

2019 m. spalio

„*therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit“ vadovas



24

2 versija



Skirta *in vitro* diagnostikai

Skirta naudoti su „Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM“ instrumentais



874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, VOKIETIJA



1119191LT

Turiny

Numatytoji paskirtis	5
Santrauka ir paaiškinimas	6
Procedūros principas	9
Pateikiamos medžiagos	13
Rinkinio turinys	13
Būtinios, bet nepateikiamos priemonės	14
Įspėjimai ir atsargumo priemonės	16
Bendrosios atsargumo priemonės	16
Reagentų laikymas ir naudojimas	18
Gabenimo sąlygos	18
Laikymo sąlygos	18
Bandinių naudojimas ir laikymas	20
Procedūra	21
DNR išskyrimas ir paruošimas	21
Protokolas. Mėginių įvertinimas	22
Protokolas. EGFR mutacijos aptikimas	33
Rezultatų aiškinimas (automatinis)	46
„Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package“ žymės	48
Trikčių šalinimo vadovas	52
Kokybės kontrolė	53
Apribojimai	53

Efektivumo charakteristikos	55
Analitinis efektyvumas	55
Tuštumo ribos (Limit of Blank, LOB), darbinis diapazonas ir ribinės reikšmės	55
DNR įvesties poveikis ΔC_T reikšmėms	56
Kryžminis reaktyvumas.....	56
Tikslumas: palyginimas su analitiniu kontroliniu metodu.....	57
Aptikimo ribos (Limit of Detection, LOD) reikšmės	58
Trukdžiai.....	60
Atkuriamumas	61
Klinikinis efektyvumas	65
Klinikinių rezultatų duomenys: „GIOTRIF®“	65
Klinikinių rezultatų duomenys: „IRESSA®“	67
Literatūra	69
Simboliai.....	71
Priedas A: „ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit“ rankinio paruošimo protokolas.....	72
Bendroji informacija.....	72
Protokolas. temperatūros profilio sukūrimas	72
Procedūra (vadovas).....	83
Protokolas. mėginių vertinimas (vadovas).....	83
Protokolas. EGFR mutacijos aptikimas (neautomatinis).....	83
Protokolas: „ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit“ „Rotor-Gene Q“ nustatymas.....	84
Rezultatų aiškinimas (neautomatinis).....	89
Programinės įrangos analizės nustatymai.....	89
Mėginių įvertinimo duomenų analizė.....	91

EGFR mutacijų aptikimo duomenų analizė	92
B priedas: „ <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package“ diegimas	100
Kontaktinė informacija	103
Užsakymo informacija	104
Dokumento peržiūrų istorija	106

Numatytoji paskirtis

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ yra „in vitro“ diagnostinis testas, skirtas EGFR geno 29 somatinėms mutacijoms aptikti. Jis pateikia auglio mėginių, paimtų iš nesmulkiąstelinio plaučių vėžio (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) sergančių pacientų, mutacijos būsenos kiekybinį vertinimą.

Rezultatai skirti padėti gydytojams identifikuoti pacientus, turinčius NSCLC, kuriems gali būti naudingas gydymas EGFR tirozino kinazės inhibitoriais.

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ tirs DNR mėginius, išskirtus iš formalinu fiksuoto parafine esančio (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) auglio audinio, paimto iš NSCLC sergančių pacientų, o tyrimas bus atliekamas „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu. Testą turi naudoti išmokytas personalas specialioje laboratorinėje aplinkoje.

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ skirtas „in vitro“ diagnostikai.

Santrauka ir paaiškinimas

EGFR onkogeno mutacijos nustatomos žmonėms, sergantiems vėžiu (1, 2). Šių mutacijų buvimas koreliuoja su atsaku į pacientų, sergančių NSCLC, gydymą tam tikrais tirozino kinazės inhibitoriais (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) (3–8). Tokios EGFR onkogeno mutacijos nustatomos bendrojoje pacientų, sergančių NSCLC, populiacijoje apytiksliai 10 % dažniu JAV, Europos ar Australijos pacientų grupėje ir iki 30 % dažniu Japonijos ir Taivano pacientų grupėje (1, 2, 9).

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ yra paruoštas naudoti rinkinys, skirtas EGFR su vėžiu susijusio geno 29 mutacijoms aptikti, naudojant polimerazinę grandininę reakciją (PGR), dirbant su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu.

Naudojant „Scorpions®“ (10) ir ARMS (amplifikacijos refrakcinės mutacijų sistemos, angl. „Amplification Refractory Mutation System“) technologijas (11), su „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ EGFR onkogeno 18, 19, 20 ir 21 egzonuose, laukinio tipo genominės DNR fone, galima aptikti 29 mutacijas (1 lentelė). Apibendrinant:

- 19 delecijų 19 egzone (aptinka bet kurios iš 19 delecijų buvimą, bet jų neišskiria)
- Tris intarpus 20 egzone (nustato bet kurio iš trijų tarpų buvimą, bet jų neišskiria)
- G719X (nustato G719S, G719A arba G719C buvimą, bet jų neišskiria)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

Naudojami metodai yra didelio selektyvumo laipsnio ir, atsižvelgiant į bendrą DNR kiekį, laukinio tipo genominės DNR fone jais galima aptikti nedidelę mutacinės DNR procentinę dalį. Šios selektyvumo ir nustatymo ribos yra didesnės nei kitų technologijų, pvz., dažų terminatoriaus sekvenavimo.

1 lentelė. Mutacijų ir COSMIC identifikatorių sąrašas

Egzonas	Mutacija	COSMIC* ID	Bazinis pokytis
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Delecijos	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
		6223	2235_2249del15
		6225	2236_2250del15
		6254**	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369**	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C		
12383	2239_2251>C		

* COSMIC: „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogas):
<http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

Ankstesniame puslapyje esančios lentelės tęsinys

1 lentelė Mutacijų ir COSMIC identifikatorių sąrašas

Egzonas	Mutacija	COSMIC* ID	Bazinis pokytis
20	S768I	6241	2303G>T
	Intarpai	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC: „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogas):
<http://cancer.sanger.ac.uk/>.

** Dėl COSM6254 (2239_2253del15) ir COSM12369 (2240_2254del15) mutacijų EGFR sekoje įvyksta 15 bazių porų delecija. Esant šioms mutacijoms, generuojama tokia pati galutinė seka ir šios mutacijos nėra atskiriamos. Dėl šios priežasties mutacija COSM6254 (2239_2253del15) buvo pašalinta iš naujausios COSMIC (v83) versijos ir abi mutacijas atitinka COSM12369 (2240_2254del15). Tai atitinka HGVS rekomendaciją nurodyti labiausiai 3' deleciją. „therascreen EGFR“ testas negali atskirti jokios iš 19 delecijos mutacijų, o bet kuri teigiama delecija yra vadinama „Deletions“ (Delecijos). Šis pakeitimas aktualus tik dokumentacijai ir neturi įtakos rinkiniui arba galimybei aptikti atskirą mutaciją.

Procedūros principas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ sudaro aštuoni atskiri PGR amplifikacijos reakcijos mišiniai: septynios konkrečių mutacijų reakcijos EGFR onkogeno 18, 19, 20 ir 21 egzonuose ir laukinio tipo kontrolinė medžiaga 2 egzone. Pagrindiniai rinkinio komponentai paaiškinti toliau.

ARMS

Alelio arba mutacijos specifinė amplifikacija atliekama naudojant ARMS. *Taq* DNR polimerazė (*Taq*) efektyvi atskiriant sutapimą arba nesutapimą PGR pradmens 3' gale. Konkrečios mutavusios sekos gali būti selektyviai amplifikuotos net mėginiuose, kuriuose dauguma sekų nemutuoja. Kai pradmuo visiškai sutampa, amplifikacija vyksta visu greičiu. Kai nesutampa 3' galo bazė, amplifikacija vyksta fone nedideliu greičiu.

Scorpions

Amplifikacija aptinkama taikant „Scorpions“ technologiją. „Scorpions“ yra dvigubos funkcijos molekulės, turinčios PGR pradmenį, kovalentiškai sujungtą su zonde. Zonde esančiam fluoroforui reaguojant su slopinamąja medžiaga, taip pat esančia zonde, sumažinama fluorescencija. Kai atliekant PGR zondas prisijungia prie amplifikacijos produkto, fluoroforas ir slopinamoji medžiaga atsiskiria, todėl aptinkamai padidėja fluorescencija.

Rinkinio formatas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ sudėtyje yra aštuoni tyrimai:

- Vienas kontrolinis tyrimas (CTRL)
- Septyni mutacijų tyrimai

Visuose reakcijos mišiniuose yra reagentų, skirtų karboksifluoresceinu (FAM™) pažymėtoms ieškomoms medžiagoms aptikti, ir vidinis kontrolinis tyrimas, pažymėtas heksachlorofluoresceinu (HEX™). Vidinis kontrolinis tyrimas leidžia aptikti inhibitorius, kurie gali lemti klaidingai neigiamus rezultatus. FAM amplifikacija gali nukonkuruoti vidinės kontrolinės medžiagos amplifikaciją, nes vidinės kontrolinės medžiagos tikslas yra tiesiog parodyti, kad tuo atveju, jei FAM amplifikacijos nėra, tai yra teisingas neigiamas rezultatas, o ne nepavykusi PGR reakcija.

Tyrimai

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ sudaro dviejų žingsnių procedūra. Pirmajame etape kontrolinis tyrimas naudojamas visam amplifikuojamos EGFR DNR kiekiui mėginyje įvertinti. Antrajame etape mutacijos ir kontroliniai tyrimai atliekami siekiant nustatyti mutacinės DNR buvimą ar nebuvimą.

Kontrolinis tyrimas

Kontrolinis tyrimas, pažymėtas FAM, naudojamas visam amplifikuojamos EGFR DNR kiekiui mėginyje įvertinti. Kontrolinio tyrimo metu amplifikuojamas EGFR geno 2 egzono regionas. Pradmenys ir „Scorpions“ zondai sukurti taip, kad būtų išvengta bet kokių žinomų EGFR polimorfizmų.

Mutacijų tyrimai

Kiekvieno mutacijų tyrimo sudėtyje yra FAM pažymėtas „Scorpions“ zondas ir ARMS pradmuo, naudojamas norint atskirti laukinio tipo DNR ir specifinę mutavusią DNR.

Kontrolinės medžiagos

Pastaba. Visuose eksperimentiniuose tyrimuose turi būti teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos.

Teigiama kontrolinė medžiaga

Kiekviename tyrime 1–8 mėgintuvėliuose turi būti teigiama kontrolinė medžiaga. „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ yra EGFR teigiama kontrolinė medžiaga (Positive Control, PC), kuri naudojama kaip teigiamos kontrolinės medžiagos reakcijos matrica. Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai įvertinami siekiant įsitikinti, kad rinkinys veikia pagal nurodytus priimtumo kriterijus.

Neigiamos kontrolinės medžiagos

Kiekviename tyrime turi būti neigiama kontrolinė medžiaga („kontrolinė medžiaga be matricos“, No Template Control, NTC) turi būti 9–16 mėgintuvėliuose. „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ yra NTC skirto vandens, naudojamo kaip kontrolinės medžiagos be matricos „matrica“. Kontrolinė medžiaga be matricos naudojama siekiant įvertinti bet kokią galimą užteršimą tyrimo nustatymo metu ir vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos veiksmingumą.

Vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos įvertinimas

Kiekviename reakcijos mišinyje kartu su tikslinės reakcijos medžiaga yra vidinė kontrolinė (Internal Control, IC) medžiaga. Nepavykusi reakcija rodo, kad gali būti inhibitorių, dėl kurių gaunami netikslūs rezultatai, arba kad nustatydama šį mėgintuvėlį operatorius padarė klaidą. IC naudojama su EGFR nesusijusi oligonukleotido tikslinė seka, nepažymėtas pradmuo ir „Scorpions“ pradmuo, pažymėtas HEX, kad jį būtų galima atskirti nuo FAM pažymėto „Scorpions“ kontroliniuose ir mutacijų reakcijos mišiniuose. FAM amplifikacija gali nukonkuoti IC amplifikaciją tiek, kad sugeneruota IC C_T (HEX) reikšmė nepateks į nurodytą diapazoną. Šių mėginių FAM rezultatai vis tiek galioja.

Mėginių įvertinimas

Visam amplifikuojamos EGFR DNR kiekiui mėginyje nustatyti primygtinai rekomenduojame naudoti kontrolinės reakcijos mišinį (mėgintuvėlis CTRL), pateikiamą su „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Kontrolinio tyrimo metu amplifikuojamas EGFR geno 2 egzono regionas. Rekomenduojame mėginius nustatyti naudojant tik kontrolinį tyrimą, kaip teigiamą kontrolinę medžiagą naudojant EGFR PC, o kaip kontrolinę medžiagą be matricos naudojant „matricos“ vandenį.

Pastaba. DNR įvertinimas turėtų būti pagrįstas PGR ir gali skirtis nuo apskaičiavimo, pagrįsto absorbcijos rodmenimis. Papildomas kontrolinės reakcijos mišinys (mėgintuvėlis CTRL) tiekiamas, kad būtų galima įvertinti mėginiuose esančios DNR kokybę ir kiekybę prieš vykdant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ analizę.

Platforma ir programinė įranga

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rinkinys skirtas naudoti konkrečiai su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentais. „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentas suprogramuotas pagal įvairių ciklų parametrus, arba „tyrimus“ naudojant „*therascreen* EGFR CE Assay Package“.

„*therascreen* EGFR CE Assay Package“ sudarytas iš dviejų šablonų: „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ (mėginiams įvertinti) ir „*therascreen* EGFR CE Locked Template“ (EGFR CE mutacijoms aptikti). Šiuose šablonuose nurodyti PGR tyrimo parametrai ir apskaičiuojami rezultatai.

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ taip pat galima naudoti su 2.3 versijos „Rotor-Gene Q“ programine įranga atviruoju režimu (t. y. nenaudojant „Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package“). Daugiau informacijos žr. Priedas A: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rankinio paruošimo protokolas.

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

therascreen EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Katalogo nr.				874111
Reakijų skaičius				24
Spalva	Identifikatorius	Mėgintuvėlio ID		Tūris
Raudona	Control Reaction Mix (Kontrolinės reakcijos mišinys)	1	CTRL	2 x 600 µl
Violetinė	T790M Reaction Mix (T790M reakcijos mišinys)	2	T790M	600 µl
Oranžinė	Deletions Reaction Mix (Delecijų reakcijos mišinys)	3	Del	600 µl
Rožinė	L858R Reaction Mix (L858R reakcijos mišinys)	4	L858R	600 µl
Žalias	L861Q Reaction Mix (L861Q reakcijos mišinys)	5	L861Q	600 µl
Geltona	G719X Reaction Mix (G719X reakcijos mišinys)	6	G719X	600 µl
Pilka	S768I Reaction Mix (S768I reakcijos mišinys)	7	S768I	600 µl
Mėlyna	Insertions Reaction Mix (Intarpų reakcijos mišinys)	8	Ins	600 µl
Rusvai gelsva	EGFR Positive Control (EGFR teigiama kontrolinė medžiaga)	9	PC	300 µl
Žalsva	Taq DNA Polymerase (Taq DNR polimerazė)	Taq	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Balta	Nuclease-free water for No Template Control (Vanduo be nukleazės, skirtas kontrolinei medžiagai be matricos)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Balta	Nuclease-free water for Dilution (Vanduo be nukleazės skiedimui)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
„therascreen EGFR RGQ PCR Kit“ vadovas				1

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (Safety Data Sheet, SDS), kuriuos gali pateikti gaminio tiekėjas.

Reagentai

- DNR išskyrimo rinkinys (žr. DNR išskyrimas ir paruošimas)

Reikmenys ir bendra laboratorijos įranga

- Specialios pipetės* (reguliuojamos), skirtos mėginiams ruošti
- Specialios pipetės* (reguliuojamos), skirtos PGR pagrindiniams mišiniams ruošti
- Specialios pipetės* (reguliuojamos), skirtos DNR matricai paskirstyti
- Pipečių antgaliai su filtrais be DNazės, RNazės ir DNR (siekiant išvengti kryžminio užteršimo, rekomenduojama naudoti pipečių antgalius su aerozoliniais barjeriais)
- „Strip Tubes and Caps, 0.1 ml“, skirti naudoti su „72-well rotor“ (kat. nr. 981103 arba 981106)
- Mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai be DNazės, RNazės ir DNR, skirti pagrindiniams mišiniams ruošti
- „Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes“, aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete (kat. nr. 9018901)
- Termostatinis maišytuvas*, šildomas žiedinis maišymo inkubatorius*, kaitinimo blokas* arba vandens vonelė*, kurioje galimas inkubavimas esant 90 °C
- Stalinė centrifuga* su rotoriumi 2ml reakcijos mėgintuvėliams
- Sūkurinis maišytuvas*

* Įsitikinkite, kad visi instrumentai ir įranga patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

PGR įranga

- „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentas su fluorescenciniais kanalais „Cycling Green“ ir „Cycling Yellow“ (atitinkamai FAM ir HEX aptikti)* †
- „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos 2.3 versija
- „Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package CD“, 3.0.5 versija (kat. nr. 9023537)

Pastaba. „Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package“ programinei įrangai reikalinga 2.3 versijos „Rotor-Gene Q“ programinė įranga.

* Įsitikinkite, kad visi instrumentai ir įranga patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

† Kai kuriose šalyse, jei yra, galima naudoti „Rotor-Gene Q 5plex HRM“ instrumentą, pagamintą 2011 m. gegužės mėn. arba vėliau. Gamybos datą galima sužinoti iš serijos numerio, esančio ant instrumento galinės dalies. Serijos numerio formatas yra „mmMMnnn“, kur „mm“ nurodo gamybos mėnesį skaitmenimis, „MM“ – paskutinius du gamybos metų skaitmenis, o „nnn“ – unikalų instrumento identifikatorių.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta in vitro diagnostikai

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (Safety Data Sheets, SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

Su „Rotor-Gene Q“ instrumentu susijusios saugos informacijos ieškokite su instrumentu pateiktame naudotojo vadove.

Mėginių ir tyrimų atliekas išmeskite laikydamiesi vietinių saugos reikalavimų.

Bendrosios atsargumo priemonės

Visada atkreipkite dėmesį į toliau aprašytus dalykus.

- Testas skirtas naudoti su FFPE NSCLC audinių mėginiais.
- Teigiamas medžiagas (mėginius ir teigiamas kontrolines medžiagas) laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo visų kitų reagentų, dėkite juos į reakcijos mišinį erdviškai atskirtoje patalpoje.
- Būkite ypač atsargūs, kad neužterštumėte PGR reakcijų sintetinė kontroline medžiaga. Reakcijos mišiniams paruošti ir DNR matricai pridėti rekomenduojama naudoti atskiras specialias pipetes. Reakcijos mišiniai turi būti ruošiami ir paskirstomi kitoje vietoje nei ta, kurioje pridedama matrica. Pabaigus PGR tyrimą, „Rotor-Gene Q“ mėgintuvėlių atidaryti negalima. Taip išvengsite laboratorijos užteršimo galutiniais PGR produktais.
- Visos cheminės ir biologinės medžiagos yra potencialiai pavojingos. Mėginiai yra potencialiai užkrečiami ir turi būti naudojami kaip biologiška pavojingos medžiagos.

- „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ reagentai yra optimaliai atskiesti. Daugiau reagentų neskieskite, nes gali sumažėti jų veiksmingumas. Nenaudokite mažesnių nei 25 µl reakcijos tūrių (reakcijos mišinys su mėginiu), nes tai didina klaidingai neigiamų rezultatų riziką.
- Visi „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ sudėtyje esantys reagentai numatyti naudoti tik su kitais reagentais iš to paties „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Nesukeiskite „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ arba skirtinguose „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ esančių reagentų, nes tai gali turėti įtakos veiksmingumui.
- Naudokite tik *Taq* DNR polimerazę (mėgintuvėlis *Taq*), pateiktą „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Nepakeiskite jos kita *Taq* DNR polimeraze iš to paties ar kito tipo rinkinio, taip pat nekeiskite *Taq* DNR polimeraze, gauta iš kito tiekėjo.
- Pasibaigus tinkamumo laikui, komponentų naudoti negalima.

Pastaba. Norint užtikrinti tinkamą mėginių tyrimą reikia būti atidiems ir ypač stengtis pašalinti netinkamo mėginio įvedimo, įkėlimo ir lašinimo pipete klaidas.

Pastaba. Reagentai patvirtinti rankiniam nustatymui. Jei naudojamas automatizuotas metodas, galimų reakcijų skaičius gali sumažėti dėl instrumentų „nulinį tūrį“ reikalingo užpildyti reagento.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Gabenimo sąlygos

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ turi būti gabenamas sausame lede ir pristatymo metu turi būti užšaldytas. Jei pristatymo metu „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ nėra užšaldytas, pervežant buvo atidaryta išorinė pakuotė, nėra važtaraščio, naudojimo instrukcijų arba reagentų, susisieki su QIAGEN techninės priežiūros skyriumi arba vietiniu platintoju (žr. galinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Laikymo sąlygos

Gavus „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, jį iš karto reikia padėti laikyti nuo -30 iki -15 °C temperatūroje, pastovią temperatūrą palaikančiame ir apsaugotame nuo šviesos šaldiklyje. „Scorpions“ (kaip ir visos fluorescenciškai pažymėtos molekulės) turi būti saugomi nuo šviesos, kad neišbluktų ir nesumažėtų jų veiksmingumas. Laikant rekomenduojamomis laikymo sąlygomis originalioje pakuotėje rinkinys yra stabilus iki ant etiketės nurodytos tinkamumo datos.

Atidarytus reagentus temperatūroje nuo -30 °C iki -15 °C galima laikyti originalioje pakuotėje iki 12 mėnesių arba iki nurodytos galiojimo pabaigos datos, atsižvelgiant į tai, kuris laikotarpis pasibaigs pirmiausia. Venkite pakartotinai atšildyti ir užšaldyti. Rekomenduojame ne daugiau nei aštuonis užšaldymo ir atšildymo ciklus.

Reagentus reikia atšildyti kambario temperatūroje (15–25 °C) – mažiausiai 1 valandą, ilgiausiai – 4,5 valandos. Kai reagentai bus paruošti naudoti, bus galima nustatyti PGR reakcijas ir „Rotor-Gene Q“ vamzdelius su pagrindiniais mišiniais ir DNR mėginį reikia nedelsiant įdėti į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ prietaisą. Bendras laikas nuo PGR sąrankos pradžios iki procedūros pradžios negali viršyti:

- 6 valandų, jei laikoma kambario temperatūroje

Pastaba. Šis laikas apima PGR nustatymą ir laikymą.

- 18 valandų, jei laikoma šaldytuve (2–8 °C)

Pastaba. Šis laikas apima PGR nustatymą ir laikymą.

Pastaba. Norint užtikrinti optimalų aktyvumą ir eksploatacines savybes, „Scorpions“ (kaip ir visos fluorescenciškai pažymėtos molekulės) turi būti saugomi nuo šviesos, kad neišbluktų.

Pastaba. Norėdami optimaliai panaudoti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ reagentus, mėginius turite apdoroti partijomis. Jei mėginiai tiriami atskirai, sunaudojama daugiau reagentų, todėl sumažėja mėginių, kuriuos galima ištirti naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, skaičius.

Bandinių naudojimas ir laikymas

Pastaba. Su visais mėginiais turi būti elgiamasi kaip su potencialiai užkrečiama medžiaga.

Mėginių medžiaga turi būti žmogaus genomine DNR, išskirta iš FFPE audinio. Mėginius būtina transportuoti pagal standartinį pataloginį metodą, kad būtų užtikrinta mėginių kokybė.

Auglio mėginiai yra nehomogeniški, o auglio mėginio duomenys gali neatitikti kitų to paties auglio dalių mėginių duomenų. Auglio mėginiuose taip pat gali būti ne auglio audinių. Ne auglio audinio DNR neturi mutacijų, aptinkamų naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“.

Toliau aprašyta, kaip paruošti audinių mėginius DNR išskyrimui.

- Naudodami įprastas medžiagas ir metodus, užfiksuokite audinio bandinį 10 % neutraliu buferiniu skysčiu atskiestame formaline (Neutral Buffered Formalin, NBF), tada audinio bandinį įdėkite į parafiną. Nuo parafino bloko mikrotomu atpjaukite 5 µm atpjovų seką ir uždėkite ant objektinių stiklelių.
- Pasitelkite patyrusį asmenį (pvz., patologą), kad jis įvertintų hematoksilinu ir eozinu (H&E) nudažytą atpjovą ir patvirtintų, kad yra auglio ląstelių.
- DNR išskyrimui negalima naudoti dažytų atpjovų.
- Visus FFPE blokus ir objektinius stiklelius laikykite kambario temperatūroje (15–25 °C). Prieš pradėdami išskirti DNR, objektinius stiklelius galima laikyti kambario temperatūroje iki 1 mėn.

Procedūra

DNR išskyrimas ir paruošimas

Šio rinkinio efektyvumo charakteristikos sugeneruotos naudojant DNR, išskirtą pasitelkus „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ (kat. nr. 60404). Šis rinkinys turi būti naudojamas DNR paruošimui, jei yra prieinamas jūsų šalyje. Jei naudojate funkcinę prasmę lygiavertį „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ (kat. nr. 56404), DNR išskyrimą atlikite pagal vadove pateiktas instrukcijas ir atkreipkite dėmesį į toliau nurodytus dalykus.

- Nenaudokite QIAGEN „Deparaffinization Solution“. Deparafinizuokite naudodami tik ksileno / etanolio metodą, aprašytą „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ vadove.
- Kur reikia, naudokite molekulinės biologijos klasės etanolį*.
- Nugrandykite visą audinio plotą nuo dviejų atplovimų pažymėtą mikrocentrifugos mėgintuvėlį, kiekvienam mėginiui naudodami naują skalpelį.
- Proteinazės K veikimas (11 veiksmas, aprašytas „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ vadove) turi tęstis 1 val. ± 5 min., esant 56 °C ± 3 °C.
- Proteinazės K veikimas (12 veiksmas, aprašytas „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ vadove) turi tęstis 1 val. ± 5 min., esant 90 °C ± 3 °C.
- Neatlikite ribonukleazės veikimo, aprašyto „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ vadove.
- Mėginiai turi būti išplauti 120 µl eliuavimo buferiniu tirpalu (ATE) iš „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ (20 veiksmas, aprašytas „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ vadove).
- Prieš naudojimą išskirta genominė DNR gali būti laikoma 2–8 °C temperatūroje 1 savaitę arba nuo –30 iki –15 °C temperatūroje iki 8 savaičių.

Pastaba. Visų „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ esančių tyrimų metu sugeneruojami trumpi PGR produktai. Vis dėlto „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ neveiks stipriai fragmentuotos DNR.

* Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletilketono.

Protokolas. Mėginių įvertinimas

Šis protokolas naudojamas visam amplifikuojamam DNR kiekiui mėginiuose įvertinti, naudojant „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ iš „Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package“, skirto automatizuotam mėginių vertinimui.

Pastaba. Informacijos apie neautomatinį DNR mėginių vertinimą ieškokite Priedas A: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rankinio paruošimo protokolas.

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš pradėdami procedūrą, paskaitykite skyrių Bendrosios atsargumo priemonės.
- Prieš pradėdami protokolą, skirkite laiko susipažinti su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu. Žr. instrumento naudotojo vadovą.
- Nevartykite *Taq* ar bet kokio mišinio, kuriame yra *Taq*, nes tai gali deaktyvinti fermentą.
- Pipete įlašinkite *Taq*: pipetės antgalį įkiškite skysčio paviršiuje, kad antgalis nepasidengtų fermentų pertekliumi.
- Naudojant turimą kontrolinį reakcijų mišinį galima įvertinti iki 24 mėginių.

Ką atlikti prieš pradėdant

- Prieš pirmą kartą naudodami „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentą, įsitinkinkite, kad įdiegta „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ programinė įranga (žr. B priedas: „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ diegimas).
- Prieš kiekvieną naudojimą visus reagentus reikia visiškai atšildyti kambario temperatūroje (15–25 °C) bent 1 valandą, bet ne ilgiau kaip 4,5 valandas, sumaišyti (vartant 10 kartų) ir trumpai centrifuguoti, kad turinys susirinktų mėgintuvėlio apačioje.
- Sumaišykite visus mėginius, pavartydami 10 kartų ir trumpai centrifuguokite, kad turinys susirinktų mėgintuvėlio apačioje.
- Kiekvieną kartą prieš naudodami įsitinkinkite, kad *Taq* yra kambario temperatūros (15–25 °C). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

Procedūra

1. Atšildykite kontrolinės reakcijos mišinį (CTRL), vandenį be nukleazės, skirtą kontrolinei medžiagai be matricos (No Template Control, NTC), ir EGFR teigiamą kontrolinę medžiagą (Positive Control, PC) kambario temperatūroje (15–25 °C) bent 1 valandą, bet ne ilgiau kaip 4,5 valandas.

Reagentų atšildymo, PGR nustatymo ir laikymo prieš pradėdant tirti laikas nurodytas 2 lentelėje.

2 lentelė. Atšildymo laikas, PGR nustatymo laikas ir laikymo temperatūra

Mažiausias atšildymo laikas	Didžiausias atšildymo laikas	Laikymo temperatūra nustačius PGR	Maksimalus PGR nustatymo ir laikymo laikas
1 val.	4,5 val.	Kambario temperatūra (15–25 °C)	6 val.
1 val.	4,5 val.	2–8 °C	18 val.

Pastaba. PGR nustatymas atliekamas kambario temperatūroje (15–25 °C). „Laikymas“ reiškia laiką nuo PGR nustatymo pabaigos iki tyrimo „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu pradžios.

Pastaba. Perkelkite *Taq* į kambario temperatūrą (15–25 °C) tuo pačiu metu kaip ir kitus reagentus (žr. Reagentų laikymas ir naudojimas). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

2. Reagentams atšilus, sumaišykite (vartydami 10 kartų), kad nesusikauptų druskos, ir trumpai centrifuguokite, kad turinį galėtumėte surinkti nuo mėgintuvėlio dugno.
3. Paruoškite pakankamai kontrolinio pagrindinio mišinio (kontrolinės reakcijos mišinį [CTRL] ir *Taq*) DNR mėginiams, EGFR PC reakcijai ir NTC reakcijai pagal 3 lentelėje nurodytus tūrius. Įtraukite reagentus vienam papildomam mėginiui, kad jų pakaktų PGR nustatyti.

Pastaba. Pagrindiniame mišinyje yra visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

3 lentelė. Kontrolinio tyrimo pagrindinio mišinio ruošimas

Komponentas	Tūris
Kontrolinės reakcijos mišinys (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
Taq DNR polimerazė (Taq)	0,5 µl × (n + 1)
Bendrasis tūris	20 µl/reakcijai

* n = reakcijų skaičius (mėginių ir kontrolinių medžiagų). Paruoškite pakankamai pagrindinio mišinio vienam papildomam mėginiui (n + 1), kad būtų pakankamas perteklius nustatant PGR. n reikšmė neturi viršyti 26 (24 mėginiai ir 2 kontrolinės medžiagos).

Pastaba. Ruošiant pagrindinį mišinį, pirmiausia į atitinkamą mėgintuvėlį pridama reikiamo tūrio kontrolinės reakcijos mišinio, o Taq pridama paskutinė.

- Gerai sumaišykite pagrindinį mišinį lėtai lašindami pipete į viršų ir į apačią 10 kartų. Į įkrovos bloką įdėkite reikiamą skaičių mėgintuvėlių juostelių pagal 4 lentelėje pateiktą išdėstymą. Nedelsdami įpilkite 20 µl pagrindinio mišinio į kiekvieną PGR mėgintuvėlių juostelę.

Dangteliai turi likti plastikiniame indelyje, kol jų prireiks. Norint įvertinti DNR mėginį, kontrolinio tyrimo pagrindinio mišinio įdedama į vieną PC mėgintuvėlį, vieną NTC mėgintuvėlį ir vieną kiekvieno mėginio mėgintuvėlį.

4 lentelė. DNR mėginių įvertinimo tyrimų išdėstymas įkrovos bloke. Skaičiai reiškia vietas įkrovos bloke ir nurodo galutinę rotoriaus padėtį.

Tyrimas	Padėtis								
Kontrolinis	1[PC]	9	17	25	–	–	–	–	–
Kontrolinis	2[NTC]	10	18	26	–	–	–	–	–
Kontrolinis	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Kontrolinis	4	12	20	–	–	–	–	–	–
Kontrolinis	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Kontrolinis	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Kontrolinis	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Kontrolinis	8	16	24	–	–	–	–	–	–

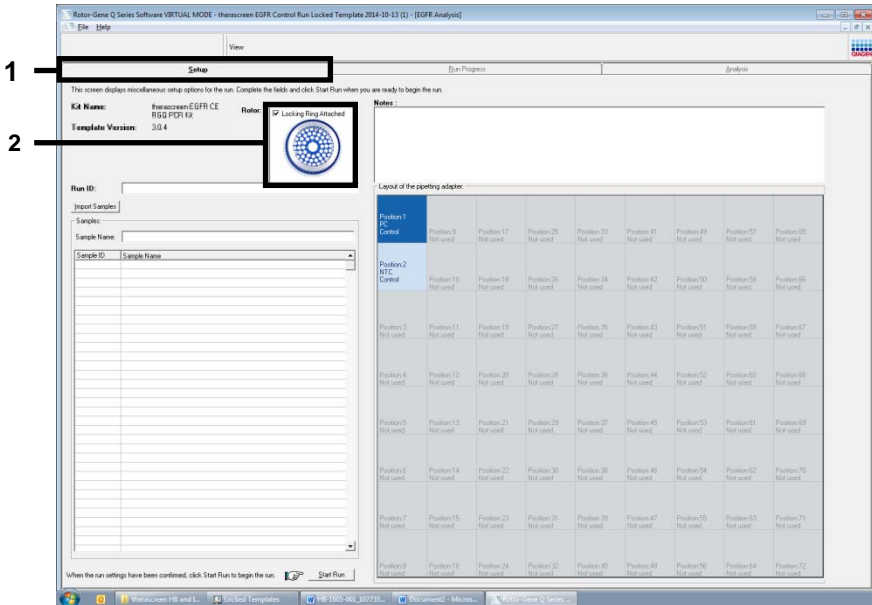
- Iškart įpilkite 5 µl NTC skirto vandens į 2 vietoje esantį mėgintuvėlį ir jį uždenkite.

6. Įpilkite po 5 µl kiekvieno mėginio į mėginių mėgintuvėlius (3–26 mėgintuvėlių vietos) ir uždenkite juos dangteliais.
7. Įpilkite 5 µl EGFR PC į 1 vietoje esantį mėgintuvėlį ir jį uždenkite.
Stenkitės išvengti įkėlimo arba lašinimo pipete klaidų, kad NTC, mėginiai ir PC būtų įpilti į tinkamus mėgintuvėlius. Pažymėkite mėgintuvėlių dangtelius, kuria kryptimi jie turi būti įdėti į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentą.
8. Uždarę visus PGR mėgintuvėlius, apžiūrėkite mėginių mėgintuvėlių užpildymo lygį, kad įsitikintumėte, jog mėginio buvo įpilta į visus mėgintuvėlius.
9. Pavartykite visus PGR mėgintuvėlius keturis kartus, kad susimaišytų mėginiai ir reakcijos mišiniai.
10. Įdėkite PGR mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas 72 šulinėlių rotoriaus vietas pagal 4 lentelėje pateiktą išdėstymą.
Jei rotorius nevisiškai užpildytas, visas tuščias rotoriaus vietas užpildykite uždengtais tuščiais mėgintuvėliais.
11. Nedelsdami įdėkite 72 šulinėlių rotorių įdėkite į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentą. Įsitinkite, kad fiksuojamasis žiedas („Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento priedas) yra uždėtas ant rotoriaus, kad tyrimo metu mėgintuvėliai būtų įtvirtinti.
Pastaba. Jei atliekate neautomatinį mėginių vertinimą, žr. Priedas A: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rankinio paruošimo protokolas.
12. Dukart spustelėkite piktogramą „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ (*therascreen* EGFR CE Control Run Locked šablonas), esančią kompiuterio, prijungto prie „Rotor-Gene Q MDx“ instrumento, darbalaukyje, kad paleistumėte „Rotor-Gene Q“ programinę įrangą (1 pav.).



1 pav. Piktograma „EGFR CE Locked šablonas“, skirta kontroliniam tyrimui (mėginio įvertinimui).

13. Kaip numatytasis atidaromas skirtukas „Setup“ (Nustatymas) (2 pav.). Įsitinkinkite, kad fiksuojamasis žiedas tinkamai uždėtas, tada pažymėkite langelį **Locking Ring Attached** (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Uždarykite „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento dangtelį.



2 pav. Skirtukas „Setup“ (Nustatymas) (1) ir laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas) (2).

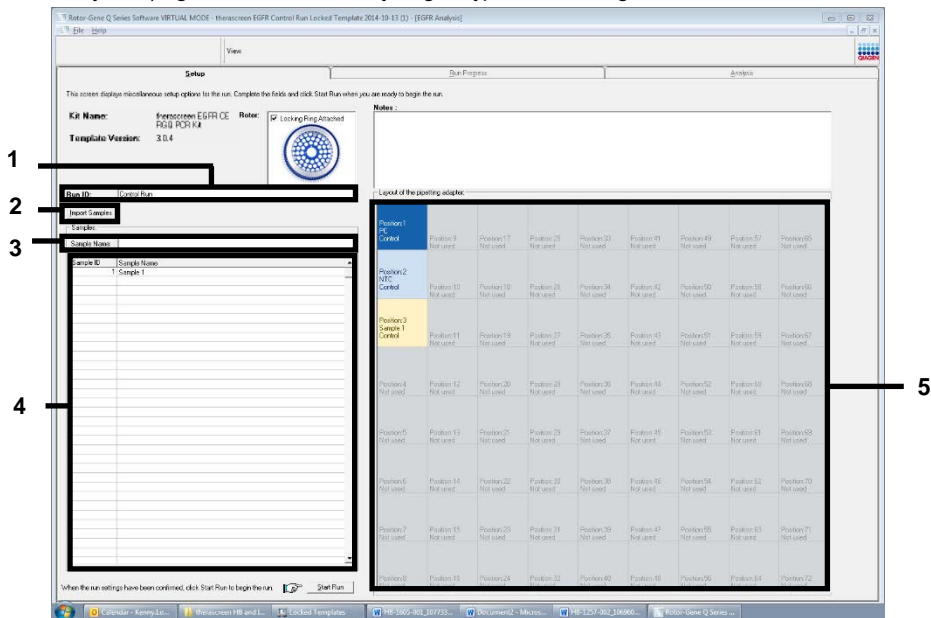
14. Lauke **Run ID** (Tyrimo ID) įveskite tyrimo ID pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką. Lauke **Sample Name** (Mėginio pavadinimas) įveskite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką ir paspauskite klavišą Return (įvedimas).

Taip į toliau pateiktą mėginių sąrašą įtraukiamas mėginio pavadinimas ir priskiriamas „Sample ID“ (Mėginio ID) (1, 2, 3 ir t. t.). Be to, atnaujinamas dešinėje pusėje esantis skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ir įtrauktas mėginio pavadinimas (3 pav.).

Pastaba. Arba *.smp („Rotor-Gene Q“ mėginio failas) ar *.csv (kableliais atskirtos reikšmės) formatais saugomus mėginių pavadinimus galima importuoti naudojant funkciją **Import Samples** (Importuoti mėginius). Naudojant šį metodą, mėginių pavadinimai įrašomi automatiškai.

Pastaba. Patikrinkite, ar skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) įtraukus mėginio pavadinimą, jis paryškintas pasikeitusia spalva, o mėginio pavadinimas yra mėginio vietoje (3 pav.).

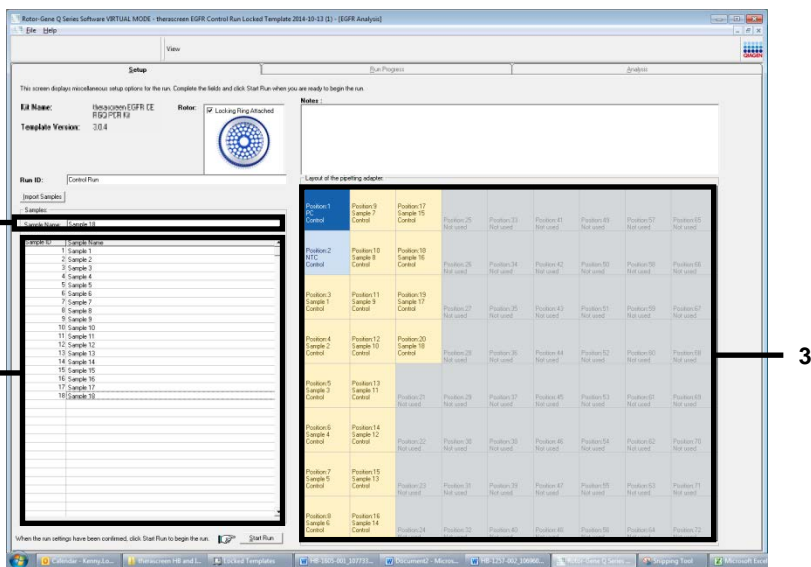
Pastaba. Skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ilgesni nei 8 simbolių mėginių pavadinimai gali būti rodomi ne visi.



3 pav. „Run ID“ (Tyrimo ID) ir „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) įvedimas. 1 = dialogo lango laukas „Run ID“ (Tyrimo ID); 2 = skydas „Import Samples“ (Mėginių importavimas); 3 = dialogo lango laukas „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas); 4 = „Sample list“ (Mėginių sąrašas); 5 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas).

15. Kartokite 14 veiksmą, kol įvesite visus kitus mėginių pavadinimus (4 pav.).

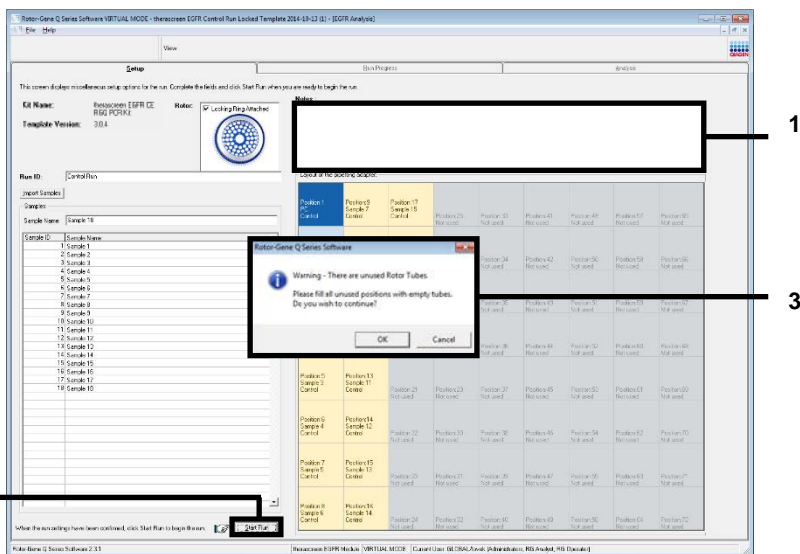
Pastaba. Norėdami redaguoti mėginio pavadinimą, mėginių sąraše spustelėkite **Sample Name** (Mėginio pavadinimas) ir pasirinktas mėginys bus rodomas viršuje, lauke **Sample Name** (Mėginio pavadinimas). Paredaguokite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką ir paspauskite klavišą Return (įvedimas), kad pavadinimą atnaujintumėte.



4 pav. Papildomų mėginių pavadinimų įvedimas į dialogo lango lauką „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas). 1 = dialogo lango laukas „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas), 2 = „Sample List“ (Mėginių sąrašas), 3 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas).

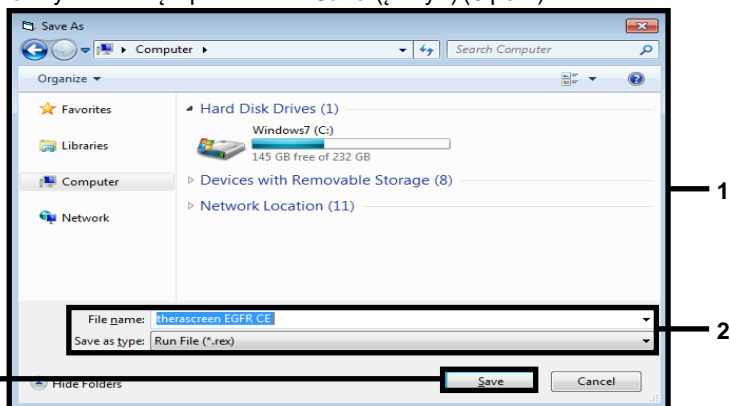
16. Kai įvesite visus mėginių pavadinimus, patikrinkite, ar jie teisingi. Jei reikia, lauke **Notes** (Pastabos) įtraukite papildomos informacijos ir spustelėkite **Start Run** (Pradėti tyrimą) (5 pav.).

Pastaba. Jei kuri nors rotoriaus vieta neužimta, rodomas „Warning“ (Ispėjimas) (5 pav.), kad primintų naudotojui, jog reikia užpildyti visas nenaudojamas rotoriaus vietas uždengtais tuščiais mėgintuvėliais. Patikrinkite, ar visos nenaudojamos rotoriaus vietos užpildytos uždengtais tuščiais mėgintuvėliais, ir norėdami tęsti spustelėkite **OK** (Gerai). Bus atidarytas langas „Save As“ (Irašyti kaip).



5 pav. Dialogo langas „Notes“ (Pastabos) (1), mygtukas „Start Run“ (Pradėti tyrimą) (2) ir „Warning“ (Įspėjimas) apie neužimtas rotoriaus vietas (3).

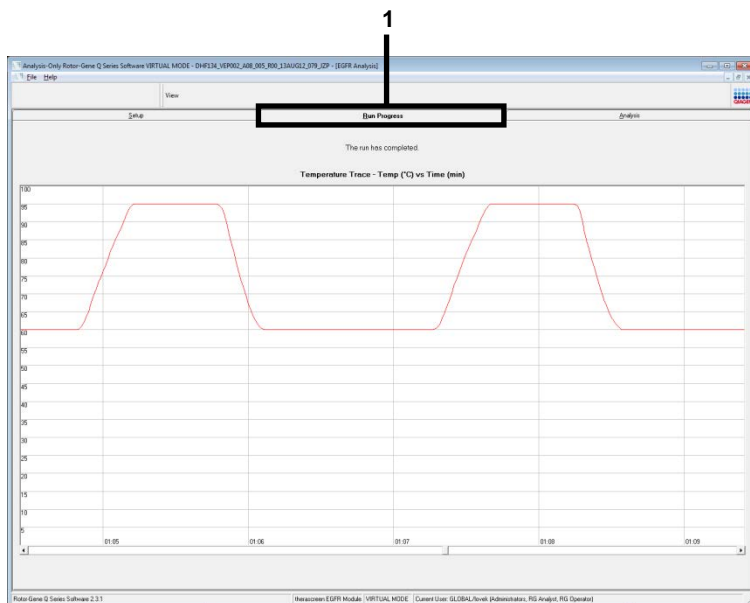
17. Pasirinkite atitinkamą failo pavadinimą ir pasirinktoje vietoje įrašykite PGR tyrimą kaip *.rex tyrimo failą. Spustelėkite **Save** (Įrašyti) (6 pav.).



6 pav. Langas „Save As“ (Įrašyti kaip) (1). 2 = Laukai „File Name“ (Failo vardas) ir „Save as type“ (Įrašomo failo tipas); 3 = „Save“ (Įrašyti).

Pradedamas PGR tyrimas.

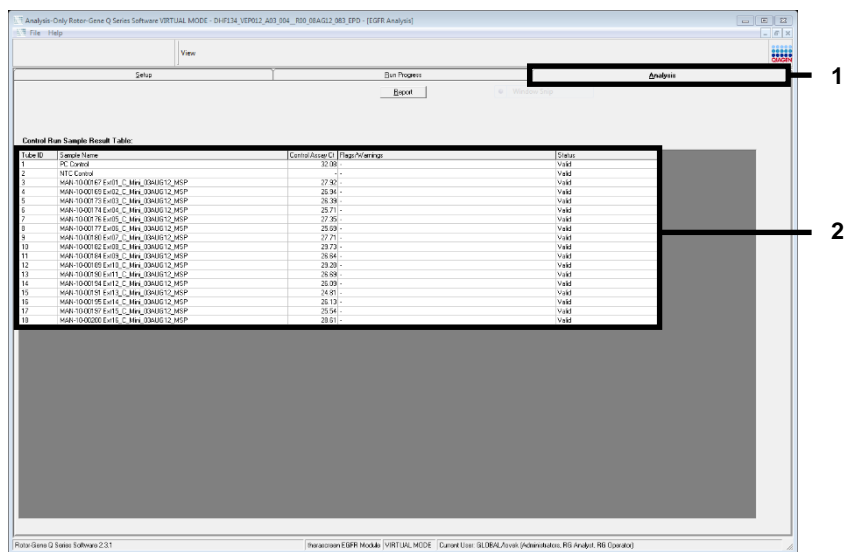
Pastaba. Pradėjus tirti automatiškai atidaromas skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga), kuriame rodoma temperatūros kreivė ir likęs laikas (7 pav.).



7 pav. Skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga) (1).

Pastaba. Baigus tirti, automatiškai atidaromas skirtukas „Analysis“ (Analizė). Jei skirtukas Analysis (Analizė) neatidaromas, spustelėkite jį (8 pav.).

Pastaba. Skaičiavimo metodo paaiškinimas pateiktas skyriuje „Rezultatų aiškinimas (automatinis)“.



8 pav. Skirtukas „Analysis“ (Analizė) (1) ir pateikti rezultatai (2 = „Control Run Sample Result Table“ (Kontrolinio mėginio pavyzdžio rezultatų lentelėje).

Kontroliniai rezultatai pateikiami „Control Run Sample Result Table“ (Kontrolinio mėginio pavyzdžio rezultatų lentelėje), kaip nurodyta toliau (8 pav.).

Tyrimo kontrolinės medžiagos (PC ir NTC, atitinkamai 1 ir 2 mėgintuvėlių vietos). Jei rezultatai yra priimtiniuose intervaluose, prie kiekvieno rodoma „Valid“ (Tinkama). Priešingu atveju rodomas rezultatas „Invalid“ (Negalioja).

Mėginio kontrolinė reakcija $C_T > 31,10$; rodoma kaip „Invalid“ (Negalioja). Mutacijų analizei nepakankamas DNR kiekis. Ištrinkite mėginį pakartotinai. Jei DNR kiekis vis dar per mažas, išskirkite daugiau auglio audinio, jei yra.

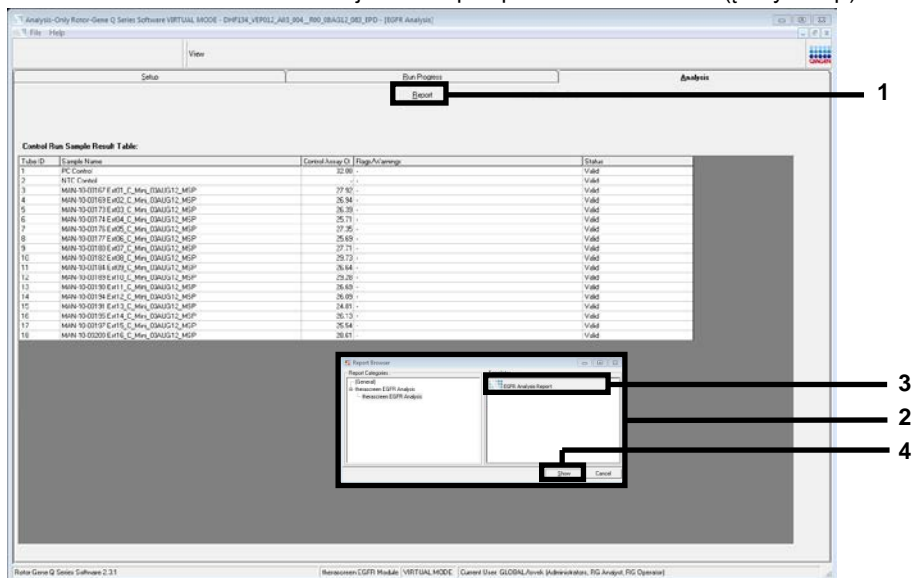
Mėginio kontrolinė reakcija $C_T < 23,70$; rodoma kaip „Invalid“ (Negalioja). Mutacijų analizei per didelė DNR koncentracija. Atskieskite vandeniu be nukleazės, skirtu skiedimui, ir ištrinkite pakartotinai. Atskieskite, kad C_T būtų 23,70–31,10. Skiedimas santykiu 1:1 padidina C_T reikšmę maždaug 1,0.

Mėginio kontrolinė reakcija, kai C_T yra 23,70–31,10 ($23,70 \leq$ kontrolinės medžiagos $C_T \leq 31,10$); rodoma kaip „Valid“ (Tinkama). Mutacijų analizei DNR koncentracija yra tinkama.

Pastaba. Jei reikia papildomai išskirti ar atskiesti, pakartokite kontrolinę reakciją, kad patvirtintumėte DNR koncentracijos tinkamumą naudoti.

18. Spustelėkite **Report** (Ataskaita), kad būtų sukurtas ataskaitos failas. Atidaromas langas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė). Dalyje „Templates“ (Šablonai) pasirinkite **EGFR CE Analysis Report** (EGFR CE analizės ataskaita), o tada spustelėkite **Show** (Rodyti) (9 pav.).

Pastaba. Norėdami įrašyti ataskaitas į kitą vietą internetinio archyvo formatu, kiekvienos ataskaitos viršutiniame kairiajame kampe spustelėkite **Save As** (Įrašyti kaip).



9 pav. „EGFR CE Analysis Report“ (EGFR CE analizės ataskaitos) pasirinkimas. 1 = „Report“ (Ataskaita); 2 = langas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė); 3 = parinktis „EGFR Analysis Report“ (EGFR analizės ataskaita); 4 = „Show“ (Rodyti).

Protokolas. EGFR mutacijos aptikimas

Šis protokolas skirtas EGFR mutacijoms aptikti. Atlikus DNR mėginio įvertinimą, jį galima tirti naudojant EGFR mutacijos tyrimus su automatizuota programine įranga.

Pastaba. Informacijos apie neautomatinį mutacijos aptikimą žr. Priedas A: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rankinio paruošimo protokolas.

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš pradėdami procedūrą paskaitykite skyrių Bendrosios atsargumo priemonės.
- Prieš pradėdami protokolą, skirkite laiko susipažinti su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu. Žr. instrumento naudotojo vadovą.
- Mėginį galima tirti naudojant EGFR mutacijų tyrimus tik atlikus DNR mėginio įvertinimą.
- Norėdami efektyviai naudoti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, mėginius sugrupuokite į partijas po septynis. Naudodami mažesnes partijas, „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ ištirsite mažiau mėginių.
- Mėginį reikia ištirti naudojant visus reakcijos mišinius, pateiktus „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“.
- Nevartykite *Taq* ar kitokio mišinio, kuriame yra *Taq*, nes tai gali deaktyvinti fermentą.
- Pipete įlašinkite *Taq*: pipetės antgalį atsargiai įkiškite skysčio paviršiuje, kad antgalis nepasidengtų fermentų pertekliumi.

Ką atlikti prieš pradėdant

- Prieš pirmą kartą naudodami „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentą, įsitinkinkite, kad įdiegta „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ programinė įranga (žr. B priedas: „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ diegimas).
- Prieš kiekvieną naudojimą visus reagentus reikia visiškai atšildyti kambario temperatūroje (15–25 °C) bent 1 valandą, bet ne ilgiau kaip 4,5 valandas, sumaišyti (vartant 10 kartų) ir trumpai centrifuguoti, kad turinys susirinktų mėgintuvėlio apačioje.

- Sumaišykite visus mėginius, pavartydami 10 kartų ir trumpai centrifuguokite, kad turinys susirinktų mėgintuvėlio apačioje.
- Kiekvieną kartą prieš naudodami įsitikinkite, kad *Taq* yra kambario temperatūros (15–25 °C). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

Procedūra

1. Visus reakcijos mišinių mėgintuvėlius, NTC skirtą vandenį ir EGFR PC atšildykite kambario temperatūroje (15–25 °C) bent 1 valandą, bet ne ilgiau kaip 4,5 valandas.
Reagentų atšildymo, PGR nustatymo ir laikymo prieš pradėdant tirti laikas nurodytas 5 lentelėje.

5 lentelė. Atšildymo laikas, PGR nustatymo laikas ir laikymo temperatūra

Mažiausias atšildymo laikas	Didžiausias atšildymo laikas	Laikymo temperatūra nustačius PGR	Maksimalus PGR nustatymo ir laikymo laikas
1 val.	4,5 val.	Kambario temperatūra (15–25 °C)	6 val.
1 val.	4,5 val.	2–8 °C	18 val.

Pastaba. PGR nustatymas atliekamas kambario temperatūroje (15–25 °C). „Laikymas“ reiškia laiką nuo PGR nustatymo pabaigos iki tyrimo „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu pradžios.

Pastaba. Perkelkite *Taq* (mėgintuvėlį *Taq*) į kambario temperatūrą (15–25 °C) tuo pačiu metu kaip ir kitus reagentus (žr. Reagentų laikymas ir naudojimas). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

2. Reagentams atšilus, sumaišykite (vartydami 10 kartų), kad nesusikauptų druskos, ir trumpai centrifuguokite, kad turinį galėtumėte surinkti nuo mėgintuvėlio dugno.
3. Paruoškite pakankamai tyrimo pagrindinių mišinių (tyrimo reakcijos mišinį ir *Taq*) DNR mėginiams, EGFR PC ir NTC reakcijai pagal 6 lentelėje nurodytus tūrius. Įtraukite reagentus vienam papildomam mėginiui, kad jų pakaktų PGR nustatyti.
Pagrindiniuose mišiniuose yra visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

6 lentelė. Tyrimo pagrindinių mišinių ruošimas

Tyrimas	Reakcijos mišinio mėgintuvėlis	Reakcijos mišinio tūris	Taq DNR polimerazės tūris (mėgintuvėlis Taq)
Kontrolinis	CTRL	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)^*$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)^*$
T790M	T790M	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
Delecijos	Del	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
L858R	L858R	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
L861Q	L861Q	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
G719X	G719X	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
S768I	S768I	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
Intarpai	Ins	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$

* **n** = reakcijų skaičius (mėginių ir kontrolinių medžiagų). Paruoškite pakankamai pagrindinio mišinio vienam papildomam mėginiui ($n + 1$), kad būtų pakankamas perteklius nustatant PGR. **n** reikšmė neturi viršyti septynių (ir kontrolinės medžiagos), nes vienu metu tirti galima daugiausia septynis mėginius.

4. Gerai sumaišykite tyrimo pagrindinius mišinius, lėtai lašindami pipete į viršų ir į apačią 10 kartų. Į įkrovos bloką įdėkite reikiamą skaičių mėgintuvėlių juostelių pagal 7 lentelėje pateiktą išdėstymą. Nedelsdami įpilkite 20 μl atitinkamo tyrimo pagrindinio mišinio į kiekvieną PGR mėgintuvėlių juostelę.

Dangteliai turi likti plastikiniame indelyje, kol jų prireiks.

7 lentelė. Kontrolinio ir mutacijų tyrimų išdėstymas įkrovos bloke. Skaičiai reiškia vietas įkrovos bloke ir nurodo galutinę rotoriaus padėtį.

Tyrimas	Kontrolinės medžiagos		Padėtis						
	PC	NTC	Mėginio numeris						
			1	2	3	4	5	6	7
Kontrolinis	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Delecijos	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Intarpai	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Iškart įpilkite 5 µl NTC skirto vandens į 9–16 vietas esančius mėgintuvėlius ir juos uždenkite.
- Įpilkite po 5 µl kiekvieno mėginio į mėginių mėgintuvėlius (17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64 ir 65–72 mėgintuvėlių vietas) ir uždenkite juos dangteliais.
- Įpilkite 5 µl EGFR PC į 1–8 vietas esančius mėgintuvėlius ir juos uždenkite.
Stenkitės išvengti įkėlimo arba lašinimo pipete klaidų, kad NTC, mėginiai ir EGFR PC būtų įpilti į tinkamus mėgintuvėlius.
Kiekviename mėgintuvėlyje iš viso turi būti 25 µl reakcijos tūris (20 µl tyrimo pagrindinio mišinio, paruošto pagal 3 veiksmą (6 lentelė), ir 5 µl NTC / mėginio / PC). Skaičiai reiškia vietas įkrovos bloke ir nurodo galutinę rotoriaus padėtį.
Pažymėkite mėgintuvėlių dangtelius, kuria kryptimi jie turi būti įdėti į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentą.
- Uždarę visus PGR mėgintuvėlius, apžiūrėkite mėginių mėgintuvėlių užpildymo lygį, kad įsitikintumėte, jog mėginio buvo įpilta į visus mėgintuvėlius.
- Pavartykite visus PGR mėgintuvėlius 4 kartus, kad susimaišytų mėginiai ir reakcijos mišiniai.

10. Įdėkite PGR mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas 72 šulinėlių rotorius pagal 7 lentelėje pateiktą išdėstymą.

Atliekant kiekvieną PGR tyrimą galima įtraukti daugiausia 7 mėginius. Jei rotorius nevisiškai užpildytas, visas tuščias rotorius užpildykite uždengtais tuščiais mėgintuvėliais.

11. Nedelsdami įdėkite 72 šulinėlių rotorius į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentą. Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas („Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento priedas) yra uždėtas ant rotorius, kad tyrimo metu mėgintuvėliai būtų įtvirtinti.

Pastaba. Jei atliksite neautomatinį EGFR mutacijų aptikimą, žr. „Priedas A: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rankinio paruošimo protokolas.

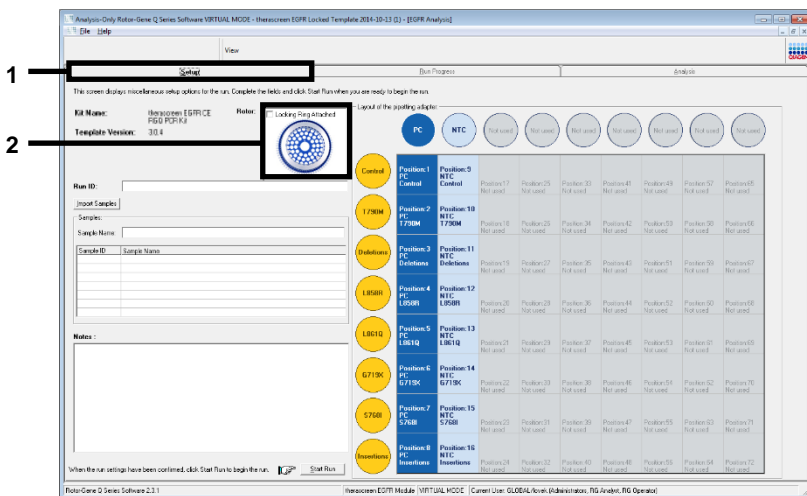
12. Du kartus spustelėkite piktogramą „*therascreen* EGFR CE Locked Template“ (*therascreen* EGFR CE Locked šablonas), esančią nešiojamojo kompiuterio, prijungto prie „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento, ekrane, kad paleistumėte „Rotor-Gene Q“ programinę įrangą (10 pav.).



therascreen EGFR CE
Locked Template

10 pav. Piktograma „EGFR CE Locked Template“ (EGFR CE Locked šablonas) (EGFR mutacijos aptikimas).

13. Kaip numatytasis atidaromas skirtukas „Setup“ (Nustatymas) (11 pav.). Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas tinkamai uždėtas, tada pažymėkite langelį **Locking Ring Attached** (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Uždarykite „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento dangtelį.



11 pav. Skirtukas „Setup“ (Nustatymas) (1) ir laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas) (2).

14. Lauke **Run ID** (Tyrimo ID) įveskite tyrimo ID pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką. Lauke **Sample Name** (Mėginio pavadinimas) įveskite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką ir paspauskite klavišą **Return** (įvedimas).

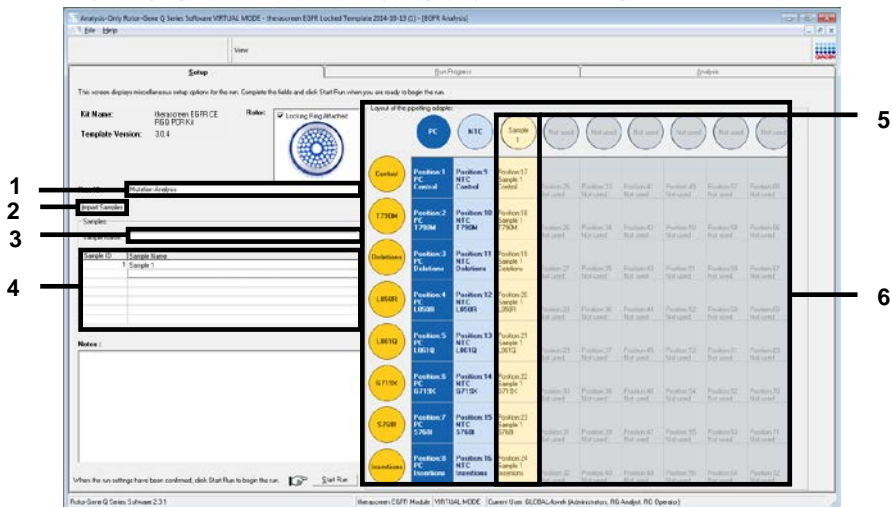
Taip į toliau pateiktą mėginių sąrašą įtraukiamas mėginio pavadinimas ir priskiriamas „Sample ID“ (Mėginio ID) (1, 2, 3 ir t. t.). Be to, atnaujinamas dešinėje pusėje esantis skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ir įtrauktas mėginio pavadinimas (12 pav.).

Pastaba. Arba *.smp („Rotor-Gene Q“ mėginio failas) ar *.csv (kableliais atskirtos reikšmės) formatais saugomus mėginių pavadinimus galima importuoti spustelėjus mygtuką **Import Samples** (Importuoti mėginius). Naudojant šį metodą, mėginių pavadinimai įrašomi automatiškai.

Pastaba. Patikrinkite, ar skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) įtraukus mėginio pavadinimą, jis paryškiamas pasikeitusia spalva, o mėginio pavadinimas yra mėginio vietoje (12 pav.).

Pastaba. Galima pridėti ne daugiau kaip 7 mėginius. Mėginių ID (mėginių skrituluose) automatiškai priskiriami nuo 1 iki 7.

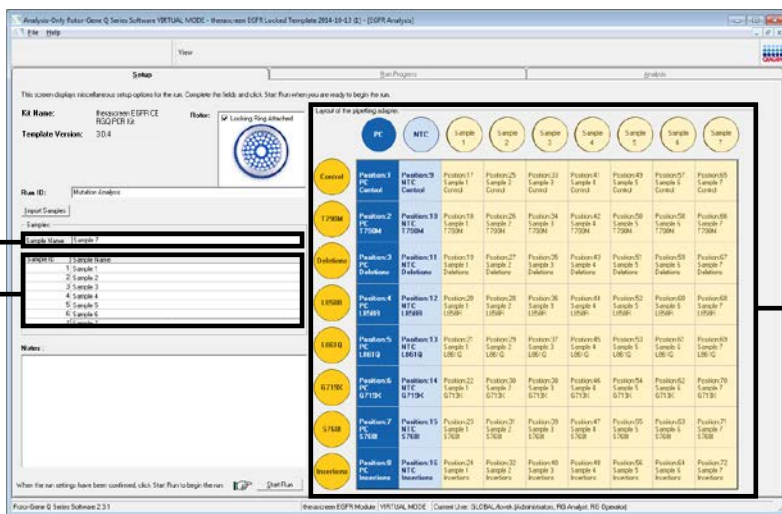
Pastaba. Skyde „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas) ilgesni nei 8 simbolių mėginių pavadinimai gali būti rodomi ne visi.



12 pav. „Run ID“ (Tyrimo ID) ir „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas) įvedimas. 1 = dialogo lango laukąs „Run ID“ (Tyrimo ID); 2 = Mygtukas „Import Samples“ (Mėginio importavimas); 3 = dialogo lango laukąs „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas); 4 = „Sample List“ (Mėginių sąrašas); 5 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas); 6 = paryškintas mėginio apskritimas ir 8 tyrimų stulpelis po juo.

15. Kartokite 14 veiksmą, kol įvesite visus kitus mėginių pavadinimus (13 pav.).

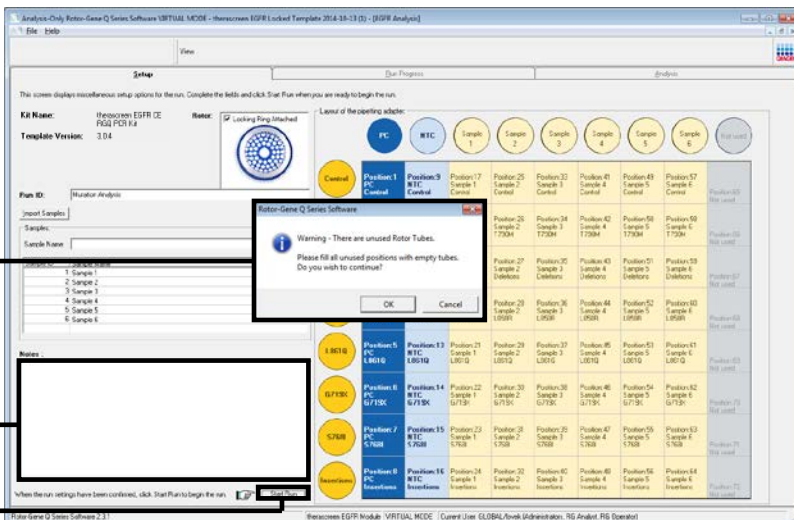
Pastaba. Norėdami redaguoti mėginio pavadinimą, mėginių sąraše spustelėkite **Sample Name** (Mėginio pavadinimas) ir pasirinktas mėginys bus rodomas viršuje, lauke **Sample Name** (Mėginio pavadinimas). Paredaguokite mėginio pavadinimą pagal vietinę pavadinimų suteikimo tvarką ir paspauskite klavišą **Return** (įvedimas), kad pavadinimą atnaujintumėte.



13 pav. Papildomų mėginių pavadinimų įvedimas į dialogo lango lauką „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas). 1 = dialogo lango laukas „Sample Name“ (Mėginio pavadinimas), 2 = „Sample List“ (Mėginių sąrašas), 3 = skydas „Layout of the pipetting adapter“ (Pipečių naudojimo adapterio išdėstymas).

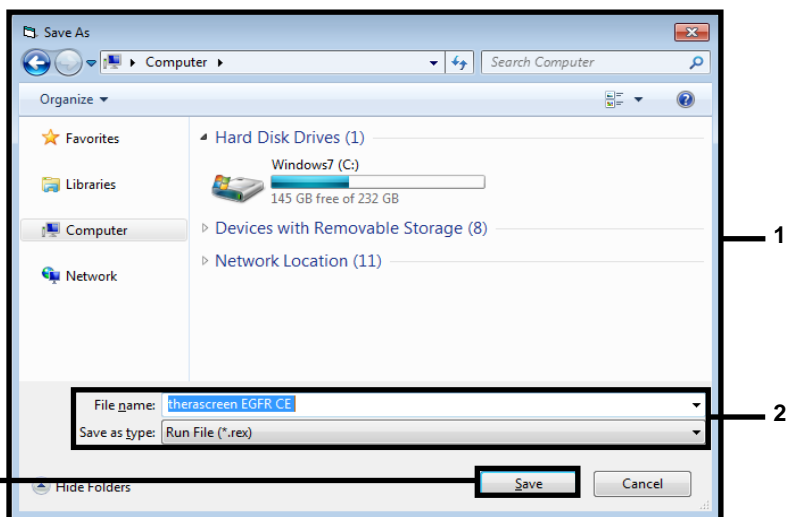
16. Kai įvesite visus mėginių pavadinimus, patikrinkite, ar jie teisingi. Jei reikia, lauke **Notes** (Pastabos) įtraukite papildomos informacijos ir spustelėkite **Start Run** (Pradėti tyrimą) (14 pav.).

Pastaba. Jei kuri nors rotorius vieta neužimta, rodomas „Warning“ (Ispėjimas) (14 pav.), kad primintų naudotojui, jog reikia užpildyti visas nenaudojamas rotorius vietas uždengtais tuščiais mėgintuvėliais. Patikrinkite, ar visos nenaudojamos rotorius vietos užpildytos uždengtais tuščiais mėgintuvėliais, ir norėdami tęsti spustelėkite **OK** (Gerai).



14 pav. Dialogo langas „Notes“ (Pastabos) (1), mygtukas „Start Run“ (Pradėti tyrimą) (2) ir „Warning“ (Ispėjimas) apie neužimtas rotorius vietas (3).

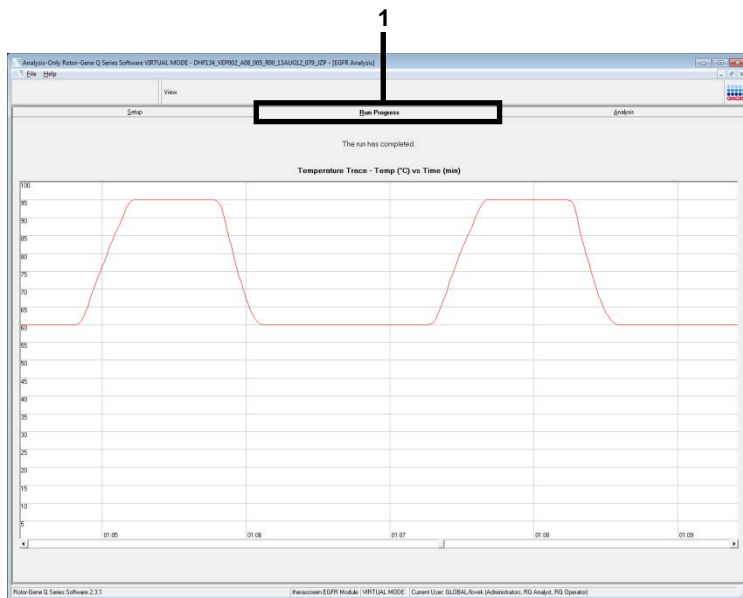
17. Atidaromas langas „Save As“ (Įrašyti kaip). Pasirinkite atitinkamą failo pavadinimą ir pasirinktoje vietoje įrašykite PGR tyrimą kaip *.rex tyrimo failą. Spustelėkite **Save** (Įrašyti) (15 pav.).



15 pav. Langas „Save As“ (Irašyti kaip) (1). 2 = Laukai „File Name“ (Failo vardas) ir „Save as type“ (Irašomo failo tipas); 3 = „Save“ (Irašyti).

Pradedamas PGR tyrimas.

Pastaba. Pradėjus tirti automatiškai atidaromas skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga), kuriame rodoma temperatūros kreivė ir likęs laikas (16 pav.).

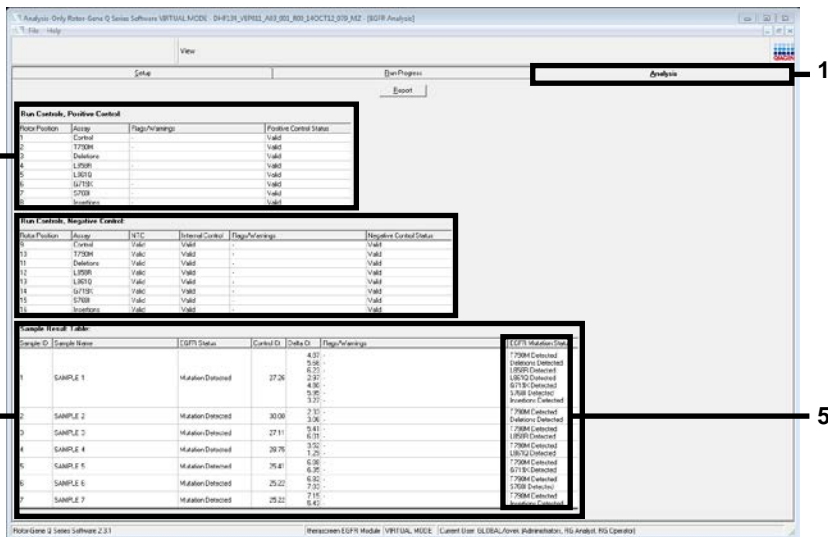


16 pav. Skirtukas „Run Progress“ (Tyrimo eiga).

Baigus tirti, automatiškai atidaromas skirtukas „Analysis“ (Analizė).

Pastaba. Jei skirtukas „Analysis“ (Analizė) neatidaromas, spustelėkite jį (17 pav.).

Pastaba. Skaičiavimo metodo paaiškinimas pateiktas skyriuje „Rezultatų aiškinimas (automatinis)“.



17 pav. Skirtukas „Analysis“ (Analizė) (1) ir pateikti rezultatai. 2 = skydas „Run Controls, Positive Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, teigiama kontrolinė medžiaga); 3 = skydas „Run Controls, Negative Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, neigiama kontrolinė medžiaga); 4 = „Sample Result Table“ (Mėginių rezultatų lentelė); 5 = skydas „Mutation Status“ (Mutacijos būseną).

18. Tyrimo rezultatai pateikiami, kaip nurodyta toliau (18 pav.).

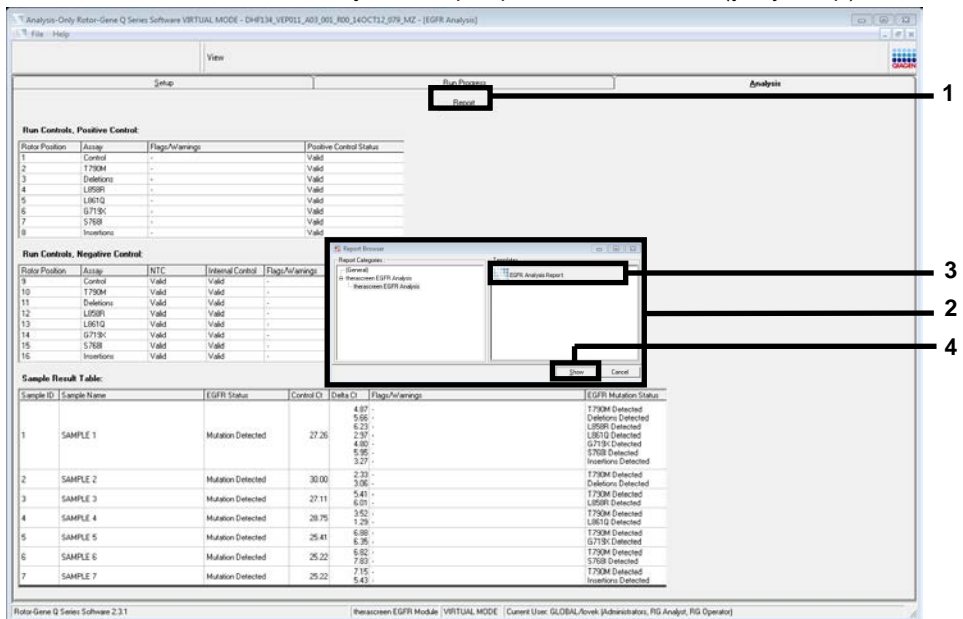
„Run Controls, Positive Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, teigiama kontrolinė medžiaga): Jei rezultatas yra priimtinaje intervale, stulpelyje „Positive Control Status“ (Teigiamos kontrolinės medžiagos būseną) bus rodoma „Valid“ (Tinkama), kitaip bus rodomas rezultatas „Invalid“ (Negalioja).

„Run Controls, Negative Control“ (Tyrimo kontrolinės medžiagos, neigiama kontrolinė medžiaga): jei tiek NTC, tiek „Internal Control“ (Vidinė kontrolinė medžiaga) rezultatai yra priimtiniuose intervaluose, stulpelyje „Negative Control Status“ (Neigiamos kontrolinės medžiagos būseną) bus rodoma „Valid“ (Tinkama), kitaip bus rodomas rezultatas „Invalid“ (Negalioja).

„Sample Result Table“ (Mėginių rezultatų lentelė): Mutacijų turinčių mėginių konkrečios mutacijos pateikiamos stulpelyje „EGFR Mutation Status“ (EGFR mutacijos būseną).

19. Spustelėkite **Report** (Ataskaita), kad būtų sukurtas ataskaitos failas. Atidaromas langas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė). Dalyje **Templates** (Šablonai) pasirinkite **EGFR CE Analysis Report** (EGFR CE analizės ataskaita), tada spustelėkite **Show** (Rodyti) (18 pav.).

Pastaba. Norėdami įrašyti ataskaitą į kitą vietą internetinio archyvo formatu, kiekvienos ataskaitos viršutiniame kairiajame kampe spustelėkite **Save As** (Įrašyti kaip).



18 pav. „EGFR CE Analysis Report“ (EGFR CE analizės ataskaitos) pasirinkimas. 1 = „Report“ (Ataskaita); 2 = skydas „Report Browser“ (Ataskaitų naršyklė); 3 = „EGFR CE Analysis Report“ (EGFR analizės ataskaita); 4 = „Show“ (Rodyti).

Rezultatų aiškinimas (automatinis)

Užbaigus tyrimą, „*therascreen* EGFR Assay Package“ automatiškai išanalizuoja ir pateikia aptiktas mutacijas. Toliau pateiktas paaiškinimas, kaip „*therascreen* EGFR Assay Package“ analizuoja ir pateikia aptiktas mutacijas.

Pastaba. Informacijos apie neautomatinę rezultatų analizę ieškokite skyriuje Rezultatų aiškinimas (neautomatinis).

PGR ciklas, kurio metu konkrečios reakcijos fluorescencija viršija slenksčio reikšmę, apibrėžiamas kaip C_T reikšmė. C_T reikšmė nurodo konkrečios įvesties DNR kiekį. Mažos C_T reikšmės nurodo aukštesnius įvesties DNR lygius, o didelės C_T reikšmės – mažesnius įvesties DNR lygius. Reakcijos naudojant C_T reikšmę klasifikuojamos kaip teigiama amplifikacija.

„Rotor-Gene Q“ programinė įranga įterpia fluorescencijos signalus tarp bet kurių dviejų įrašytų reikšmių. Todėl C_T reikšmės gali būti bet kuris realusis skaičius (neapsiribojant sveikaisiais) nuo 0 iki 40. „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ slenksčio reikšmė nustatyta kaip 0,075 santykinų fluorescencijos vienetų Green (FAM) kanale ir 0,02 Yellow (HEX) kanale. Šios reikšmės yra automatiškai sukonfigūruotos „*therascreen* EGFR Assay Package“. Tyrimo kontrolinės medžiagos (PC, NTC ir IC) vertinamos norint užtikrinti, kad yra priimtinos C_T reikšmės ir tinkamai atliekamos reakcijos.

Kiekvieno mutacijos tyrimo mėginio ΔC_T reikšmės apskaičiuojamos pagal šią formulę:

$$\Delta C_T = [\text{mutacijos tyrimo } C_T \text{ reikšmė}] - [\text{kontrolinio tyrimo } C_T \text{ reikšmė}]$$

Mėginiai klasifikuojami kaip turintys mutacijų, jei jų ΔC_T reikšmė yra mažesnė arba lygi šio tyrimo kritinės ribos ΔC_T reikšmei. Jei reikšmė yra didesnė, mėginyje gali būti mažesnis mutacijų procentas, nei galima aptikti naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ (už tyrimo ribų), arba mėginyje nėra mutacijų, ir apie tai pranešama kaip „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta).

Jei mutacijų reakcijoje nevyksta amplifikacija, pateikiamas rezultatas „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta). Visos foninės amplifikacijos ΔC_T reikšmės turėtų būti didesnės negu kritinės ribos ΔC_T reikšmės, todėl mėginys klasifikuojamas kaip „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta).

Tyrimo rezultatai pateikiami kaip „Mutation Detected“ (Mutacijų aptikta), „No Mutation Detected“ (Mutacijų neaptikta), „Invalid“ (Negalioja) arba, jei kontrolinis tyrimas nepavyks, „Run Control Failed“ (Kontrolinis tyrimas nepavyko). Jei mėginiuose bus aptikta mutacijų, bus pranešta apie konkrečias mutacijas. Auglyje gali būti ne viena mutacija. Tokiais atvejais bus pateikta informacija apie kelias mutacijas.

„Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package“ žymės

8 lentelėje (kitame psl.) išvardytos galimos žymės, kurias gali sugeneruoti „Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package“, jų reikšmės ir atliktini veiksmai.

Žymių pavadinimai sudaryti taip, kad pateiktų informaciją apie paveiktą rinkinio komponentą, paveiktą mėginį arba kontrolę ir nepavykusios reakcijos režimą.

Pavyzdžiui:

- **PC_CTRL_ASSAY_FAIL** = teigiamos kontrolės (Positive Control, PC) kontrolinis tyrimas (CTRL_ASSAY) nepavyko (FAIL)
- **NTC_INT_CTRL_FAIL** = kontrolinės medžiagos be matricos (No Template Control, NTC) vidinė kontrolė (INT_CTRL) nepavyko (FAIL)
- **SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC** = mėginio (SAMPLE) kontrolinio tyrimo (CTRL) didelė koncentracija (HIGH_CONC).

8 lentelė. Žymės, reikšmės ir atliktini veiksmai

Žymė	Reikšmė	Veiksmas
PC_CTRL_ ASSAY_FAIL	PGR tyrimas netinkamas – kontrolinės reakcijos teigiamos kontrolinės medžiagos FAM C _T reikšmė yra už intervalo ribų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
PC_MUTATION_ ASSAY_FAIL	PGR tyrimas netinkamas – vienos ar kelių mutacijų kontrolinių reakcijų FAM C _T reikšmė yra už intervalo ribų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
PC_CTRL_ INVALID_DATA	PGR tyrimas netinkamas – nepavyksta interpretuoti teigiamos kontrolinės medžiagos (kontrolinio reakcijų mišinio) fluorescencijos duomenų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
PC_MUTATION_ INVALID_DATA	PGR tyrimas netinkamas – nepavyksta interpretuoti teigiamos kontrolinės medžiagos (mutacijų reakcijos mišinio) fluorescencijos duomenų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
NTC_INT_CTRL_ FAIL	PGR tyrimas netinkamas – vidinė kontrolinė medžiaga yra už neigiamos kontrolinės medžiagos intervalo viršutinės ribos.	Kartokite visą PGR tyrimą.
NTC_INT_CTRL_ EARLY_CT	PGR tyrimas netinkamas – vidinė kontrolinė medžiaga yra už neigiamos kontrolinės medžiagos intervalo apatinės ribos.	Kartokite visą PGR tyrimą.
NTC_INVALID_CT	PGR tyrimas netinkamas – neigiamos kontrolinės medžiagos FAM reikšmė netinkama (mažesnė už ribą).	Kartokite visą PGR tyrimą.
NTC_INVALID_ DATA	PGR tyrimas netinkamas – nepavyksta interpretuoti neigiamos kontrolinės medžiagos fluorescencijos duomenų.	Kartokite visą PGR tyrimą.
SAMPLE_CTRL_ INVALID_DATA	Mėginys netinkamas – nepavyksta interpretuoti mėginio kontrolinės medžiagos fluorescencijos duomenų.	Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai išstirkite susijusius mėginius.
SAMPLE_CTRL_ HIGH_CONC	Mėginys netinkamas – mėginio kontrolinės medžiagos FAM C _T reikšmė per maža.	Atskieskite mėginį, kad padidintumėte C _T reikšmę. Skiedimas turi būti apskaičiuotas laikantis prielaidos, kad skiedžiant rinkinyje pateiktu vandeniu santykiu 1:1 C _T reikšmė padidės 1,0; atskiedę mėginį, nustatykite naują mutacijų įvertinimo tyrimą ir pakartotinai išstirkite mėginį. Arba, jei atlikus DNR mėginio įvertinimo tyrimą mėginys buvo atskiestas, pereikite tiesiai prie EGFR mutacijos aptikimo tyrimo naudodami atskiestą mėginį.

8 lentelė. Žymės, reikšmė ir atliktini veiksmai (tęs.)

Žymė	Reikšmė	Veiksmas
SAMPLE_CTRL_FAIL	Mėginys netinkamas – mėginio kontrolinės reakcijos FAM C _T reikšmė per didelė.	Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai iširkite mėginį. Jei atlikus pakartotinį PGR tyrimą mėginys yra netinkamas, o DNR kiekio vis dar nepakanka, išskirkite dar 2 FFPE audinio atpjovas, jei galima. Nustatykite naują PGR tyrimą ir iširkite šį išskirtą mėginį. Jei mėginys bus netinkamas, pakartokite PGR tyrimą su antrąja atpjova. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būsena ir daugiau tyrimų atlikti neberekės.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Vidinės kontrolinės medžiagos (HEX) C _T reikšmė per didelė (arba C _T nėra), FAM kanalas be mutacijų.	Mėginiai, kuriems sugeneruojama žymė SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID, kai mutacija aptinkama (arba neaptinkama) kliniškai susijusiamė mutacijų reakcijų mišinyje – pateikite rezultatus; daugiau tirti nebereikia. Atskieskite mėginį rinkinyje pateiktu vandeniu, naudodami prielaidą, kad santykis 1:1 padidins kontrolinės reakcijos C _T 1,0, užtikrinkite, kad galutinis tūris būtų > 40 µl (pvz., 40 µl DNR ir 40 µl vandens iš mėgintuvėlio, pažymėto DIL). Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai iširkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio PGR tyrimo, išskirkite mėginį iš dar dviejų FFPE atpjavų. Nustatykite naują PGR tyrimą ir iširkite šį išskirtą mėginį. Jei antra išskirta atpjova bus netinkama, atskieskite, kaip buvo aprašyta anksčiau. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būsena ir daugiau tyrimų atlikti neberekės.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutacijų mėgintuvėlis netinkamas – mėginio (vidinės kontrolinės medžiagos) C _T HEX reikšmė per maža.	Mėginiai, kuriems sugeneruojama žymė SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID, kai mutacija aptinkama (arba neaptinkama) kliniškai susijusiamė mutacijų reakcijų mišinyje – pateikite rezultatus; daugiau tirti nebereikia. Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai iširkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio PGR tyrimo, išskirkite audinio iš dar 2 FFPE atpjavų, jei yra. Nustatykite naują PGR tyrimą ir iširkite šį išskirtą mėginį. Jei mėginys bus netinkamas, pakartokite PGR tyrimą su antrąja atpjova. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būsena ir daugiau tyrimų atlikti neberekės.

8 lentelė. Žymės, reikšmė ir atliktini veiksmai (tęs.)

Žymė	Reikšmė	Veiksmai
SAMPLE_ INVALID_DATA	Mutacijų mėgintuvėlis netinkamas – nepavyksta interpretuoti vidinės kontrolinės medžiagos fluorescencijos duomenų.	<p>Mėginiai, kuriems sugeneruojama žymė SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID, kai mutacija aptinkama (arba neaptinkama) kliniškai susijusiame mutacijų reakcijų mišinyje – pateikite rezultatus; daugiau tirti nebereikia.</p> <p>Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį. Jei mėginys bus netinkamas ir po pakartotinio PGR tyrimo, išskirkite audinio iš dar 2 FFPE atpvovų, jei yra. Nustatykite naują PGR tyrimą ir ištyrinkite šį išskirtą mėginį. Jei mėginys bus netinkamas, pakartokite PGR tyrimą su antrąja atpvova. Jei ir po šio tyrimo mėginys bus netinkamas, šiam mėginiui bus priskirta neaiškios mutacijos būseną ir daugiau tyrimų atlikti nebereikės.</p>
SAMPLE_ POSITIVE_AND_ INVALID	Yra viena ar kelios teigiamos mėginio mutacijos, bet tuo pačiu metu viena ar kelios to paties mėginio mutacijos yra netinkamos.	<p>Mėginiai, kuriems sugeneruojama žymė SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID, kai mutacija aptinkama (arba neaptinkama) kliniškai susijusiame mutacijų reakcijų mišinyje – pateikite rezultatus; daugiau tirti nebereikia.</p> <p>Mėginiai, kuriems sugeneruojama žymė SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID, kai kliniškai susijusiame mutacijų reakcijų mišinyje gaunamas rezultatas INVALID (negalioja) – pakartotinai ištyrinkite mėginį naudodami visus reakcijų mišinius ir atlikdami konkrečiai netinkamo mėginio žyme skirtus veiksmus.</p> <p>Jei tiriant mėginį žymė SAMPLE_INT_CTRL_FAIL sugeneruojama kartu su kita žyme, tuomet reikia atlikti mėginio skiedimo veiksmą, taikomą žymei SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite mėginį.</p> <p>Mėginiai, kuriems sugeneruojama žymė SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID, kai atliekant pakartotinį PGR tyrimą kliniškai susijusiame mutacijų reakcijų mišinyje gaunamas rezultatas INVALID (negalioja) – išskirkite mėginį iš dar 2 FFPE atpvovų. Nustatykite naują PGR tyrimą naudodami visus reakcijų mišinius ir ištyrinkite šį išskirtą mėginį.</p> <p>Jei šis mėginys kliniškai susijusiame mutacijų reakcijų mišinyje vėl pateikia netinkamus rezultatus, pakartotinai ištyrinkite mėginį naudodami visus reakcijų mišinius ir atlikdami konkrečiai netinkamo mėginio žyme skirtus veiksmus. Jei tiriant mėginį sugeneruojama SAMPLE_INT_CTRL_FAIL kartu su kita žyme, tuomet reikia atlikti mėginio skiedimo veiksmą, taikomą žymei SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Nustatykite naują PGR tyrimą ir pakartotinai ištyrinkite šį mėginį.</p> <p>Jei pakartojus žymė SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID vėl rodoma, mėginiui priskiriama neaiškios mutacijos būseną.</p>

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali padėti šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Dažniausiai Užduodami Klausimai“ (Frequently Asked Questions, FAQ) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilčius klausimus apie šiame vadove ir protokoluose pateiktą informaciją, mėginius ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją žr. galiniame viršelyje arba apsilankykite www.qiagen.com).

Pastabos ir pasiūlymai

Rodomas teigiamas NTC mėginių rezultatas Green FAM kanale

PGR ruošimo metu atsirado tarša

Pakartokite PGR, naudodami naujus reagentus kartotiniams tyrimams. Jei galima, įdėję reikiamą bandyti mėginį, iš karto uždarykite PGR mėgintuvėlius. Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami.

Jokio signalo naudojant EGFR teigiamas kontrolines medžiagas

- | | |
|--|--|
| a) PGR duomenų analizei pasirinktas fluorescencinis kanalas neatitinka protokolo. | Atlikdami duomenų analizę pasirinkite fluorescencinį kanalą „Cycling Green“ analitinei EGFR PGR ir fluorescencinį kanalą „Cycling Yellow“ – vidinės kontrolinės medžiagos PGR. |
| b) Neteisingas „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento temperatūros profilio programavimas | Palyginkite temperatūros profilį su protokolu. Jei neteisingas, pakartokite tyrimą. |
| c) Neteisinga PGR konfigūracija | Patikrinkite savo darbo veiksmus naudodami lašavimo pipete schemą ir, jei reikia, pakartokite PGR. |
| d) Vieno ar kelių rinkinio komponentų laikymo sąlygos neatitiko nurodymų, pateiktų „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (18 psl.) | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį. |
| e) Baigėsi „therascreen EGFR RGQ PCR Kit“ tinkamumo laikas | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį. |

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, kiekviena „*therascreen EGFR RGQ PCR Kit*“ partija išbandoma pagal nustatytas specifikacijas, siekiant nuolat išlaikyti produktų kokybę.

Apribojimai

Produkto rezultatai turi būti interpretuojami susijusių klinikinių ir laboratorinių duomenų kontekste, o nustatant diagnozę nenaudojami be konteksto.

Produktą turi naudoti tik personalas, specialiai išmokytas atlikti „in vitro“ diagnostines procedūras ir dirbti su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentais.

Produktą numatyta naudoti tik su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ real-time PCR ciklu valdikliu.

Siekiant užtikrinti optimalius rezultatus reikia griežtai laikytis „*therascreen EGFR RGQ PCR Kit*“ vadovo nurodymų. Nerekomenduojama skiesti reagentų kitaip, nei nurodyta šiame vadove, nes gali sumažėti jų veiksmingumas.

Prieš atliekant mėginio analizę su „*therascreen EGFR RGQ PCR Kit*“ svarbu įvertinti mėginio DNR kiekį ir kokybę. Papildomas kontrolinės reakcijos mišinys pateikiamas siekiant nustatyti, ar C_T reikšmė yra tinkama tyrimui. Absorbcijos rodmenų negalima naudoti, nes jie nesusiję su C_T reikšmėmis fragmentuotuose DNR mėginiuose.

EGFR delecijų reakcijos mišinio pradmenys buvo sukurti taip, kad aptiktų įvairias 19 egzono delecijas, apimančias nukleotidus nuo 55174772 iki 55174795 (GRCh38 chr7) – 23 bp intervalą.

Nors buvo analitiškai patvirtinta ir pademonstruota, kad 19 egzono delecijų tyrimas aptinka 14 nurodytų 19 egzono delecijų (žr. sąrašą šio vadovo 1 lentelėje), tačiau įmanoma, kad delecijų pradmenų rinkinys amplifikuos papildomas mutacijas (įskaitant papildomas 19 egzono delecijas, 19 egzono intarpus ir L747P mutaciją).

Tokiu atveju paciento mėginiui dėl papildomų mutacijų bus gautas rezultatas „Deletions Detected“ (Aptiktos delecijos).

Be to, įmanoma, kad L858R tyrimas aptiks L858Q mutaciją. Todėl, jei yra paciento mėginyje, dėl L858Q mutacijos gali būti gautas rezultatas „L858R Detected“ (Aptikta L858R).

Reikia atkreipti dėmesį į tinkamumo datas, išspausdintas ant dėžutės ir visų komponentų etikečių. Pasibaigus tinkamumo laikui, komponentų naudoti negalima.

Efektyvumo charakteristikos

Analitinis efektyvumas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ specifinės efektyvumo charakteristikos buvo nustatytos tyrimais, kuriuose buvo naudojami FFPE audinių mėginiai, surinkti iš NSCLC sergančių pacientų ir FFPE žmogaus ląstelių linijų (FFPE ląstelių linijų). FFPE ląstelių linijos buvo sugeneruotos naudojant plaučių vėžio ląstelių liniją (A549), kad būtų sukurtos ląstelių linijos, kuriose būtų norimos specifinės EGFR mutacijos. Kai audinių mėginių ar ląstelių linijų nebuvo, buvo naudojama plazmidžių DNR.

Tuštumo ribos (Limit of Blank, LOB), darbinis diapazonas ir ribinės reikšmės

Siekiant nustatyti kiekvieno mutacijostyrimo LOB ir ribines reikšmes, vadovaujantis NCCLS EP17–A (2004) (12) rekomendacija tyrimo metu iš viso buvo ištirta 417 FFPE mėginių. Be to, buvo nustatytas darbinis diapazonas. Nustatytos ribinės reikšmės pateiktos 9 lentelėje.

9 lentelė. Nustatytos kiekvienos mutacijos tyrimo kritinės ribos reikšmės

Tyrimas	Kritinė riba (ΔC_T)
T790M	$\leq 7,40$
Delecijos	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Intarpai	$\leq 8,00$

Nustatytas kontrolinės reakcijos C_T diapazonas nuo 23,70 iki 31,10 C_T .

Ribinės tyrimo reikšmės ir darbiniai diapazonai buvo patikrinti naudojant standartus ir papildomus FFPE mėginius. Patikrinimo metu buvo įvertintos ribinės reikšmės, kad laukinio tipo DNR fone būtų galima atskirti tinkamą mutaciją, kiekvieną tyrimą įvertinant su aukštos koncentracijos įvesties genomine DNR ir aukštos koncentracijos įvesties mutacijos DNR (žr. Kryžminis reaktyvumas). Taip pat buvo vertintas įvesties DNR poveikis mutacijos aptikimui (žr. DNR įvesties poveikis ΔC_T reikšmėms).

Norint nustatyti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ efektyvumą nesant matricos ir užtikrinti, kad tuščias mėginys arba mėginys su laukinio tipo DNR nesukuria analitinio signalo, kuris galėtų rodyti mažą mutacijos koncentraciją, buvo vertinami mėginiai be matricos ir NSCLC EGFR laukinio tipo DNR. Rezultatai parodė, kad NTC mėginiuose ir FFPE laukinio tipo mėginiuose jokių teigiamų mutacijų nebuvo aptikta.

DNR įvesties poveikis ΔC_T reikšmėms

DNR įvesties lygis apibrėžiamas kaip bendras amplifikuojamos EGFR DNR kiekis mėginyje, nustatytas pagal kontrolinės reakcijos C_T reikšmes. Siekiant įrodyti, kad „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ veiksmingumas yra vienodas kontrolinės reakcijos C_T diapazone (23,70–31,10), visi 7 EGFR mutacijos tyrimai buvo atlikti naudojant 6 santykių 1:3 skiedinių sekas (DNR išskirta iš FFPE ląstelių linijų). Kiekvienos mutacijos 1 skiedimo tikslinė C_T buvo apytiksliai 24,70. Galutinis skiedimas, kurio C_T buvo apytiksliai 32–33, nepateko į kontrolinės reakcijos C_T diapazoną. Bendrai ΔC_T reikšmės, išmatuotos esant skirtingiems visos DNR įvesties lygiams, darbiniam „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ diapazone buvo nuoseklios.

Kryžminis reaktyvumas

Aukšto DNR įvesties lygio laukinio tipo EGFR DNR buvo tiriama, siekiant įvertinti nespecifinę amplifikaciją. Rezultatai parodė, kad žemiausios ΔC_T reikšmės viršijo nustatytas ribines reikšmes. Tai rodo, kad nespecifinės amplifikacijos nėra.

Aukšto DNR įvesties lygio FFPE ląstelių linijos buvo tiriamos naudojant visus reakcijos mišinius, siekiant įvertinti potencialų kryžminį reaktyvumą. Rezultatai parodė, kad dėl mutacijų reakcijų kryžminio reaktyvumo poveikio nebuvo. Visų neatitinkamų reakcijos mišinių ir DNR mėginių visos mažiausios ΔC_T reikšmės buvo aukštesnės nei atitinkamo tyrimo ribinės reikšmės.

Tikslumas: palyginimas su analitiniu kontroliniu metodu

Tyrimas parodė, kad „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ mutacijos aptikimas atitinka dvikryptį Sangerio sekvenavimą. Šiame tyrime buvo tirama 360 FFPE mėginių.

Siekiant įvertinti teigiamų rezultatų procentinį sutapimą (Positive Percent Agreement, PPA), neigiamų rezultatų procentinį sutapimą (Negative Percent Agreement, NPA) ir bendrą procentinį sutapimą (Overall Percent Agreement, OPA), buvo analizuojami mėginiai ir su Sangerio, ir su „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ tinkamais rezultatais. Šie procentai kartu su atitinkamais dvipusiais 95 % patikimumo intervalais (Confidence Interval, CI) apibendrinti 10 lentelėje.

10 lentelė. Sutapimo analizė

Matas	Procentinis sutapimas (N)	95 % CI
Teigiamų rezultatų procentinis sutapimas	99,4 % (157/158)	96,5–100,0 %
Neigiamų rezultatų procentinis sutapimas	86,6% (175/202)	81,2–91,0 %
Bendras procentinis sutapimas	92,2% (332/360)	89,0–94,8 %

28 prieštaringi bendro procentinio sutapimo rezultatai:

- 1 (3,6 %) mėginys buvo laukinio tipo (t. y. mutacija neaptikta), naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, tačiau naudojant Sangerio sekvenavimą rezultatai parodė, kad mutacija aptikta.
- 27 (96,4 %) mėginiuose buvo aptikta mutacija, naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, tačiau naudojant Sangerio sekvenavimą, rezultatai buvo laukinio tipo.

Aptikimo ribos (Limit of Detection, LOD) reikšmės

Tyrimas buvo atliktas, siekiant nustatyti kiekvienos iš 29 EGFR mutacijų LOD. LOD buvo apibrėžta kaip mažiausias mutacinės DNR kiekis laukinio tipo DNR fone, kuriam esant mutaciniame mėginyje teigiami mutacijos rezultatai bus 95 % testo rezultatų (C_{95}).

Siekiant nustatyti kiekvienos mutacijos LOD, buvo paruošti mažos ir didelės įvesties DNR koncentracijos mėginiai su skirtingos mutacijos procentais ir ištirti, naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ (11 lentelė). Kiekvieno tyrimo LOD buvo apskaičiuota naudojant logistinės regresijos metodą. Siekiant patikrinti LOD, remiantis nustatyta LOD buvo ištirti mutacijos mėginiai ir patikrintas teigiamas tyrimo rodiklis.

11 lentelė. LOD nustatyta, naudojant mažo ir didelio DNR įvesties lygio FFPE klinikius mėginius, FFPE ląstelių linijas arba plazmidės

Egzonas	Mutacija	COSMIC* ID	Bazinis pokytis	LOD (mutacijos %)	
				Mažas	Didelė
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	– [†]
19	Delecijos	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	– [†]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	– [†]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	– [†]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	– [†]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]		
12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]		

11 lentelė. LOD nustatyta, naudojant mažo ir didelio DNR įvesties lygio FFPE klininius mėginius, FFPE ląstelių linijas arba plazmides (ankstesnio puslapio tęsinys)

Egzonas	Mutacija	COSMIC* ID	Bazinis pokytis	LOD (mutacijos %)	
				Mažas	Didelė
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Intarpai	12376	2307_2308insGCCAGCGT G	11,61 [†]	– [†]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

* COSMIC: „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogas):
<http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] LOD reikšmės nustatytos naudojant ląstelių linijas

[‡] LOD reikšmės nustatytos naudojant plazmides

[§] LOD reikšmės nustatytos naudojant klininius mėginius

[†] Nevertinta

Trukdžiai

Nekrotinio audinio poveikis

NSCLC FFPE klininiai mėginiai (EGFR mutaciniai ir laukinio tipo mėginiai), kuriuose nekrotinio audinio buvo iki 50 %, nedarė įtakos „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ aptikimo rezultatams.

Egzogeninės medžiagos

Mutaciniuose ir laukinio tipo mėginiuose buvo tiriamos DNR išskyrimo procese esančios ir galimai trukdančios medžiagos, esant 10× koncentracijai: parafinas, ksilenas, etanolis ir proteinazė K. Rezultatai parodė, kad šios medžiagos nedarė įtakos „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rezultatams.

Atkuriamumas

Partijų atkuriamumas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ tyrimo sistemoje naudojami du atskiri rinkiniai: DNR išskirti skirtas „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ arba „QIAamp DNA FFPE Tissue Kit“ ir DNR amplifikacijai bei EGFR mutacijos būklei aptikti skirtas „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Partijų atkuriamumas ir pakeičiamumas buvo įrodytas naudojant 3 partijas iš „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ ir 3 partijas iš „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Bendras tinkamų aptikimų partijose procentas EGFR mutacijos tyrime buvo 97,8 % (317/324), o laukinio tipo mėginiuose – 100 % (379/379).

Mėginių naudojimas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ atkuriamumas buvo tiriamas, naudojant atpjovas iš trijų FFPE mėginių blokų, konkrečiai 19 egzono delecijos mutacijos mėginys (2235–2249 del15), 21 egzono L858R mutacijos mėginys ir vienas laukinio tipo mėginys. Kiekviename mėginyje išskyrimas buvo atliekamas du kartus 3 vietose ir per 6 dienų laikotarpį tiriamas 3 ne paeilui einančias dienas, pateikiant iš viso 18 duomenų šaltinių vienam mėginiui. Kiekvienoje vietoje 2 operatoriai atliko tyrimą, naudodami 1 „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ partiją (1 partija vienai vietai, iš viso 3 partijos) kartu su tokia pačia „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ reagentų partija visose vietose. Visi mutacinio ir laukinio tipo mėginių rezultatai buvo tinkami ir pateikė tikėtiną aptikimo rezultatą (tinkamas aptikimas = 100 %, 18/18 kiekviename mėginyje), kuris patvirtino „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ atkuriamumą ir pakartojamumą DNR išskyrimo priešanalitiniame veiksmė.

Tikslumas ir atkuriamumas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ tikslumas ir atkuriamumas buvo tikrinamas, tiriant DNR, kuri buvo išskirta iš NSCLC FFPE klinikinių mėginių arba FFPE ląstelių linijų, atspindinčių „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ septynis mutacijų tyrimus. NSCLC laukinio tipo FFPE klinikiniai mėginiai taip pat buvo įtraukti į tyrimą (12 lentelė).

Norint įvertinti tyrimo atkuriamumą, buvo atliekamas matricos tipo tyrimas: mėginiai buvo tiriami 3 laboratorijose (vietose), naudojant 3 partijas iš „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ (3 partijos 3 vietose), kiekvienoje vietoje naudojant 2 operatorius, 2 instrumentus ir kiekvieną mėginį (paruoštą LOD artimu lygiu) ištiriant du kartus per 16 dienų laikotarpį. Kiekvienos atskiros mutacijos atkuriamumas kiekvienoje vietoje buvo atliekamas per ne paeiliui einančias dienas. Tinkamų aptikimo atvejų santykis pateiktas kitame puslapyje esančioje 12 lentelėje.

12 lentelė. Tyrimo atkuriamumas – tirtų EGFR mutacijų tinkamų aptikimo atvejų santykis

Egzonas	Mutacija	COSMIC* ID	Aptikimo atvejai		Tinkamų %	
			Tinkami / iš viso	Tinkamų %	Apatinis vienpusis 95 % CI	
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06	
19	Delecijos	12384	92/92	100	96,80	
		12387	95/95	100	96,90	
		12419	83/83	100	96,46	
		12422	94/94	100	96,86	
		13551	95/95	100	96,90	
		6220	96/96	100	96,93	
		6223	95/95	100	96,90	
		6225	91/95	95,79	90,62	
		6254	92/92	100	96,80	
		6255	94/96	97,92	93,59	
		12369	95/95	100	96,90	
		12370	62/63	98,41	92,69	
		12382	92/95	96,84	92,04	
		12383	93/93	100	96,83	
20	S768I	6241	82/82	100	96,41	
		Intarpai	12376	92/92	100	96,80
			12378	93/93	100	96,83
			12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80	
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48	
	L861Q	6213	84/84	100	96,50	
Laukinio tipo	—	—	77/78	98,72	94,06	

* COSMIC: „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogas): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Siekiant įvertinti tyrimo, kelių tyrimų, kelių dienų, kelių partijų ir kelių vietų kintamumo standartinį nuokrypį ir 95 % patikimumo intervalą, buvo naudojama variacijos komponentų analizė. Visuose variacijos komponentuose visų tirtų EGFR mutacijų bendras variacijos koeficientas (Coefficient of Variation, CV) buvo $\leq 14,11$ %. Visuose mutacijų skyduose kelių partijų, kelių dienų ir kelių tyrimų CV procentas buvo $\leq 8,33$ %. Tyrimo kintamumo (pakartojamumo / tikslumo) CV procentas svyravo nuo 5,99 % iki 13,49 %.

Klinikinis efektyvumas

Klinikinių rezultatų duomenys: „GIOTRIF[®]“

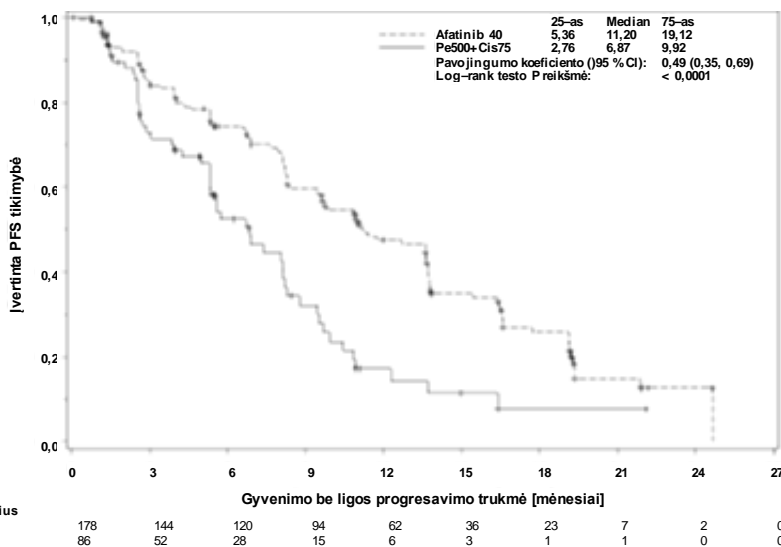
„LUX-Lung 3“ klinikinis tyrimas – tai tarptautinis, kelis centrus apimantis, atviras, atsitiktinis 3 etapo tyrimas, kuriame buvo lyginamas afatinibas ir chemoterapija, kaip pirmos eilės gydymas pacientams, sergantiems IIIB arba IV stadijos plaučių liaukinių ląstelių vėžiu su EGFR suaktyvinančia mutacija (ClinicalTrials.gov numeris NCT00949650). Paciento tinkamumas įtraukti į tyrimą buvo nustatytas ištyrus paciento EGFR mutacijos būklę klinikinio tyrimo (Clinical Trial Assay, CTA) metu. Audinių mėginių retrospektyvus tyrimas buvo atliktas naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Siekiant įvertinti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ ir CTA atitikimą, buvo atliktas papildomas tyrimas.

Remiantis CTA tyrimo rezultatais, 345 pacientai buvo įtraukti į atsitiktinę imtį (afatinibas: 230 pacientų; chemoterapija: 115 pacientų). Pirminis veiksmingumo rezultatas buvo išgyvenamumas ligai neprogresuojant (Progression-Free Survival ,PFS), kurį įvertino nepriklausoma peržiūros komisija (Independent Review Committee, IRC). Tiriant 345 atsitiktinai atrinktus pacientus, 264 pacientų auglių mėginiai (afatinibas: 178 pacientų; chemoterapija: 86 pacientų) buvo ištirti retrospektyviu būdu, naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. IRC nustatė, kad visoje CTA+ populiacijoje ir „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+“ / CTA+ populiacijoje pacientų, atsitiktinai įtrauktų į afatinibo grupę, PFS buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginti su pacientų, atsitiktinai įtrauktų į chemoterapijos grupę, PFS. Visi veiksmingumo rezultatai apibendrinti 13 lentelėje ir 19 paveikslėlyje.

13 lentelė. „LUX-Lung 3“ klinikinio tyrimo populiacijos pacientų, tirtų naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, klinikinė nauda

Parametras	„ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit“ / CTA+ populiacija n = 264		CTA+ populiacija, n = 345	
	Chemoterapija n = 86	Afatinibas n = 178	Chemoterapija n = 115	Afatinibas n = 230
Išgyvenamumas ligai neprogresuojant (Progression-Free Survival, PFS)				
Mirčių arba progresavimų skaičius, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
PFS mediana (mėn.)	6,9	11,2	6,9	11,1
PFS medianos 95 % CI	5,3, 8,2	9,7, 13,7	5,4, 8,2	9,6, 13,6
Pavojingumo koeficientas		0,49		0,58
Pavojingumo koeficiento 95 % CI		0,35, 0,69		0,43, 0,78
P reikšmė (stratifikuotas „log rank“ testas)*		< 0,0001		< 0,001

* Stratifikuota pagal EGFR mutacijos būklę ir rasę.



19 pav. Nepriklausomos peržiūros komisijos sudaryta išgyvenamumo ligai neprogresuojant (Progression-Free Survival, PFS) Kaplan–Meier kreivė pagal gydymo grupę („*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ / CTA+ populiacija).

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+“ / CTA+ pogrupio (n = 264) analizė parodė, kad afatinibu gydomų pacientų PFS laikas reikšmingai padidėjo (PFS mediana 11,2 mėn., palyginti su 6,9 mėn.), o ligos progresavimas ar mirtis pasireiškė rečiau (HR = 0,49, 95 % CI [0,35; 0,69], p < 0,0001), palyginti su pacientais, kurie buvo gydomi chemoterapija. Klinikinė nauda, stebima pacientų, kurie buvo tiriami naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, pogrupyje, buvo panaši į naudą, stebimą visoje tyrimo populiacijoje (n = 345).

Klinikinių rezultatų duomenys: „IRESSA®“

IRESSA paskesnės priemonės (IRESSA Follow-Up Measure, IFUM) tyrimas buvo 4 etapo atviras vienos grupės tyrimas (NCT01203917) norint apibūdinti pirminei terapijai skirtą gefitinibo efektyvumą ir saugumą / toleravimą taikant baltaodžiams pacientams, sergantiems IIIA/B/IV stadijos EGFR mutacijų turinčiu vietoje išplitusiu arba metastazavusiu NSCLC. IFUM tyrimas buvo skirtas objektyvaus atsako dažniui įvertinti pagal RECIST kriterijus tiriant prospektyviai atrinktus EGFR mutaciniu NSCLC sergančius baltaodžius pacientus.

Tinkami pacientai privalėjo turėti EGFR 19 egzono, L858R, L861Q arba G719X pakaitalo mutacijos deleciją ir neturėti T790M arba S768I mutacijos arba 20 egzono intarpų auglio mėginiuose, kaip prospektyviai buvo nustatyta atliekant CTA. Mėginių, gautų iš IFUM klinikiniame tyrime tirtų pacientų, retrospektyvus tyrimas buvo atliktas naudojant atrankinės diagnostikos „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“. Buvo atliktas papildomas tyrimas norint įvertinti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ ir CTA, naudoto atrenkant pacientus IFUM klinikiniam tyrimui, atitikimą. Bendras dviejų tyrimų atitikimas aptinkant EGFR 19 egzono delecijas ir L858R mutaciją buvo 98,2 % (n = 700/713; 95 % CI: 96,9 %, 99,0 %) ir 88,2 % PPA (n = 90/102; 95 % CI: 80,4 %, 93,8 % ir 99,8 % NPA (n = 610/611; 95 % CI: 99,1 %, 100,0 %).

CTA tyrimo rezultatai gauti tiriant 859 pacientus, iš kurių 106 pacientai buvo tinkami gydyti gefitinibu. Iš 859 mėginių, turinčių CTA rezultatą, 765 mėginius buvo galima iširti retrospektyviai naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, įskaitant 87 mėginius, kurių EGFR mutacijos rezultatas buvo teigiamas, tiek atliekant CTA, tiek tiriant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“.

Pagrindinis veiksmingumo rezultatas buvo objektyvaus atsako dažnis (Objective Response Rate, ORR), įvertintas koduota nepriklausoma centrine peržiūra (Blinded Independent Central Review, BICR) ir tyrėjų. Klinikinė nauda, stebima pacientų, kurie buvo tiriami naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, pogrupyje, buvo panaši į naudą, stebimą visoje tyrimo populiacijoje.

Visi veiksmingumo rezultatai apibendrinti 14 lentelėje.

14 lentelė. IFUM klinikinio tyrimo populiacijos pacientų, tirtų naudojant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“, klinikinė nauda

Parametras	„ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit“ + populiacija n = 87	CTA+ populiacija, n = 106
Objektyvaus atsako dažnis (Objective Response Rate, ORR) pagal BICR	42	53
Atsako skaičius (N)		
ORR, % (95 % CI)	48,3 (38,1–58,6)	50,0 (40,6–59,4)
Atsako trukmės mediana (mėnesiai)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
Objektyvaus atsako dažnis (Objective Response Rate, ORR) pagal tyrėjus	62	74
Atsako skaičius (N)		
ORR, % (95 % CI)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Atsako trukmės mediana (mėnesiai)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

BICR: Blinded Independent Central Review (koduota nepriklausoma centrinė peržiūra); **CI:** Confidence interval (ntervalpatikimumo intervalas); **CTA:** Clinical Trial Assay (klinikinis tyrimas).

Pastaba. Rinkinyje yra teigiami 19 egzono delecijų / L8585R / L861Q / G719X rezultatai.

Atsižvelgiant į tai, kad „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ nebuvo naudojamas atrenkant pacientus į IFUM klinikinį tyrimą, buvo atlikta papildoma veiksmingumo analizė, norint atsižvelgti į pacientus, kurie nebuvo įtraukti į tyrimą, nes atliekant CTA jų rezultatas buvo neigiamas, bet rezultatas galėjo būti teigiamas tiriant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ (t. y. „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+“ / CTA–), taip pat į pacientus, kurie buvo įtraukti į tyrimą, bet pakartotinai tiriant „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ jų rezultatas nebuvo tinkamas (t. y. „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ – nežinomas / CTA+). Visų hipotetinių analizių rezultatai iš esmės buvo panašūs į gautus atliekant pirminę veiksmingumo analizę.













Literatūra

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **65**, 7525.
3. Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* **24** (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May 3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* **26** (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* **15**, 2442.
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl), abstr 8038.

-
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4416s.
 10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* **17**, 804.
 11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Simboliai

Ant pakuotės ir etikečių gali būti pateikti šie simboliai:

Simbolis	Simbolio apibrėžimas
 Σ	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti
	Tinka naudoti iki
	In vitro diagnostikos medicinos prietaisas
	Katalogo numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris
	Saugokite nuo šviesos
	Visuotinis prekės numeris
Rn	R yra naudojimo instrukcijų (vadovo) peržiūrėtas leidimas, n yra peržiūrėtoleidimo numeris
	Temperatūros apribojimai
	Gamintojas
	Žr. naudojimo instrukcijas
	Dėmesio

Priedas A: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rankinio paruošimo protokolas

Šiame skyriuje pateikiamos instrukcijos, kaip naudoti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ su 2.3 versijos „Rotor-Gene Q“ programine įranga atviruoju režimu (t. y. nenaudojant „Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package“).

Bendroji informacija

- Reikalingų medžiagų sąrašo ieškokite Būtinės, bet nepateikiamos priemonės.
- Visų mėginių paruošimo ir išdėstymo instrukcijų ieškokite Protokolas. Mėginių įvertinimas ir Protokolas. EGFR mutacijos aptikimas.
- Prieš pradėdami kiekvieną tyrimą įsitinkinkite, kad ciklo parametrai yra tinkami.

Protokolas. temperatūros profilio sukūrimas

Prieš pradėdami sukurkite „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ analizės temperatūros profilį. DNR mėginių vertinimo ir EGFR mutacijos aptikimo ciklo parametrai yra tokie patys.

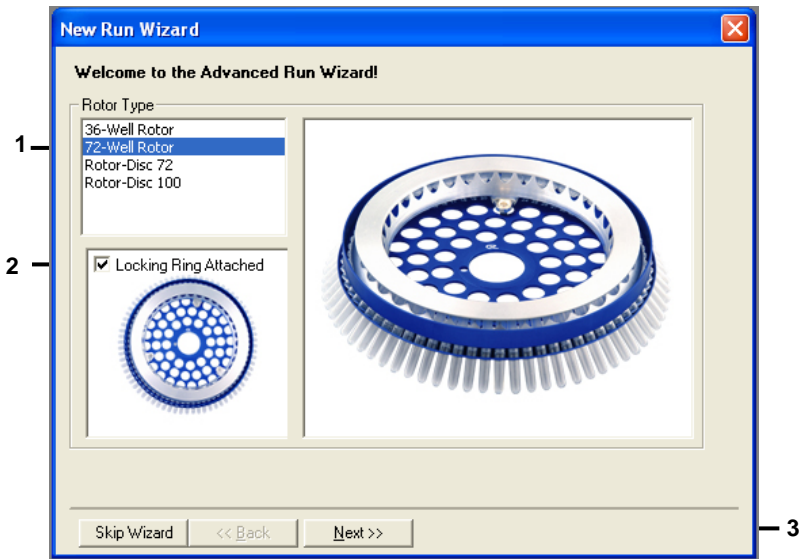
Procedūra

Ciklo parametų suvestinė pateikta 15 lentelėje.

15 lentelė. Temperatūros profilis

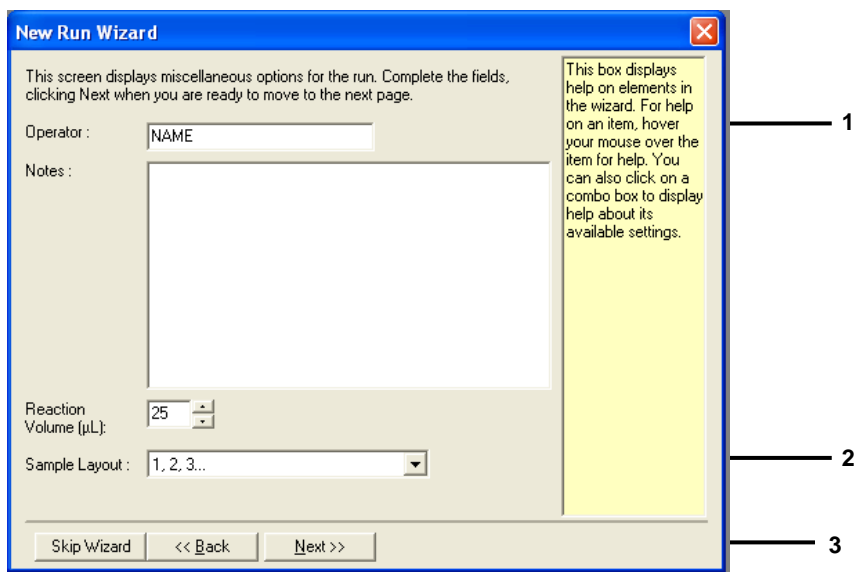
Ciklai	Temperatūra	Laikas	Duomenų gavimas
1	95 °C	15 min.	Nėra
40	95 °C	30 sek.	Nėra
	60 °C	60 sek.	Green ir Yellow

1. Du kartus spustelėkite „Rotor-Gene Q Series Software 2.3“ piktogramą, esančią kompiuterio, prijungto prie „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento, darbalaukyje.
2. Norėdami sukurti naują šabloną, pasirinkite **Empty Run** (Tuščias tyrimas), tada spustelėkite **New** (Naujas) ir įveskite „New Run Wizard“ (Naujo tyrimo vedlys).
3. Pasirinkite rotoriaus tipą **72-well rotor** (72 šulinėlių rotorius). Patvirtinkite, kad fiksuojamasis žiedas uždėtas, ir pažymėkite langelį **Locking Ring Attached** (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Spustelėkite **Next** (Kitas) (20 pav.).



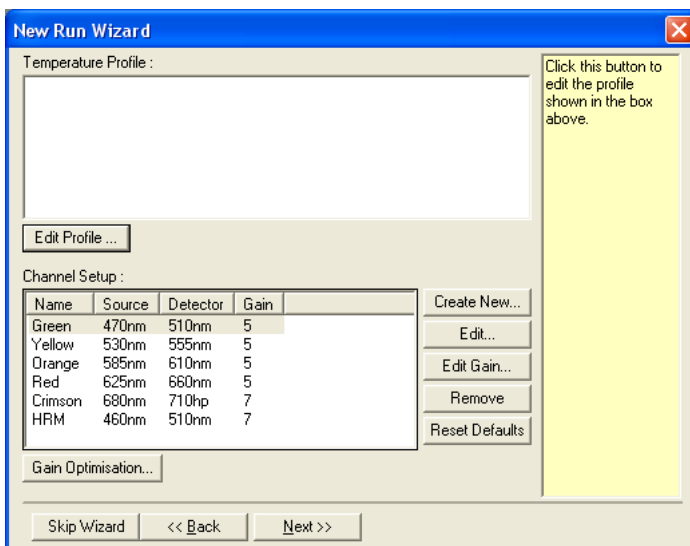
20 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (naujos procedūros vedlys). 1 = „Rotor type“ (Rotoriaus tipas); 2 = laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas); 3 = „Next“ (Kitas).

4. Įveskite operatoriaus vardą. Įtraukite pastabas ir įveskite reakcijos tūrį **25**. Įsitinkinkite, kad lauke **Sample Layout** (Mėginio išdėstymas) rodoma **1, 2, 3...** . Spustelėkite **Next** (Kitas) (21 pav.).



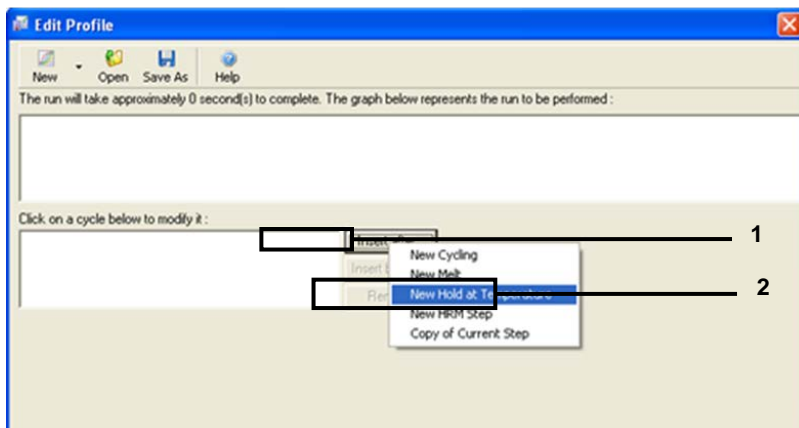
21 pav. Operatoriaus vardo ir reakcijų tūrių įvedimas. 1 = dialogo lango laukais „Operator“ (Operatorius) ir „Notes“ (Pastabos); 2 = laukais „Reaction Volume“ (Reakcijos tūris) ir „Sample Layout“ (Mėginio išdėstymas); 3 = „Next“ (Kitas).

5. Dialogo lange „New Run Wizard“ (Naujos tyrimų serijos vedlys) spustelėkite **Edit Profile** (Redaguoti profilį) (22 pav.) ir patikrinkite tyrimo parametrus, atlikdami toliau nurodytus veiksmus.



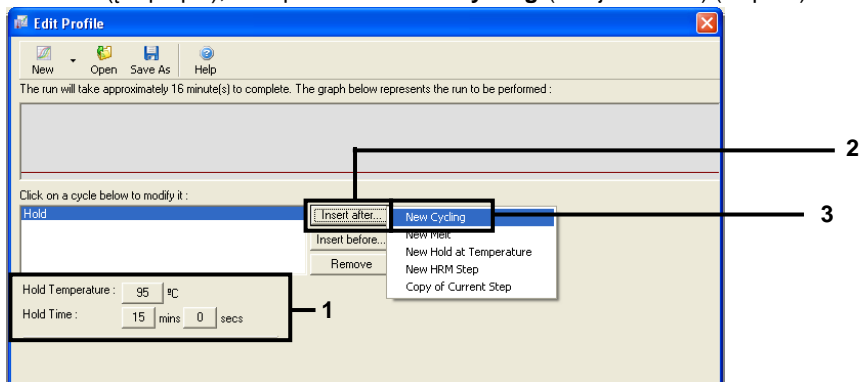
22 pav. Parinktis „Edit Profile“ (Redaguoti profilį) vedlyje „New Run Wizard“ (Naujo tyrimo vedlys).

6. Spustelėkite **Insert after** (Įterpti po) ir pasirinkite **New Hold at Temperature** (Naujas išlaikymas esant temperatūrai) (23 pav.).



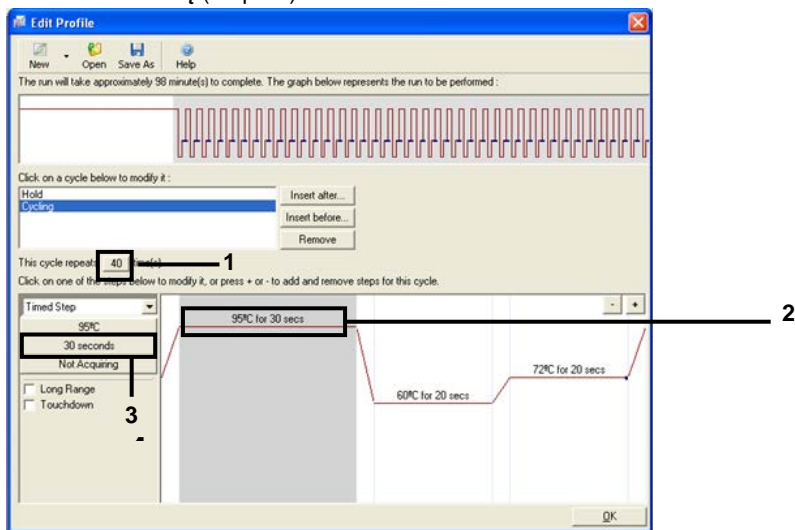
23 pav. Pradinio inkubavimo veiksmo įterpimas. 1 = „Insert After“ (Įterpti po); 2 = „New Hold at Temperature“ (Naujas išlaikymas esant temperatūrai).

7. Lauke **Hold Temperature** (išlaikymo temperatūra) nustatykite reikšmę **95 °C**, o lauke **Hold Time** (išlaikymo laikas) – **15 mins 0 secs** (15 min. 0 sek.). Spustelėkite **Insert After** (Įterpti po), tada pasirinkite **New Cycling** (Naujas ciklas) (24 pav.).



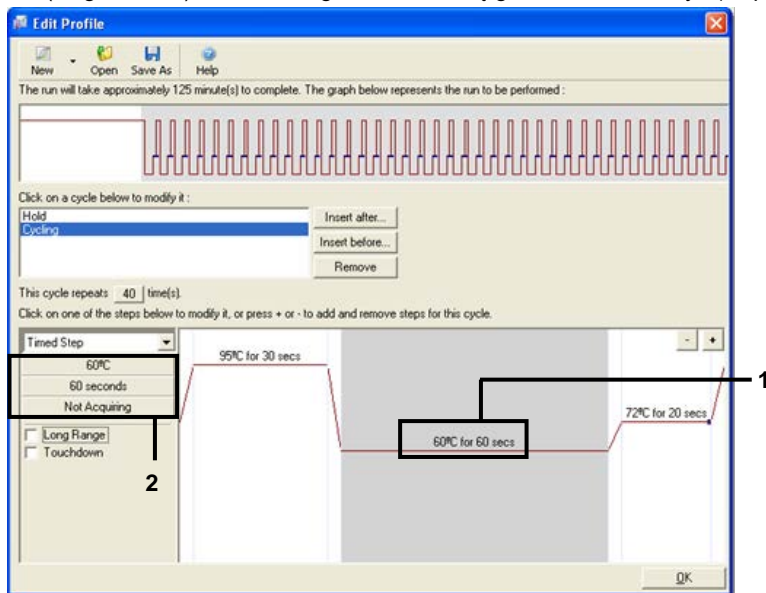
24 pav. Pradinis inkubavimo veiksmas, esant 95 °C. 1 = „Hold Temperature“ (Išlaikymo temperatūra) ir „Hold Time“ (Išlaikymo laikas); 2 = „Insert After“ (Įterpti po); 3 = „New Cycling“ (Naujas ciklas).

8. Nustatykite ciklo kartojimų skaičių **40**. Pasirinkite pirmą žingsnį ir nustatykite **95 °C 30 sekundžių** (25 pav.).



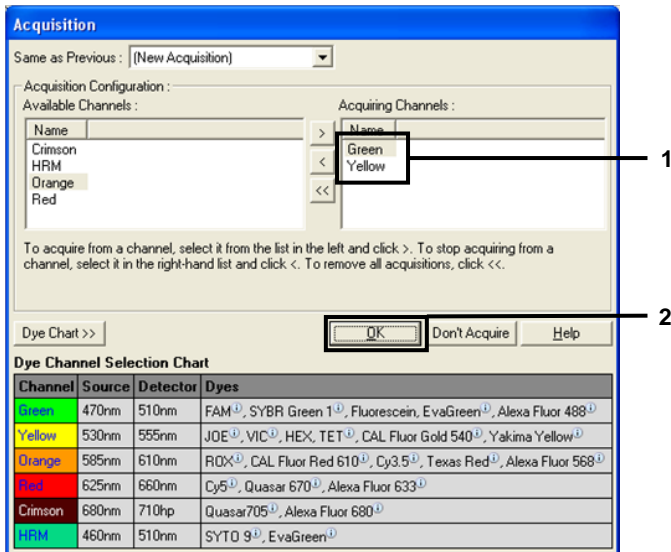
25 pav. Ciklo veiksmas, esant 95 °C. 1 = laukas „Cycle repeats“ (Ciklo kartojimų skaičius); 2 = pirmas veiksmas: temperatūros nustatymas; 3 = pirmas veiksmas: laiko nustatymas.

9. Pasirinkite antrą žingsnį ir nustatykite **60 °C 60 sekundžių**. Spustelėkite **Not Acquiring** (Negaunama), kad šio žingsnio metu būtų gaunami duomenys (26 pav.).



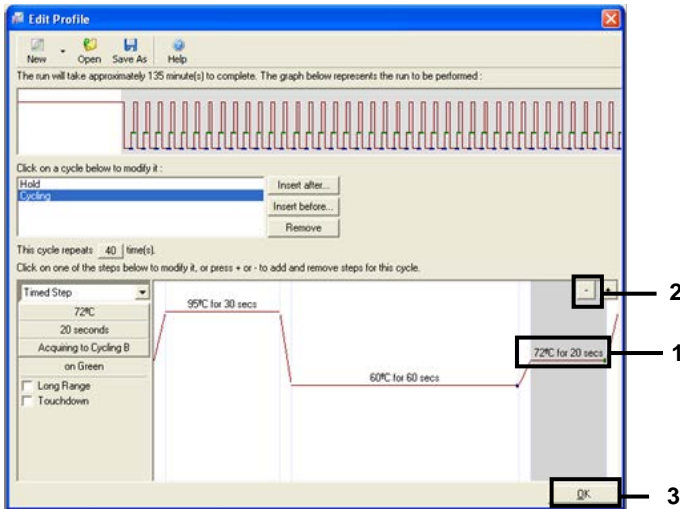
26 pav. Ciklo veiksmas, esant 60 °C 1 = antras veiksmas: temperatūros ir laiko nustatymas; 2 = „Not Acquiring“ (Negaunama).

10. Kaip gavimo kanalus pasirinkite **Green** ir **Yellow** Spustelėkite **>**, kad perkeltumėte šiuos kanalus iš sąrašo „Available Channels“ (Pasiekiami kanalai) į sąrašą **Acquiring Channels** (Gaunami kanalai). Spustelėkite „**OK**“ (Gerai) (27 pav.).



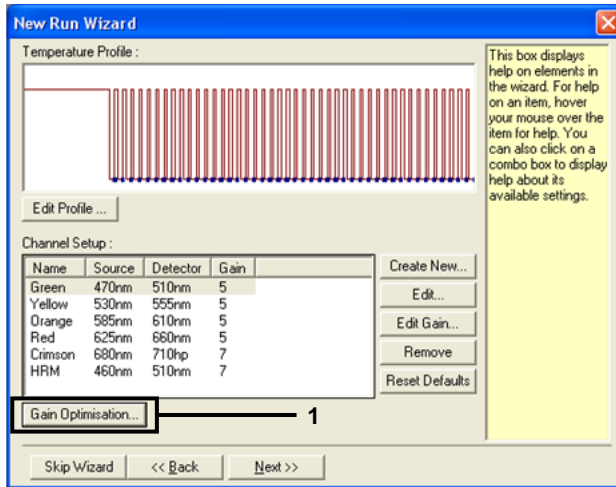
27 pav. Gavimas ciklo veiksmė, esant 60 °C 1 = Pasirinkti kanalai; 2 = Mygtukas „OK“ (Gerai).

11. Pažymėkite trečiąjį veiksmą ir spustelėkite –, kad pašalintumėte. Spustelėkite „OK“ (Gerai) (28 pav.).



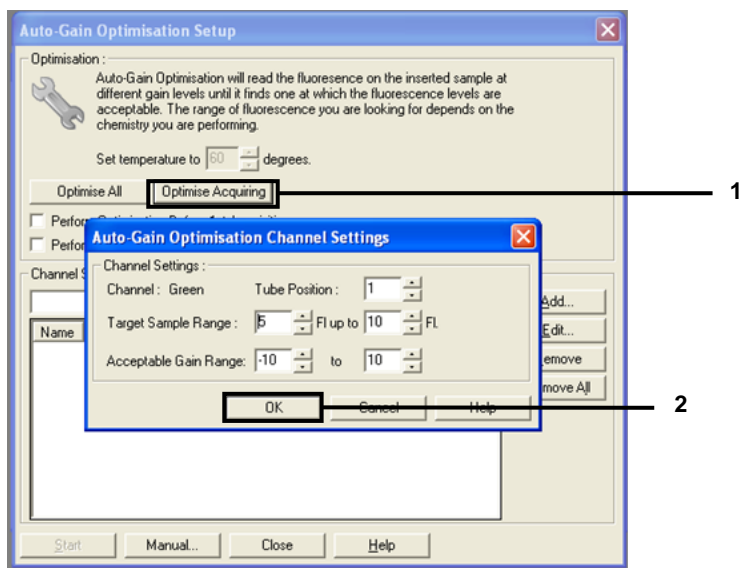
28 pav. Išplėtimo žingsnio pašalinimas. 1 = Trečias veiksmas; 2 = Panaikinti; 3 = „OK“ (Gerai).

12. Kitame dialogo lange spustelėkite **Gain Optimisation** (Gavimo optimizavimas) (29 pav.).



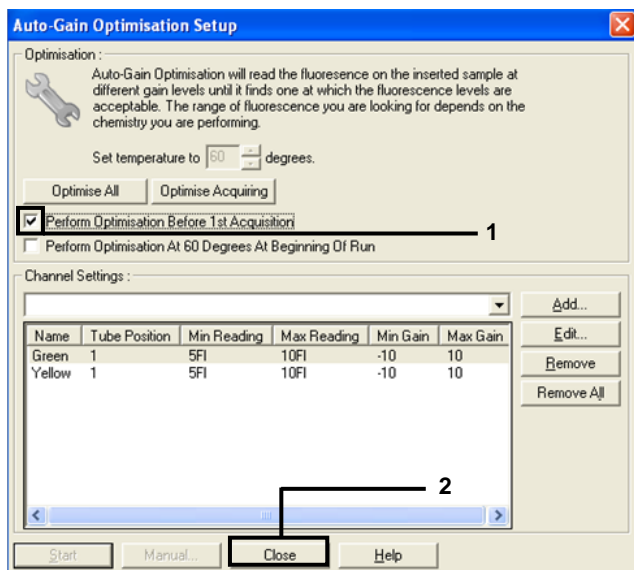
29 pav. Gain Optimisation (Gavimo optimizavimas) (1).

13. Spustelėkite **Optimize Acquiring** (Optimizuoti gavimą). Rodomi kiekvieno kanalo nustatymai. Spustelėkite „OK“ (Gerai), kad patvirtintumėte abiejų kanalų numatytąsias reikšmes. (30 pav.).



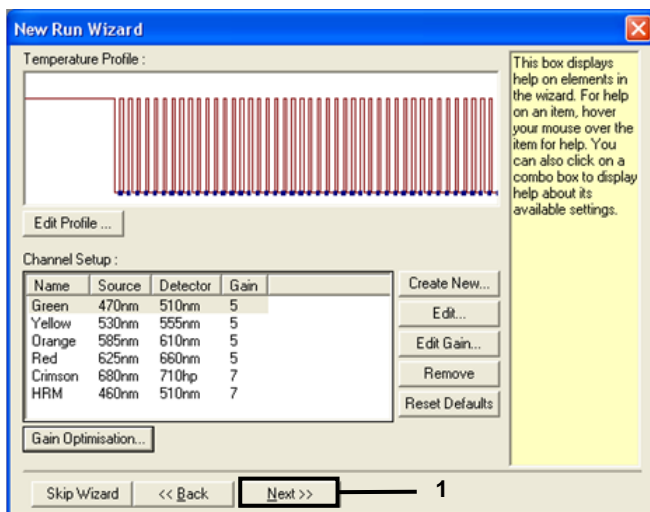
30 pav. Automatinis Green kanalo gavimo optimizavimas. 1 = „Optimise Acquiring“ (Optimizuoti gavimą); 2 = „OK“ (Gerai).

14. Pažymėkite langelį **Perform Optimisation before 1st Acquisition** (Atlikti optimizavimą prieš pirmą gavimą), tada spustelėkite **Close** (Uždaryti) ir grįžkite į vedlį (31 pav.).



31 pav. Green ir Yellow kanalų pasirinkimas. 1 = „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Atlikti optimizavimą prieš pirmą gavimą); 2 = Mygtukas „Close“ (Uždaryti).

15. Spustelėkite **Next** (Kitas) (32 pav.). Norėdami įrašyti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ šabloną (*.ret failą) atitinkamoje vietoje pasirinkdami spustelėkite **Save Template** (Įrašyti šabloną).



32 pav. „Next“ (Kitas)(1).

Procedūra (vadovas)

Protokolas. mėginių vertinimas (vadovas)

Šis protokolas naudojamas visam amplifikuojamos DNR kiekiui mėginiuose įvertinti ir turi būti atliekamas prieš EGFR analizę.

- Paruoškite mėginius, kaip aprašyta skyriuje Protokolas. Mėginių įvertinimas, iki 11 veiksmo.
- Nustatykite PGR tyrimą „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu, kaip aprašyta skyriuje Protokolas: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ „Rotor-Gene Q“ nustatymas.
- Pabaigę tyrimą, analizuokite duomenis pagal instrukcijas, pateiktas skyriuje Mėginių įvertinimo duomenų analizė.

Protokolas. EGFR mutacijos aptikimas (neautomatinis)

- Atlikus mėginio įvertinimą, jį galima tirti, norint nustatyti EGFR mutacijas.
- Paruoškite mėginius, kaip aprašyta skyriuje Protokolas: EGFR mutacijos aptikimas, iki 11 veiksmo.
- Nustatykite PGR tyrimą „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu, kaip aprašyta skyriuje Protokolas: „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ „Rotor-Gene Q“ nustatymas.
- Pabaigę tyrimą, analizuokite duomenis pagal instrukcijas, pateiktas skyriuje „EGFR mutacijų aptikimo duomenų analizė“.

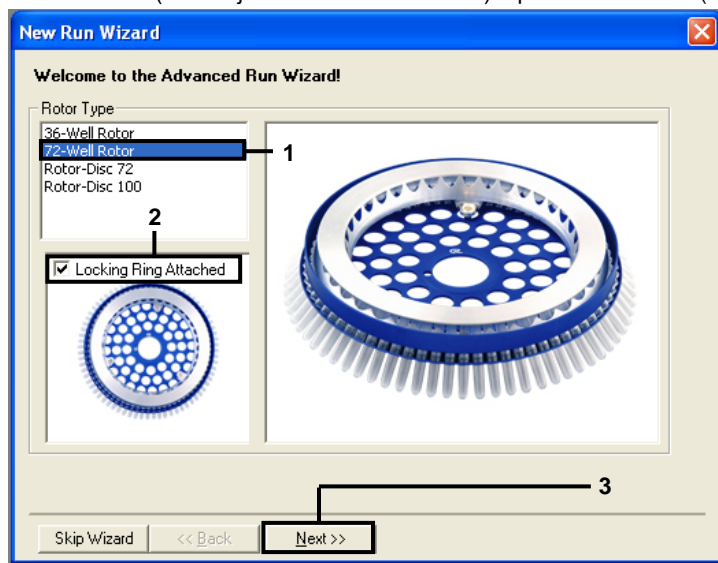
Protokolas: „therascreen EGFR RGQ PCR Kit“ „Rotor-Gene Q“ nustatymas

Procedūra

1. Atidarykite 2.3 versijos „Rotor-Gene Q“ serijos programinę įrangą ir atitinkamą „therascreen EGFR RGQ PCR Kit“ temperatūros profilį (*.ret failą).

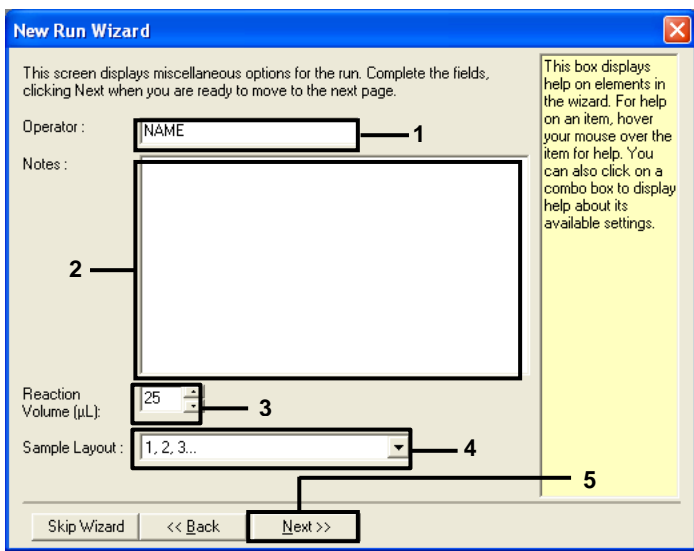
Instrukcijų, kaip sukurti temperatūros profilį ir patikrinti tyrimo parametrus, ieškokite Protokolas. temperatūros profilio sukūrimas.

2. Įsitinkinkite, kad pasirinktas tinkamas rotorius, ir pažymėkite langelį **Locking Ring Attached** (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Spustelėkite **Next** (Kitas) (33 pav.).



33 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujo tyrimo vedlys) ir darbo pradžios ekranas. 1 = „Rotor type“ (Rotoriaus tipas); 2 = laukas „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas); 3 = „Next“ (Kitas).

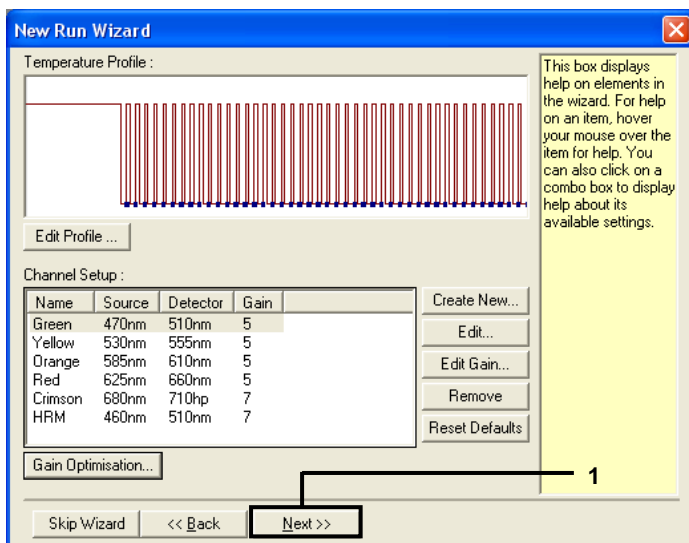
3. Įveskite operatoriaus vardą. Įtraukite pastabų, patikrinkite, kad reakcijos tūris būtų nustatytas kaip **25**, o lauke **Sample Layout** (Mėginio išdėstymas) būtų reikšmė **1, 2, 3...** Spustelėkite **Next** (Kitas) (34 pav.).



34 pav. „New Run Wizard“ (Naujo tyrimo vedlys) parinkčių ekranas. 1 = laukas „Operator“ (Operatorius); 2 = laukas „Notes“ (pastabos), 3 = laukas „Reaction Volume“ (Reakcijos tūris); 4 = laukas „Sample Layout“ (Mėginių išdėstymas), 5 = „Next“ (Kitas).

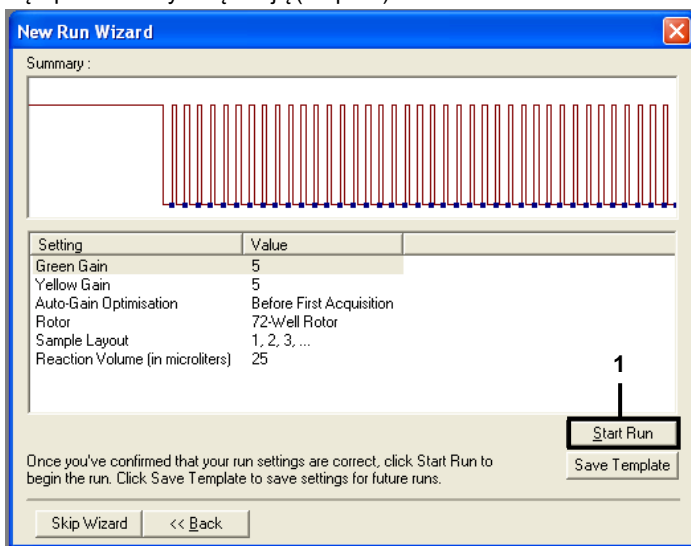
Pastaba. Kitam lange galima redaguoti temperatūros profilį. (Redaguoti nebūtina, nes temperatūros profilis buvo sukurtas pagal instrukcijas, pateiktas Protokolas temperatūros profilio sukūrimas)

4. Spustelėkite **Next** (Kitas) (35 pav.).



35 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujo tyrimo vedlys) ir temperatūros redagavimo ekranas (1 = „Next“ (Kitas)).

- Patikrinkite suvestinę, tada spustelėkite **Start Run** (Pradėti tyrimų seriją), įrašykite tyrimų serijos failą ir pradėkite tyrimų seriją (36 pav.).



36 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujo tyrimo vedlys) ir suvestinės ekranas (1 = „Start Run“ (Pradėti tyrimą)).

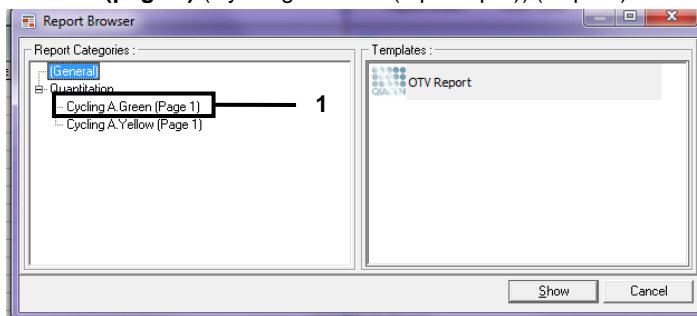
6. Naujame lange, kuris rodomas pradėjus tyrimą, atlikite vieną iš nurodytų veiksmų.

- Įveskite mėginių pavadinimus.
- Spustelėkite **Finish** (Baigti), kad galėtumėte įvesti mėginių pavadinimus vėliau. Norėdami tai padaryti, tyrimo metu arba pasibaigus tyrimui pasirinkite **Sample** (Mėginys).

Svarbu. Jei spustelėsite **Finish and Lock Samples** (Baigti ir užrakinti mėginius), nebegalėsite redaguoti mėginių pavadinimų. Turite itin atidžiai įvesti mėginių pavadinimus, kad būtų užtikrintas tinkamas mėginių tyrimas ir analizė.

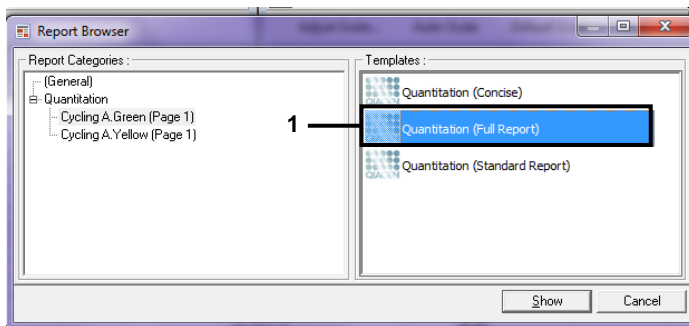
Pastaba. Įvedant mėginių pavadinimus, tuščių mėgintuvėlių laukai stulpelyje „Name“ (Pavadinimas) turėtų būti palikti tušti.

7. Pabaigę tyrimą analizuokite duomenis, kaip nurodyta skyriuje Mėginių įvertinimo duomenų analizė arba EGFR mutacijų aptikimo duomenų analizė.
8. Jei reikia kiekybinių ataskaitų, „Rotor-Gene Q“ tyrimo failo įrankių juostoje spustelėkite piktogramą **Reports** (Ataskaitos).
9. Ataskaitų naršyklėje, dalyje „Report Categories“ (Ataskaitų kategorijos) spustelėkite **Cycling A Green (page 1)** (Cycling A Green (1 puslapis)) (37 pav.).



37 pav. Ataskaitų naršyklė (1 = „Cycling A. Green (Page 1)“ (Cycling A Green (1 puslapis))

10. Dalyje „Templates“ (Šablonai) pasirinkite **Quantitation (Full Report)** (Kiekybinė (išsami ataskaita)) (38 pav.).



38 pav. Kiekybinė ataskaita (išsami ataskaita) (1).

11. Norėdami generuoti ataskaitą, spustelėkite **Show** (Rodyti).
12. Norėdami įrašyti elektroninę versiją, spustelėkite **Save As** (Įrašyti kaip).
13. Kartokite su **Cycling A. Yellow (Page 1)** (Cycling A. Yellow (1 puslapis)).

Rezultatų aiškinimas (neautomatinis)

Pasibaigus „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ tyrimui (DNR mėginio įvertinimui ar EGFR mutacijos analizei), analizuokite duomenis pagal toliau pateiktą procedūrą.

- Analizės programinės įrangos nustatymai
- DNR mėginio įvertinimo analizė (neautomatinė)
Pastaba. Mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 4 lentelėje.
- EGFR mutacijos aptikimo analizė (neautomatinė)
Pastaba. Mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 7 lentelėje.

Programinės įrangos analizės nustatymai

1. Atidarykite atitinkamą tyrimo failą (*.rex), naudodami 2.3 versijos „Rotor-Gene Q“ serijos programinę įrangą.
2. Jei prieš atliekant tyrimą mėginiams nebuvo suteiktas pavadinimas, spustelėkite **Edit Samples** (Redaguoti mėginius).
3. Stulpelyje „Name“ (Pavadinimas) įterpkite mėginių pavadinimus.
Pastaba. Tuščių mėgintuvėlių pavadinimų nerašykite.
4. Spustelėkite **Analysis** (Analizė). Analizės puslapyje spustelėkite **Cycling A. Yellow** ir patikrinkite Yellow (HEX) kanalą.
5. Spustelėkite **Named On** (Pavadinta).
Pastaba. Taip užtikrinama, kad tušti mėgintuvėliai nebūtų įtraukti į analizę.
6. Pasirinkite **Dynamic tube** (Dinaminis mėgintuvėlis).
7. Pasirinkite **Slope correct** (Teisingas nuolydis).
8. Pasirinkite **Linear scale** (Linijinė skalė).

-
9. Pasirinkite **Take Off Adj** (Kilimo koregavimas) ir viršutiniame lauke („If take off point was calculated before cycle“ (Jei kilimo taškas buvo apskaičiuotas prieš ciklą) įveskite reikšmę **15.01**, o apatiniame lauke („then use the following cycle and take off point“ (tada naudoti šį ciklą ir kilimo tašką) – reikšmę **20.01**.
 10. Nustatykite slenksčio reikšmę **0.02** ir patikrinkite Yellow (HEX) kanalo C_T reikšmes.
 11. Analizės puslapyje spustelėkite **Cycling A Green**, kad peržiūrėtumėte **Green** (FAM) kanalą.
 12. Pasirinkite **Named On** (Pavadinta).
 13. Pasirinkite **Dynamic tube** (Dinaminis mėgintuvėlis).
 14. Pasirinkite **Slope correct** (Teisingas nuolydis).
 15. Pasirinkite **Linear scale** (Linijinė skalė).
 16. Pasirinkite **Take Off Adj** (Kilimo koregavimas) ir viršutiniame lauke („If take off point was calculated before cycle“ (Jei kilimo taškas buvo apskaičiuotas prieš ciklą) įveskite reikšmę **15.01**, o apatiniame lauke („then use the following cycle and take off point“ (tada naudoti šį ciklą ir kilimo tašką) – reikšmę **20.01**.
 17. Nustatykite slenksčio reikšmę **0.075** ir patikrinkite kanalo Green (FAM) kanalo C_T reikšmes.

Mėginių įvertinimo duomenų analizė

Pasibaigus DNR mėginio įvertinimui, analizuokite duomenis, kaip nurodyta skyriuje Programinės įrangos analizės nustatymai. (Mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 4 lentelėje, 24 psl.)

Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė

Neigiamos kontrolinės medžiagos

Norint užtikrinti, kad matrica nebūtų užteršta, NTC neturi generuoti mažesnės nei 40 C_T reikšmės Green (FAM) kanale.

Norint užtikrinti tinkamą tyrimo nustatymą, NTC turi rodyti amplifikaciją diapazone nuo 29,85 iki 35,84 Yellow (HEX) kanale. Nurodytos reikšmės turi patekti į šį diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes.

Teigiama kontrolinė medžiaga

EGFR PC turi pateikti C_T reikšmę Green (FAM) kanale, kuri patektų į diapazoną nuo 28,13 iki 34,59. Jei reikšmė nepatenka į šį diapazoną, tai rodo tyrimo nustatymo problemą. Tyrimas nepavyko.

Pastaba. Mėginio duomenų naudoti negalima, jei neigiamos arba teigiamos kontrolinės medžiagos tyrimas nepavyksta.

Mėginių analizė

Jei DNR mėginio įvertinimo tyrimo kontrolės yra tinkamos, analizę galima tęsti. Mėginio kontrolinės medžiagos C_T reikšmė turi patekti į diapazoną nuo 23,70 iki 31,10 Green (FAM) kanale. Jei mėginio C_T reikšmė nepatenka į šį diapazoną, pateikiamos toliau nurodytos rekomendacijos.

- < 23,70 mėginio kontrolinio tyrimo C_T

Mėginiai, kurių kontrolinės medžiagos C_T reikšmė yra < 23,70 (didelė DNR koncentracija), perkraus mutacijos tyrimus, todėl juos reikia atskiesti. Norėdami aptikti žemo lygio mutacijas, per daug koncentruotus mėginius reikia atskiesti, kad C_T reikšmės pateiktų į diapazoną nuo 23,70 iki 31,10. Atskiedus mėginio DNR, padidėja C_T reikšmė (atskiedus santykiu 1:1, C_T reikšmė padidėja apytiksliai 1,0). Skieskite mėginius rinkinyje pateiktu vandeniu (Vanduo skiedimui).

- > 31,10 mėginio kontrolinio tyrimo C_T

Rekomenduojama pakartotinai išskirti mėginius, kurių kontrolinės medžiagos C_T yra > 31,10 Green (FAM) kanale. Norint aptikti visas EGFR mutacijas, esant nurodytoms tyrimo ribinėms reikšmėms, pradinė DNR matrica yra nepakankama.

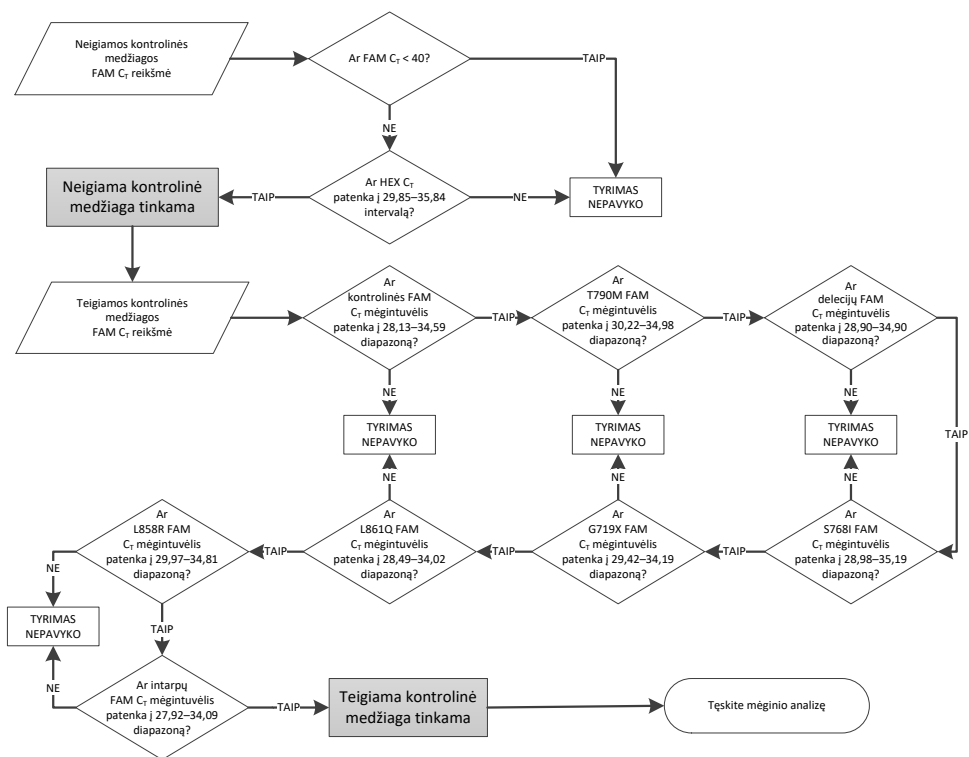
EGFR mutacijų aptikimo duomenų analizė

Kai norint aptikti EGFR mutacijas reikia iširti mėginį, prieš tai turi būti atliktas DNR mėginio įvertinimas (žr. Mėginių įvertinimo duomenų analizė).

Pasibaigus EGFR mutacijų aptikimui, analizuokite duomenis, kaip nurodyta Programinės įrangos analizės nustatymai. (mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 7 lentelėje.)

Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė

Žr. tyrimo kontrolinės medžiagos analizės schemą, parodytą 39 paveikslyje.



39 pav. Tyrimo kontrolinės medžiagos analizės schema, skirta EGFR mutacijoms aptikti.

Neigiamos kontrolinės medžiagos

Norint užtikrinti, kad matrica nebūtų užteršta, kiekvienos EGFR mutacijos tyrimo NTC neturi generuoti mažesnės nei 40 C_T reikšmės Green (FAM) kanale.

Norint užtikrinti tinkamą tyrimo medžiagos nustatymą, NTC turi rodyti amplifikaciją diapazone nuo 29,85 iki 35,84 Yellow (HEX) kanale. Nurodytos reikšmės turi patekti į šį diapazoną, įskaitant nurodytas reikšmes.

Teigiama kontrolinė medžiaga

Kiekvienos EGFR mutacijos tyrime EGFR PC turi pateikti C_T reikšmę Green (FAM) kanale, kuri patektų į diapazoną, kaip parodyta 16 lentelėje. Jei reikšmė nepatenka į šį diapazoną, tai rodo tyrimo nustatymo problemą. Tyrimas nepavyko.

Pastaba. Mėginio duomenų naudoti negalima, jei tyrimo neigiamos arba teigiamos kontrolinės medžiagos tyrimas nepavyksta.

16 lentelė. Priimtini reakcijos teigiamos kontrolinės medžiagos C_T diapazonai (EGFR mutacijos aptikimo tyrimas)

Reakcijos mišinys	Mėginys	Kanalas	C_T diapazonas
Kontrolinis	PC	Green	nuo 28,13 iki 34,59
T790M	PC	Green	nuo 30,22 iki 34,98
Delecijos	PC	Green	nuo 28,90 iki 34,90
L858R	PC	Green	nuo 29,97 iki 34,81
L861Q	PC	Green	nuo 28,49 iki 34,02
G719X	PC	Green	nuo 29,42 iki 34,19
S768I	PC	Green	nuo 28,98 iki 35,19
Intarpai	PC	Green	nuo 27,92 iki 34,09

Mėginio analizė – mėginio kontrolinės medžiagos Green (FAM) kanalo C_T reikšmė

Jei EGFR mutacijos aptikimo tyrimo teigiamos ir neigiamos kontrolinės medžiagos yra tinkamos, galima tęsti EGFR mutacijos aptikimą mėginiuose.

Mėginio kontrolinės medžiagos C_T reikšmė Green (FAM) kanale turi patekti į diapazoną nuo 23,70 iki 31,10. (mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 7 lentelėje.)

Jei mėginio kontrolinės medžiagos C_T reikšmė nepatenka į šį diapazoną, pateikiamos toliau nurodytos rekomendacijos.

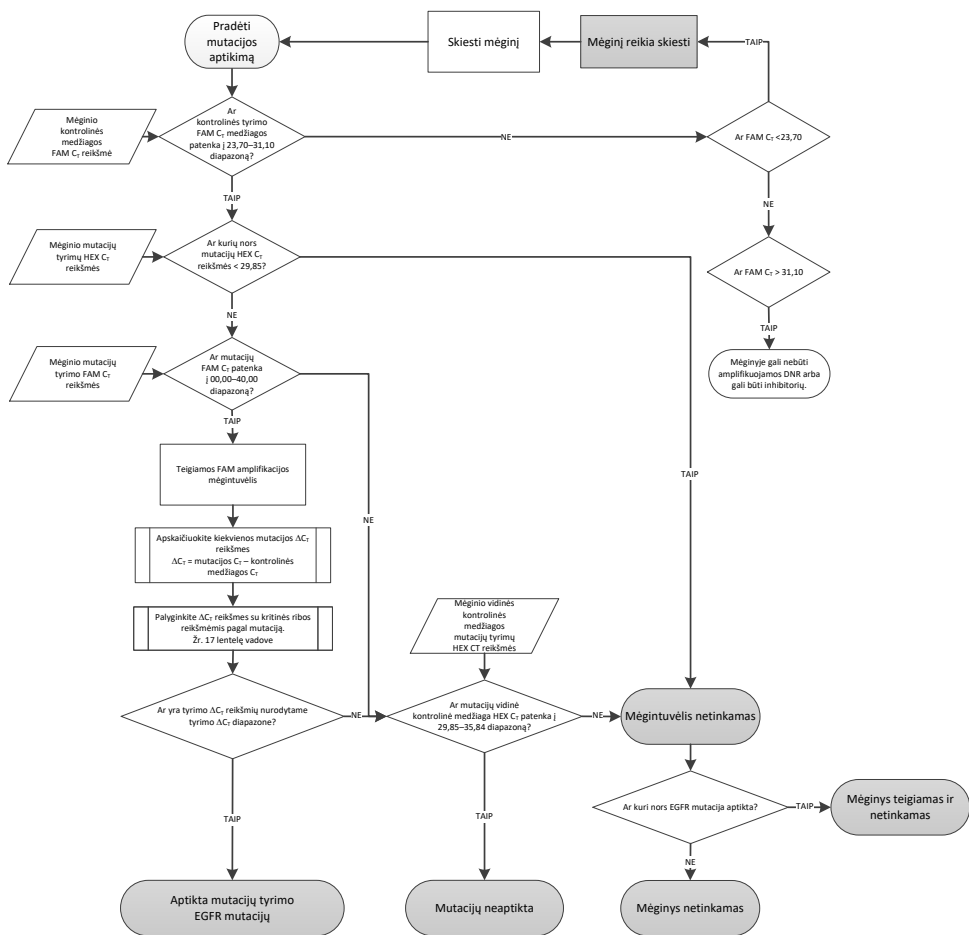
- $< 23,70$ mėginio kontrolinio tyrimo C_T

Mėginiai, kurių kontrolinės medžiagos C_T reikšmė yra $< 23,70$ (didelė DNR koncentracija), perkraus mutacijos tyrimus, todėl juos reikia atskiesti. Norėdami aptikti žemo lygio mutacijas, per daug koncentruotus mėginius reikia atskiesti, kad C_T reikšmės pateiktų į diapazoną nuo 23,70 iki 31,10. Atskiedus mėginio DNR, padidėja C_T reikšmė (atskiedus santykiu 1:1, C_T reikšmė padidėja apytiksliai 1,0). Skieskite mėginius rinkinyje pateiktu vandeniu (Vanduo skiedimui).

- $> 31,10$ mėginio kontrolinio tyrimo C_T

Rekomenduojama pakartotinai išskirti mėginius, kurių kontrolinės medžiagos C_T yra $> 31,10$ Green (FAM) kanale. Norint aptikti visas EGFR mutacijas, esant nurodytoms tyrimo ribinėms reikšmėms, pradinė DNR matrica yra nepakankama.

Žr. EGFR mutacijos aptikimo mėginio analizės schemą, parodytą 40 paveikslėlyje.



40 pav. Mėginio analizės schema, skirta EGFR mutacijoms aptikti.

Mėginio analizė – mėginio vidinės kontrolinės medžiagos Yellow (HEX) kanalo C_T reikšmė

Pastaba. Žr. EGFR mutacijos aptikimo mėginio analizės schemą, parodytą 40 paveikslėlyje.

Turi būti išanalizuoti visi kiekvieno mėginio mėgintuvėliai. Patikrinkite, kad kiekvienas mėgintuvėlis iš vidinės kontrolinės medžiagos Yellow (HEX) kanale generuotų HEX signalą diapazone nuo 29,85 iki 35,84. Galimi 3 variantai.

- Jei bet kurio tyrimo vidinės kontrolinės medžiagos C_T reikšmė mažesnė už nurodytą diapazoną (<29,85), Yellow (HEX) kanalo amplifikacijos rezultatas yra netinkamas. Mėgintuvėlio amplifikacija Yellow (HEX) kanale yra netinkama.
- Jei vidinės kontrolinės medžiagos C_T reikšmė patenka į nurodytą diapazoną (nuo 29,85 iki 35,84), Yellow (HEX) kanalo amplifikacijos rezultatas yra teigiamas.
- Mėgintuvėlio amplifikacija Yellow (HEX) kanale yra tinkama.
- Jei vidinės kontrolinės medžiagos C_T reikšmė viršija nurodytą diapazoną (> 35,84), Yellow (HEX) kanalo amplifikacijos rezultatas yra neigiamas.

Jei Green (FAM) kanale amplifikacija vyksta, o tos reakcijos ΔC_T reikšmė mažesnė arba lygi to mėgintuvėlio tyrimo kritinei reikšmei, Yellow (HEX) kanalo amplifikacija yra tinkama. Jei Green (FAM) kanale mėgintuvėlio amplifikacija nevyksta arba ΔC_T reikšmė didesnė už tyrimo kritinę reikšmę, Yellow (HEX) kanalo amplifikacija yra netinkama.

Vidinės kontrolinės medžiagos amplifikacija Yellow (HEX) kanale gali būti nesėkminga dėl PGR inhibicijos. Atskiedus mėginį galima sumažinti inhibitorių poveikį. Atkreipkite dėmesį, kad atlikus šį veiksmažaidį taip pat atskiedžiama mėginyje esanti tikslinė DNR. Skieskite mėginius rinkinyje pateiktu vandeniui (Vanduo skiedimui).

Mėginio analizė – mėginio mutacijų tyrimų Green (FAM) kanalo C_T reikšmė

Visų septynių EGFR mutacijų reakcijų mišinių Green (FAM) kanalo reikšmes reikia patikrinti pagal 17 lentelėje pateiktas reikšmes. Nurodytos reikšmės turi patekti į šių reikšmių diapazoną, įskaitant pateiktas reikšmes. (mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 7 lentelėje.)

17 lentelė. Priimtinos mėginio EGFR mutacijos reakcijų reikšmės Green (FAM) kanale (EGFR mutacijos aptikimo tyrimas)

Tyrimas	C _T diapazonas	Kritinė riba (ΔC _T)
T790M	nuo 0,00 iki 40,00	≤ 7,40
Delecijos	nuo 0,00 iki 40,00	≤ 8,00
L858R	nuo 0,00 iki 40,00	≤ 8,90
L861Q	nuo 0,00 iki 40,00	≤ 8,90
G719X	nuo 0,00 iki 40,00	≤ 8,90
S768I	nuo 0,00 iki 40,00	≤ 8,90
Intarpai	nuo 0,00 iki 40,00	≤ 8,00

- Jei mėginio C_T reikšmės Green (FAM) kanale patenka į nurodytą diapazoną, FAM amplifikacija yra teigiama.
- Jei mėginio C_T reikšmės Green (FAM) kanale viršija nurodytą diapazoną, arba amplifikacija nevyksta, FAM amplifikacija yra neigiama.

Apskaičiuokite kiekvieno EGFR mutacijos aptikimo mėgintuvėlio, kuriame FAM amplifikacija yra teigiama, ΔC_T reikšmę, kaip parodyta, ir įsitikinkite, kad mutacijos ir kontrolinės medžiagos C_T reikšmės yra iš to paties mėginio. (mėgintuvėlių išdėstymas pateiktas 7 lentelėje.)

$$\Delta C_T = [\text{mutacijos tyrimo } C_T \text{ reikšmė}] - [\text{kontrolinio tyrimo } C_T \text{ reikšmė}]$$

Palyginkite mėginio ΔC_T reikšmę su analizuojamo tyrimo kritinės ribos reikšme (17 lentelė). Įsitikinkite, kad pritaikyta tinkama kritinės ribos reikšmė.

Kritinės ribos reikšmė yra taškas, virš kurio tyrimo signalas gali būti teigiamas dėl laukinio tipo DNR ARMS pradmens foninio signalo. Jei mėginio ΔC_T reikšmė yra didesnė nei tyrimo kritinės ribos taško reikšmė, mėginys klasifikuojamas kaip neigiamas arba neaptinkamas tyrime, naudojant šį rinkinį.

Kiekvieno mėginio kiekvienos mutacijos reakcijos būklė gali būti viena iš šių:

- Mutacija aptikta
- Mutacijų neaptikta
- Negalioja

Mutacija aptikta

Green (FAM) kanalo amplifikacija teigiama, o ΔC_T reikšmė yra ties ribine reikšme arba mažesnė. Jei aptinkamos kelios mėginio mutacijos, visas galima įtraukti į ataskaitą.

Mutacijų neaptikta

Green (FAM) kanalo amplifikacija teigiama, o ΔC_T reikšmė didesnė už ribinę reikšmę.

Green (FAM) kanalo amplifikacija yra neigiama, o Yellow (HEX) kanalo amplifikacija (vidinės kontrolinės medžiagos) – teigiama.

Negalioja

Yellow (HEX) kanalo amplifikacija (vidinės kontrolinės medžiagos) yra netinkama.

Green (FAM) kanalo ir Yellow (HEX) kanalo amplifikacija (vidinės kontrolinės medžiagos) yra neigiama.

Pastaba. Viename mėgintuvėlyje mėginio Yellow (HEX) kanalo amplifikacija gali būti neigiama, tačiau kitame mėgintuvėlyje Green (FAM) kanalo amplifikacija gali būti teigiama. Tokiu atveju rezultatas „mutation detected“ (mutacija aptikta) antrajame mėgintuvėlyje gali būti laikomas tinkamu, tačiau konkreti nustatyta mutacija gali būti ne vienintelė galima mėginio mutacija.

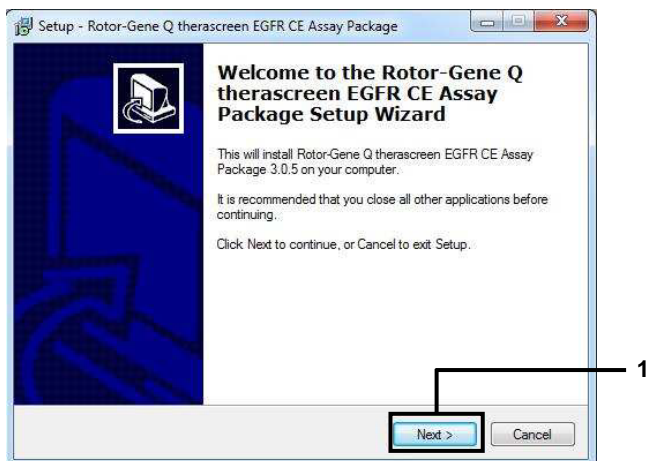
B priedas: „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ diegimas

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ skirtas naudoti kartu su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu ir 72 šulinėlių rotoriumi. „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ pateikiamas atskirai CD (kat. nr. 9023537). Į tyrimo paketą įtraukta „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ ir „*therascreen* EGFR CE Locked Template“.

Pastaba. „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ suderinamas tik su 2.3 versijos „Rotor-Gene Q“ programine įranga. Prieš pradėdami diegti „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ įsitikinkite, kad įdiegta tinkama „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos versija. Jei „Rotor-Gene Q MDx“ instrumentas buvo pateiktas su ankstesnės versijos programine įranga, atnaujinkite ją atsisiųsdami 2.3 versijos „Rotor-Gene Q“ programinę įrangą iš „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ produktų puslapio (skyriuje „Operating Software“ (Operacinė programinė įranga), dalyje „Product Resources“ (Produktų ištekliai); žr. www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources).

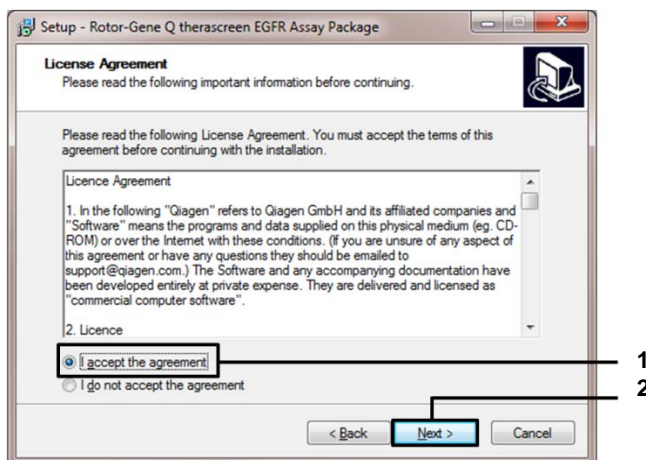
Procedūra

1. Užsisakykite „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ CD (kat. nr. 9023537).
2. Įdėkite CD į kompiuterio, prijungto prie „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento, CD įrenginį.
3. Jei CD automatiškai nepaleidžiamas, du kartus spustelėkite **therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe**, kad pradėtumėte įdiegimą.
Arba raskite ir paleiskite šį vykdomosios programos failą iš prijungto kompiuterio failų naršyklės.
Atidaromas „*therascreen* EGFR CE Assay Package“ sąrankos vedlys.
4. Norėdami tęsti spustelėkite **Next** (Kitas) (41 pav.).



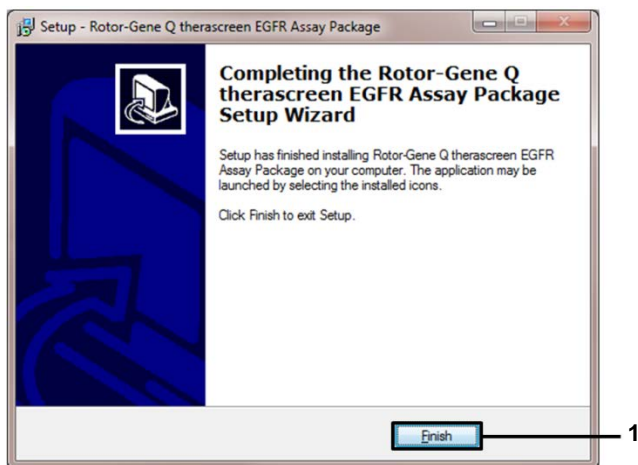
41 pav. Dialogo langas „Setup Wizard“ (Sąrankos vedlys) (1 = „Next“ (Kitas).

5. Dialogo lange perskaitykite licencijos sutartį ir pasirinkite **I accept the agreement** (Sutinku su sutarties sąlygomis). Norėdami tęsti spustelėkite **Next** (Kitas) (42 pav.). Sąranka paleidžiama automatiškai.



42 pav. Dialogo langas „License Agreement“ (Licencijos sutartis). 1 = „I accept the agreement“ (Sutinku su sutarties sąlygomis); 2 = „Next“ (Kitas).

6. Baigus įdiegimą, dialogo lange „Setup (sąrankos) vedlys“ spustelėkite **Finish** (Baigti) (43 pav.).



43 pav. Nustatymo vedlio darbo užbaigimas (1 = „Finish“ (Baigti)).

7. Paleiskite kompiuterį iš naujo.

„*thetascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ (EGFR CE Locked šablonas) ir „*thetascreen* EGFR CE Locked Template“ (*thetascreen* EGFR CE Locked šablonas) nuorodos sukuriamos automatiškai ir rodomos darbalaukyje (44 pav.).



thetascreen EGFR CE
Control Run Locked
Template



thetascreen EGFR CE
Locked Template

44 pav. „EGFR CE Control Run Locked Template“ (EGFR CE Control Run Locked šablonas) ir „EGFR CE Locked Template“ (EGFR CE Locked šablonas) piktogramos.

Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu **www.qiagen.com/Support**, skambinkite tel. 00800–22–44–6000 arba kreipkitės į vieną iš mūsų QIAGEN techninės priežiūros skyrių ar vietinių pardavėjų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite **www.qiagen.com**).

Užsakymo informacija

Gaminys	Turinys	Kat. nr.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	24 reakcijos: kontrolinis tyrimas, 7 mutacijų tyrimas, teigiama kontrolė, <i>Taq</i> DNR polimerazė, NTC skirtas vanduo ir vanduo mėginiams skiesti.	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	Programinės įrangos protokolų paketas, skirtas naudoti su „ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit“ ir „QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR preparatų: „QIAamp MinElute“ [®] cilindry, proteinazė K, buferiniai tirpalai ir Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 paruošimų: 50 „QIAamp MinElute“ cilindry, proteinazė K, buferiniai tirpalai ir Collection Tubes (2 ml)	56404
„Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ ir priedai		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, diegimas ir mokymas	9002033

Gaminys	Turinys	Kat. nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR ciklų valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai: apima 1 metų garantiją dalims ir darbui, montavimas ir mokymai neįtraukti	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aliuminio blokas rankiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete 72 x 0,1 ml mėgintuvėliuose	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 1000 reakcijų	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangteliai 10 000 reakcijų	981106

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų gaminių garantinių įsipareigojimų ribojimą pateikta atitinkamame „QIAGEN“ rinkinio vadove arba naudotojo vadove. „QIAGEN“ rinkinių vadovai arba naudotojo vadovai pasiekiami svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti „QIAGEN“ techninės pagalbos skyriaus ar vietinio platintojo.

Dokumento peržiūrų istorija

Data	Keitimai
R4, 2018 m. kovas	<p>Pakeisti nustatymo ir laikymo laikai, patikslinant atšildymo laiką ir bendrą laiką dalyje „Laikymo sąlygos“ ir 2 bei 5 lentelėje.</p> <p>Atnaujintas 40 pav. Mėginio analizės schema, skirta EGFR mutacijoms aptikti.</p> <p>Įtraukta „QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit“ (kat. nr. 60404) užsakymo informacija</p>
R5, 2019 m. sausis	<p>Pridėtas įgaliotasis atstovas (priekinis viršelis).</p> <p>Atnaujintas skyrius „Simboliai“.</p>
R6, 2019 m. spalį	<p>Pakeista teisinė informaciją apie gamintoją (antraštinis puslapis)</p> <p>Instrumento pavadinimas pakeistas iš „Rotor-Gene Q MDx“ į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“, kad atitiktų instrumento etiketėje nurodytą pavadinimą</p> <p>Pridėta reagentų laikymo sąlyga skyriuje „Reagentų laikymas ir naudojimas“.</p> <p>Atnaujinta 1 lentelė, kurioje pridėta pastaba dėl COSM6254 pašalinimo iš COSMIC duomenų bazės</p> <p>Skyriuje „Apribojimai“ atnaujinta informacija apie 19 egzono delecijų tyrimą ir L858R tyrimą.</p> <p>Iš antraštinio puslapio ir simbolių skyriaus pašalintas EC + REP simbolis</p>

„*therascreen* EGFR RQ PCR Kit“ ribotosios licencijos sutartis

Naudodamas šį gaminį pirkėjas ar naudotojas sutinka su šiomis sąlygomis.

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su jį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytuose protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.qiagen.com. QIAGEN naudotojams pateikiami keli papildomi protokoliai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino arba optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokoliai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Jei aiškiai nenurodyta licencijoje, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiminti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti anksčiau nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo komplektu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite www.qiagen.com.

Prekių ženklai: „QIAGEN®“, „Sample to Insight®“, „QIAamp®“, „MinElute®“, „Rotor-Gene®“, „Scorpions®“, „*therascreen*®“ (QIAGEN Group); „FAM™“, „HEX™“ („Thermo Fisher Scientific Inc.“); „GIOTRIF®“ („Boehringer Ingelheim“), „IRESSA®“ („AstraZeneca Group“). Šiame dokumente vartojami registruotieji pavadinimai, prekių ženklai ir kt., net jei jie specialiai nepažymėti, vis tiek yra saugomi įstatymų.

„*therascreen* EGFR RQ PCR Kit“ CE paženklintas diagnostikos rinkinys pagal Europos direktyvą 98/79/EB dėl „in vitro“ diagnostikos medicinos prietaisų. Tiekiamas neįvisas šalis.

1119191 10/2019 HB–1909–006 © 2019 QIAGEN. Visos teisės saugomos.

