

Lokakuu 2019

therascreen[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan käsikirja



Versio 1



In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -laitteiden kanssa



870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA



1119189FI

Sisältö

Käyttötarkoitus	4
Yhteenveto ja selitykset	5
Menetelmän toimintaperiaate	6
Sarjan rakenne.....	6
Määrittelyt.....	7
Kontrollit	8
Toimitetut materiaalit	9
Sarjan sisältö.....	9
Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)	10
Varoitukset ja varotoimet	11
Turvallisuustiedot	11
Yleiset varotoimet	11
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	13
Näytteiden säilytys ja käsittely	15
Menetelmä	16
Protokolla: EGFR-mutaatioiden havaitseminen	17
Protokolla: Rotor-Gene Q EGFR:n valmisteleminen	21
Mutaation arviointitietojen analyysi	29
Vianmääritys.....	37
Laadunvalvonta.....	38
Rajoitukset.....	38
Suorituskykyominaisuudet.....	40

Analyttinen herkkyys – LOB-raja	40
Havaitsemisraja (Limit of Detection, LOD)	40
Analyttinen herkkyys – ΔC_T -rajat	42
Toistettavuus ja uusittavuus	42
Lähtö-DNA:n vaikutus C_T -arvoihin	42
Häiritsevät aineet	43
Kliininen suorituskyky	47
Lähdeviitteet	48
Yhteystiedot	48
Symbolit	49
Liite A: Mutaatiotiedot	50
Tilaustiedot	51
Asiakirjan muutoshistoria	53

Käyttötarkoitus

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja on in vitro -diagnostinen testi eksonin 19 deleetioiden sekä eksonin 20 ja 21 substituutioiden (T790M ja L858R) havaitsemiseen epidermisen kasvutekijäreseptorigeenissä (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Testi antaa kvalitatiivisen arvion mutaation tilasta. Tulosten on tarkoitus auttaa tunnistamaan potilaat, joilla on ei-pienisolainen keuhkosityöpä (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) ja jotka voivat hyötyä IRESSA[®]-hoidosta (gefitinibi), kun kudospäätettä ei voida arvioida.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja on tarkoitettu koulutetun henkilöstön käytettäväksi ammattimaisessa laboratorioympäristössä DNA-näytteisiin, jotka on eristetty ei-pienisoluista keuhkosityöpää sairastavan potilaan veren plasmasta.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja on tarkoitettu in vitro -diagnostiseen käyttöön.

Yhteenveto ja selitykset

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja on käyttövalmis sarja syöpään liittyvän EGFR-geenin mutaation tunnistamiseen polymeerasiketjureaktiomenetelmän (polymerase chain reaction, PCR) avulla Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitetta käyttämällä.

Scorpions®- ja ARMS-tekniikoiden avulla *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja mahdollistaa seuraavien EGFR-geenin mutaatioiden tunnistamisen villityypin genomisesta DNA:sta.

- Deleetiot eksonissa 19
- T790M
- L858R

Käytetyt menetelmät ovat erittäin selektiivisiä ja – DNA:n kokonaismäärän mukaan – mahdollistavat pienen mutaatioprosentin havaitsemisen villityypin genomisessa DNA:ssa. Annetut selektiivisyys- ja havaitsemisrajat ovat tehokkaampia kuin väriaineeseen perustuva sekvensointi.

Menetelmän toimintaperiaate

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja tunnistaa mutaatioita kahden tekniikan – ARMS ja Scorpions – avulla realtime PCR:llä (Polymerase Chain Reaction, PCR).

ARMS

Alleeli- tai mutaatiokohtainen monistus saadaan aikaan ARMS-tekniikan (amplifikaation refraktaarinen mutaatiojärjestelmä) avulla. *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) erottaa tehokkaasti vastaavuudet ja poikkeamat PCR-alkukkeen 3'-päässä. Spesifiset mutaation läpikäyneet sekvenssit monistuvat tasaisesti näytteissä, joissa suurimmassa osassa sekvenssejä mutaatiota ei ole. Kun alkukkeen vastaavuus on täydellinen, monistus jatkuu täydellä teholla. Kun 3'-pään emäs ei ole vastaava, tapahtuu vain matalan tason taustan monistusta.

Scorpions

Monistuksen tunnistamisessa käytetään Scorpions-tekniikkaa. Scorpionit ovat bifunktionaalisia molekyyliä, jotka sisältävät PCR-alkuketta, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt koettimeen. Koettimen fluorofori liittyy koettimessa olevaan sammuttajaan, joka vähentää fluoresenssia. Kun koetin PCR:n aikana sitoutuu amplikoniin, fluorofori ja sammuttaja irtoavat toisistaan. Tämä johtaa fluoresenssin lisääntymiseen reaktioputkesta.

Sarjan rakenne

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjaan sisältyy neljä määrittystä:

- yksi kontrollimäärittys (Ctrl)
- kolme mutaatiomäärittystä.

Kaikki reaktioseokset sisältävät reagensseja, jotka tunnistavat FAM™kohteen ja sisäisen HEX™kontrollin. Sisäinen kontrollimääritys voi tunnistaa inhibiittoreita, mikä voi johtaa vääriin negatiivisiin tuloksiin. FAM-monistus voi ylikilpailla kontrollimonistuksen kanssa ja sisäisen kontrollin tarkoitus on vain osoittaa, että jos FAM-monistusta ei ole, tulos on todellinen negatiivinen tulos eikä syynä ole epäonnistunut PCR-reaktio.

Määritykset

Kontrollimääritys

Kontrollimäärityksellä, joka on leimattu FAM:lla, arvioidaan näytteen DNA-kokonaismäärä. Kontrollimääritys monistaa EGFR-geenin eksonin 2 alueen. Aluke ja koetin on suunniteltu välttämään tunnettuja EGFR-polymorfismeja.

Mutaatiomääritykset

Jokaisessa mutaatiomäärityksessä on FAM-merkitty Scorpion-koetin ja ARMS-alue, joilla erotetaan villityypin DNA ja erityinen DNA:n mutaatio.

Kontrollit

Kaikissa testierissä on oltava mukana seuraavat kontrollit:

Positiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana positiivinen kontrolli putkissa 1-4. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja sisältää EGFR-positiivisen kontrollin (Positive Control, PC), jota käytetään mallina positiivisessa kontrollireaktiossa. Positiiviset kontrollitulokset arvioidaan, jotta voidaan varmistaa, että sarja toimii mainittujen hyväksyntäkriteerien vaatimusten mukaisesti.

Negatiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana negatiivinen kontrolli (malliton kontrolli, NTC) putkissa 9–12. NTC sisältää nukleasitonta vettä (H₂O) käytettäväksi ”mallina” mallittomassa kontrollissa. Mallitonta kontrollia käytetään arvioimaan mahdollinen kontaminaatio erän valmistelun aikana ja arvioimaan sisäisen kontrollin reaktion toimintaa.

Sisäisen kontrollireaktion arviointi

Jokainen reaktioseos sisältää kohdereaktion lisäksi sisäisen kontrollin. Epäonnistuminen osoittaa, että läsnä saattaa olla inhibiittoreita, jotka voivat johtaa virheelliseen positiiviseen tulokseen. Kyseessä voi myös olla testin suorittajan virheellinen putken käsittely erän valmistelun aikana.

Jos sisäisen kontrollin virhe johtuu PCR-inhibitiosta, näytteen laimentaminen saattaa vähentää inhibiittorien vaikutusta. Tässä tapauksessa on kuitenkin huomattava, että tällöin myös kohde-DNA laimenee. FAM-monistus voi ylikilpailla sisäisen kontrollin monistuksen kanssa niin, että saatu IC_{C_T} (HEX) -arvo voi olla määritetyn vaihteluvälin ulkopuolella. Näiden näytteiden FAM-tulokset ovat silti hyväksyttävviä.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Tuotenumero			870311
Reaktioiden määrä			24
Punainen	Control Reaction Mix (Kontrollireaktioseos)	Ctrl	2 x 600 µl
Violetti	T790M Reaction Mix (T790M-reaktioseos)	T790M	600 µl
Oranssi	Deletions Reaction Mix (Deleetioiden reaktioseos)	Del	600 µl
Vaaleanpunainen	L858R Reaction Mix (L858R-reaktioseos)	L858R	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-positiivinen kontrolli)	PC	300 µl
Mintunvihreä	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeraasi)	Taq	2 x 80 µl
Valkoinen	Nuclease-Free Water for No Template Control (Nukleasiton vesi mallittomaan kontrolliin)	NTC	1 x 1,9 ml
Valkoinen	Nuclease-Free Water for Dilution (Nukleasiton vesi laimennukseen)	Dil	1 x 1,9 ml

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työkenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvallisuustiedotteissa (Safety Data Sheets, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

- DNA:n eristämissarja (katso Menetelmä, sivu 16)
- tarkoitukseen sopivia pipettejä* (säädettäviä) näytteen valmisteluun
- tarkoitukseen sopivia pipettejä* (säädettäviä) PCR-pääseoksen valmisteluun
- tarkoitukseen sopivia pipettejä* (säädettäviä) malli-DNA:n annosteluun
- DNA:ttomia, RNA:ttomia ja DNA:ttomia, suodattimellisia pipetin kärkiä (ristikontaminaation välttämiseksi suosittelemme käyttämään pipetin kärkiä, joissa on aerosoliesteet)
- vesihaude tai samantapainen laite, johon mahtuu 50 ml:n sentrifugiputkia lämpötilassa 60 °C.
- lämmitin tai samantapainen laite, joka voi inkuboida lämpötilassa 56 °C[†]
- jäämurskaa
- roottorillinen pöytämallinen sentrifugi* 2 ml:n reaktioputkille
- vortex-sekoittaja
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite* †, , jossa on Cycling Green- ja Cycling Yellow -fluoresenssikanava (FAM:n ja HEX:n tunnistamiseen)
- Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, käytettäväksi tuotteen 72-well rotor kanssa (tuotenro 981103 tai 981106)
- DNA:ttomat, RNA:ttomat ja DNA:ttomat mikrosentrifugiputket pääseosten valmistusta varten
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, alumiinilohko manuaaliseen reaktion valmisteluun, sis. yksikanavainen pipetti (QIAGEN, tuotenro 9018901).

* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

† Joissakin maissa voidaan tilanteen mukaan käyttää Rotor-Gene Q 5plex HRM -laitetta, jonka valmistuspäivä on toukokuussa 2011 tai myöhemmin. Valmistuspäivämäärä käy ilmi laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Ammattilaiskäyttöön

Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheets, SDS). Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina osoitteessa www.qiagen.com/safety. Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjojen ja niiden osien käyttöturvallisuustiedotteet.

Yleiset varotoimet

Käyttäjän on aina huomioitava alla mainitut varotoimet:

- Käytä suodattimellisia DNAasittomia, RNAasittomia ja DNA:ttomia pipetinkärkiä ja varmista, että pipetit on kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaisesti.
- Säilytä ja eristä positiiviset materiaalit (näytteet ja positiiviset kontrollit) erikseen kaikista muista reagensseista, ja lisää ne reaktioseokseen erillisessä tilassa.
- Sulata kaikki osat huolellisesti huoneenlämpötilassa (15–25 °C) ennen määrittämisen aloittamista.
- Kun ne ovat sulaneet, sekoita osat kääntämällä kukin putki ylösalaisin 10 kertaa ja sentrifugoi ne lyhyesti.

Huomautus: Varmista huolellisesti, etteivät PCR:t pääse kontaminoitumaan synteettisestä kontrollimateriaalista. Suosittelemme käyttämään reaktioseosten valmistuksessa ja DNA-mallin lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä. Reaktioseosten valmistaminen ja annostelu on suoritettava eri paikassa kuin mallin lisääminen. Rotor-Gene Q -putkia ei saa avata PCR-ajon on päättymisen jälkeen. Syynä on laboratorionkontaminoitumisen estäminen PCR-ajon jälkeen.

Huomautus: Reagenssit on hyväksytty käytettäväksi manuaalisessa valmistelussa. Jos käytetään automaattista menetelmää, se voi vähentää mahdollisten reaktioiden määrää, koska reagenssien on täytettävä näiden laitteiden "kuolleet tilat".

Huomautus: Kaikki *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan reagenssit on suunniteltu erityisesti käytettäväksi mainittujen testien yhteydessä. Kaikki *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa.

Pakkauksen reagensseja ei saa korvata muilla reagensseilla, jos halutaan säilyttää pakkauksen optimaalinen suorituskyky.

Huomautus: Käytä ainoastaan sarjan mukana toimitettua *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*). Älä korvaa *Taq* DNA -polymeraasia muiden saman- tai toisentyyppisten sarjojen polymeraaseilla tai muiden toimittajien *Taq* DNA -polymeraaseilla.

Huomautus: *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan reagenssit on laimennettu optimaaliseen vahvuuteen. Emme suosittele laimentamaan reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen. Suosittelemme yhdellä kertaa käytettävän reagenssin vähimmäismääräksi 25 µl, koska muutoin väärin positiivisten tulosten riski kasvaa.

Reagenssien säilytys ja käsittely

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja toimitetaan hiilihappojäähän pakattuna. Jos *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja ei ole vastaanottohetkellä jäässä tai jos ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai jos toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa, käyttöohjetta tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen palveluun tai paikalliseen jälleenmyyjään (katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa $-30...-15$ °C:n lämpötilassa olevaan pakastimeen valolta suojattuna. Kyseisissä olosuhteissa säilytetty *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja on stabiili mainittuun viimeiseen käyttöpäivämäärään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan $-30...-15$ °C:n lämpötilassa 12 kuukautta tai pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti (näistä ensin umpeutuvaan). Sarjan toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään kahdeksan.

Reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä vähintään 1 tunti ja enintään 4,5 tuntia. Kun reagenssit ovat valmiita käytettäväksi, PCR-reaktiot voidaan valmistella ja pääseokset sisältävät Rotor-Gene Q -putket ja DNA-näyte on lisättävä Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen välittömästi. Kokonaisuena PCR:n valmistelun aloittamisesta ajoin alkuun ei saa olla yli:

- 6 tuntia, jos putkia säilytetään huoneenlämmössä
Huomautus: tämä aika sisältää sekä PCR:n valmistelun että säilytyksen.
- 18 tuntia, jos putkia säilytetään jääkaapissa ($2-8$ °C:ssa)
Huomautus: tämä aika sisältää sekä PCR:n valmistelun että säilytyksen.

Huomautus: Reaktioseosten reagenssien Scorpionit (kuten kaikki fluoresoivalla aineella merkityt molekyylit) ovat valoherkkiä. Vältä valon aiheuttama valkaisu suojaamalla kontrolli- ja reaktioseosten reagenssit valolta.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit-sarjan reagenssit on laimennettu optimaalisesti eikä lisäpuhdistusta tai -käsittelyä tarvita ennen niiden käyttöä analysissä *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit*-sarjan käyttöohjeiden (käsikirjan) mukaisesti.

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Näytteiden säilytys ja käsittely

Huomautus: Kaikkia näytteitä on käsiteltävä tartuntavaarallisena materiaalina.

Näytteen materiaalin täytyy olla ihmisen genomista DNA:ta, joka on eristetty plasmasta. Näytteet on kuljetettava tavanomaisia patologian käytäntöjä noudattaen näytteen hyväksyttävän laadun varmistamiseksi.

Menetelmä

DNA:n eristäminen

Tämän sarjan suorituskykyominaisuudet on saatu käyttämällä QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit -sarjalla (tuotenro 55114) eristettyä DNA:ta. Jos käytössä on QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit-sarja, suorita DNA:n eristäminen käsikirjan ohjeiden mukaisesti huomioiden myös alla esitetyt ohjeet.

- Plasman alkumäärä on 2 ml.
- Ennen DNA:n eristämistä 2 ml plasmaa on sentrifugoitava nopeudella 3 000 r/min kahden minuutin ajan ja supernatantti siirrettävä puhtaaseen putkeen.
- Proteinaasi K:n määrän on oltava 250 µl.
- Proteinaasi K:ta on hajotettava 1 tunnin ajan 60 °C:ssa.
- Puhdistettu genominen DNA on eluoitava 55 µl:aan Buffer AVE -puskuria (sisältyy QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit-sarjaan).
- Säilytä puhdistettu genominen DNA –30...–15 °C:n lämpötilassa.

Huomautus: Kaikki *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit-sarjan määritykset tuottavat lyhyitä PCR-tuotteita. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit-sarja ei kuitenkaan toimi voimakkaasti fragmentoituneen DNA:n kanssa.

Protokolla: EGFR-mutaatioiden havaitseminen

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Lue ennen toimenpiteen aloittamista kohta Yleiset varotoimet sivulta 11.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Tutustu laitteen käyttöoppaseen.
- Älä sekoita *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*) tai mitään *Taq* DNA -polymeraasia sisältävää seosta vortex-laitteessa, sillä sekoittaminen saattaa inaktivoida entsyymiin.
- Yhdellä levyllä voidaan käsitellä enintään 16 näytettä.
- Pipetoi *Taq* asettamalla pipetin kärki aivan nestepinnan alapuolelle, jotta kärkeen ei pääse liikaa entsyymiä.
- Kustakin DNA-näytteestä on analysoitava kontrolli ja mutaatio samalla PCR-ajolla, jotta ajojen välinen vaihtelu vältetään.

Ennen kuin aloitat

- Ennen jokaista reagenssien käyttökertaa kaikkia reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ja enintään 4,5 tunnin ajan, käännettävä 10 kertaa ja käytettävä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että *Taq* on huoneenlämpöistä (15–25 °C). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

Menetelmä

1. Sulata reaktioseoksia, mallintonta kontrollia varten tarkoitettua nukleasitonta vettä (No Template Control, NTC) ja EGFR-positiivista kontrollia (Positive Control, PC) huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ajan (Taulukko 1). Kun reagenssit ovat sulaneet, sekoita ne kääntelemällä jokaista putkea 10 kertaa, jotta paikallisia suolakertymiä ei pääse muodostumaan, ja sentrifugoi sen jälkeen hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva materiaali sekoittuu.

Taulukko 1. Sulatusajat, PCR:n valmisteluajat ja säilytyslämpötilat

Vähimmäissulatusaika	Enimmäissulatusaika	Säilytyslämpötila PCR:n valmistelun jälkeen	PCR:n valmistelun ja säilytyksen enimmäisaika
1 tunti	4,5 tuntia	Huoneenlämpötila (15–25 °C)	6 tuntia
1 tunti	4,5 tuntia	2–8 °C	18 tuntia

Huomautus: PCR:n valmistelu on tehtävä huoneenlämmössä. Säilytyksellä tarkoitetaan aikaa PCR:n valmistelun ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella aloitettavan PCR-ajan välillä.

Huomautus: Tuo *Taq* DNA -polymeraasi (putki *Taq*) huoneenlämpöön (15–25 °C) samaan aikaan kuin muut reagenssit (katso "Reagenssien säilytys ja käsittely, sivu 13). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

2. Tee seuraavat toimet:

- 2a. Merkitse neljä mikrosentrifugiputkea (ei sisälly sarjaan) kunkin taulukossa 2 mainitun reaktioseoksen mukaan.
- 2b. Valmista riittävästi pääseoksia (kontrolli- tai mutaatioreaktioseosta [putki CTRL, T790M, deleetit, L858R] plus *Taq* DNA -polymeraasia [*Taq*]) DNA-näytteitä varten, yksi EGFR-positiivinen kontrollireaktio (putki PC) ja yksi nukleasiton vesi mallittomaan kontrollireaktioon (putki NTC) taulukossa 2 ilmoitettu määrä.

Huomautus: Sisällytä mukaan reagensseja yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten.

Pääseokset sisältävät kaikki PCR:ää varten tarvittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 2. Pääseosten valmisteleminen*

Määrittäminen	Reaktioseosputki	Reaktioseoksen määrä	Taq DNA -polymeraasin (putki Taq) määrä
Kontrolli	CTRL	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)
T790M	T790M	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)
Deleetiot	Del	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)
L858R	L858R	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)

* Valmista pääseosta valmistaessasi riittävä määrä seosta yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittämisestä varten.

Huomautus: valmistettaessa pääseosta kontrolli- tai mutaatioreaktioseokseen tarvittava määrä lisätään asianomaiseen putkeen ensin ja Taq DNA -polymeraasi lisätään viimeiseksi.

3. Aseta sopiva määrä PCR:n 4-liuskaputkia (kussakin liuskassa on neljä putkea) latauslohkoon taulukossa 3 esitetyllä tavalla. Älä pane putkiin korkkeja.

Huomautus: jätä korkit muovisäiliöön myöhempää käyttöä varten.

4. Pane pääseoksen putkeen korkki ja käännä putkea 10 kertaa ylösalaisin, jotta seos sekoittuu. Käytä putkea sen jälkeen hetki sentrifugissa, jotta seos siirtyy putken pohjalle. Lisää välittömästi 20 µl pääseosta jokaiseen PCR-liuskaputkeen.
5. Lisää välittömästi 5 µl nukleasitonta vettä (H₂O) mallittoman kontrollin PCR-liuskaputkiiin (PCR-putket numero 9–12) ja aseta putkien korkit paikoilleen.
6. Lisää 5 µl näytettä jokaiseen näyteputkeen (PCR-putkiin numero 5–8, 13–16 ja 17–72) ja aseta putkien korkit paikoilleen.
7. Lisää 5 µl EGFR-positiivista kontrollia (Positive Control, PC) positiivisiin kontrolliputkiiin (PCR-putket numero 1-4). Kaikki DNA-näytteet on testattava sekä kontrollilla että kaikilla mutaatiomäärittäyksillä. Työnkulku näkyy taulukossa 3.

Taulukko 3. Kontrolli- ja mutaatiomäärittysten asetelu

Määrittys	Kontrollit		Näytteen numero						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deleetiot	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
Näytteen numero									
Määrittys	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ctrl	5	13	21	29	37	45	53	61	69
T790M	6	14	22	30	38	46	54	62	70
Deleetiot	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. Merkitse tussilla alin numerokohta kunkin PCR:n 4-liuskaputken ensimmäisten putkien kansiin (esim. kohdat 1, 5, 9 jne.), jotta näet putkien lataussuunnan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen 72-kuoppaiseen roottoriin.
9. Aseta kaikki PCR:n 4-liuskaputket asianomaisiin kohtiin 72-kuoppaiseen roottoriin ja tarkista silmämääräisesti, että kaikissa putkissa on sama määrä.
Huomautus: varmista, että putkiliuskat eivät käänny ympäri, kun siirrät ne roottoriin.
10. Jos roottori ei ole täynnä, täytä jäljellä olevat kohdat korkillisilla tyhjiillä putkilla.
11. Aseta roottori välittömästi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen. Varmista, että lukkorengas (Rotor-Gene Q MDx -laitteen varuste) on asetettu roottorin päälle, jotta putket pysyvät paikoillaan ajon aikana.
12. Katso Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen valmisteluohjeista (katso Protokolla: Rotor-Gene Q EGFR:n valmisteleminen, sivu 21), miten luot lämpötilaprofiilin ja käynnistät ajon.

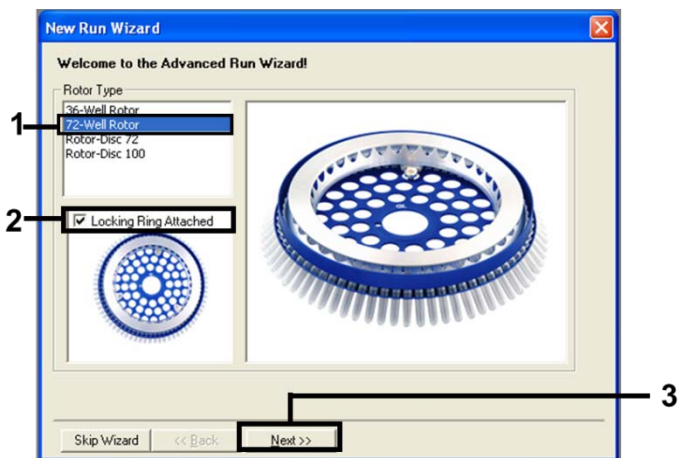
Protokolla: Rotor-Gene Q EGFR:n valmisteleminen

Jakson parametrit on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Jakson parametrit

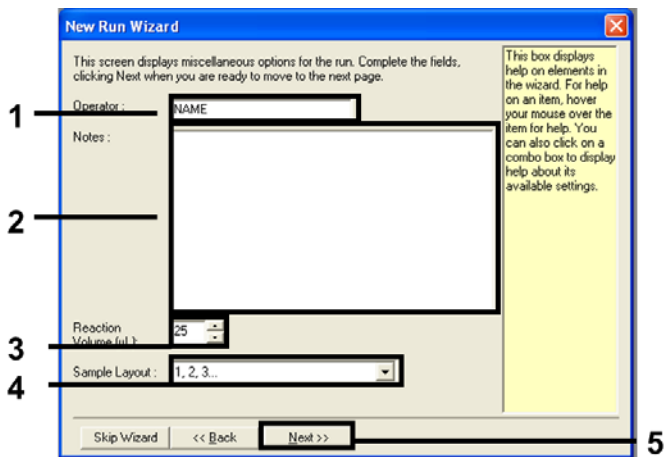
Jaksot	Lämpötila	Aika	Tiedonkeruu
1	95 °C	15 minuuttia	Ei mitään
40	95 °C	30 sekuntia	Ei mitään
	60 °C	60 sekuntia	Green and Yellow

1. Kaksoisnapsauta Rotor-Gene Q Series Software 2.3 -ohjelmistokuvaketta Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen liitetyn kannettavan tietokoneen työpöydällä. Valitse näkyviin tulevasta New Run (Uusi ajo) -valintaikkunasta Advanced (Lisäasetukset) -välilehti.
2. Luo uusi malli valitsemalla Empty Run (Tyhjä ajo) ja sitten New (Uusi).
New Run Wizard (Uuden ajon asetusohjelma) -ikkuna avautuu.
3. Valitse roottorityypiksi 72-Well Rotor (72-kuoppainen roottori). Varmista, että lukkorengas on paikallaan ja laita rasti Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Valitse Next (Seuraava) (kuva 1).



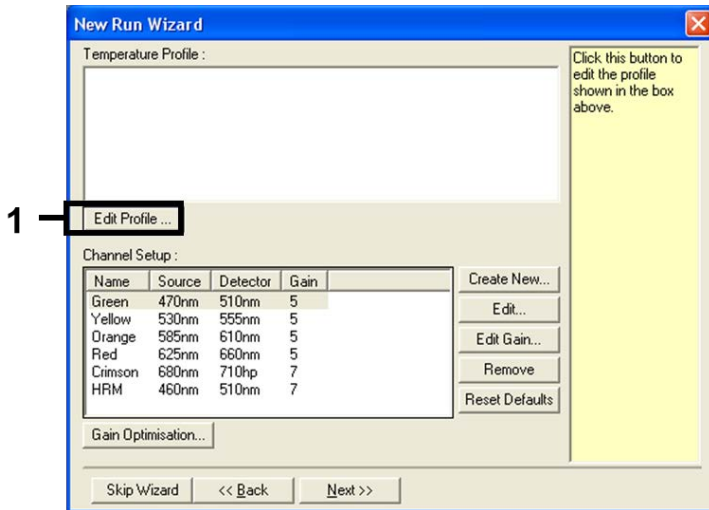
Kuva 1. New Run Wizard (Uuden ajon asetushjelma) -valintaruutu.

4. Anna testaajan nimi. Lisää mahdolliset huomautukset ja anna reaktiomääräksi 25. Varmista, että Sample Layout (Näyteasettelu) -kentän arvot ovat 1, 2, 3.... Valitse Next (Seuraava) (kuva 2).



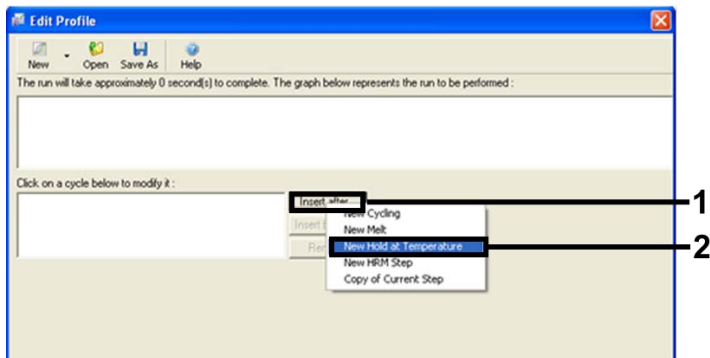
Kuva 2. Testaajan nimen ja reaktiomäärän antaminen.

5. Napsauta New Run Wizard (Uuden ajon asetushjelma) -ikkunassa Edit Profile (Muokkaa profiilia) -painiketta (kuva 3) ja aseta ajon parametrit seuraavien vaiheiden mukaisesti.



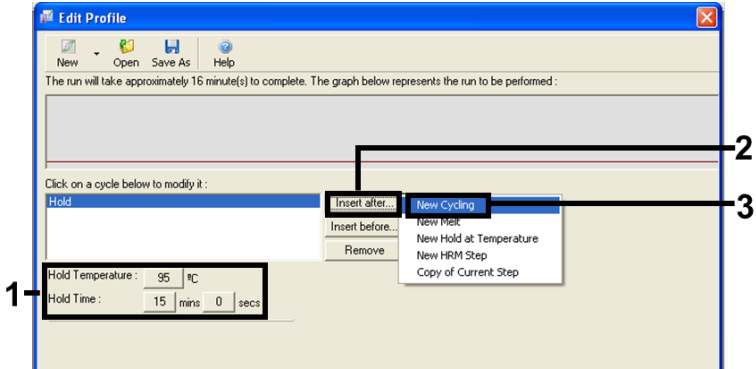
Kuva 3. Profiilin muokkaus.

6. Napsauta Insert after (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta New Hold at Temperature (Uusi pito lämpötilassa) (kuva 4).



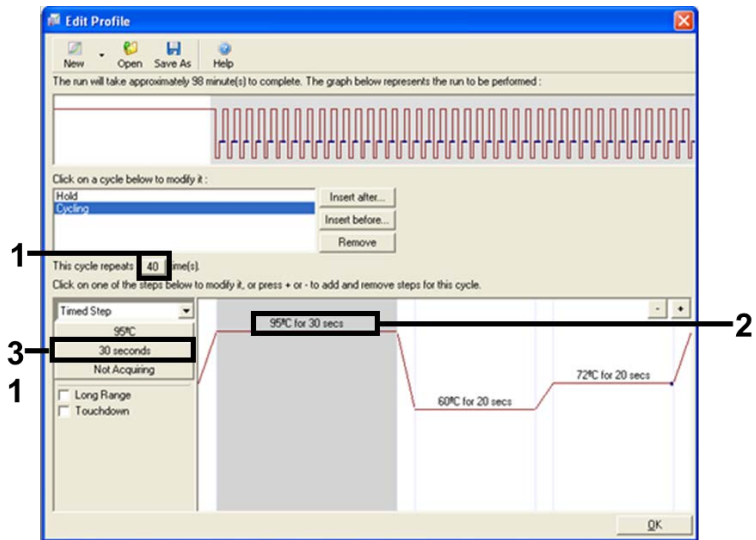
Kuva 4. Alun inkubointivaiheen määrittäminen.

7. Aseta Hold Temperature (Pitolämpötila) -kentän arvoksi 95°C ja Hold Time (Pitoaika) - arvoksi 15 mins 0 secs (15 minuuttia 0 sekuntia). Napsauta Insert After (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta New Cycling (Uusi jakso) (kuva 5).



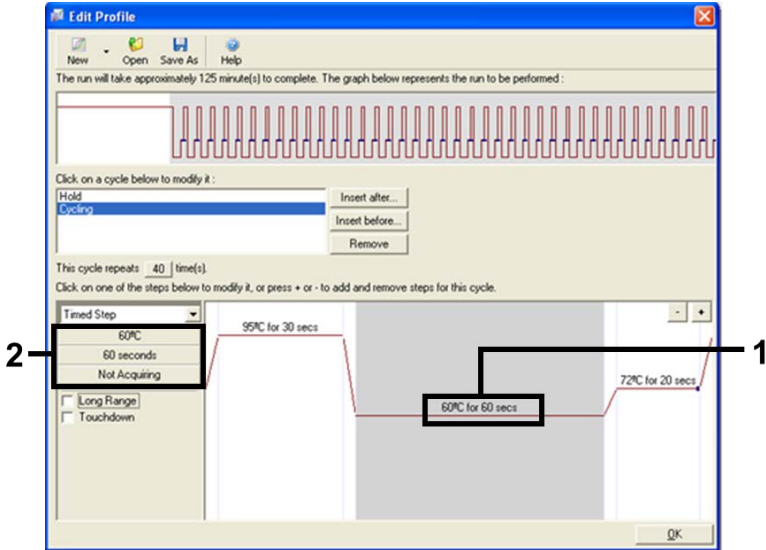
Kuva 5. Alkuinkubaatio 95 °C:ssa.

8. Vaihda jakson toistojen määräksi 40. Valitse ensimmäinen vaihe ja asetukseksi 95 °C 30 sekunnin ajan (kuva 6).



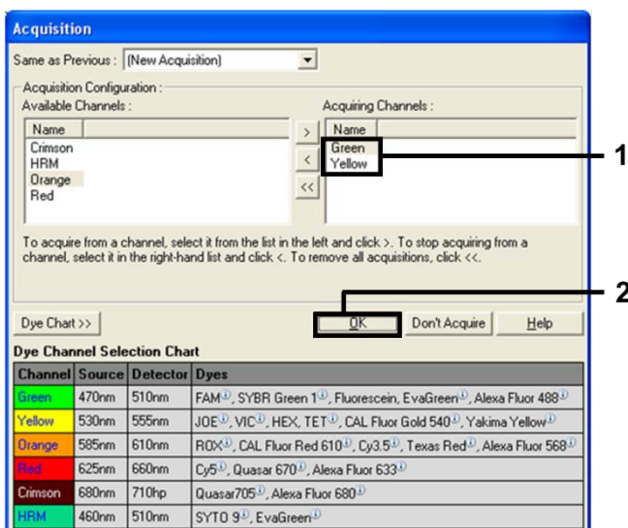
Kuva 6. Käsittelyjakso 95 °C:ssa.

9. Korosta toinen vaihe ja asetukseksi 60 °C 60 sekunnin ajan. Ota tiedonkeruu käyttöön tämän vaiheen aikana valitsemalla Not Acquiring (Ei kerää). (Kuva 7.)



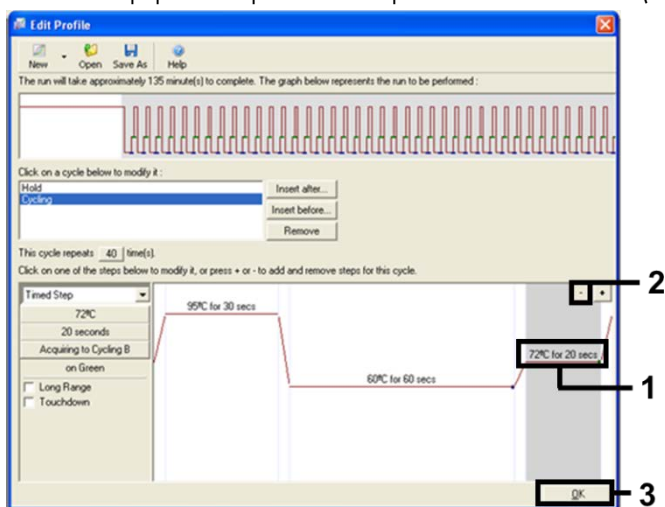
Kuva 7. Käsittelyjakso 60°C:ssa.

10. Aseta keruukanaviksi Green ja Yellow siirtämällä ne Available Channels (Käytettävissä olevat kanavat) -luettelosta valitsemalla >-painike. Valitse OK (kuva 8).



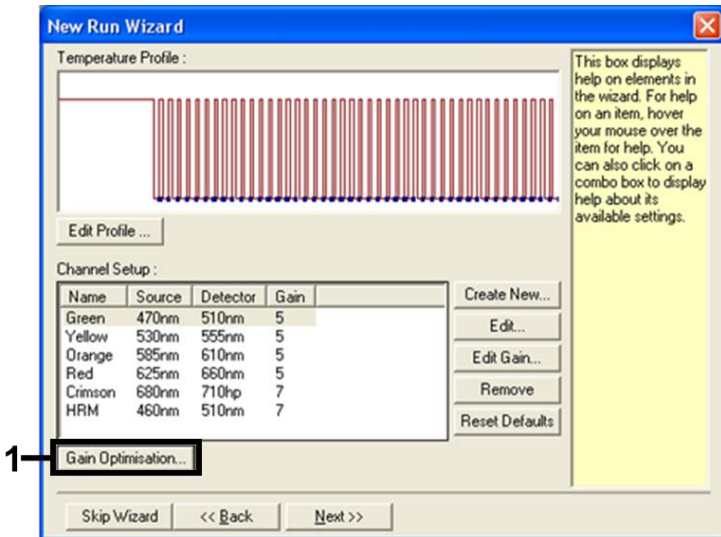
Kuva 8. Keräysjakso 60 °C:ssa.

11. Korosta kolmas vaihe ja poista napsauttamalla painiketta -. Valitse OK (kuva 9).



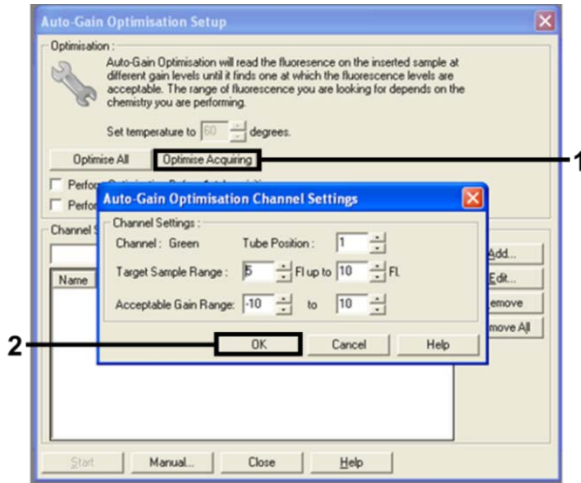
Kuva 9. Laajennusvaiheen poistaminen.

12. Napsauta seuraavassa valintaikkunassa Gain Optimisation (Vahvistuksen optimointi) -painiketta (kuva 10).



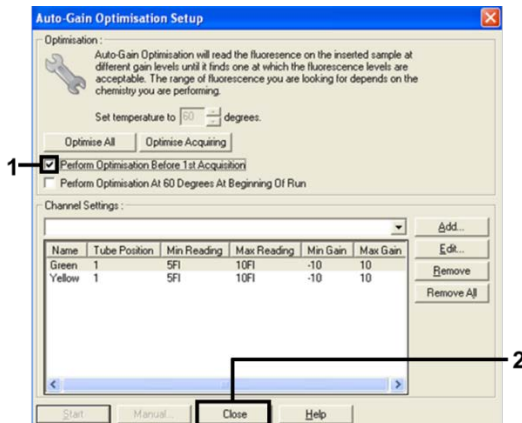
Kuva 10. Gain optimization (Vahvistuksen optimointi).

13. Valitse Optimise Acquiring (Optimoi keräys). Kanavan asetukset näkyvät kustakin kanavasta. Hyväksy nämä oletusarvot molemmille kanaville valitsemalla OK. (Kuva 11.)



Kuva 11. Green-kanavan automaattisen vahvistuksen optimointi.

14. Valitse Perform Optimisation before 1st Acquisition (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu ja palaa ohjattuun toimintoon napsauttamalla Close (Sulje) -painiketta (kuva 12).



Kuva 12. Green- ja Yellow-kanavan valinta.

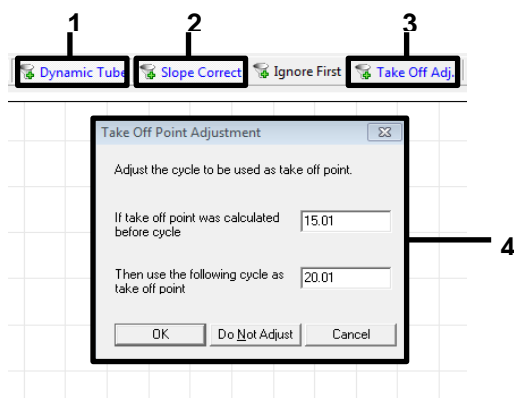
15. Napsauta Next (Seuraava) -painiketta ja tallenna malli haluamaasi sijaintiin valitsemalla Save Template (Tallenna malli).

Mutaation arviointitietojen analyysi

Ajon valmistumisen jälkeen tiedot on analysoitava seuraavasti.

Ohjelmiston analyysin määrittäminen

1. Avaa tarvittava tiedosto Rotor-Gene Q series software 2.3 -ohjelmistolla.
2. Jos et ole jo nimennyt näytteitä ennen ajon suorittamista, valitse Edit Samples (Muokkaa näytteitä).
3. Anna näytteille nimet Name (Nimi) -sarakeessa.
Huomautus: jätä tyhjiä kuoppia tyhjiksi.
4. Valitse Analysis (Analyysi). Valitse analyysisivulla Cycling A Yellow, jos haluat tarkastella HEX-kanavaa.
5. Tarkista, että Dynamic Tube (Dynaaminen putki) on korostettu. Valitse Slope Correct (Kulmakertoimen korjaus) ja Linear scale (Lineaarinen asteikko).
6. Valitse Take Off Adj (Poista viereinen) ja kirjoita 15.01 ja 20.01 kuten kuvassa 13.



Kuva 13. EGFR-analyysin normalisointiasetukset. 1 = Dynamic Tube (Dynaaminen putki), 2 = Slope Correct (Kulmakertoimen korjaus), 3 = Take Off Adj (Poista viereinen), 4 = Take Off Point Adjustment (Poistopisteen säätö)-valintaikkuna ja parametrien arvot.

7. Aseta kynnsarvoksi 0.02 ja tarkista HEX C_T -arvot.

8. Valitse analyysisivulla Cycling A, Green, jos haluat tarkastella FAM-kanavaa. Määritä parametrit kuvan 13 mukaisesti.
Dynaamisen putken pitäisi olla korostettu.
9. Valitse Slope Correct (Kulmakertoimen korjaus) ja Linear scale (Lineaarinen asteikko).
10. Aseta kynnyсарvoksi 0.075 ja tarkista C_T -arvot.

Ajon kontrollin analyysi

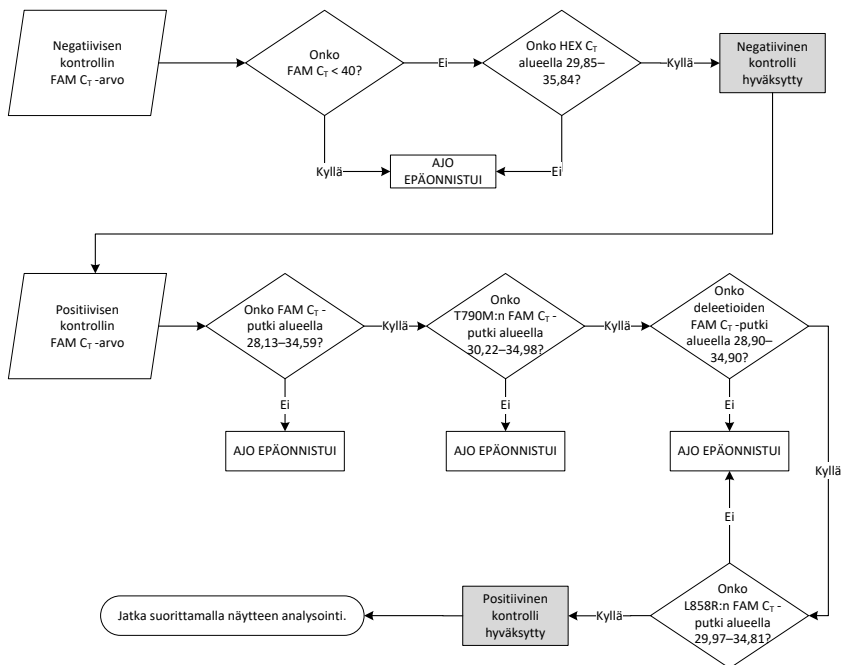
Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot seuraavasti.

- Negatiivinen kontrolli: Mallin kontaminoitumisen estämiseksi NTC ei saa tuottaa alle 40:n C_T -arvoa vihreässä (FAM) kanavassa. Jotta voisit varmistaa, että ajo on määritetty oikein, NTC:ssä täytyy näkyä monistusta alueella 29,85–35,84 keltaisessa (HEX) kanavassa (sisäinen kontrolli). Jos vihreässä kanavassa on positiivista monistusta ja/tai monistus on alueen 29,85–35,84 ulkopuolella keltaisessa kanavassa, ajo on epäkelpo.
- Positiivinen kontrolli: EGFR:n positiivisen kontrollin (Positive Control, PC) on annettava C_T -arvo jokaisesta reaktioseoksesta sekä raja-arvoista, jotka on annettu taulukossa 5. Ajo, jossa on positiivinen kontrolliarvo tämän alueen ulkopuolella, on merkki määrittelyn valmistelun ongelmasta, ja ajo on määritettävä epäkelvoksi. Jos positiivinen kontrolli antaa C_T -arvon alueen sisällä (FAM), mutta sisäisen kontrollin C_T (HEX) on alueen 29,85–35,84 ulkopuolella, jatka analyysiä.

Huomautus: näytteen tietoja ei saa käyttää, jos jompikumpi näistä kontrolleista on epäonnistunut.

Taulukko 5. Ajon kontrollien hyväksyttävä C_T -alue.

Reaktion kontrolli	Määritys	Kanava	C_T -alue
Positiivinen kontrolli	Kontrolli	Green (FAM)	28,13–34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22–34,98
	Deleetiot	Green (FAM)	28,90–34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97–34,81
Malliton kontrolli	Kaikki neljä reaktioseosta	Green (FAM)	$\geq 40,00$
	Kaikki neljä reaktioseosta	Yellow (HEX)	29,85–35,84



Kuva 14. Ajon kontrollin analyysin työvaiheet.

Kun molemmat kontrollit ovat hyväksyttäviä, jokaisen näytteen C_T -arvon on oltava vihreässä (FAM Taulukko 6) kanavassa alueella 23,70–31,10.

Taulukko 6. Näytteen kontrollireaktion hyväksyttävä FAM C_T -alue

Reaktioseos	Kanava	Hyväksyttävä C_T -alue
Kontrolli	Green (FAM)	23,70–31,10

Jos näyte on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

- Näytteen kontrollimääritys $C_T < 23,70$: Näytteet, joiden kontrollin C_T -arvo on $< 23,70$, ylikuormittavat mutaatiomäärityksiä, ja ne on laimennettava. Jotta vähäinen mutaatio voidaan havaita, liian konsentroituja näytteitä on laimennettava siten, että niiden pitoisuus on sallitun alueen rajojen sisäpuolella, jolloin laimennus puolella nostaa C_T -arvoa yhdellä numerolla.
- Näytteen kontrollimääritys $C_T > 31,10$: Näyte ei sisällä riittävää DNA-määrää analyysiä varten.

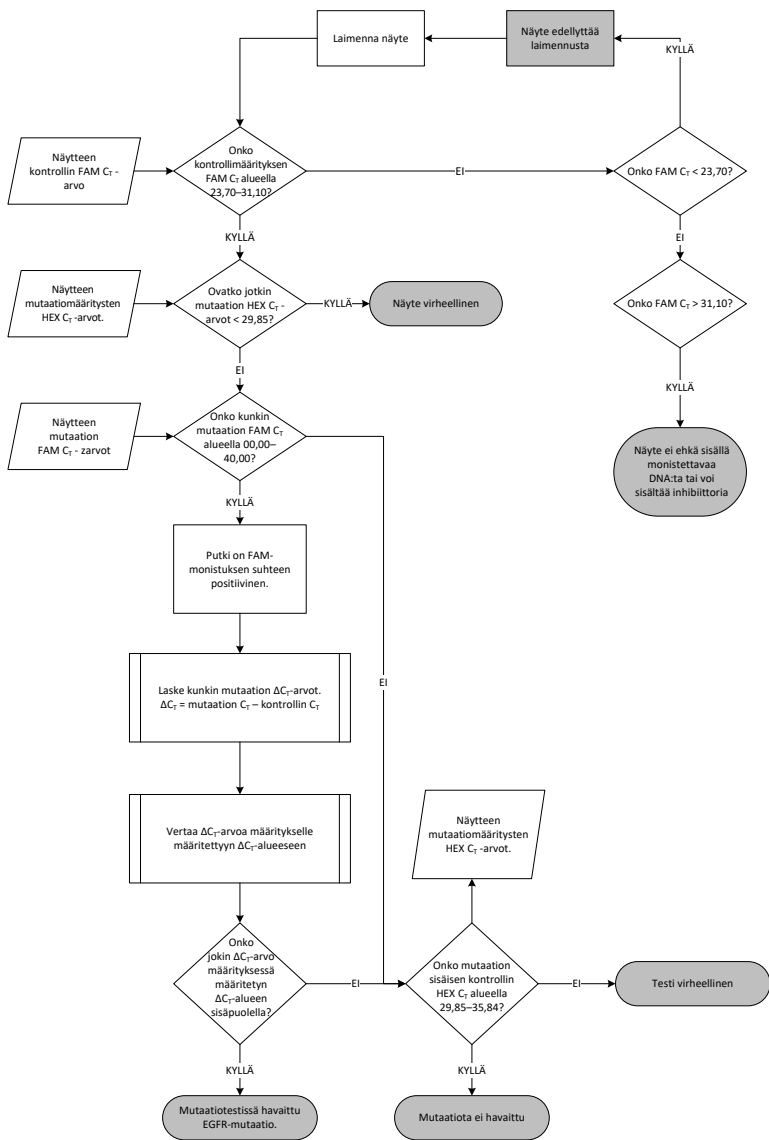
Kun molemmat ajon kontrollit ovat hyväksyttäviä ja kontrollimääritys on taulukossa 6 mainitulla alueella, jokaisen näytteen mutaation C_T -arvon on oltava taulukossa 7 määritetyllä alueella vihreässä (FAM) kanavassa. Jos näyte on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

Taulukko 7. Hyväksyttävät näytteen mutaation reaktioarvot

Reaktio	Reaktioseos	Kanava	C_T -alue
Mutaatioreaktio	T790M	Green (FAM)	0,00–40,00
	Deleetiot	Green (FAM)	0,00–40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00–40,00
	Kaikki kolme mutaatiota	Yellow (HEX)	29,85–35,84

Huomautus: jos näyte ei tuota C_T -arvoa (fs. $C_T > 40$), se voi johtua inhibiittorin läsnäolosta, määrittelyn valmistelun virheestä tai siitä, ettei monistettavaa EGFR DNA:ta ole.

- Sisäisen kontrollin CT -arvo on välillä 29,85–35,84: Monistettavaa EGFR DNA:ta ei ole.
- Sisäisen kontrollin CT -arvo ei ole välillä 29,85–35,84: Tämä voi olla merkki määrittelyn valmistelun virheestä tai inhibiittorin läsnäolosta. On mahdollista vähentää inhibiittorin vaikutusta laimentamalla näytettä, vaikka se laimentaa myös DNA:n.



Kuva 15. Mutaation analyysin vaihekaavio.

Näytteen mutaatiomäärittysten FAM C_T -arvot.

FAM-arvot kaikille kolmelle mutaatioreaktioseokselle on tarkistettava taulukossa 8 esitettyjen arvojen avulla.

Laske ΔC_T -arvo kaikille monistuspositiivisille mutaatioputkille alla esitetyllä tavalla varmistaen, että mutaation ja kontrollin C_T-arvot ovat peräisin samasta näytteestä.

$$\Delta C_T = \text{mutaation } C_T - \text{kontrollin } C_T$$

Vertaa näytteen ΔC_T -arvoa kyseisen määrittelyn raja-arvoon (taulukko 8) varmistaen, että kuhunkin määrittelyyn käytetään oikeaa raja-arvoa.

Taulukko 8. Mutaatiomäärittelyn raja-arvot

Mutaatiomäärittely	ΔC_T -raja-arvot
T790M	≤ 7,40
Deleetiot	≤ 8,00
L858R	≤ 8,90

Raja-arvo on arvo, jonka ylittävä positiivinen signaali voi johtua villityypin DNA:n ARMS-alkueen taustasignaalista. Jos näytteen ΔC_T -arvo on korkeampi kuin raja-arvo, näyte luokitellaan negatiiviseksi (Mutation not detected [Mutaatiota ei havaittu]) tai sarjan havaitsemisrajojen ulkopuolella olevaksi. Jos näytteen arvo on rajalla tai sen alapuolella, määrittely tunnistaa näytteen sisältävän mutaation.

Huomautus: Jos näytteessä ei ilmene FAM-mutaation C_T-arvoa, sisäisen kontrollin (HEX) C_T-arvo on arvioitava, jotta voidaan määrittää, onko mutaatio jäänyt havaitsematta vai onko määrittely virheellinen. Jos HEX C_T -arvo on välillä 29,85–35,84, mutaatiota ei ole tunnistettu. Jos HEX C_T -arvo on tämän alueen ulkopuolella, näyte on epäkelpo.

Jokaisen näytteen kohdalla jokaiselle mutaatioreaktiolle annetaan status havaitun mutaation perusteella: mutaatio havaittu, mutaatiota ei havaittu tai virheellinen alla esitettyjen kriteerien mukaisesti.

- Mutaatio havaittu: FAM-monistus on positiivinen ja ΔC_T -arvot ovat raja-arvon mukaisia tai sen alapuolella. Jos määrittäminen havaitsee useita mutaatioita, kaikki voidaan raportoida.
- Mutaatiota ei havaittu:
 - FAM-monistus on positiivinen ja ΔC_T -arvo on raja-arvon yläpuolella ja HEX (sisäinen kontrolli) on alueella 29,85–35,84.
 - FAM-monistus on negatiivinen ja HEX (sisäinen kontrolli) on alueella 29,85–35,84.
- Virheellinen: FAM-monistus on negatiivinen ja HEX-monistus määrittysten ulkopuolella.

Vianmääritys

Tämä vianmääritysohje voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Katso myös usein kysytyjä kysymyksiä (Frequently Asked Questions, FAQ) teknisen tuen sivulta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja määrytyksiin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän käsikirjan takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com.)

Huomautuksia ja ehdotuksia

EGFR-positiivisen kontrollin (Positive Control, PC) signaalittomuus vihreässä fluoresenssikanavassa

- | | |
|--|--|
| a) PCR-tietojen analysointia varten valittu fluoresenssikanava ei ole protokollan mukainen. | Tietojen analysoimisessa pitää valita Cycling Green - fluoresenssikanava analyttistä EGFR:n PCR:ää varten ja Cycling Yellow -fluoresenssikanava sisäisen kontrollin PCR:ää varten. |
| b) Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen lämpötilaprofilin virheellinen ohjelmointi | Vertaa lämpötilaprofilia protokollaan ja jos se on väärä, toista ajo. |
| c) PCR on määritetty väärin | Tarkista, noudattavatko työskentelyvaiheesi pipetointitapaa ja toista PCR tarvittaessa. |
| d) Yhden tai useamman sarjan osan säilytysolosuhteet eivät vastanneet kohdassa Reagenssien säilytys ja käsittely (sivu 13) annettuja ohjeita | Tarkista säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja on vanhentunut. | Tarkista säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |

Negatiivisten kontrollien signaaleja analyttisen PCR:n Cycling Green -fluoresenssikanavassa

- | | |
|---|--|
| PCR:n valmistelun aikana tapahtui kontaminaatio | Toista PCR uusilla reagensseilla replikaateissa.
Jos mahdollista, sulje PCR-putket heti testattavan näytteen lisäämisen jälkeen.
Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti. |
|---|--|

Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Rajoitukset

Tuotteella saatujen tulosten tulkinnessa on otettava huomioon kaikki asianmukaiset kliiniset löydökset ja laboratoriolöydökset, eikä diagnoosia saa tehdä yksin testitulosten pohjalta.

Tätä tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet erityisopastuksen ja -koulutuksen *in vitro* -diagnostisiin toimenpiteisiin ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöön.

Analyttisissä hyväksyntätutkimuksissa käytettiin plasmanäytteistä eristettyä ihmisen DNA:ta.

Tuote on tarkoitettu käytettäväksi vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen real-time PCR-laitteessa.

Optimaalisten tulosten saavuttaminen edellyttää kaikkien *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* -sarjan käsikirjassa *annettujen* ohjeiden huolellista noudattamista. Reagenssien muu kuin tässä käsikirjassa määritetty laimentaminen ei ole suositeltavaa, ja se johtaa suorituskyvyn heikkenemiseen.

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

EGFR-deleetioreaktioseoksen alukkeet on suunniteltu kohdistumaan useisiin eksonin 19 deleetioihin, jotka kattavat nukleotidit 55174772–55174795 (GRCh38 chr7), 23 emäsparin alue.

Kun eksonin 19 deleetiomääritys on analyttisesti validoitu ja sen on osoitettu tunnistavan määritetyt deleetiot eksonissa 19 (katso taulukko 13 tässä käsikirjassa), on kuitenkin mahdollista, että deleetioreaktioseos monistaa lisämutaatioita (mukaan lukien mm. ylimääräisiä eksonin 19 deleetioita, eksonin 19 insertioita ja L747P-mutaation).

Mikäli näitä lisämutaatioita ilmenee, ne aiheuttavat Deletions Detected (Deleetioita tunnistettu) -tuloksen tietystä potilasnäytteestä.

Lisäksi on mahdollista, että L858R Reaction Mix -reaktioseos tunnistaa L858Q-mutaation. Jos L858Q-mutaatiota esiintyy potilasnäytteessä, tuloksena voi siis olla L858R Mutation Detected (L858R-mutaatio tunnistettu).

Suorituskykyominaisuudet

Analyttinen herkkyys – LOB-raja

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan suorituskyvyn arvioimiseksi mallin puuttuessa sekä sen varmistamiseksi, että tyhjä näyte tai villityypin DNA:ta sisältävä näyte ei tuota pienen pitoisuuden mutaatiota ilmaisevaa analyttistä signaalia, NSCLC-potilaan plasmanäytteen villityypin EGFR DNA arvioitiin 59 näytteestä. Tutkimuksen hyväksyntäkriteerit (vähintään 95 %:ssa villityypin näytteistä täytyy olla ΔC_T -arvo asianomaisen rajan yläpuolella) täytyivät.

Havaitsemisraja (Limit of Detection, LOD)

LOD on vähimmäisprosentti mutatoitunutta DNA:ta, joka voidaan havaita villityypin tausta-DNA:sta, kun kaikki monistettava DNA (syöttöalueella) tuotti oikeat mutaatiotulokset 95 %:ssa kustakin mutaation sisältävästä näytteestä (C95). Määrityksen lähtö-DNA-työskentelyalueen määrittää kontrollin C_T -arvo esimääritetyllä alueella 23,70–31,10.

LOD määritettiin matalilla lähtö-DNA:n (kontrollin C_T noin 30,10) tasoilla käyttämällä FFPE-kudoksesta saatua DNA:ta ja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa. LOD määritettiin käyttämällä sekä kliinisiä FFPE-näytteitä että FFPE-solulinjoja näiden EGFR-mutaatioiden matalilla lähtö-DNA:n tasoilla.

FFPE-kudoksen avulla määritetyt LOD-arvot *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjalle tarkistettiin DNA:lla, joka oli saatu keinotekoisista mutaation sisältävistä plasmanäytteistä.

Taulukossa 9 seuraavalla sivulla luetellut lopulliset LOD-väitteet osoittavat mutaatioprosentin, joka tuotti ennustetun oikeiden tulosten todennäköisyyden, 95 % kullekin mutaatiolle.

Taulukko 9. Kunkin EGFR-mutaatiotestin LOD-arvot

Eksoni	Mutaatio	COSMIC-tunniste*	% LOD -väite
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43†
		12419	16,87†
		12422	3,24†
		6218	9,83†
		6210	7,44†
		6254	10,2*
		12370	8,1*
19	Deleetiot	12678	10,40†
		12367	4,39†
		12384	7,54†
		6225	6,5*
		6220	2,7*
		6255	0,81*
		12382	1,45*
		12383	4,58*
		12387	4,91†
12369	4,94*		
21	L858R	6224	5,94*

* LOD-väitteet on vahvistettu plasmalla osana *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan LOD-arvon vahvistustutkimusta.

† Näitä mutaatioita ei vahvistettu plasmasta.

Analyttinen herkkyys – ΔC_T -rajat

Virheellisten positiivisten tulosten asteissa käytettiin riskiin perustuvaa lähestymistapaa määrityksen rajojen määrittämiseen, ja arvioituja LOB-arvoja käytettiin yhtenä raja-arvojen kehittämisen osatekijänä. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit-sarjan kunkin mutaatiotestin ΔC_T -rajat on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit-sarjan ΔC_T -rajat

Mutaatiomääritys	ΔC_T -raja-arvot
T790M	$\leq 7,40$
Deleetio	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$

Toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuus ja uusittavuus arvioitiin testaamalla mutaatiotaso $3 \times \text{LOD}$ -arvolla taustan villityypin genomisesta DNA:sta kolmella tutkimuspaikalla käyttämällä useita sarjan eriä, käyttäjiä ja ajoja eri päivinä sekä kahta replikaattia kustakin näytteestä. Kaikista kolmesta mutaatiotestistä 100 % mutaation sisältävistä DNA-näytteistä tunnistettiin mutaatiopositivisiksi. Villityypin näytteiden testitulokset olivat mutaationegatiivisia kaikissa määrityksissä kaikissa tutkimuspaikoissa.

Lähtö-DNA:n vaikutus C_T -arvoihin

DNA-lähtötaso on monistettavan EGFR DNA:n kokonaismäärä näytteessä kontrollireaktion C_T -arvoilla määritettynä. Jotta voitiin osoittaa, että *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit-sarjan suorituskyky on yhdenmukainen koko kontrollireaktion C_T -alueella (23,70–31,10), kaikki kolme EGFR-mutaatiotestiä testattiin kuusipisteisellä 1-in-3-laimennussarjalla (DNA eristetty FFPE-solulinjoista). Kunkin mutaation ensimmäisen laimennuksen C_T -tavoitearvo oli noin 24,70. Lopullinen laimennus, joka antoi C_T -arvoksi noin 32–33, oli kontrollireaktion C_T -alueen ulkopuolella.

Eri DNA-kokonaislähtötasoilla mitatut ΔC_T -arvot olivat yleensä yhdenmukaisia *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan työskentelyalueella.

Häiritsevät aineet

Endogeeniset häiritsevät aineet

Mahdollisesti häiritsevät aineet lisättiin keinotekoisesti 3xLOD-mutaatioposiitivisiin plasmanäytteisiin. Näytteet testattiin sen jälkeen *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjalla. Näytteitä, joissa oli mahdollisesti häiritseviä aineita, verrattiin keinotekoisin 3xLOD-mutaatioposiitivisiin plasmanäytteisiin, joihin ei ollut lisätty häiritsevää ainetta. Kukin häiritsevä aine testattiin neljänä replikaattina.

Testin ja kontrollin ΔC_T -arvojen (ts. ei häiritsevää ainetta) välillä olevan > 2 keskihajonnan (Standard Deviation, SD) (edellisestä tutkimuksesta) suuruisen eron katsottiin ilmaisevan mahdollista häiriötä. Näissä tapauksissa on annettu havaittu ΔC_T -arvojen ero.

Taulukossa 11 annetut testipitoisuudet valittiin CLSI-ohjeen EP07-A2 perusteella, ja ne edustavat kliinisessä näytteessä odotettavissa olevia enimmäispitoisuuksia.

Huomautus: Nämä endogeeniset yhdisteet lisättiin keinotekoisin mutaatioposiitivisiin plasmanäytteisiin, jotka koostuivat terveiden luovuttajien plasmasta. Tämän vuoksi nämä endogeeniset yhdisteet olisivat olleet luontaisesti läsnä näytteissä tuntemattomina pitoisuuksina ennen lisäystä. Kunkin mahdollisen endogeenisen häiritsevän aineen testattu lopullinen pitoisuus olisi todennäköisesti suurempi kuin testipitoisuus.

Taulukko 11. Mahdolliset häiritsevät endogeeniset aineet

Mahdollinen häiritsevä aine (Interfering Substance, IS)	Testipitoisuus
Konjugoitumaton bilirubiini	150 mg/dl
Hemoglobiini (ihmisen)	0,2 g/dl
Triglyseridit	3 g/dl

T790M-määritys

Seuraavilla endogeenisillä yhdisteillä taulukossa 11 ilmoitettuna pitoisuuksina osoitettiin olevan $> 2 \times \text{SD}$:n vaikutus ($0,40 \Delta C_T$) T790M-määrityksen suorituskykyyn:

- Triglyseridit, ero $1,37 \Delta C_T$

Deleetiomääritys

Seuraavilla endogeenisillä yhdisteillä taulukossa 11 ilmoitettuna pitoisuuksina osoitettiin olevan $> 2 \times \text{SD}$:n vaikutus ($0,71 \Delta C_T$) deleetiomäärityksen suorituskykyyn:

- Hemoglobiini, ero $0,80 \Delta C_T$

L858R-määritys

Seuraavilla endogeenisillä yhdisteillä taulukossa 11 ilmoitettuna pitoisuuksina osoitettiin olevan $> 2 \times \text{SD}$:n vaikutus ($0,56 \Delta C_T$) L858R-määrityksen suorituskykyyn:

- Bilirubiini, ero $1,13 \Delta C_T$
- Triglyseridit, ero $1,53 \Delta C_T$

Eksogeeniset häiritsevät aineet

Mahdollisesti häiritsevät aineet lisättiin keinotekoisesti $3 \times \text{LOD}$ -mutaatioposiitivisiin plasmanäytteisiin. Näytteet testattiin sen jälkeen *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjalla. Näytteitä, joissa oli mahdollisesti häiritseviä aineita, verrattiin keinotekoisiiin $3 \times \text{LOD}$ -mutaatioposiitivisiin plasmanäytteisiin, joihin ei ollut lisätty häiritsevää ainetta. Kukin häiritsevä aine testattiin neljänä replikaattina.

Testin ja kontrollin ΔC_T -arvojen välillä (ts. ei häiritsevää ainetta) olevan $\Delta > 2$ keskihajonnan (edellisestä tutkimuksesta) suuruisen eron katsottiin ilmaisevan mahdollista häiriötä. Näissä tapauksissa on annettu havaittu ΔC_T -arvojen ero.

Taulukossa 12 annetut testipitoisuudet valittiin CLSI-ohjeen EP07-A2 perusteella ja ne edustavat kaikissa tapauksissa terapeuttisen pitoisuuden ylämäärää.

Taulukko 12. Mahdolliset häiritsevät endogeeniset aineet

Mahdollinen häiritsevä aine (Interfering Substance, IS)	Testipitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)
Sitalopraamihydrobromidi	0,75
Paroksetiinihydrokloridihemihydraatti	1,14
Sertraliinihydrokloridi	0,67
Fluoksetiinihydrokloridi	3,87
Asetaminofeeni	200,7
K ₂ EDTA	3600

T790M-määrittäminen

Seuraavilla eksogeenisillä yhdisteillä taulukossa 12 ilmoitettuna pitoisuuksina osoitettiin olevan $> 2 \times \text{SD}$:n vaikutus ($0,40 \Delta C_T$) T790M-määrittämyksen suorituskykyyn:

- Sitalopraamihydrobromidi, ero $0,52 \Delta C_T$
- Sertraliinihydrokloridi, ero $0,47 \Delta C_T$
- Fluoksetiinihydrokloridi, ero $0,48 \Delta C_T$

Deleetiomääritys

Seuraavilla eksogeenisillä yhdisteillä taulukossa 12 ilmoitettuna pitoisuuksina osoitettiin olevan $> 2 \times \text{SD:n}$ vaikutus ($0,71 \Delta C_T$) deleetiomäärityksen suorituskykyyn:

- Fluoksetiini, ero $0,73 \Delta C_T$

L858R-määritys

Seuraavilla eksogeenisillä yhdisteillä taulukossa 12 ilmoitettuna pitoisuuksina osoitettiin olevan $> 2 \times \text{SD:n}$ vaikutus ($0,56 \Delta C_T$) L858R-määrityksen suorituskykyyn:

- Sitalopraamihydrobromidi, ero $0,72 \Delta C_T$
- Paroksetiinihydrokloridihemihydraatti, ero $0,92 \Delta C_T$
- Sertraliinihydrokloridi, ero $0,82 \Delta C_T$
- Fluoksetiinihydrokloridi, ero $0,98 \Delta C_T$
- Asetaminofeeni, ero $0,81 \Delta C_T$
- K_2 EDTA, ero $0,57 \Delta C_T$

Kliininen suorituskyky

Kliininen tutkimus NCT01203917 oli faasin IV avoin yhden tutkimusryhmän tutkimus, jolla arvioitiin ensilinjan geftinibihoidon tehokkuutta ja turvallisuutta/siedettävyyttä valkoihoisilla potilailla, joilla oli vaiheen IIIA/B/IV, EGFR-mutaatiopositiivinen ei-pienisolainen keuhkosyöpä (NSCLC).

Potilaiden kelpoisuus kliiniseen NCT01203917-tutkimukseen määritettiin EGFR-herkistävien mutaatioiden esiintymisen perusteella. NSCLC-potilaiden EGFR-mutaatiotila arvioitiin käyttämällä kliinistä tutkimustestiä (Clinical Trial Assay, CTA) ja DNA:ta vastaavista kudosis- ja plasmanäytteistä. Tutkimus koostui ennalta suunnitellusta biomarkerin tutkimustavoitteesta, jolla määritettiin, voitaisiinko plasmanäytteitä harkita mutaatioanalyysiä varten, jos kudosisnäytteitä ei ollut saatavilla. Tulokset osoittivat korkeaa 94,3 %:n yhdenmukaisuusastetta vastaavien kudosis- ja plasmanäytteiden välillä testin spesifisyyden ollessa 99,8 % ja herkkyden ollessa 65,7 %.

NCT01203917-tutkimukseen otettujen potilaiden plasmanäytteiden myöhempi testaus tehtiin käyttämällä *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjaa. Yhdistävällä tutkimuksella arvioitiin *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan yhdenmukaisuutta sen CTA:n kanssa, jolla potilaat valikoitiin kliiniseen NCT01203917-tutkimukseen. CTA:n ja *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjan välinen vastaavuus osoitettiin.

Lähdeviitteet















1. Douillard, J.Y., et al. (2014). First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 110(1), 55.
2. Walsh, K., et. al. (2014) A cautionary lesson on the use of targeted methods for EGFR mutation analysis; a case report. *J. Clin. Pathol.* 67, 734
3. Huang, J., Wang, Y., Zhai, Y., and Wang, J. (2018) Non-small cell lung cancer harboring a rare EGFR L747P mutation showing intrinsic resistance to both gefinitib and osimertinib (AZD9291): A case report. *Thorac. Cancer.* 9, 745

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tuen sivuilla osoitteessa **www.qiagen.com/Support**, soita ilmaisnumeroon 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Selitys
 Σ <N>	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaite
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	Komponentit
	Sisältö
	Numero
	GTIN-numero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Katso käyttöohjeet
	Huomio

Liite A: Mutaatiotiedot

Taulukossa 13 on osoitettu Catalogue of Somatic Mutations in Cancer -luettelosta (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) otetut COSMIC-tunnisteet.

Taulukko 13. Mutaatioluettelo ja COSMIC-tunnisteet

Mutaatio	Eksoni	Emäsjärjestyksen muutos	COSMIC-tunniste
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
		2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (kompleksi)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (kompleksi)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (kompleksi)	12422
Deleetiot	19	2238_2252>GCA (kompleksi)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (kompleksi)	12382
		2239_2258>CA (kompleksi)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (kompleksi)	12383

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarja – EGFR-geenin mutaatioiden havaitsemiseen		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	24 reaktioon: 1 kontrollimääritys, 3 mutaatiomääritystä, positiivinen kontrolli, Taq DNA -polymeraasi	870311
Rotor-Gene Q MDx ja lisävarusteet		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime PCR-jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sis. asennusta ja koulutusta	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtime PCR -laite ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 kpl:ssa 0,1 ml:n putkia	9018901

Tuote	Sisältö	Tuotenro
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106
Liittyvät tuotteet		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	50 preparaatiota varten: QIAamp Mini -kolonneja, putkien jatkeita (20 ml), QIAGEN Proteinase K, Carrier RNA, Buffers, VacConnectors ja Collection Tubes (1,5 ml ja 2 ml)	55114

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteessa www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Asiakirja	Muutokset
R2, huhtikuu 2018	<p>Sample to Insight-tuotemerkin päivitys</p> <p>Valmistelu- ja säilytyslämpötilojen selvennys kohdassa Reagenssien säilytys ja käsittely ja taulukossa 1.</p> <p>Kuva 15: Laatikko "On FAM C_T <31,10?" muutettu muotoon "On FAM C_T >31,10?" ja pieniä tekstimuutoksia.</p> <p>Osa "DNA-lähtöpitoisuuden vaikutus" poistettu ja vaihdettu uuteen osaan "Lähtö-DNA:n vaikutus ΔC_T-arvoihin.</p> <p>Taulukko 11: Testattu (ihmisen) hemoglobiinipitoisuus korjattu arvosta 2 g/dl arvoon 0,2 g/dl.</p> <p>Pieniä tekstimuutoksia koko tekstiin.</p>
R3, tammikuu 2019	<p>Valtuutetun edustajan lisäys (etukanteen). Symbolit-osan päivitys.</p>
R4, lokakuu 2019	<p>Lainmukainen valmistaja vaihdettu (kansilehti)</p> <p>Laitteen nimi vaihdettu laitteesta Rotor-Gene Q MDx laitteeksi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tuote-etiketin mukaisesti</p> <p>Korjattu reagenssien säilytysohjeet 90 päivästä 12 kuukauteen tai viimeiseen käyttöpäivään asti</p> <p>Päivitetty Rajoitukset-osan tiedot eksonin 19 deleetiomäärityksestä ja L858R-määrityksestä</p> <p>Muutettu taulukko 9 korvaamaan kaksinkertaistuneen eksonin 21 L858R:n eksonin 19 deleetioilla</p> <p>Poistettu EC + REP -symboli kansilehdeltä ja Symbolit-osasta</p>

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit -sarjaa koskeva rajoitettu lisenssisopimus

1. Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:
2. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen asiakirjojen ja tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aiheettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa asiakirjoissa, tässä käyttöoppaassa ja lisämateriaalissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laadittua. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Muutoin kuin nimenomaisesti ilmoitettujen käyttöoikeuksien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä sarja ja/tai sen käyttö eivät loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
4. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
5. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
6. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi käynnäyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen käytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellet ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Tavaramerkki: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *therascreen*®, Rotor-Gene®, Scorpions® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

1119189 10-2019 HB-1898-005 © 2019 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

