknolojisini kullanır. Reaksiyondaki her hedefe özgü oligonükleotid probu, haberci işlevi gören floresan bir boya ve intakt bir prob içerisindeki haberci boyadan gelen floresan emisyonları absorbe eden (söndüren) bir söndürücü molekül ile işaretlenir. Her bir amplifikasyon döngüsü esnasında, amplikondaki tek zincirli DNA sekansına tamamlayıcı prob bağlanır ve ardından Z05-AS1 DNA Polimerazın 5' ila 3' nükleaz aktivitesiyle bölünür. Haberci boya bu nükleaz aktivitesi ile söndürücüden ayrıldığında, haberci boya uygun ışık spektrumu ile uyarıldığında karakteristik bir dalga boyunun floresansı ölçülebilir. Testle hedeflenen PIK3CA sekanslarının saptanması için dört farklı haberci boya kullanılır. Hedeflenen PIK3CA sekanslarının amplifikasyonu, özel optik kanallarda dört karakteristik dalga boyunda floresansın ölçülmesiyle üç reaksiyon boyunca bağımsız olarak saptanır.

Selektif amplifikasyon

Numuneden gelen hedef nükleik asidin selektif amplifikasyonu **cobas** PIK3CA Test'te, AmpErase (urasil-N-glikosilaz) enzimi ve deoksiüridin trifosfat (dUTP) kullanılarak gerçekleştirilir.¹⁴ AmpErase enzimi, timidin içeren DNA'yı değil, deoksiüridin içeren DNA zincirlerini tanıyarak bunların yıkımını katalize eder. Deoksiüridin doğal oluşumlu DNA'da yoktur ancak Master Mix reaktiflerinde nükleotid trifosfatlardan birisi olarak deoksitimidin trifosfata ek olarak dUTP kullanıldığı için amplikonda her zaman mevcuttur; bu nedenle sadece amplikon, deoksiüridin içerir. Deoksiüridin,

kontamine edici amplikonu, hedef DNA'nın amplifiye edilmesi öncesinde AmpErase enzimiyle yıkılmaya maruz bırakır. Master Mix reaktiflerinde yer alan AmpErase enzimi, C1 konumunda deoksiriboz zincirini açarak deoksiüridin kalıntılarında deoksiüridin içeren DNA'nın bölünmesini katalize eder. Alkalin pH'da birinci ısıl çevrim aşamasında ısıtıldığında, ampikon DNA zinciri deoksiüridin konumunda kırılır, böylece DNA'nın amplifiye edilemez olmasını sağlar. AmpErase enzimi, 55°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yani ısıl çevrim aşamalarının tümünde inaktiftir ve böylece hedef amplikonu yıkmaz.

Reaktifler ve materyaller

Tüm açılmamış reaktifler ve kontroller, Reaktif saklama ve kullanma koşulları tablosunda önerilen şekilde saklanmalıdır.

cobas® PIK3CA Mutation Test, 24 Test için sağlanan reaktifler (P/N: 07003986190)

Reaktifler	Reaktif içeriği	Kit başına miktar	Güvenlik sembolü ve uyarı
PIK3CA MMX-1 (PIK3CA Master Mix 1; beyaz düğmeli kapak) (P/N 07003897001)	Tris tamponu, potasyum klorür, gliserol, EDTA, iyonik olmayan deterjan, dimetil sülfoksit, %0,09 sodyum azit, dNTP'ler, DNA polimeraz, AmpErase (urasil-N-glikosilaz) enzimi (mikrobik), Aptamer, PIK3CA primerleri, floresan etiketli PIK3CA probları	2 × 0,48 mL	Yok
PIK3CA MMX-2 (PIK3CA Master Mix 2; altın rengi düğmeli kapak) (P/N 07003927001)	Tris tamponu, potasyum klorür, gliserol, EDTA, iyonik olmayan deterjan, dimetil sülfoksit, %0,09 sodyum azit, dNTP'ler, DNA polimeraz, AmpErase (urasil-N-glikosilaz) enzimi (mikrobik), Aptamer, PIK3CA primerleri, floresan etiketli PIK3CA probları	2 × 0,48 mL	Yok
PIK3CA MMX-3 (PIK3CA Master Mix 3; mavi düğmeli kapak) (P/N 07003943001)	Tris tamponu, potasyum klorür, gliserol, EDTA, iyonik olmayan deterjan, dimetil sülfoksit, %0,09 sodyum azit, dNTP'ler, DNA polimeraz, AmpErase (urasil-N-glikosilaz) enzimi (mikrobik), Aptamer, PIK3CA primerleri, floresan etiketli PIK3CA probları	2 × 0,48 mL	Yok
MGAC (Magnezyum asetat; sarı düğmeli kapak) (P/N 05854326001)	Magnezyum asetat, %0,09 sodyum azit	6 × 0,20 mL	Yok
PIK3CA MC (PIK3CA Mutant Control; kırmızı düğmeli kapak) (P/N 07003960001)	Tris tamponu, EDTA, Poly-rA RNA (sentetik), %0,05 sodyum azit, PIK3CA ekzon 2, 5, 8, 10 ve 21 sekanslarını içeren Plazmid DNA, PIK3CA yabanıl tip DNA	6 × 0,10 mL	Yok
DNA SD (DNA Specimen Diluent) (P/N 05854474001)	Tris-HCl tamponu, %0,09 sodyum azit	2 × 3,5 mL	Yok

Reaktif saklama ve kullanma koşulları

Reaktif	Saklama sıcaklığı	Saklama Süresi
cobas® PIK3CA Mutation Test*	2°C ila 8°C	Açıldığında 90 gün içindeki 4 kullanıma kadar veya son kullanma tarihine kadar (hangisi önceyse) stabildir.

* **PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2, PIK3CA MMX-3** ve çalışma MMX (**MGAC**'nin **PIK3CA MMX-1** veya **PIK3CA MMX-2** veya **PIK3CA MMX-3**'ye eklenmesiyle hazırlanır) uzun süreli ışığa maruz kalmaktan korunmalıdır. Çalışma MMX'i 2°C ila 8°C'de karanlık bir yerde muhafaza edilmelidir. Hazırlanan numuneler ve kontroller, çalışma MMX'i hazırlandıktan sonra 1 saat içinde eklenmelidir. İşlenen numuneler ve kontroller çalışma MMX'ine eklendikten sonra 1 saat içinde amplifikasyon başlatılmalıdır.

Kullanımdan önce, her bir reaktifi görsel olarak inceleyerek sızıntı belirtisi olmadığından emin olun. Herhangi bir sızıntı kanıtı varsa bu materyali test için kullanmayın.

Diğer gerekli malzemeler

Malzemeler	P/N
Çamaşır suyu	Herhangi bir satıcı
%70 etanol	Herhangi bir satıcı
cobas® 4800 Sistemi Mikrokuyucuk Plakası (AD plakası) ve kapatıcı film	Roche 05232724001
cobas® 4800 Sistemi kapatıcı film aplikatörü (cobas® 4800 Sisteminin montajıyla sağlanır)	Roche 04900383001
Ayarlanabilen pipetleyiciler* (5–1000 µL pipetleme yapabilir)	Herhangi bir satıcı
Aerosol bariyer veya pozitif yer değiştirmeli DNase içermeyen uçlar	Herhangi bir satıcı
Tezgaah üstü mikrosantrifüj* (20.000 × g kapasiteli)	Herhangi bir satıcı
Kilitleme kapaklı mikrosantrifüj tüpleri (1,5 mL steril, RNaz/DNaz içermeyen, PCR sınıfı)	Herhangi bir satıcı
Mikrosantrifüj tüp rakları	Herhangi bir satıcı
DNA konsantrasyonunun ölçümü için spektrofotometre*	Herhangi bir satıcı
Vorteks karıştırıcı*	Herhangi bir satıcı
Tek kullanımlık eldivenler, pudrasız	Herhangi bir satıcı

* Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmelidir.

Ayrı satılan malzemelerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Gereken ancak sağlanmayan cihaz ve yazılımlar

Gerekli Cihaz ve Yazılımlar, Sağlanmamıştır	P/N
cobas z 480 analizörü ve Kontrol Ünitesi	05200881001
cobas® 4800 Sistemi Uygulama Yazılımı (Ana) sürüm 2.2 veya üzeri	07565500001
cobas® PIK3CA P1 Analiz Paketi Yazılım sürümü 1.0 veya üstü	08249628001

Ayrı satılan malzemelerle ilgili daha fazla bilgi için, lütfen yerel Roche temsilcinizle iletişime geçin.

Önlemler ve taşıma gereklilikleri

Uyarılar ve önlemler

Herhangi bir test prosedüründe olduğu gibi, bu testin iyi performans sağlaması için iyi laboratuvar uygulamaları esastır.

- Sadece *in vitro* diagnostik kullanım içindir.
- Güvenlik Bilgi Formları (SDS) talep halinde bölge Roche ofisinizden temin edilebilir.
- Bu test, FFPET numuneleriyle kullanım içindir. Numuneler, Mikrobiyoloji ve Biyomedikal Laboratuvarlarında Biyogüvenlik (*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*)¹⁵ ve CLSI Belgesi M29-A4'te¹⁶ tanımlanan güvenli laboratuvar prosedürleri kullanılarak enfeksiyöz madde gibi değerlendirilmelidir.
- Steril tek kullanımlık pipetlerin ve DNase içermeyen pipet uçlarının kullanılması önerilir.
- Testin doğru şekilde gerçekleştirildiğinden emin olmak için temin edilen kılavuzları ve prosedürleri yakından takip edin. Prosedürlerden ve kılavuzlardan herhangi bir sapma, optimum test performansını etkileyebilir.
- Bu testi kullanırken meydana gelebilecek tüm ciddi olayları yerel yetkili makama ve üreticiye bildirin.

İyi laboratuvar uygulamaları

- Ağzınızla pipetleme yapmayın.
- Laboratuvar çalışma ortamlarında yiyecek veya içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin.
- Numunelerle ve kit reaktifleriyle işlem yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Reaktiflerle işlem yaparken gözlük, laboratuvar önlüğü ve tek kullanımlık eldiven kullanın. Bu materyallerin cildinize, gözlerinize veya mukoza membranlarına temas etmesinden kaçının. Temas etmeniz durumunda, vakit kaybetmeden bol miktarda suyla yıkayın. Tedavi edilmezse yanıklar oluşabilir. Dökülme meydana gelirse, silmeden önce suyla seyreltin.
- Distile veya deiyonize suya %0,5 oranında sodyum hipoklorit ekleyerek taze hazırlayacağınız çözeltiyle laboratuvardaki tüm çalışma yüzeylerini iyice temizleyin ve dezenfekte edin (ev temizliği için kullanılan çamaşır suyunu 1:10 oranında seyreltin). Bunun ardından %70 etanol içeren çözeltiyle yüzeyi silin.

Not: *Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.*

Kontaminasyon

- Kontaminasyonu önlemek için eldiven kullanılmalıdır ve farklı numunelerle ve **cobas** PIK3CA Test reaktifleriyle işlem yapıldıktan sonra eldiven değiştirilmelidir. Numunelerle işlem yaparken kontamine edici eldiven kullanmaktan kaçının.
- Eldivenler, kontaminasyon potansiyelini azaltmak için sık değiştirilmelidir.
- DNA izolasyon alanlarından ayrılmadan önce veya çözeltilerle veya bir numuneyle temas edildiğinden şüpheleniliyorsa eldivenler değiştirilmelidir.
- Reaktiflerin mikrobik kontaminasyonundan kaçının.
- Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı MMX hazırlama işlemine başlamadan önce tümüyle temizlenmelidir. Her aktiviteye ayrı malzemeler ve ekipmanlar hazırlanmalıdır ve bu malzemeler ve ekipmanlar diğer aktiviteler için kullanılmamalıdır veya alanlar arasında hareket ettirilmemelidir. Örneğin, DNA izolasyonu için kullanılan pipetleyiciler ve malzemeler amplifikasyon ve saptama işlemlerine yönelik reaktifleri hazırlamak için kullanılmamalıdır.

Laboratuvardaki iş akışının tek yönlü olarak ilerlemesi, bir sonraki aktiviteye geçmeden önce hali hazırdaki aktivitenin tamamlanması önemle tavsiye edilir. Örneğin, amplifikasyon ve saptama işlemlerine geçmeden önce DNA izolasyonu tamamlanmalıdır. DNA izolasyonu, amplifikasyon ve saptama işlemleri için kullanılacak alandan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Çalışma master mix'inin DNA numuneleriyle kontamine edilmesini önlemek için çalışma master mix'inin hazırlanması öncesinde amplifikasyon ve saptama çalışma alanı tümüyle temizlenmelidir.

Bütünlük

- Kitleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Farklı kitlerden veya lotlardan alınan reaktifleri birlikte kullanmayın.
- Farklı kit lotlarından gelen reaktif şişelerini birleştirmeyin.
- Tek kullanımlık ürünleri son kullanma tarihi geçmişse kullanmayın.
- Tek kullanımlık ürünlerin hepsi sadece bir kez kullanılmak içindir. Tekrar kullanmayın.
- Tüm ekipmanların bakımı üreticinin talimatlarına göre doğru bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

İmha

1. **MGAC, PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2, PIK3CA MMX-3, PIK3CA MC ve DNA SD**, sodyum azit içerir. Sodyum azit, bakır ve kurşun su borularıyla reaksiyona girerek yüksek patlayıcı özelliğe sahip metal azitler oluşturabilir. Laboratuvardaki lavabolarda çözeltileri içeren sodyum azit atılırken, azit birikimini önlemek için bol miktarda soğuk su akıtarak giderleri temizleyin.
2. Kullanılmayan reaktifleri ve atıkları ülke genelindeki, federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere göre atın.

Dökülme ve temizleme

- Dökülme **cobas® 4800** cihazının üzerinde gerçekleşirse, temizlemek için **cobas® 4800** Sistemi – Yardım Asistanı'nda yer alan yönergeleri izleyin.
- **cobas z 480** analizörü temizlemek için sodyum hipoklorit çözeltisi (çamaşır suyu) kullanmayın. **cobas z 480** analizörünü **cobas® 4800** Sistemi – Yardım Asistanı'nda tarif edilen prosedürlere göre temizleyin.
- **cobas z 480** analizörünün kontaminasyon riskini azaltmaya yönelik ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için, **cobas® 4800** Sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.

Numune toplama, taşıma ve saklama

Not: Tüm numuneleri bulaşıcı madde yayma potansiyeli olduğunu varsayarak kullanın.

Numune toplama

BC FFPET numuneleri, **cobas** PIK3CA Test ile birlikte kullanım için doğrulanmıştır.

Numunelerin taşınması, saklanması ve stabilitesi

BC FFPET numuneleri, 15°C ila 30°C'de taşınabilir. BC FFPET numunelerinin taşınması, etiyolojik ajanların taşınması ile ilgili ülkeye, eyalete özgü federal ve yerel düzenlemelere uygun olmalıdır.¹⁷

Numune alma tarihinden sonraki 12 aya kadar 15°C ila 30°C'de saklanan BC FFPET numunelerinin stabilitesi doğrulanmıştır. Slaytlara yerleştirilen 5 µm'lik kesitler, 60 güne kadar 15–30°C'de saklanabilir.

BC FFPET numuneleri aşağıdaki süreler boyunca stabildir:

FFPET Numune Tipi	FFPET Bloğu	5 µm FFPET Kesiti
FFPET Numune Saklama Sıcaklığı	15°C ila 30°C	15°C ila 30°C
Saklama Süresi	12 aya kadar	60 güne kadar

İşlenmiş numunelerin saklanması ve stabilitesi

İşlenmiş numuneler (ekstrakte edilen DNA), aşağıdakilerden birinde stabildir:

Ekstrakte Edilmiş DNA Saklama Sıcaklığı	-15°C ila -25°C	2°C ila 8°C	15°C ila 30°C
Saklama Süresi	60 gün boyunca 3 kez dondurma/çözmeye kadar	14 güne kadar	1 güne kadar

Ekstraksiyon uygulanan DNA, önerilen saklama dönemleri içinde ya da DNA'yı ekstrakte etmek için kullanılan cobas® DNA Sample Preparation Kit'in son kullanma tarihinden önce (hangisi daha önce gelirse) kullanılmalıdır.

Test prosedürü

Testin çalıştırılması

Şekil 1: cobas® DNA Sample Preparation Kit ile cobas PIK3CA Test iş akışı

No.	İş Akışı Aşamaları
1	Sistemi başlatın
2	Cihaz bakımını gerçekleştirin
3	Numuneleri ve reaktifleri saklama alanından alın
4	Numuneleri parafinden ayırın
5	DNA izolasyonu gerçekleştirin
6	DNA'yı elüte edin
7	İş istemi oluşturun ve plaka yerleşim planının çıktısını alın
8	Amplifikasyon reaktiflerini hazırlayın
9	AD plakasına amplifikasyon reaktiflerini yerleştirin
10	AD plakasına numuneyi yerleştirin
11	AD plakasını kapatın
12	AD plakasını cobas z 480 analizöre yerleştirin
13	Çalışmayı başlatın
14	Sonuçları gözden geçirin
15	LIS ile: sonuçları LIS'e gönderin
16	Analizörü boşaltın

Kullanım talimatları

Not: *cobas PIK3CA Test'te yalnızca bölgeye göre en az %10 tümör içeriği olan 5 µm kalınlığındaki BC FFPET kesitleri kullanılmalıdır. Bölgeye göre %10'dan az tümör içeriği olan herhangi bir numune, parafinden arındırıldıktan sonra makrodiseksiyona tabi tutulmalıdır.*

Not: *cobas z 480 analizörünün ayrıntılı çalıştırma yönergeleri için cobas® 4800 Sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.*

Çalışma hacmi

Tek bir çalışma döngüsü, 96 kuyucuklu AD plakası başına 1 ila 30 numune (artı kontroller) içerebilir. 24'ten fazla numuneyle çalışırken birden fazla **cobas PIK3CA Test** kiti gerekli olacaktır.

cobas PIK3CA Test, kit başına maksimum 24 numune için 3 numunenin (artı kontroller) 8 çalışması için yeterli reaktif içerir.

Tam işlem kontrolü

Bu test, tam işlemleri bir negatif kontrolü (**NEG**) gerektirir. Her çalışma için, DNA izolasyon prosedüründen başlayarak numuneler ile eşzamanlı bir **NEG** işleyin.

DNA izolasyonu

DNA, **cobas® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190)** kullanılarak BC FFPET numunelerinden izole edilir.

Makrodiseksiyon

Numune alana göre %10'dan az tümör içeriğine sahipse, numunenin numune hazırlama işlemi kapsamında makrodiseksiyona tabi tutulması gerekir.

DNA kantitasyonu

Not: *DNA konsantrasyonu ölçümü, DNA izolasyonu prosedüründen hemen sonra ve saklama sürecinden önce gerçekleştirilmelidir.*

Not: *DNA stokunu Numunelerin taşınması, saklanması ve stabilitesi bölümündeki talimatlara göre saklayın.*

- Her DNA stokunu 5 saniye vorteksleyerek karıştırın.
- Üretici protokolüne uygun şekilde spektrofotometre kullanarak DNA kantitasyonu gerçekleştirin. DNA Elution Buffer'ı (**DNA EB**) cihaz için kör olarak kullanın. Ortalama 2 tutarlı değerlendirme gereklidir. İki ölçüm, DNA konsantrasyon değerlendirmeleri $\geq 20,0$ ng/µL olduğunda birbirinin $\pm 10\%$ 'u içinde olmalıdır. $< 20,0$ ng/µL DNA konsantrasyon değerlendirmeleri için iki ölçüm, ± 2 ng/µL dahilinde olmalıdır. İki ölçüm, DNA konsantrasyon değerlendirmeleri $\geq 20,0$ ng/µL iken birbirinin $\pm 10\%$ 'u içinde veya DNA konsantrasyon değerlendirmeleri $< 20,0$ ng/µL iken ± 2 ng/µL dahilinde olmadığında, gereklilikler karşılanana kadar ek 2 değerlendirme daha yapılmalıdır. Ardından, bu iki yeni ölçümün ortalaması hesaplanmalıdır.

Not: *İşlenmiş NEG'den alınan DNA stokunun ölçülmesine gerek yoktur.*

- Numunelerdeki DNA stoku konsantrasyonu, **cobas PIK3CA Test**'in gerçekleştirilmesi için ≥ 2 ng/µL olmalıdır. Her amplifikasyon/saptama için 2 ng/µL DNA stoku dilüsyonunun 25 µL'si (toplam 50 ng DNA) kullanılarak numune başına üç amplifikasyon/saptama çalıştırılır.

Not: Her DNA stoku, **cobas** PIK3CA Test'in gerçekleştirilmesi için minimum 2 ng/µL konsantrasyona sahip olmalıdır. DNA stok konsantrasyonu < 2 ng/µL ise, bu numune için parafinden ayırma işlemini, DNA izolasyonunu ve DNA kantitasyon prosedürlerini iki adet 5 µm'lik FFPET kesiti kullanarak tekrarlayın. Yerleştirilen numuneler için, parafinden ayırma işleminin ardından, her iki kesitten alınan dokuyu bir tüpün içinde birleştirin, dokuyu DNA Tissue Lysis Buffer (**DNA TLB**) + Proteinaz K (**PK**) içine daldırın ve yukarıda açıklandığı gibi DNA izolasyonu ve kantitasyon işlemini gerçekleştirin. Yerleştirilmeyen numuneler için, iki kesiti bir tüpün içinde birleştirin ve parafinden ayırma işlemini gerçekleştirin. Dokuyu **DNA TLB** + **PK**'nin içine daldırın ve yukarıda açıklandığı gibi DNA izolasyonu ve kantitasyon işlemini gerçekleştirin. DNA stoku hala < 2 ng/µL ise, ilgili klinik merkezden başka bir FFPET numune kesiti isteyin.

Amplifikasyon ve saptama

Not: Çalışma MMX'inin DNA numuneleriyle kontamine edilmesini önlemek için, amplifikasyon ve saptama işlemleri DNA izolasyonundan ayrı bir alanda gerçekleştirilmelidir. Amplifikasyon ve saptama çalışma alanı MMX hazırlama işlemine başlamadan önce tümüyle temizlenmelidir. Doğru temizlik için, raklar ve pipetleyiciler dahil tüm yüzeyler önce %0,5 sodyum hipoklorit çözeltisiyle ardından %70 etanol çözeltisiyle tümüyle silinmelidir. Ev işlerinde kullanılan piyasadaki çamaşır suları genel olarak %5,25 oranında sodyum hipoklorit içerir. A 1:10 oranında seyreltilen çamaşır suyu %0,5 oranında sodyum hipoklorit çözeltisi üretir.

Cihaz düzeneği

cobas z 480 analizör kurulumu ile ilgili ayrıntılı yönergeler için **cobas**® 4800 Sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.

Test istemi düzeneği

cobas PIK3CA Test iş akışı aşamalarıyla ilgili ayrıntılı yönergeler için **cobas**® 4800 Sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.

Çalışmadaki tüm numune ve kontrollerin konumunu içeren bir plaka yerleşim haritası oluşturun. Mutant Kontrolü (MC), plaka üzerinde A01–A03 konumlarına yüklenir. **NEG**, plaka üzerinde B01–B03 konumlarına yüklenir. Seyreltilmiş numuneler daha sonra aşağıdaki Tablo 2 içinde gösterildiği gibi C01–C03'ten başlayarak H10–H12'ye kadar 3 sütunluk setler halinde eklenir.

Tablo 2: cobas PIK3CA Test için plaka yerleşim düzeni

Satır/ Sütun	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3

Burada: MC = Mutant Kontrolü, NEG = Negatif Kontrol; S# = numune kimliği ve MMX #, Master Mix Reagent 1, 2 veya 3'ü belirtir.

Not: Yanıt oluşturmak için herhangi bir numune, bir satırda art arda gelen üç sütuna yayılmalıdır.

Not: Çalışma Master Mix 1, plaka üzerinde 01, 04, 07 ve 10 sütunlarına yüklenmelidir. Çalışma Master Mix 2, plaka üzerinde 02, 05, 08 ve 11 sütunlarına yüklenmelidir. Çalışma Master Mix 3, plaka üzerinde 03, 06, 09 ve 12 sütunlarına yüklenmelidir.

Not: Tek plakaya 30'a kadar numune yüklenebilir. Plakadaki tüm numuneleri işlemek için birden fazla reaktif kiti gerekiyorsa, kitlerin tümü aynı lottan olmalıdır.

Numune DNA stokunun dilüsyon hesaplaması

2 ng/µL ila 36 ng/µL DNA stoku konsantrasyonları için dilüsyon hesaplaması

Not: Numunelerden alınan DNA stokları, amplifikasyon ve saptamadan hemen önce seyreltilmelidir.

Not: 2 ng/µL DNA stoku dilüsyonunun (toplam 150 ng DNA) toplam hacminin 75 µL (üç reaksiyonun her biri için 25 µL) olmasını gerektiren her numune için üç amplifikasyon/saptama çalıştırılır.

1. Her numune için gereken DNA stokunun hacmini (µL) hesaplayın:

$$\text{DNA stoku } \mu\text{L miktarı} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{DNA stoku konsantrasyonu [ng}/\mu\text{L}]$$

2. Her numune için gereken DNA SD hacmini (µL) hesaplayın:

$$\text{DNA SD } \mu\text{L miktarı} = 90 \mu\text{L} - \text{DNA stoku } \mu\text{L değeri}$$

Örnek:

$$\text{DNA stoku konsantrasyonu} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$1. \text{ DNA stoku } \mu\text{L değeri} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{L} = 27,7 \mu\text{L}$$

$$2. \text{ DNA SD } \mu\text{L değeri} = (90 \mu\text{L} - 27,7 \mu\text{L}) = 62,3 \mu\text{L}$$

> 36 ng/µL olan DNA stoku konsantrasyonları için dilüsyon hesaplaması

Not: Numunelerden alınan DNA stokları, amplifikasyon ve saptamadan hemen önce seyreltilmelidir.

Not: 2 ng/µL DNA stoku dilüsyonunun (toplam 150 ng DNA) toplam hacminin 75 µL (üç reaksiyonun her biri için 25 µL) olmasını gerektiren her numune için üç amplifikasyon/saptama çalıştırılır.

1. > 36 ng/µL DNA stoku konsantrasyonu için, en az 90 µL seyreltilmiş DNA stoku hazırlamak için gereken DNA SD miktarını hesaplamak üzere aşağıdaki formülü kullanın. Bu, her numunede minimum 5 µL DNA stoku kullanılmasını sağlama amaçlıdır.

2. Her numune için 5 µL DNA stokunu 2 ng/µL'ye seyreltmek için gereken DNA SD hacmini (µL) hesaplayın:

$$\mu\text{L cinsinden gerekli DNA SD hacmi} = ((5 \mu\text{L DNA stoku} \times \text{ng}/\mu\text{L cinsinden DNA stok konsantrasyonu}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L}$$

Örnek:

$$\text{DNA stoku konsantrasyonu} = 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$1. \mu\text{L cinsinden gerekli DNA SD hacmi} = ((5 \mu\text{L} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L} = 245 \mu\text{L}$$

$$2. 5 \mu\text{L DNA stokunu seyreltmek için hesaplanan DNA SD hacmini kullanın.}$$

Numune dilüsyonu

1. DNA Dilüsyonları için uygun sayıda 1,5 mL'lik kilitli kapaklı mikrosantrifüj tüplerini uygun numune tayiniyle etiketleyerek hazırlayın.
2. Aerosol dirençli ucu olan bir pipet kullanarak, hesaplanan **DNA SD** hacimlerini ilgili etiketli tüplere pipetleyin. **NEG** olarak etiketlenmiş, kilitli kapaklı bir mikrosantrifüj tüpüne 45 µL **DNA SD** pipetleyin.
3. Her bir DNA stokunu ve **NEG**'i 5 ila 10 saniye vorteksleyin.
4. Aerosol dirençli ucu olan bir pipet kullanarak (her pipetleme işlemi için yeni uç), her bir DNA stokundan hesaplanan hacmi nazıkçe **DNA SD** içeren ilgili tüpe pipetleyin. 45 µL **NEG**'i (ekstrakte edilmiş elüat), **NEG** tüpüne pipetleyin.
5. Tüplerin kapağını kapatın ve her birini 5 ila 10 saniye vorteksleyin.
6. Eldiven değiştirin.

Reaksiyon düzeneği

Çalışma master mix'lerinin hazırlanması (MMX-1, MMX-2 ve MMX-3)

Not: **PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2, PIK3CA MMX-3** ve çalışma **MMX**'i ışığa karşı duyarlıdır ve uzun süreli ışığa maruz kalmaktan korunmalıdır.

Not: Çalışma **MMX**'i ve **PIK3CA** reaktiflerinin viskozitesinden ötürü, tüm karışımın uçtan tamamen dağıtıldığından emin olmak için yavaşça pipetleyin.

Not: **PIK3CA MMX-1, PIK3CA MMX-2** ve **PIK3CA MMX-3**, açık mavi/morumsu renkte görülebilir. Bu durum reaktifin performansını etkilemez.

Ayrı 1,5 mL kilitli kapaklı mikrosantrifüj tüplerinde biri **PIK3CA MMX-1**, biri **PIK3CA MMX-2** ve diğeri **PIK3CA MMX-3** içeren üç bulk çalışma **MMX**'i hazırlayın.

1. Aşağıdaki formülü kullanarak her çalışma **MMX**'i için gerekli olan **PIK3CA MMX-1** veya **PIK3CA MMX-2** veya **PIK3CA MMX-3** hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli olan PIK3CA MMX-1 veya PIK3CA MMX-2 veya PIK3CA MMX-3 hacmi} = (\text{Numune Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 20 \mu\text{L}$$

2. Aşağıdaki formülü kullanarak her bir çalışma **MMX**'i için gerekli **MGAC** hacmini hesaplayın:

$$\text{Gerekli MGAC hacmi} = (\text{Numune Sayısı} + 2 \text{ Kontrol} + 1) \times 7 \mu\text{L}$$

Çalışmaya dahil edilen numune sayısına bağlı olarak çalışma **MMX**'inin hazırlanması için gereken her reaktifin hacmini belirlemek için Tablo 3 kullanın.

Tablo 3: Test edilen numune sayısına* dayalı olarak çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 için gerekli olan reaktiflerin hacimleri

Reaktif	Hacim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 µL	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	7 µL	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
-	Her Çalışma MMX'i için Toplam Hacim (µL)	108	135	162	189	216	243	270	297	324	351

* Numunelerin Sayısı için hacimler, Numunelerin Sayısı + 2 Kontrol + 1 toplamına dayanır

3. Uygun sayıda **PIK3CA MMX-1** veya **PIK3CA MMX-2** ya da **PIK3CA MMX-3** ve **MGAC** flakonlarını 2°C ila 8°C sıcaklıktaki depodan çıkarın. Her reaktifi 5 saniye vorteksleyin ve kullanmadan önce tüpün altındaki sıvıyı toplayın. Çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 için steril bir mikrosantrifüj tüpünü etiketleyin.
4. **PIK3CA MMX-1** veya **PIK3CA MMX-2** veya **PIK3CA MMX-3**'nin hesaplanan hacmini ilgili çalışma MMX'i tüpüne ekleyin.
5. Hesaplanan **MGAC** hacmini çalışma MMX'i tüplerine ekleyin.
6. Yeterli karışımı sağlamak için tüpleri 3 ila 5 saniye vorteksleyin.

Not: Numuneler ve kontroller, çalışma MMX'leri hazırlandıktan sonra 1 saat içinde AD plakasına eklenmelidir.

Not: Sadece **cobas® 4800 Sistemi AD plakası ve Kapatıcı film** kullanın.

Plakanın hazırlanması

1. Çalışma için gerekli AD plakasının her bir reaksiyon kuyucuğuna 25 µL çalışma MMX'i pipetleyin. Pipet ucunun kuyucuğun dışındaki plakaya temas etmesine izin vermeyin.
 - 01, 04, 07 ve 10 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-1'i (**PIK3CA MMX-1** içeren) ekleyin.
 - 02, 05, 08 ve 11 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-2'yi (**PIK3CA MMX-2** içeren) ekleyin.
 - 03, 06, 09 ve 12 sütunlarındaki AD plakası kuyucuklarına gerektiği biçimde çalışma MMX-3'ü (**PIK3CA MMX-3** içeren) ekleyin.

2. 25 µL **PIK3CA MC**'yi AD plakasının **A01**, **A02** ve **A03** kuyucuklarına pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.
3. Yeni bir pipet ucu kullanarak, 25 µL **NEG**'i AD plakasının **B01**, **B02** ve **B03** kuyucuklarına pipetleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak iyice karıştırın.

Not: Her çalışma **A01**, **A02** ve **A03** kuyucuklarında **PIK3CA MC** ve **B01**, **B02** ve **B03** kuyucuklarında **NEG** içermelidir aksi halde çalışma **cobas z 480** analizörü tarafından geçersiz kılınacaktır.

Not: Numuneden numuneye geçebilecek kontaminasyona veya PCR reaksiyon tüpü kontaminasyonuna karşı koruma sağlamak için gerektiği biçimde eldivenlerinizi değiştirin.

4. Her seyreltilmiş numune DNA'sı için yeni pipet uçları kullanarak, numune DNA'sının her bir kuyucuğa eklenmesi için yeni bir uç kullanarak AD plakasının **C01**, **C02** ve **C03** kuyucuklarına ilk numune DNA'sından 25 µL ekleyin; en az iki kez aspirasyon usulüyle çekmek ve kuyucuğa aktarmak için pipeti kullanarak her kuyucuğu iyice karıştırın. Bu prosedürü her numunedeki seyreltilmiş DNA için tekrarlayın ve tüm numunelerin DNA Dilüsyonları AD plakasına yüklenene kadar Tablo 2 içindeki şablonu takip edin. Tüm sıvının kuyucukların tabanında toplandığından emin olun.
5. AD plakasını kapatıcı film (plakalarla birlikte verilen) ile örtün. Filmi AD plaka sağlam bir şekilde yapıştırmak için kapatıcı film aplikatörünü kullanın.
6. PCR'yi başlatmadan önce tüm sıvının her kuyucuğun tabanında toplandığını onaylayın.

Not: Amplifikasyon ve saptama, çalışma MMX'ine ilk numune DNA dilüsyonunun eklenmesinden sonraki 1 saat içinde başlatılmalıdır.

PCR'nin başlatılması

PIK3CA iş akışı aşamaları ile ilgili ayrıntılı yönergeler için **cobas® 4800 Sistemi** – Yardım Asistanı'na bakın. “Select test” açılır penceresi açıldığında, “PCR Only” iş akışı tipini seçin, ardından “PIK3CA P1”i işaretleyin ve “OK” düğmesine tıklayın.

Sonuçlar

Sonuçların yorumlanması

Not: Tüm çalışma ve numune doğrulama işlemleri **cobas® 4800** yazılımıyla gerçekleştirilir.

Not: Geçerli bir test çalışması hem geçerli hem de geçersiz numune sonuçlarını içerebilir.

Geçerli bir çalışma için, numune sonuçları Tablo 4'da gösterildiği gibi yorumlanır.

Tablo 4: cobas PIK3CA Test için sonuç yorumlama

Test sonucu	Mutasyon sonucu	Yorum
Mutasyon Saptandı	R88Q	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	N345K	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	C420R	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	E542K	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	E545X (E545A, E545D*, E545G veya E545K)	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	Q546X (Q546E, Q546K, Q546L veya Q546R)	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	M1043I**	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	H1047X (H1047L, H1047R veya H1047Y)	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	G1049R	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptandı	(Birden fazla mutasyon mevcut olabilir)	Belirtilen hedeflenen PIK3CA bölgesinde mutasyon saptandı.
Mutasyon Saptanmadı	Yok	Hedeflenen PIK3CA bölgelerinde mutasyon saptanmadı.
Geçersiz	Yok	Numune sonucu geçersizdir. Aşağıdaki “Sonuçları geçersiz numunelerin yeniden test edilmesi” adlı bölümde yer alan yönergeleri izleyerek geçersiz sonuç içeren numuneleri yeniden test edin.
Başarısız	Yok	Donanım veya yazılım hatası nedeniyle çalışma başarısız oldu. Teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

* E545D amino asit değişikliği için, test tarafından yalnızca nükleotid değişikliği c.1635G>T mutasyonu saptanır.

** M1043I amino asit değişikliği için, test tarafından yalnızca nükleotid değişikliği c.3129G>T mutasyonu saptanır.

Not: “Mutasyon Saptanmadı” sonucu, sonuçların mutant sekanslarının yüzdesine, yeterli numune bütünlüğüne, inhibitörlerin yokluğuna ve saptanacak yeterli DNA'ya bağlı olmasından ötürü hedeflenen PIK3CA bölgelerinde bir mutasyonun varlığını engellemez.

Sonuçları geçersiz numunelerin yeniden test edilmesi

- Amplifikasyon ve saptama** bölümündeki “Numune DNA Stokunun Dilüsyon Hesaplaması” ve “Numune Dilüsyonu” prosedürlerinden başlayarak geçersiz numune DNA stokunun dilüsyonunu tekrarlayın.
- DNA stoku dilüsyonunu “Numune dilüsyonu” bölümünde açıklandığı gibi 2 ng/μL olarak gerçekleştirdikten sonra “çalışma MMX (MMX-1, MMX-2 ve MMX-3) hazırlama” ve amplifikasyon ve saptama prosedürünün geri kalanı ile devam edin.

Not: Numune yeniden test edildikten sonra geçersiz kalırsa veya adım A'daki Sonuçları Geçersiz Numunelerin Yeniden Test Edilmesi sırasında başka bir dilüsyon hazırlamak için yeterli DNA stoku yoksa, yeni bir 5 µm FFPET tümör kesitini kullanarak Parafinden Arındırma ve DNA izolasyonu ile başlayın ve bu numune için tüm test prosedürünü tekrarlayın.

Kalite kontrol ve sonuçların geçerliliği

30 numuneye kadar her bir çalışmaya, çalışma MMX-1, çalışma MMX-2 ve çalışma MMX-3 için bir set **cobas** PIK3CA PIK3CA MC (A01, A02 ve A03 kuyucukları) ve **NEG** (B01, B02 ve B03 kuyucukları) dahil edilir. Hem **PIK3CA MC** hem de **NEG** geçerli ise çalışma geçerlidir. **PIK3CA MC** veya **NEG** geçersiz ise, tüm çalışma geçersizdir ve tekrar edilmelidir. Amplifikasyon ve saptama için kontrollerle birlikte yeni bir AD plakası düzeneği kurmak için önceden izole edilmiş numune DNA stokundan yeni bir dilüsyon hazırlayın.

Mutant kontrolü

PIK3CA MC sonucu “Geçerli” olmalıdır. **PIK3CA MC** sonuçları sürekli geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Negatif kontrol

NEG sonucu “Geçerli” olmalıdır. **NEG** sonuçları sürekli geçersizlik gösteriyorsa, teknik destek almak için bölgesel Roche ofisinizle iletişime geçin.

Prosedür ile ilgili sınırlamalar

1. Yalnızca belirtilen numune tiplerini test edin. **cobas** PIK3CA Test, BC FFPET numuneleri kullanılarak doğrulanmıştır.
2. **cobas** PIK3CA Test, yalnızca **cobas**® DNA Sample Preparation Kit kullanılarak doğrulanmıştır (Roche M/N: 05985536190).
3. Bir mutasyonun saptanması numunede mevcut olan kopya sayısına bağlıdır ve numunenin bütünlüğünden, izole edilen DNA konsantrasyonundan ve etkileşimde bulunan maddelerin varlığından etkilenebilir.
4. Alınan sonuçların güvenilir olması yeterli numune fiksasyonu, taşıma, depolama ve işleme koşullarına bağlıdır. **cobas**® DNA Sample Preparation Kit Kullanım Talimatları (M/N 05985536190), bu Kullanım Talimatları ve **cobas**® 4800 Sistemi – Yardım Asistanı içindeki prosedürleri takip edin.
5. Numune fiksasyonu değişkenleri gibi diğer potansiyel değişkenlerin etkileri değerlendirilmemiştir.
6. AmpErase enziminin **cobas** PIK3CA Test Master Mix'e eklenmesi, hedef DNA'nın selektif amplifikasyonunu sağlar; ancak iyi laboratuvar uygulamaları ve bu Kullanım Talimatları'nda belirtilen prosedürlere tam uyum, reaktiflerde kontaminasyondan kaçınmak için gereklidir.
7. Bu ürünü sadece PCR tekniklerinde ve **cobas**® 4800 Sisteminin kullanımında eğitimli olan personel kullanmalıdır.
8. Sadece **cobas z 480** analizörünün bu ürünle kullanımı doğrulanmıştır. Başka gerçek zamanlı optik saptama sistemi olan hiçbir termal döngüleyici bu ürünle kullanılamaz.
9. Teknolojiler arasındaki içsel farklılıklardan ötürü, bir teknolojiden diğer teknolojiye geçmeden önce kullanıcıların, teknoloji farklılıklarını değerlendirmek için kendi laboratuvarlarında yöntem korelasyon çalışmaları yapmaları önerilir.

10. PCR inhibitörlerinin varlığı, yanlış negatif ya da geçersiz sonuçlara yol açabilir.
11. Nadir de olsa, **cobas** PIK3CA Test'te kullanılan primerlerin veya problemlerin kapsadığı PIK3CA geninin genomik DNA bölgelerindeki mutasyonlar yanlış sonuçlara yol açabilir.
12. Nadir olsa da, **cobas** PIK3CA Test, ekzon 10 ve 21'de hedeflenen mutasyonların çevresindeki mutasyonlar için bazı sınırlı çapraz reaktivite ("Mutasyon Saptandı" sonuçları) gösterebilir (örneğin, yüksek mutant yüzdelerinde E545K, E545X; Q546X'in bir mutasyon sonucunu verebilir veya H1047X, H1047X; G1049R'nin bir mutasyon sonucunu verebilir).
13. **cobas** PIK3CA Test, reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng DNA ile kullanılmak üzere doğrulanmıştır. Reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng'nin altındaki DNA girdisi miktarları önerilmez.
14. **cobas** PIK3CA Test, kalitatif bir testtir. Test, mutasyon yüzdesinin kantitatif ölçümleri için değildir.
15. Bozunmuş DNA içeren BC FFPET numuneleri, testin PIK3CA mutasyonlarını saptama becerisini etkileyebilir.
16. "Mutasyon Saptanmadı" olarak raporlanan sonuçlara sahip numuneler, test tarafından saptanmayan PIK3CA mutasyonlarını içerebilir.
17. Nadir olsa da, aynı DNA zincirinde yakındaki çift mutasyonları içeren numuneler, iki mutasyondan birinin saptanmasını engelleyebilir (ör. P539R (CCT>CGT), E542K'nin saptanmasını engelleyebilir veya Y343Y (TAC>TAT), N345K'nin saptanmasını engelleyebilir).

Klinik olmayan performans değerlendirmesi

Not: Aşağıdaki çalışma açıklamaları, **cobas** PIK3CA Test ile gerçekleştirilen kümülatif verileri içerir.

Aşağıda açıklanan klinik dışı çalışmalar için, tümör yüzdesi patoloji incelemesi ile değerlendirilmiştir. Test edilecek numuneleri seçmek için çift yönlü Sanger sekanslaması ve yeni nesil sekanslama (NGS) kullanılmıştır. BC FFPET numunesinin mutasyon yüzdesi, bir NGS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Temel performans özellikleri

Analitik hassasiyet – boş sınırı (LoB)

cobas PIK3CA Test'in performansını değerlendirmek ve yabancı tip (WT) numunelerin düşük bir mutasyon konsantrasyonuna işaret edebilecek bir analitik sinyal oluşturmadığından emin olmak için BC FFPET PIK3CA WT numuneleri değerlendirilmiştir. LoB, PIK3CA WT numuneleri için CLSI kılavuzu EP17-A2¹⁸'de belirtildiği gibi parametrik olmayan seçenek kullanılarak belirlenmiştir. LoB, tüm mutasyonlar için sıfır olarak belirlenmiştir.

FFPET numune karışımlarını kullanarak Saptama Limiti

PIK3CA mutasyonlarına sahip 33 BC FFPET numunesinden izole edilen DNA, 25 PIK3CA WT BC FFPET numunesinden izole edilen DNA ile karıştırılarak bir NGS metoduyla belirlenen %10,0, %7,5, %5,0, %2,5 ve %1,0 mutasyon seviyelerini hedefleyen 42 benzersiz DNA karışımı elde edilmiştir. Her numune DNA karışımının dilüsyonları hazırlanmış ve üç **cobas** PIK3CA Test kiti lotu (n = 21/panel üyesi) kullanılarak her mutasyon seviyesinin toplam 21 tekrarı çalıştırılmıştır. Her numune için saptama limiti, Tablo 5 içinde gösterildiği şekilde hedeflenen mutasyon için en az %95'lik bir PIK3CA "Mutasyon Saptandı" oranı veren en düşük mutasyon yüzdesi ile belirlenmiştir.

Tablo 5: FFPET numune DNA karışımlarını kullanan cobas PIK3CA Test için saptama limiti

PIK3CA Ekzonu	PIK3CA Mutasyonu	PIK3CA Nükleik Asit Sekansı	COSMIC ID ¹²	Numune	Reaksiyon kuyucuğu başına 50 ng DNA girdisi ile \geq %95 "Mutasyon Saptandı" Oranı elde etmek için Panel Ögesindeki Mutasyon Yüzdesi (N = 21 kopya)
2	R88Q	263 G>A	746	Numune 1	%2,2
2	R88Q	263 G>A	746	Numune 2	%1,3
2	R88Q	263 G>A	746	Numune 3	%1,1
5	N345K	1035 T>A	754	Numune 4	%2,2
5	N345K	1035 T>A	754	Numune 5	%1,9
5	N345K	1035 T>A	754	Numune 6	%1,3
8	C420R	1258 T>C	757	Numune 7	%1,7
8	C420R	1258 T>C	757	Numune 8	%1,9
8	C420R	1258 T>C	757	Numune 9	%1,6
10	E542K	1624 G>A	760	Numune 10	%1,1
10	E542K	1624 G>A	760	Numune 11	%1,2
10	E542K	1624 G>A	760	Numune 12	%1,1
10	E545A	1634 A>C	12458	Numune 13	%2,8
10	E545A	1634 A>C	12458	Numune 14	%0,9
10	E545A	1634 A>C	12458	Numune 15	%1,6
10	E545G	1634 A>G	764	Numune 16	%1,8
10	E545G	1634 A>G	764	Numune 17	%1,2
10	E545G	1634 A>G	764	Numune 18	%1,6
10	E545K	1633 G>A	763	Numune 19	%3,3
10	E545K	1633 G>A	763	Numune 20	%1,5
10	E545K	1633 G>A	763	Numune 21	%1,8
10	Q546E	1636 C>G	6147	Numune 22	%3,5
10	Q546E	1636 C>G	6147	Numune 23	%1,6
10	Q546E	1636 C>G	6147	Numune 24	%2,5
10	Q546K	1636 C>A	766	Numune 25	%3,4
10	Q546K	1636 C>A	766	Numune 26	%2,3
10	Q546K	1636 C>A	766	Numune 27	%2,7
10	Q546R	1637 A>G	12459	Numune 28	%1,5
10	Q546R	1637 A>G	12459	Numune 29	%3,2
10	Q546R	1637 A>G	12459	Numune 30	%1,3
21	H1047L	3140 A>T	776	Numune 31	%2,8
21	H1047L	3140 A>T	776	Numune 32	%1,8
21	H1047L	3140 A>T	776	Numune 33	%3,3
21	H1047R	3140 A>G	775	Numune 34	%2,8
21	H1047R	3140 A>G	775	Numune 35	%1,5
21	H1047R	3140 A>G	775	Numune 36	%1,0
21	H1047Y	3139 C>T	774	Numune 37	%3,5
21	H1047Y	3139 C>T	774	Numune 38	%2,2
21	H1047Y	3139 C>T	774	Numune 39	%3,4
21	G1049R	3145 G>C	12597	Numune 40	%1,0
21	G1049R	3145 G>C	12597	Numune 41	%0,7
21	G1049R	3145 G>C	12597	Numune 42	%1,0

cobas PIK3CA Test, 50 ng/PCR DNA girdisi ile %0,7 ile %3,5 arasında değişen mutasyon yüzdesi seviyesi ile PIK3CA genindeki hedeflenen mutasyonları saptayabilmiştir.

Plazmidler kullanılarak nadir genotiplerin saptanması

Tablo 6 içinde listelenen üç PIK3CA mutasyonu için, düşük yüzdeli mutant DNA numuneleri hazırlamak amacıyla bir DNA plazmid yapısı WT DNA ile karıştırılmıştır. Her plazmid karışımı için toplam en az 20 tekrar, en az bir **cobas** PIK3CA Test kiti lotu kullanılarak 50 ng'lik bir DNA girdisi ile test edilmiştir. Her plazmid karışımı için binom %95 üst güven limiti, Tablo 6 içinde gösterilmiştir.

Tablo 6: Mutant plazmid DNA karışımları kullanılarak cobas PIK3CA Test ile saptanan mutasyonlar

PIK3CA Ekzonu	PIK3CA Mutasyonu	PIK3CA Nükleik Asit Sekansı	COSMIC ID ¹²	Gerçek Mutasyon Yüzdesi	Binom %95 alt güven limiti (N ≥ 20)	Binom %95 üst güven limiti (N ≥ 20)
10	E545D	1635 G>T	765	%1,2	%62	%97
10	Q546L	1637 A>T	25041	%2,1	%83	%100
21	M1043I	3129 G>T	773	%2,6	%83	%100

Tekrarlanabilirlik

cobas PIK3CA Test'in tekrarlanabilirliği, her biri bir E542K, N345K, E545K, C420R, G1049R, Q546K, R88Q veya H1047R mutasyonuna sahip iki WT numunesi ve sekiz mutant numune dahil olmak üzere on FFPET numunesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu numuneler, sekiz gün boyunca iki farklı reaktif lotu ve iki **cobas z 480** analizörü kullanılarak iki operatör tarafından iki kopya halinde test edilmiştir. Her numunenin toplam 32 tekrarı değerlendirilmiştir. **cobas** PIK3CA Test, %99,7 (319/320) doğru karar oranına sahiptir.

Referans yöntem ile korelasyon

cobas PIK3CA Test ve Sanger sekanslamasının (Sanger) iki lotunun her biri kullanılarak yapılan 206 BC FFPET numunesi karşılaştırma testi, yöntemler arasındaki pozitif, negatif ve genel yüzde uyumunu belirlemek için gerçekleştirilmiştir. **cobas** PIK3CA Test ile Sanger arasındaki uyumsuz sonuçlar, uyumsuzluğu gidermek için NGS kullanılarak test edilmiştir.

cobas PIK3CA Test ve Sanger sonuçları

Sanger ve **cobas** PIK3CA Test için 205 geçerli sonucun karşılaştırması Tablo 7 içinde gösterilmiştir.

Tablo 7: cobas PIK3CA Test ile Sanger karşılaştırmasının uyum analizi

	Sanger, MD	Sanger, NMD	Toplam
cobas PIK3CA Test, MD	95*	7	102
cobas PIK3CA Test, NMD	0	103	103
cobas PIK3CA Test, Geçersiz	0	1	1
Toplam	95	111	206

Pozitif uyumu = %100 (%95 GA = %96,1–100)

Negatif uyumu = %93,6 (%95 GA = %87,4–96,9)

Genel uyumu = %96,6 (%95 GA = %93,1–98,3)

MD: Mutasyon Saptandı

NMD: Mutasyon Saptanmadı

* Lot 1 için beş numune ve Lot 2 için üç numune hem Sanger sekanslaması hem de **cobas** PIK3CA Test ile MD olarak sonuçlanmış ancak Sanger sekanslaması birinci mutasyonu saptarken ikinci mutasyonu kaçırmıştır (bkz. Tablo 9).

cobas PIK3CA Test ile Sanger arasındaki karşılaştırma, her numune için dokuz hedefi değerlendirmiştir. 205 geçerli numunenin sonuçlarına göre toplam 1845 karar verilmiştir. Tablo 8 **cobas** PIK3CA Test ile Sanger'ın Lot 1 için karar bazında karşılaştırmasını gösterir.

Tablo 8: Lot 1 için cobas® PIK3CA Test ile Sanger'ın karar başına karşılaştırması

	Sanger, R88Q	Sanger, N345K	Sanger, C420R	Sanger, E542K	Sanger, E545X	Sanger, Q546X	Sanger, M1043I	Sanger, H1047X	Sanger, G1049R	Sanger, NMD	Toplam
cobas PIK3CA Test, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
cobas PIK3CA Test, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
cobas PIK3CA Test, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
cobas PIK3CA Test, E542K	-	-	-	14	-	-	-	-	-	2	16
cobas PIK3CA Test, E545X	-	-	-	-	17	-	-	-	-	2	19
cobas PIK3CA Test, Q546X	-	-	-	-	-	8	-	-	-	1*	9
cobas PIK3CA Test, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
cobas PIK3CA Test, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	42	-	7*	49
cobas PIK3CA Test, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
cobas PIK3CA Test, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1738	1738
cobas PIK3CA Test, Geçersiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
Toplam	1	7	3	14	17	8	0	42	3	1759	1854

* Lot 2 sonuçları, Lot 2 için toplam iki adet daha az uyumsuz sonuç olması dışında Lot 1 ile benzer olmuştur. Tablo 9 içindeki Numune 8 ve Numune 9'a bakın.

NGS ile uyumsuzluk analizi

Yedi numune mutasyon sonucu Sanger sekanslaması ve **cobas** PIK3CA Test arasında uyumsuz olmuştur. Bir mutasyon için beş numune daha uyumlu olmuş ancak **cobas** PIK3CA Test her biri için fazladan bir mutasyon saptamıştır. Bu on iki numune NGS tarafından analiz edilmiş ve Tablo 9 içinde gösterilmiştir. NGS sonuçlarına göre revize edilmiş bir uyum analizi yapılmıştır. Bu analizde, **cobas** PIK3CA Test sonucuyla uyumlu olan NGS sonuçlarına sahip numuneler uyumlu kabul edilmiştir.

Tablo 9: NGS'ye göre uyumsuz sonuç çözümlenmesi

Numune	Sanger	cobas PIK3CA Test, Lot 1	NGS Çözümleme, Lot 1**	cobas PIK3CA Test, Lot 2	NGS Çözümleme, Lot 2**
Numune 1	NMD	H1047X	H1047R (%3,4 mutasyon)	H1047X	H1047R (%2,5 mutasyon)
Numune 2	NMD	E542K	E542K (%4,8 mutasyon)	E542K	E542K (%3,4 mutasyon)
Numune 3	NMD	H1047X	H1047R (%2,0 mutasyon)	H1047X	H1047R (%2,8 mutasyon)
Numune 4	NMD	E542K	E542K (%10,1 mutasyon)	E542K	E542K (%8,3 mutasyon)
Numune 5	NMD	E545X	E545K (%4,3 mutasyon)	E545X	E545K (%2,2 mutasyon)
Numune 6	NMD	H1047X	H1047R (%5,1 mutasyon); H1047Y (%1,1 mutasyon)	H1047X	H1047R (%4,1 mutasyon)
Numune 7	NMD	E545X	E545K (%17,2 mutasyon)	E545X	E545K (%25,6 mutasyon)
Numune 8*	H1047L	H1047X; Q546X	Q546K (%2,2 mutasyon)	H1047X	Yok
Numune 9*	Q546R	H1047X; Q546X	H1047R (%0,6 mutasyon); H1047Y (%0,4 mutasyon)	Q546X	Yok
Numune 10	C420R	H1047X; C420R	H1047R (%0,9 mutasyon)	H1047X; C420R	H1047R (%1,1 mutasyon)
Numune 11	E545K	H1047X; E545X	H1047R (%1,7 mutasyon)	H1047X; E545X	H1047R (%1,8 mutasyon)
Numune 12	Q546E	H1047X; Q546X	H1047R (%6,7 mutasyon)	H1047X; Q546X	H1047R (%5,4 mutasyon)

* Numune 8 ve 9, Lot 1 ve Lot 2 arasında uyumsuz sonuçlara sahip olmuştur. Lot 2 sonuçları Sanger ile uyumlu olmuş, bu nedenle çözümlenme testi gerekli olmamıştır.

** Çözümleme için NGS, yalnızca uyumsuz sonucu olan ekzonlar için gerçekleştirilmiştir.

Not: Numune 8–12 için **cobas PIK3CA Test sonuçları, Sanger ile aynı PIK3CA mutasyonlarını saptamış ancak ek mutasyonlar NGS tarafından saptanmış ve doğrulanmıştır.**

cobas PIK3CA Test ve Sanger arasındaki uyumsuz sonuçlar NGS tarafından çözümlendikten sonra, Tablo 10 içinde gösterildiği gibi, cobas PIK3CA Testinin sekanslama ile genel uyumu, her lot için hedeflenen tüm mutasyonlarda %100 olmuştur.

Tablo 10: NGS (Sanger+NGS) tarafından uyumsuzluk çözümlenmesiyle cobas PIK3CA Test ile Sanger karşılaştırmasının uyum analizi

	Sanger+NGS, MD	Sanger+NGS, NMD	Toplam
cobas PIK3CA Test, MD	102	0	102
cobas PIK3CA Test, NMD	0	103	103
cobas PIK3CA Test, Geçersiz	0	1	1
Toplam	102	104	206

Pozitif uyumu = %100 (%95 GA = %96,4–100)

Negatif uyumu = %100 (%95 GA = %96,4–100)

Genel uyumu = %100 (%95 GA = %98,2–100)

Tablo 11 Lot 1 için karar bazında NGS tarafından uyumsuzluk çözümlenmesiyle birlikte cobas PIK3CA Test ve Sanger karşılaştırmasını gösterir.

Tablo 11: NGS (Sanger+NGS) tarafından uyumsuzluk çözümlenmesiyle birlikte karar başına cobas PIK3CA Test ile Sanger karşılaştırması

	Sanger+ NGS, R88Q	Sanger+ NGS, N345K	Sanger+ NGS, C420R	Sanger+ NGS, E542K	Sanger+ NGS, E545X	Sanger+ NGS, Q546X	Sanger+ NGS, M1043I	Sanger+ NGS, H1047X	Sanger+ NGS, G1049R	Sanger+ NGS, NMD	Toplam
cobas PIK3CA Test, R88Q	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
cobas PIK3CA Test, N345K	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	7
cobas PIK3CA Test, C420R	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	3
cobas PIK3CA Test, E542K	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	16
cobas PIK3CA Test, E545X	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	19
cobas PIK3CA Test, Q546X	-	-	-	-	-	9*	-	-	-	-	9
cobas PIK3CA Test, M1043I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
cobas PIK3CA Test, H1047X	-	-	-	-	-	-	-	49*	-	-	49
cobas PIK3CA Test, G1049R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
cobas PIK3CA Test, NMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1738*	1738
cobas PIK3CA Test, Geçersiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9
Toplam	1	7	3	16	19	9	0	49	3	1747	1854

* Lot 2 sonuçları Lot 1 ile benzer olmuştur ancak cobas PIK3CA Test ve Sanger + NGS tarafından saptanan toplam iki adet daha az mutasyon vardır. Tablo 9 içindeki Numune 8 ve Numune 9'a bakın. Lot 2 sonuçlarında fazladan iki NMD ve buna bağlı olarak bir adet daha az Q546X mutasyonu ve bir adet daha az H1047X mutasyonu olmuştur.

Çapraz reaktivite

Aşağıdaki hedeflenmeyen mutasyonlar, genomik DNA girdisi seviyesinde yaklaşık %50'lik bir plazmidde çapraz reaktivite için plazmidler kullanılarak test edilmiştir: M1043I, M1043V, M1043T, G1049S, G1049A, E542V, E542Q, E545D, E545V, E545Q, Q546P, Q546H ve PIK3CA psödogeni. Bu hedeflenmeyen mutasyonlar, WT ve mutant PIK3CA sekansları içeren numunelere eklendiğinde **cobas** PIK3CA Test ile çapraz reaksiyona girmemiştir (veya etkileşimde bulunmamıştır).

Potansiyel etkileşimde bulunan maddelerin değerlendirilmesi

Endojen

Trigliseritler (≤ 37 mM, CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon¹⁹) ve hemoglobinin (≤ 2 mg/mL, CLSI tarafından önerilen yüksek konsantrasyon¹⁹), numune hazırlama prosedürü sırasında numunelere madde eklendiğinde **cobas** PIK3CA Test ile etkileşime girmediği gösterilmiştir. Ek olarak, %90'a kadar yağ dokusu içeren numunelerin **cobas** PIK3CA Test ile etkileşime girmediği gösterilmiştir.

Ekzojen

Aşağıdaki ilaçlar, interferans açısından test edilmiştir: letrozol (107,25 ng/mL), anastrozol (91,20 ng/mL), kapesitabin (11,97 ng/mL), tamoksifen (111,0 ng/mL), eksemestan (66,9 ng/mL), everolimus (47,1 ng/mL), paklitaksel (10.950,0 ng/mL), dosetaksel (16,50 µg/mL), siklofosamid (603 µg/mL), doksorubisin (1998,4 ng/mL) ve fulvestrant (84 ng/mL).

Bu ilaçların, numune hazırlama prosedürü sırasında numunelere ilaç eklendiğinde **cobas** PIK3CA Test ile etkileşime girmediği görülmüştür.

Nekrotik doku

PIK3CA mutanları için %55'e kadar ve WT numunelerde %70'e kadar nekrotik doku içeriğine sahip BC FFPET numunelerinin, **cobas** PIK3CA Test kullanılarak sonuçları etkilemediği gösterilmiştir.

Klinik performans değerlendirmesi

Klinik tekrar üretilebilirlik çalışması

cobas PIK3CA Test'in tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için 3 test merkezinde, 1 dahili ve 2 harici (merkez başına 2 operatör), 3 reaktif lotu ve 5 ardışık olmayan test gününde ticari doku depolarından elde edilen meme kanseri Yabancıl tip (WT) ve Mutant tip (MT) tümör numunelerinin FFPET kesitlerinden ekstrakte edilen DNA numunelerinden oluşan 21 ögeli bir panel ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu panel, DNA sekanslaması ile teyit edilen 2, 5, 8, 10 ve 21 ekzonlarındaki mutasyonları içermiştir. Geçerli olan 90 çalışmada 21 panel ögesi üzerinde toplam 3780 test gerçekleştirilmiştir ve tüm test sonuçları geçerlidir. WT panel üyelerinin 180 geçerli testinde %100 uyum sağlayan "Mutasyon Saptanmadı" sonuçları elde edilmiştir. 20 MT panel ögesinin 19'u için %100 uyum sağlanmıştır. Panel üyesi Ekzon 10 E545 – LoD için, uyum %99,4 olmuştur (180 test sonucundan 179'unda Mutasyon Saptanmıştır). Genel uyuma göre sonuçlar Tablo 12 içinde gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı (CV), tüm mutasyon panel ögelerinde < %2'dir. İnternal kontroller için CV, < %1,9 olmuştur. CV, lotlar arası < %0,4 ve lot içi < %1,9'dir.

Tablo 12: Tekrar üretilebilirlik çalışmasında panel ögesine göre genel uyum tahminleri

Panel Ögesi	Geçerli Test Sayısı	Uyum N	Uyum % (%95 GA) ^a
Yabancıl tip	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 5 N345K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 10 E542K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 10 E545K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 21 H1047L – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 21 G1049R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 5 N345K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 10 E542K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 10 E545K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 21 H1047L – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 21 G1049R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 2 R88Q – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 8 C420R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 10 E545A – LoD	180	179	99,4 (96,9, 100,0)
Ekzon 10 Q546K – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 21 H1047R – LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 2 R88Q – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 8 C420R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 10 E545A – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 10 Q546K – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)
Ekzon 21 H1047R – 2 × LoD	180	180	100 (98,0, 100,0)

Not: Geçerli bir Mutant panel ögesi testinin sonucu "Mutasyon Saptandı" şeklindeyse veya geçerli bir Yabancıl Tip panel ögesi testinin sonucu "Mutasyon Saptanmadı" ise sonuçlar uyumlu olarak dahil edilir.

^a %95 GA = %95 kesin güven aralığı.

Özetle, formalinle sabitlenmiş parafine gömülü insan meme kanseri dokusundan elde edilen DNA'daki PIK3CA geninin 2., 5., 8., 10. ve 21. ekzonlarındaki mutasyonların tayini için cobas PIK3CA Test'in tekrar üretilebilirliği mükemmel olarak değerlendirilmiş ve uyum bu çalışmada değerlendirilen tüm mutasyonlar için > %99 olmuştur.

Sonuç işaretleri

Sonuç işaretlerinin açıklaması

Bir işaretin kaynağı, Tablo 13 içinde belirtildiği şekilde işaret kodunda gösterilir.

Tablo 13: İşaret kaynağı

İşaret kodu başlangıcı	İşaret kaynağı	Örnek
M*	Birden çok veya diğer nedenler	M6
R	Sonucun yorumlanması	R500
Z*	Analizör	Z1

* cobas® 4800 Sistemi – Yardım Asistanı'na bakın.

Sistemde bulunan kullanıcıya yönelik tüm sonuç işaretleri Tablo 14 içinde listelenmiştir.

Tablo 14: Sonuç yorumlama işaretlerinin listesi

İşaret kodu	Açıklama	Önerilen işlem
R500–R511	Mutant kontrolü saptanamadı	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, dirsek tayini algoritmasının bir hatayla karşılaştığını gösterir. Bu, atipik veya gürültülü bir floresan modeli durumunda ortaya çıkabilir.
R512–R523	Mutant kontrolü saptanamadı	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, Mutant Kontrolü için negatif bir sonucun oluştuğunu belirtir (Mutant Kontrolü DNA'sı bir veya daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir).
R524–R535	Mutant kontrolü aralık dışındadır	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları Mutant Kontrolü için gözlemlenen bir dirsek değerinin, belirlenen eşiğin altında olduğunu gösterir (yani dirsek çok düşük). Bu hata, DNA kontaminasyonu durumunda oluşabilir.
R536–R547	Mutant kontrolü aralık dışındadır	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları Mutant Kontrolü için gözlemlenen bir dirsek değerinin, belirlenen eşiğin üzerinde olduğunu gösterir (yani dirsek çok yüksektir). Bu, aşağıdaki durumlarda meydana gelebilir: 1. Çalışma Master Mix'inin yanlış hazırlanması, 2. Çalışma Master Mix'ini AD plakasının bir reaksiyon kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası veya 3. Mutant Kontrolü AD plakasının bir reaksiyon kuyucuğuna eklerken pipetleme hatası.
R548–R559	Negatif kontrol saptanamadı	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, dirsek tayini algoritmasının bir hatayla karşılaştığını gösterir. Bu, atipik veya gürültülü bir floresan modeli durumunda ortaya çıkabilir.
R560–R571	Negatif kontrol aralık dışındadır	Çalışmayı tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, Negatif Kontrol için pozitif bir sonuç oluştuğunu gösterir (yani bir kontaminasyon gerçekleşmiştir).
R572–R583	Hedef saptanamadı	Numuneyi tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, dirsek tayini algoritmasının bir hatayla karşılaştığını gösterir. Bu, atipik veya gürültülü bir floresan modeli durumunda ortaya çıkabilir.

İşaret kodu	Açıklama	Önerilen işlem
R584–R586, R588–R590, R592–R594, R596–R604	Sonuç, aralık dışındadır	Numuneyi tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları aşağıdakilerden birini gösterir: 1. Numune için atipik olan düşük bir dirsek değeri gözlenmiştir veya 2. Numune için Mutant dirsek değeri ile İnternal Kontrol dirsek değeri arasında atipik bir ilişki gözlenmiştir.
R587, R591, R595	İnternal kontrol aralık dışındadır	Numuneyi tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, numunede atipik düşük bir İnternal Kontrol dirsek değerinin gözlemlendiğini gösterir. Bu, PCR karışımının konsantre genomik DNA ile önemli ölçüde aşırı yüklenmesi durumunda ortaya çıkabilir.
R605–R610	İnternal kontrol saptanamadı	Numuneyi tekrarlayın. Test prosedürü bölümüne bakın. Bu işaret kodları, numune için İnternal Kontrol sonucunun geçerli olmadığını gösterir. Geçerli bir İnternal Kontrol sonucunun olmaması aşağıdakilerin belirtisidir: 1. Numuneden alınan genomik DNA'nın kalitesi düşüktür. 2. İşleme alınan numune miktarı yetersizdir. 3. Numune içinde PCR inhibitörleri vardır. 4. Genomik DNA bölgelerinin içindeki nadir mutasyonlar İnternal Kontrol primerleriyle ve/veya problemlerle kapatılmıştır. 5. Numune DNA bir ya da daha fazla kuyucuğa eklenmemiş olabilir veya 6. Diğer faktörler.

Ek bilgiler

Temel test özellikleri

Numune tipi	Formalinle Sabitlenmiş Parafine Gömülü Doku (FFPET)
Gereken minimum numune miktarı	5 µm FFPET kesiti
Analitik hassasiyet	50 ng DNA'da %5 mutant sekansı
Analitik özgüllük	Sekanslama ile %100 uyum R88Q N345K C420R E542K
Saptanan genotipler	E545X (E545A, E545D*, E545G veya E545K) Q546X (Q546E, Q546K, Q546L veya Q546R) M1043I** H1047X (H1047L, H1047R veya H1047Y) G1049R


























* E545D amino asit değişikliği için, test tarafından yalnızca nükleotid değişikliği c.1635G>T mutasyonu saptanır.

** M1043I amino asit değişikliği için, test tarafından yalnızca nükleotid değişikliği c.3129G>T mutasyonu saptanır.

Semboller

Aşağıdaki semboller Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılır.

Tablo 15: Roche PCR diagnostik ürünlerinin etiketlenmesinde kullanılan semboller

Age/DOB Yaş veya doğum tarihi	 Hasta yanında test için uygun olmayan cihaz	QS IU/PCR PCR reaksiyonu başına QS IU, sonuçların hesaplanmasında PCR reaksiyonu başına QS ulusal birimlerini (IU) kullanın.
 Yardımcı yazılım	 Kendi kendine test için uygun olmayan cihaz	SN Seri numarası
Assigned Range [copies/mL] Atanan aralık (kopya/mL)	 Distribütör (Not: Sembolün altında geçerli ülke/bölge belirtilmiş olabilir)	Site Tesis
Assigned Range [IU/mL] Atanan aralık (IU/mL)	 Tekrar kullanmayın	Procedure Standard Standart prosedür
EC REP Avrupa Topluluğundaki yetkili temsilci	 Kadın	STERILE EO Etilen oksit ile sterilize edilmiştir
BARCODE Barkod Veri Sayfası	 Sadece IVD performans değerlendirmesi için	 Karanlık ortamda muhafaza edin
LOT Seri kodu	GTIN Küresel ticaret ürün numarası	 Sıcaklık sınırı
 Biyolojik riskler	 İthalatçı	 Test tanım dosyası
REF Katalog numarası	IVD <i>In vitro</i> tıbbi tanı cihazı	 Burası yukarı gelecek
CE CE uygunluk işareti; bu cihaz, <i>in vitro</i> tıbbi tanı cihazı için geçerli CE işareti gerekliliklerine uygundur	LLR Belirlenen aralığın alt limiti	Procedure UltraSensitive Ultra hassas prosedür
Collect Date Numune alma tarihi	 Erkek	UDI Benzersiz cihaz tanımlayıcı
 Kullanım talimatlarına bakın	 Üretici	ULR Belirlenen aralığın üst limiti
 <n> test için yeterli miktarda içerir	CONTROL - Negatif kontrol	Urine Fill Line İdrar dolum çizgisi
CONTENT Kit içeriği	 Steril değil	Rx Only Yalnızca ABD: Federal yasalar, bu cihazın yalnızca bir hekim tarafından veya hekimin siparişiyle satışına izin verir.
CONTROL Kontrol	 Hasta adı	 Son kullanma tarihi
 Üretim tarihi	 Hasta numarası	
 Hasta yanında test için uygun cihaz	 Buradan soyarak açın	
 Kendi kendine test için uygun cihaz	CONTROL + Pozitif kontrol	
	QS copies / PCR PCR reaksiyonu başına QS kopya, sonuçların hesaplanmasında PCR reaksiyonu başına QS kopyalarını kullanın.	

Teknik destek

Teknik destek için lütfen yerel bağlı şirket ile iletişime geçin:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Üretici

Tablo 16: Üretici



Amerika Birleşik Devletleri'nde
üretimiştir

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

ABD'de imal edilir

Ticari markalar ve patentler

Bkz. <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Telif hakkı

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Referanslar

1. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:1075-83. PMID: 20085938.
2. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:615-75. PMID: 11687500.
3. Workman P, Clarke P. P13 Kinase in Cancer: From Biology to Clinic. ASCO 2012 Educational Book. Available at: https://ascopubs.org/doi/pdf/10.14694/EdBook_AM.2012.32.89. Accessed September 3, 2020.
4. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell.* 2005;7:561-73. PMID: 15950905.
5. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:489-501. PMID: 12094235.
6. van der Heijden MS, Bernards R. Inhibition of the PI3K pathway: hope we can believe in? *Clin Cancer Res.* 2010;16:3094-9. PMID: 20400520.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90. PMID: 21296855.
8. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 2004;304:554. PMID: 15016963.
9. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68:6084-91. PMID: 18676830.
10. Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA oncology.* 2019;5:1749-68. PMID: 31560378.
11. Mackay J, Jemal A, Lee NC, Parkin DM. The Cancer Atlas. Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2006.
12. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer.* 2004;91:355-8. PMID: 15188009.
13. LRG. LRG_310 – Gene: PIK3CA. Available at: http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/LRG_310.xml. Accessed September 3, 2020.
14. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
15. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
17. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 61st Edition. 2020.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Wayne, Pennsylvania: Clinical Laboratory Standards Institute; 2012.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline–Second Edition. CLSI Document EP7-A2E Appendix D. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.

Belge revizyonu

Belge revizyonu bilgileri	
Doc Rev. 2.0 08/2023	<p>IVDR gerekliliklerini içerecek şekilde güncellenmiştir.</p> <p>Tablo 1'de yer alan protein ve nükleotid terimlerindeki 3 yazım yanlışı düzeltilmiştir.</p> <p>Reaktif saklama ve kullanma koşulları bölümüne sızıntıyla ilgili ifade eklenmiştir.</p> <p>Uyarılar ve önlemler bölümüne aşağıdaki prosedürler ve ciddi olaylarla ilgili ifadeler eklenmiştir.</p> <p>Ekzojen bölümüne konsantrasyon bilgileri dahil edilmiştir.</p> <p>Üçüncü taraf referansını çıkarmak için Diğer gerekli materyaller bölümü güncellenmiştir.</p> <p>Uyumlaştırılmış sembol sayfası güncellenmiştir.</p> <p>Güncel ekonomik operatörlere göre güncellenmiştir.</p> <p>Ticari marka ve patentler bölümü güncellenmiştir.</p> <p>Herhangi bir sorunuz varsa lütfen Roche Temsilciniz ile iletişime geçin.</p>

Güvenlilik ve performans raporunun özetine aşağıdaki bağlantıyı kullanarak ulaşabilirsiniz:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>