

Tháng 3 năm 2022

Hướng dẫn Sử dụng *therascreen*[®] EGFR Plus RGQ PCR Kit



Phiên bản 1

IVD

Dùng cho Mục đích Sử dụng Chẩn đoán trong Ống nghiệm
Dùng với huyết tương hoặc mô FFPE

Để sử dụng với dụng cụ Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM và
Rotor-Gene[®] AssayManager[®]



REF

874611



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, ĐỨC

R1

MAT

1126175VN

Mục lục

Mục đích Sử dụng	6
Tuyên bố chỉ định sử dụng	6
Mô tả và Nguyên tắc	7
Tóm tắt và giải thích	7
Nguyên lý của quy trình	10
Công nghệ	12
Vật tư được Cung cấp	16
Thành phần bộ dụng cụ	16
Hình thức bộ dụng cụ và xét nghiệm	17
Nền tảng và phần mềm	19
Vật tư Yêu cầu nhưng Không được Cung cấp	20
Thuốc thử bổ sung để chuẩn bị mẫu	20
Vật tư tiêu hao và thiết bị thí nghiệm thông thường	20
Thiết bị	21
Cảnh báo và Phòng ngừa	23
Thông tin an toàn	23
Các biện pháp phòng ngừa	23
Bảo quản và Xử lý Thuốc thử	26
Điều kiện vận chuyển	26
Điều kiện bảo quản	26
Độ ổn định	27
Bảo quản và Xử lý Mẫu	28

Mẫu FFPE	28
Mẫu huyết tương.....	29
Các mẫu DNA bộ gen và DNA lưu thông tự do.....	29
Quy trình thực hiện.....	30
Giao thức: Tách chiết và chuẩn bị DNA	30
Giao thức: tách chiết gDNA từ các mẫu FFPE.....	30
Giao thức: Tách chiết gDNA tự động từ các mẫu FFPE bằng QIASymphony SP ...	32
Giao thức: Tách chiết gDNA thủ công từ các mẫu FFPE.....	32
Giao thức: Khử paraffin đoạn FFPE với QIAGEN Deparaffinization Solution	33
Giao thức: Giao thức tiền xử lý để sử dụng với QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	36
Giao thức: tách chiết ccfDNA từ các mẫu huyết tương.....	39
Giao thức: Tách chiết ccfDNA tự động từ các mẫu huyết tương bằng QIASymphony SP	40
Giao thức: Tách chiết ccfDNA thủ công từ các mẫu huyết tương.....	40
Giao thức: định lượng và chuẩn hóa gDNA	41
Giao thức: Đánh giá đột biến <i>EGFR</i> bằng qPCR trên dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM	43
Giao thức: Chuẩn bị dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.....	47
Giải thích Kết quả [nếu có]	59
Mẫu chứng.....	59
Mẫu	60
Nhãn	62
Xét nghiệm lại	65
Hạn chế	68

Đặc tính Hiệu năng.....	70
Giới hạn trống	70
Giới hạn Phát hiện	71
Đầu vào DNA	73
Khả năng lặp lại	74
Khả năng tái lập	77
Các chất gây nhiễu	80
Độ đặc hiệu và phản ứng chéo	83
Nhiễm bản chéo và khả năng mang sang	83
Khung thời gian Sử dụng	84
Hiệu suất Lâm sàng	85
Tài liệu tham khảo	93
Hướng dẫn Xử lý sự cố.....	95
Kiểm soát Chất lượng	100
Biểu tượng	101
Thông tin Liên hệ.....	102
Phụ lục A: Cài đặt phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in và Nhập Hồ sơ Xét nghiệm	103
Phụ lục B: Chạy Hồ sơ Xét nghiệm FFPE và Huyết tương trong Cùng một Thí nghiệm	107
Thông tin Đặt hàng.....	110
Lịch sử Sửa đổi Tài liệu.....	113

Mục đích Sử dụng

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit là xét nghiệm real-time PCR trong ống nghiệm để phát hiện định tính và xác định các đột biến ở các exon 18, 19, 20 và 21 của gen thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*) (1) trong DNA lấy từ mô u cố định formalin, gắn paraffin (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) và huyết tương của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit còn được chỉ định để đo bán định lượng đột biến ở các exon 18, 20 và 21 của gen *EGFR* trong huyết tương người nhằm hỗ trợ cho việc điều trị bệnh nhân ung thư NSCLC.

Xét nghiệm này dành cho nhân viên được đào tạo sử dụng trong môi trường phòng thí nghiệm chuyên nghiệp

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit được dùng cho mục đích sử dụng chẩn đoán trong ống nghiệm.

Tuyên bố chỉ định sử dụng

Xét nghiệm này được sử dụng để hỗ trợ lựa chọn bệnh nhân NSCLC cho liệu pháp điều trị bằng chất ức chế tyrosine kinase (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) *EGFR*.

Mô tả và Nguyên tắc

Tóm tắt và giải thích

Các đột biến trong gen gây ung thư *EGFR* được tìm thấy trong bệnh ung thư ở người (1, 2). Sự hiện diện của những đột biến này tương quan với việc đáp ứng một số liệu pháp điều trị bằng chất ức chế tyrosine kinase (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) (3–8). Những đột biến như vậy trong gen gây ung thư *EGFR* hiện diện trong nhóm bệnh nhân NSCLC nói chung với tần suất xấp xỉ 10% ở bệnh nhân đến từ Hoa Kỳ, Châu Âu hoặc Úc và lên đến 30% ở bệnh nhân đến từ Nhật Bản và Đài Loan (1, 2, 9).

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit là xét nghiệm real-time PCR (phản ứng chuỗi polymerase) để phát hiện 42 đột biến trong gen liên quan đến ung thư *EGFR* bằng cách sử dụng Hệ thống Đột biến Chịu nhiệt Khuếch đại (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) (10, 11) và công nghệ kẹp PCR để phát hiện và xác định định tính các đột biến trong gen *EGFR*; các exon 18, 19, 20 và 21 (Bảng 1). Bộ dụng cụ này cho phép bán định lượng G719X (X = A, S hoặc C; exon 18), T790M (exon 20), C797Sa và C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) và L861Q (exon 21) trong mẫu DNA tách chiết từ huyết tương người. Tóm tắt:

- G719X trong exon 18 (phát hiện và bán định lượng G719S, G719A hoặc G719C nhưng không phân biệt giữa các đột biến này)
- 28 đột biến mất đoạn ở exon 19 (phát hiện sự hiện diện của bất kỳ đột biến nào trong số 28 đột biến mất đoạn nhưng không phân biệt giữa các đột biến này)
- S768I, T790M, C797Sa và C797Sb trong exon 20 (phát hiện và bán định lượng cả bốn đột biến, nhưng không phân biệt giữa C797Sa và C797Sb)
- Năm đột biến thêm đoạn ở exon 20 (phát hiện sự hiện diện của bất kỳ đột biến nào trong số năm đột biến thêm đoạn nhưng không phân biệt giữa các đột biến này)

Các phương pháp được sử dụng có tính chọn lọc cao và tùy thuộc vào tổng lượng DNA hiện có, cho phép phát hiện tỷ lệ phần trăm DNA đột biến thấp trong nền DNA bộ gen kiểu tự nhiên. Các giới hạn về tính chọn lọc và phát hiện này vượt trội so với các công nghệ như giải trình tự đoạn kết thúc nhuộm màu.

Bảng 1. Danh sách các đột biến và mã nhận dạng COSMIC

Exon	Đột biến	ID COSMIC*	Thay đổi base
18	G719A	6239	c.2156G>C
	G719S	6252	c.2155G>A
	G719C	6253	c.2155G>T
19	Mất đoạn	26038	c.2233_2247del15
		13550	c.2235_2248>AATTC
		6223	c.2235_2249del15
		6225	c.2236_2250del15
		18427	c.2237_2257>TCT
		6220	c.2238_2255del18
		12367	c.2237_2254del18
		12384	c.2237_2255>T
		12678	c.2237_2251del15
		13551	c.2235_2252>AAT
		13552	c.2235_2251>AATTC
		12386	c.2237_2252>T
		12416	c.2237_2253>TTGCT
		12728	c.2236_2253del18
		12422	c.2238_2248>GC
12382	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C		

Bảng tiếp tục ở trang sau

Bảng tiếp tục từ trang trước

Bảng 1. Danh sách các đột biến và mã nhận dạng COSMIC (tiếp)

Exon	Đột biến	ID COSMIC*	Thay đổi base
19	Mất đoạn	6218	c.2239_2247delTTAAGAGAA
		12387	c.2239_2258>CA
		12370	c.2240_2257del18
		12403	c.2239_2256>CAA
		6255	c.2239_2256del18
		12383	c.2239_2251>C
		12419	c.2238_2252>GCA
		6210	c.2240_2251del12
		23571	c.2238_2252del15
		12369 [†]	c.2240_2254del15
		13556	c.2253_2276del24
		12385	c.2235_2255>AAT
20	S768I	6241	c.2303G>T
	Thêm đoạn	12376	c.2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	c.2310_2311insGGT
		12377	c.2319_2320insCAC
		13428	c.2311_2312insGCGTGGACA
		13558	c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT
	T790M	6240	c.2369C>T
	C797Sa	6493937	c.2389T>A
C797Sb	5945664	c.2390G>C	

Bảng tiếp tục ở trang sau

Bảng tiếp tục từ trang trước

Bảng 1. Danh sách các đột biến và mã nhận dạng COSMIC (tiếp)

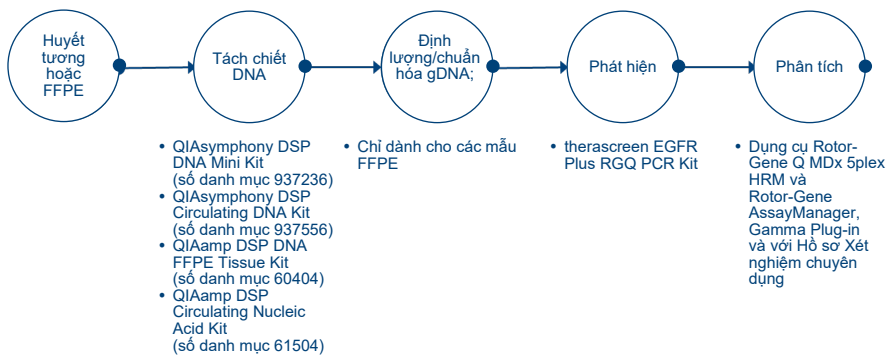
Exon	Đột biến	ID COSMIC*	Thay đổi base
21	L858R	6224	c.2573T>G
	L861Q	6213	c.2582T>A

* COSMIC: Danh mục các Đột biến Sinh dưỡng trong Ung thư: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

† Theo cơ sở dữ liệu COSMIC mới, do sự tương đồng về trình tự sau khi xảy ra mất đoạn, mất đoạn 6254 được kết hợp với mất đoạn 12369.

Nguyên lý của quy trình

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit sử dụng real-time PCR để phát hiện 42 đột biến trong gen *EGFR* (exon 18, 19, 20 và 21) và bán định lượng G719X (với X = A, S hoặc C; exon 18), T790M (exon 20), C797Sa và C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) và L861Q (exon 21) trong mẫu DNA tách chiết từ huyết tương người. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit sẽ xét nghiệm DNA bộ gen (genomic DNA, gDNA) tách chiết từ mô khối u FFPE và DNA lưu thông tự do (circulating cell-free DNA, ccfDNA) tách chiết từ mẫu huyết tương của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (Non-small Cell Lung Cancer, NSCLC). Trạng thái đột biến EGFR và bán định lượng (nếu có) của ccfDNA tinh sạch được xác định bằng cách sử dụng *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit trên dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM được thực hiện với phần mềm Rotor-Gene AssayManager (RGAM) phiên bản 2.1 (trở lên) kết hợp với Gamma plug-in phiên bản 1.0.0 (trở lên) được liên kết với Hồ sơ Xét nghiệm chuyên dụng cho huyết tương. Phân tích dữ liệu và giải thích kết quả hoàn toàn tự động và được quản lý bởi RGAM (Hình 1).



Hình 1. Quy trình hoạt động của *theascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.

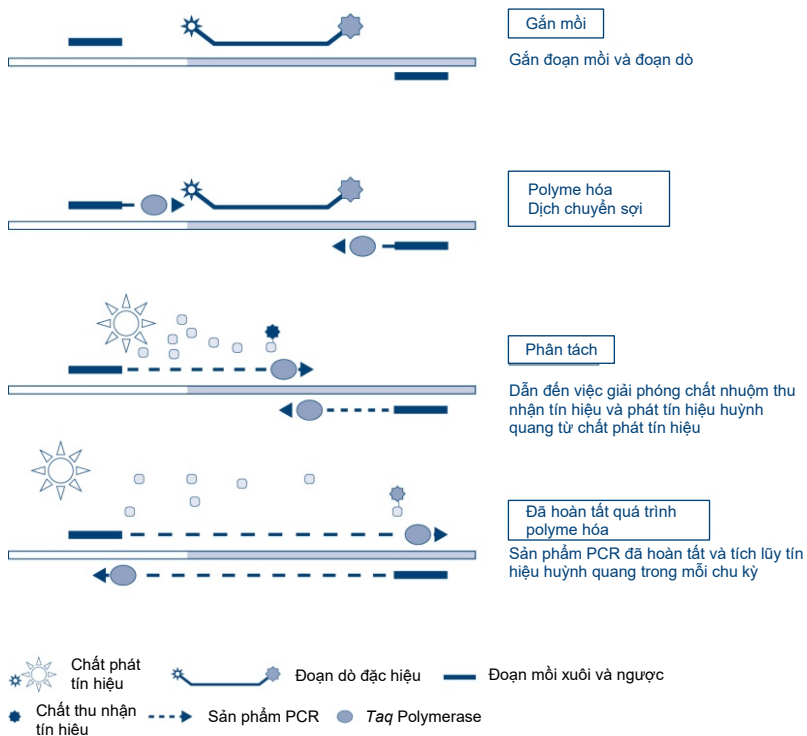
Công nghệ

Việc sử dụng qPCR cho phép phát hiện chính xác các sản phẩm PCR trong pha mũ của quá trình khuếch đại PCR. Có thể nhanh chóng thu được dữ liệu qPCR mà không cần xử lý sau PCR bằng cách phát hiện các tín hiệu huỳnh quang trong thời gian thực trong chu kỳ PCR.

Xét nghiệm *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR sử dụng nguyên tắc thủy phân oligonucleotide qPCR. Trong quá trình PCR, đoạn mồi xuôi và ngược lai với một trình tự cụ thể. Một oligonucleotide liên kết với chất nhuộm khác có trong cùng một hỗn hợp. Đoạn dò này, bao gồm một oligonucleotide dán nhãn chất nhuộm phát tín hiệu 5' và chất thu nhận tín hiệu không nhuộm 3', lai với trình tự đích trong sản phẩm PCR. Phân tích qPCR bằng đoạn dò thủy phân sử dụng hoạt động exonuclease 5'→3' của *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polymerase. Khi đoạn dò vẫn còn nguyên vẹn, khoảng cách giữa chất nhuộm phát tín hiệu với chất thu nhận tín hiệu dẫn đến ức chế huỳnh quang phát tín hiệu, chủ yếu bằng cách truyền năng lượng kiểu Förster.

Trong PCR, nếu hiện diện đích quan tâm, cả hai đoạn mồi xuôi và ngược sẽ gắn mồi và nằm một bên đoạn dò đặc hiệu. Hoạt động exonuclease 5'→3' của DNA polymerase tách đoạn dò giữa chất phát tín hiệu và chất thu nhận tín hiệu chỉ khi 3 oligonucleotide lai với đích. Các mảnh đoạn dò sau đó được tách khỏi đích và quá trình polyme hóa sợi tiếp tục. Đầu 3' của đoạn dò bị chặn để ngăn chặn sự giãn nở của đoạn dò trong quá trình PCR (Hình 2). Quá trình này xảy ra trong mỗi chu kỳ và không ảnh hưởng đến sự tích lũy theo hàm mũ của sản phẩm.

Sự gia tăng tín hiệu huỳnh quang chỉ được phát hiện khi trình tự đích bổ sung cho đoạn mồi và đoạn dò và do đó khuếch đại trong PCR.

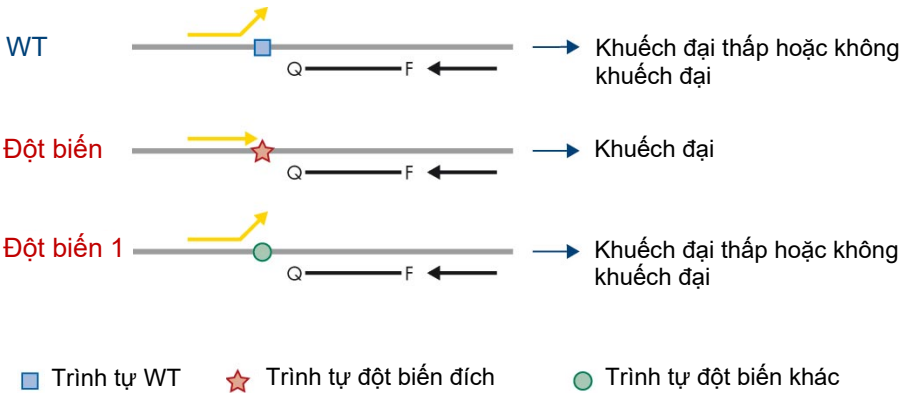


Hình 2. Nguyên lý phản ứng.

Trong *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, các phản ứng đặc hiệu với đột biến sử dụng Hệ thống Đột biến Chịu nhiệt Khuếch đại (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) và thiết kế kẹp để phát hiện, xác định và bán định lượng (nếu có) các đột biến trong DNA tách chiết từ huyết tương.

ARMS

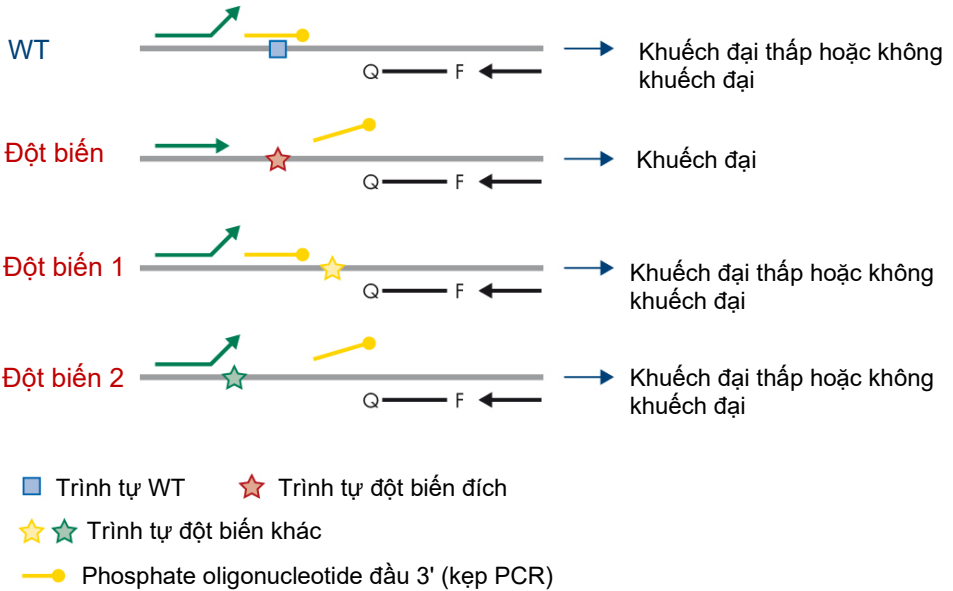
Hệ thống Đột biến Chịu nhiệt Khuếch đại (Amplification Refractory Mutation System, ARMS) sử dụng khả năng của *Taq* DNA polymerase trong việc phân biệt giữa base khớp và không khớp ở đầu 3' của đoạn mồi PCR. Khi đoạn mồi khớp hoàn toàn, khuếch đại tiếp tục với hiệu quả đầy đủ. Khi base 3' không khớp, chỉ có thể xảy ra khuếch đại nền mức thấp. Do đó, trình tự đột biến được khuếch đại có chọn lọc ngay cả trong các mẫu mà phần lớn DNA không mang đột biến (Hình 3).



Hình 3. Xác định đột biến đặc hiệu bằng ARMS PCR. WT: Kiểu tự nhiên. Q—F: Đoạn dò nhuộm kép. D: Đoạn mồi xuôi và ngược.

Kẹp PCR

Phương pháp này được sử dụng để phát hiện một số biến thể tập trung trong cùng một điểm nóng (ví dụ: mất đoạn *EGFR* trong exon 19). Xét nghiệm kẹp kết hợp đoạn mồi chuẩn và đoạn dò với một oligonucleotide bổ sung bị chặn đầu 3' bằng cách thêm nhóm phosphate, để ngăn cản sự kéo dài PCR. Oligonucleotide kẹp, cũng như các đoạn mồi và đoạn dò, đặc hiệu với trình tự kiểu tự nhiên (kẹp PCR). Khi mẫu PCR chứa trình tự kiểu tự nhiên, kẹp sẽ lai trước đoạn mồi, do T_m cao hơn dẫn đến không khuếch đại hoặc khuếch đại thấp. Ngược lại, khi có một trình tự đột biến, kẹp không thể liên kết, điều này cho phép gắn mồi và khuếch đại đoạn mồi (Hình 4).



Hình 4. Phát hiện đột biến bằng công nghệ kẹp. WT: Kiểu tự nhiên. Q—F: Đoạn dò nhuộm kép. D: Đoạn mồi xuôi và ngược.

Vật tư được Cung cấp

Thành phần bộ dụng cụ

<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit			(24)
Số danh mục			874611
Số lượng phản ứng			24
Màu sắc	Nhận dạng	ID ống	Thể tích
Màu xanh lá	T790M & L861Q Mix (Hỗn hợp T790M & L861Q)	<i>EGFR</i> T790M & L861Q Mix (Hỗn hợp T790M & L861Q <i>EGFR</i>)	280 µl
Màu vàng	Insertions & G719X Mix (Hỗn hợp Thêm đoạn & G719X)	<i>EGFR</i> Insertions & G719X Mix (Hỗn hợp Thêm đoạn & G719X <i>EGFR</i>)	280 µl
Màu tím	L858R & C797S Mix (Hỗn hợp L858R & C797S)	<i>EGFR</i> L858R & C797S Mix (Hỗn hợp L858R & C797S <i>EGFR</i>)	280 µl
Màu cam	Deletions & S768I Mix (Hỗn hợp Mất đoạn & S768I)	<i>EGFR</i> Deletions & S768I Mix (Hỗn hợp Mất đoạn & S768I <i>EGFR</i>)	280 µl
Màu đỏ	<i>EGFR</i> Positive Control (Mẫu chứng dương <i>EGFR</i>)	<i>EGFR</i> Positive Control (Mẫu chứng dương <i>EGFR</i>)	190 µl
Màu xanh dương	PCR Master Mix (Hỗn hợp chính PCR)	<i>EGFR</i> PCR Master Mix (Hỗn hợp chính PCR <i>EGFR</i>)	2 × 940 µl
Không màu	Water for NTC (Nước cho NTC)	NTC	1,9 ml
Không màu	Water for sample dilution (Nước để pha loãng mẫu)	Dil.	1,9 ml

Lưu ý: Các thành phần của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit đủ cho 24 mẫu (bộ dụng cụ này chứa đủ thuốc thử cho tối đa bốn lần chạy qPCR với sáu mẫu mỗi lần chạy, bao gồm cả mẫu chứng lần chạy).

Hình thức bộ dụng cụ và xét nghiệm

Xét nghiệm đột biến

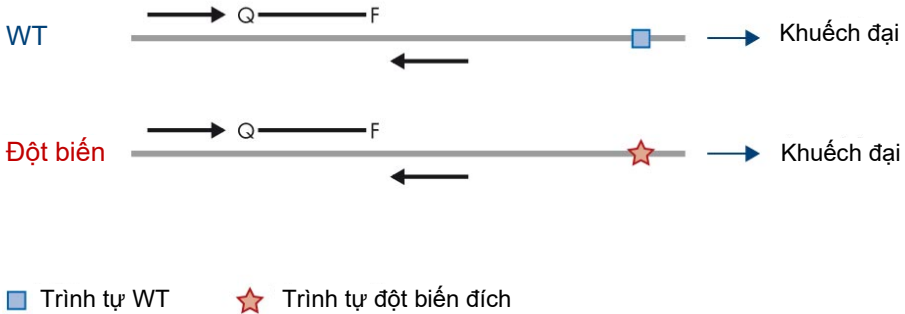
Bốn hỗn hợp đoạn mồi và đoạn dò được cung cấp trong *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:

- T790M và L861Q
- Thêm đoạn (exon 20) và G719X
- L858R và C797S
- Mất đoạn (exon 19) và S768I

Tất cả hỗn hợp đoạn mồi và đoạn dò, khi kết hợp với Hỗn hợp chính PCR, cho phép phát hiện các đích được gắn nhãn carboxyfluorescein (FAM™), CAL Fluor® Red 610 và mẫu chứng nội được gắn nhãn hexachlorofluorescein (HEX™).

Xét nghiệm mẫu chứng nội

Phản ứng mẫu chứng khuếch đại bên trong, được gắn nhãn HEX, được sử dụng để đánh giá tổng số mẫu DNA *EGFR* có thể khuếch đại trong một mẫu đột biến và không đột biến (kiểu tự nhiên.) (Hình 5), và để xác định phản ứng thất bại do đầu vào DNA dưới mức tối ưu, hoặc sự hiện diện của các chất ức chế trong ma trận mẫu. Phản ứng khuếch đại bên trong này khuếch đại vùng exon 2 của gen *EGFR*. Các đoạn mồi và đoạn dò được thiết kế để tránh mọi hiện tượng đa hình *EGFR* đã biết.



Hình 5. Phát hiện mẫu chứng nội (Internal Control, IC) trong *EGFR* exon 2. WT: Kiểu tự nhiên. Q—F: Đoạn dò nhuộm kép. D Đoạn mỗi xuôi và ngược.

Nước để pha loãng mẫu (Dil.)

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit chứa Nước Không có Nuclease được sử dụng để pha loãng mẫu gDNA.

Mẫu chứng

Mỗi lần chạy PCR phải chứa một mẫu chứng dương (Positive Control, PC) và một mẫu chứng âm (Negative Control, NTC) cho mỗi xét nghiệm trong số bốn xét nghiệm.

Mẫu chứng dương (Positive Control, PC)

Mỗi lần chạy phải chứa một mẫu chứng dương trong các ống 1–4. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit chứa một Mẫu chứng dương (Positive Control, PC) *EGFR* được sử dụng làm mẫu trong phản ứng mẫu chứng dương. Các kết quả mẫu chứng dương sẽ được Rotor-Gene AssayManager® đánh giá tự động để đảm bảo rằng bộ dụng cụ hoạt động trong các tiêu chí chấp nhận được xác định trước.

Mẫu chứng không mẫu (No Template Control, NTC)

Mỗi lần chạy phải chứa một mẫu chứng âm (mẫu chứng không mẫu (No Template Control, NTC)) trong các ống 5–8. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit chứa nước cho NTC được sử dụng làm “mẫu” cho mẫu chứng không mẫu. Mẫu chứng không mẫu được sử dụng để đánh giá mọi khả năng nhiễm bẩn thuốc thử và môi trường.

Nền tảng và phần mềm

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit được thiết kế đặc biệt để sử dụng với các dụng cụ Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM* có các kênh huỳnh quang cho Cycling Green, Yellow và Red với phần mềm lõi Rotor-Gene AssayManager v2.1.X (X≥0), Gamma plug-in v1.0.X (X≥0) và Hồ sơ Xét nghiệm *therascreen* EGFR Plus.

Có sẵn hai Hồ sơ Xét nghiệm *therascreen* EGFR: **therascreen EGFR Plus FFPE** (để đánh giá mẫu FFPE) và **therascreen EGFR Plus Plasma** (để đánh giá mẫu Huyết tương). Hồ sơ xét nghiệm chứa các thông số chạy PCR và các thông số phân tích cho phép giải thích kết quả tự động.

* Đảm bảo rằng các dụng cụ và thiết bị đã được kiểm tra và hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Vật tư Yêu cầu nhưng Không được Cung cấp

Thuốc thử bổ sung để chuẩn bị mẫu

- Deparaffinization Solution (số danh mục 19093 hoặc 939018) để chuẩn bị gDNA theo cách thủ công và tự động từ các mẫu FFPE
- QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (số danh mục 937236) để chuẩn bị gDNA tự động từ các mẫu FFPE
- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (số danh mục 937556) để chuẩn bị ccfDNA tự động từ các mẫu huyết tương
- QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (số danh mục 60404) để chuẩn bị gDNA theo cách thủ công từ các mẫu FFPE
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (số danh mục 61504) để chuẩn bị ccfDNA theo cách thủ công từ các mẫu huyết tương

Lưu ý: Các vật tư yêu cầu nhưng không được cung cấp cho bộ dụng cụ tách chiết DNA như liệt kê ở trên được trình bày chi tiết trong sổ tay bộ dụng cụ tương ứng.

- RNase A (số danh mục 19101) để chuẩn bị mẫu gDNA theo cách thủ công hoặc tự động từ mẫu FFPE
- Buffer ATL (số danh mục 939016) cho giao thức khử paraffin được sử dụng với QIASymphony DSP DNA Mini Kit (số danh mục 937236) hoặc QIASymphony DNA Mini Kit (số danh mục 931236)

Vật tư tiêu hao và thiết bị thí nghiệm thông thường

- Pipet chuyên dụng* (có thể điều chỉnh) để chuẩn bị mẫu
- Pipet chuyên dụng* (có thể điều chỉnh) để chuẩn bị Hỗn hợp Phản ứng PCR
- Pipet chuyên dụng* (có thể điều chỉnh) để phân phối DNA mẫu

* Đảm bảo rằng các dụng cụ đã được kiểm tra và hiệu chuẩn theo khuyến nghị của nhà sản xuất.

- Đầu tip pipet PCR vô trùng, chịu sol khí, không có nuclease với bộ lọc không thấp nước (khuyên dùng đầu tip pipet có tấm chắn sol khí để giúp ngăn ngừa nhiễm bẩn chéo)
- Bộ trộn xoáy*
- Ly tâm trên bề phẳng* với rôto cho các ống phản ứng 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml (có khả năng đạt được 13.000–14.000 vòng/phút)
- Ống ly tâm nhỏ không có DNase, RNase, DNA, vô trùng 1,5 hoặc 2,0 ml để chuẩn bị hỗn hợp phản ứng DNA và PCR
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml cho dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (số danh mục 981103 hoặc 981106)
- Dụng cụ định lượng DNA
- Các ống mẫu (ví dụ: 2 ml Sarstedt tube [số danh mục 72.693]) để chuẩn bị gDNA tự động (từ các khối FFPE). Các hình thức ống chính và phụ tương thích được liệt kê tại www.qiagen.com/goto/dspdnakits.
- Dao mổ vô trùng, sử dụng một lần để chuẩn bị gDNA theo cách thủ công và tự động (từ phần FFPE trên mẫu lam kính)
- Nước muối đệm phosphate (Phosphate-Buffered Saline, PBS) vô trùng và sử dụng cho tinh mạch (có thể được yêu cầu để tăng thể tích mẫu huyết tương)

Thiết bị

Thiết bị chuẩn bị mẫu tự động

- Dụng cụ QIASymphony SP* (số danh mục, 9001297) và các phụ kiện được cung cấp
Lưu ý: Các phụ kiện cần thiết được trình bày chi tiết trong sổ tay bộ dụng cụ tách chiết tương ứng và trong *Mô tả chung của Hướng dẫn Sử dụng QIASymphony SP/AS*.
- Phần mềm QIASymphony phiên bản 4.0 trở lên

* Đảm bảo rằng các dụng cụ đã được kiểm tra và hiệu chuẩn theo khuyến nghị của nhà sản xuất.

- Giao thức QIASymphony Tissue_LC_200_DSP để chuẩn bị gDNA tự động từ các mẫu FFPE (xem www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-dna-kits-row/#resources)
- Giao thức QIASymphony circDNA_2000_DSP để chuẩn bị ccfDNA tự động từ các mẫu huyết tương (xem www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-circulating-dna-kit/#resources)

Thiết bị và vật liệu cho qPCR

- Dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* với các kênh huỳnh quang cho Cycling Green, Cycling Red và Cycling Yellow (phát hiện FAM, CAL Fluor Red 610 và HEX tương ứng)
- Loading Block 72× 0.1 ml Tubes, khối nhôm để thiết lập phản ứng thủ công với pipet một kênh (số danh mục 9018901)
- 72-Well Rotor (số danh mục 9018903), Locking Ring 72-Well Rotor (số danh mục 9018904) và Rotor Holder (số danh mục 9018908)
- Phần mềm Rotor-Gene AssayManager phiên bản 2.1.x (trong đó x = 1 trở lên)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in đã cài đặt, phiên bản 1.0.x (trong đó x = 0 trở lên)
- Hồ sơ Xét nghiệm EGFR RGQ PCR phiên bản 1.0.x (trong đó x = 0 trở lên)
 - **therascreen_EGFR_Plus_FFPE** cho mẫu FFPE
 - **therascreen_EGFR_Plus_Plasma** cho mẫu huyết tương

* Ở một số quốc gia, có thể sử dụng dụng cụ Rotor-Gene Q 5plex HRM có ngày sản xuất từ tháng 5 năm 2011 hoặc sau đó nếu phù hợp. Bạn có thể xem ngày sản xuất từ số sê-ri ở mặt sau của dụng cụ. Số sê-ri có định dạng "mmyynnn" trong đó "mm" cho biết tháng sản xuất bằng chữ số, "yy" cho biết hai chữ số cuối của năm sản xuất và "nnn" cho biết mã nhận dạng dụng cụ duy nhất.

Cảnh báo và Phòng ngừa

Đối với các khách hàng ở khu vực Liên minh Châu Âu, lưu ý rằng bạn được yêu cầu báo cáo các sự cố nghiêm trọng đã xảy ra liên quan đến thiết bị cho nhà sản xuất và cơ quan chức năng của Quốc gia Thành viên nơi người dùng và/hoặc bệnh nhân cư trú.

Thông tin an toàn

Khi làm việc với hóa chất, luôn mang áo choàng phòng thí nghiệm, găng tay dùng một lần và kính bảo hộ phù hợp. Để biết thêm thông tin, vui lòng tham khảo bảng chỉ dẫn an toàn (Safety Data Sheet, SDS) phù hợp. Các bảng này có sẵn trực tuyến ở định dạng PDF thuận tiện và nhỏ gọn tại www.qiagen.com/safety nơi bạn có thể tìm, xem và in SDS cho mỗi bộ dụng cụ QIAGEN và thành phần của bộ dụng cụ.

Để biết thông tin an toàn liên quan đến dụng cụ QIASymphony SP và dụng cụ Rotor-Gene Q, hãy tham khảo hướng dẫn sử dụng kèm theo dụng cụ.

- Tất cả các hóa chất và vật liệu sinh học đều có khả năng gây nguy hiểm. Bệnh phẩm và mẫu có khả năng lây nhiễm và phải được coi là vật liệu nguy hiểm sinh học.
- Loại bỏ mẫu và chất thải xét nghiệm phải tuân theo quy trình an toàn tại của địa phương của bạn.

Các biện pháp phòng ngừa

Việc sử dụng *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit yêu cầu thực hành phòng thí nghiệm tốt, bao gồm khả năng truy xuất nguồn gốc, bảo trì thiết bị chuyên dụng cho sinh học phân tử và tuân thủ các quy định hiện hành và các tiêu chuẩn liên quan.

Bộ dụng cụ này dành cho sử dụng chẩn đoán *trong ống nghiệm*. Thuốc thử và hướng dẫn được cung cấp trong bộ dụng cụ này đã được thử nghiệm để đạt hiệu suất tối ưu.

Người dùng phải luôn chú ý đến những điều sau:

- Xét nghiệm này được sử dụng với các bệnh phẩm FFPE và NSCLC huyết tương.
- Cần hết sức thận trọng để mẫu và thuốc thử không bị nhiễm vật liệu dương tính với *EGFR* (nghĩa là Mẫu chứng Dương) hoặc vật liệu có khả năng dương tính với *EGFR* (nghĩa là bệnh phẩm sẽ được xét nghiệm).
 - Thay đổi dao mổ giữa các mẫu khi nạo mô.
 - Sử dụng các pipet chuyên dụng, riêng biệt để tách chiết/chuẩn bị DNA, thiết lập hỗn hợp phản ứng PCR (chuẩn bị hỗn hợp phản ứng trước PCR) và thêm mẫu DNA vào ống PCR.
 - Sử dụng các đầu tip pipet mới chịu sol khí cho tất cả các bước hút pipet để tránh nhiễm bẩn chéo các mẫu và thuốc thử. Cần hết sức thận trọng để ngăn ngừa nhiễm bẩn chuyển sang sản phẩm DNA hoặc PCR và có thể dẫn đến tín hiệu dương tính giả.
 - Phải thực hiện việc chuẩn bị và phân phối hỗn hợp phản ứng trong một khu vực dành riêng tách biệt với khu vực chuẩn bị DNA, nơi không có chất nền DNA (DNA, plasmid hoặc sản phẩm PCR) được đưa vào. Trong cùng khu vực này, thêm nước vào các ống NTC và đóng chúng lại.
 - Thêm mẫu DNA trong một khu vực riêng, tốt nhất là trong một phòng riêng, bằng thiết bị chuyên dụng (pipet, đầu tip, v.v.).
 - Không được mở các ống Rotor-Gene Q sau khi lần chạy PCR kết thúc. Điều này nhằm ngăn ngừa nhiễm bẩn các sản phẩm sau PCR trong phòng thí nghiệm.
- Thuốc thử *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit phải được bảo vệ khỏi ánh sáng, nhiệt độ và tránh rã đông và đông lạnh nhiều lần, nếu không, hiệu suất của bộ dụng cụ có thể bị thay đổi.
- Các thành phần đông lạnh được rã đông hoàn toàn ở nhiệt độ phòng (15–25 °C) (hoặc trong tủ lạnh (2–8 °C)) và tránh ánh sáng. Kiểm tra thường xuyên để xem vật liệu đã được rã đông chưa.
- Tất cả các hóa chất và vật liệu sinh học đều có khả năng gây nguy hiểm. Bệnh phẩm và mẫu có khả năng lây nhiễm và phải được coi là vật liệu nguy hiểm sinh học.

- Thuốc thử cho *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit đã được pha loãng một cách tối ưu. Không pha loãng thuốc thử thêm vì điều này có thể dẫn đến mất hiệu năng.
- Không sử dụng thể tích phản ứng (hỗn hợp phản ứng cộng với mẫu) nhỏ hơn 25 μ l vì điều này sẽ làm tăng nguy cơ kết quả âm tính giả.
- Tất cả các thuốc thử được cung cấp trong *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit chỉ được sử dụng với các thuốc thử khác được cung cấp trong cùng *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.
- Không thay thế thuốc thử trong *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit hoặc giữa các lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, vì điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu năng.
- Không sử dụng các thành phần đã hết hạn hoặc được bảo quản không đúng cách.
- Cần phải thận trọng để đảm bảo xét nghiệm và phân tích mẫu chính xác với trọng tâm là loại bỏ nạp sai mẫu, lỗi nạp, lỗi hút pipet và đặt các ống dạng dải PCR vào các vị trí thích hợp của 72-well rotor.
- Đảm bảo các mẫu được xử lý một cách có hệ thống để đảm bảo xác định và truy vết chính xác.
- Cần hết sức thận trọng để ngăn ngừa nhiễm bẩn bởi DNase, có thể gây biến chất DNA mẫu. Sử dụng dụng cụ phòng thí nghiệm không có nuclease (ví dụ: pipet, đầu tip pipet, lọ phản ứng) và đeo găng tay khi thực hiện xét nghiệm.
- **Lưu ý:** Sản phẩm này chỉ được sử dụng bởi nhân viên phòng thí nghiệm có kinh nghiệm, quen thuộc với các quy trình phòng thí nghiệm và dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Bảo quản và Xử lý Thuốc thử

Cần chú ý đến ngày hết hạn và điều kiện bảo quản in trên hộp và nhãn của tất cả các thành phần. Không sử dụng các thành phần đã hết hạn hoặc được bảo quản không đúng cách.

Điều kiện vận chuyển

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit được vận chuyển trên đá khô và vẫn phải được đông lạnh khi đến nơi. Nếu bất kỳ thành phần nào của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit không đông lạnh khi đến, nếu bao bì bên ngoài đã được mở trong quá trình vận chuyển hoặc lô hàng không có Hướng dẫn Sử dụng hoặc thuốc thử, vui lòng liên hệ với một trong các Bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật của QIAGEN hoặc nhà phân phối tại địa phương của bạn (truy cập www.qiagen.com).

Để biết các điều kiện vận chuyển liên quan đến bộ dụng cụ tách chiết DNA và thuốc thử liên quan được sử dụng, hãy tham khảo sổ tay bộ dụng cụ tương ứng.

Điều kiện bảo quản

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit phải được bảo quản ngay lập tức sau khi nhận ở -30 đến -15 °C trong buồng đông lạnh nhiệt độ ổn định và tránh ánh sáng.

Lưu ý: Tất cả các đoạn dò được dán nhãn huỳnh quang trong thuốc thử của hỗn hợp phản ứng đều nhạy sáng. Bảo vệ thuốc thử của hỗn hợp phản ứng khỏi ánh sáng để tránh tẩy trắng quang.

Tránh đông lạnh và rã đông nhiều lần. Lý tưởng nhất là thuốc thử phải trải qua tối đa bốn chu kỳ đông lạnh – rã đông.

Để biết thông tin về bảo quản và vận chuyển liên quan đến bộ dụng cụ tách chiết DNA và thuốc thử liên quan được sử dụng, hãy tham khảo sổ tay bộ dụng cụ tương ứng.

Độ ổn định

Khi được bảo quản trong các điều kiện bảo quản được chỉ định, *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ổn định cho đến ngày hết hạn đã nêu trên nhãn. Tránh đông lạnh – rã đông không cần thiết đối với các thành phần của bộ dụng cụ.

Sau khi mở, thuốc thử có thể được bảo quản trong bao bì gốc ở -30 đến -15 °C cho đến ngày hết hạn được ghi trên bao bì. Tổng thời gian trước khi chạy khi các phản ứng PCR được thiết lập không được vượt quá 24 giờ nếu được bảo quản trong tủ lạnh ($2-8$ °C; thời gian này bao gồm cả thiết lập và bảo quản PCR).

Để biết thông tin về độ ổn định liên quan đến bộ dụng cụ tách chiết DNA và thuốc thử liên quan được sử dụng, hãy tham khảo sổ tay bộ dụng cụ tương ứng.

Cần chú ý đến ngày hết hạn và điều kiện bảo quản in trên hộp và nhãn của tất cả các thành phần. Không sử dụng các thành phần đã hết hạn hoặc được bảo quản không đúng cách.

Bảo quản và Xử lý Mẫu

Vật liệu mẫu là DNA bộ gen người được tách chiết từ mô khối u FFPE hoặc DNA lưu thông tự do (circulating cell-free DNA, ccfDNA) được tách chiết từ huyết tương 2K-EDTA.

Mẫu phải được vận chuyển theo phương pháp bệnh học tiêu chuẩn để đảm bảo chất lượng bệnh phẩm.

Lưu ý: Tất cả các mẫu phải được xử lý như vật liệu có khả năng lây nhiễm.

Lưu ý: Để sử dụng tối ưu các thuốc thử trong *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, các mẫu phải được chia thành từng lô. Nếu các mẫu được xét nghiệm riêng lẻ, xét nghiệm này sẽ sử dụng nhiều thuốc thử hơn và giảm số lượng mẫu có thể được xét nghiệm với bộ dụng cụ.

Mẫu FFPE

Các mẫu khối u không đồng nhất và dữ liệu từ một mẫu khối u có thể không phù hợp với các phần khác từ cùng một khối u. Các mẫu khối u cũng có thể chứa mô không phải khối u. DNA từ mô không phải khối u dự kiến sẽ không chứa các đột biến được phát hiện bởi *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.

Để chuẩn bị các mẫu mô cho tách chiết gDNA:

- Nên sử dụng quy trình cố định formalin và gắn paraffin tiêu chuẩn. Tham khảo sổ tay hướng dẫn cho bộ dụng cụ tách chiết tương ứng để biết thêm thông tin chi tiết.
- Sử dụng thiết bị vi phẫu, cắt các đoạn nối tiếp 5 µm từ khối paraffin và gắn chúng lên lam kính. Sử dụng một cá nhân được đào tạo (ví dụ như nhà nghiên cứu bệnh học) để đánh giá một đoạn nhuộm Hematoxylin & Eosin (H&E) để xác nhận rằng có khối u. Các đoạn đã nhuộm không được sử dụng để tách chiết DNA.

- Vật liệu ban đầu để lọc gDNA là các phần mô FFPE (lý tưởng nhất là mới cắt).
- Bảo quản tất cả các khối FFPE và các lam kính ở nhiệt độ phòng (15–25 °C). Các đoạn FFPE gắn lên lam kính có thể được bảo quản ở nhiệt độ môi trường trong tối đa 1 tháng trước khi tách chiết DNA.

Mẫu huyết tương

Sử dụng các quy trình phòng thí nghiệm tiêu chuẩn để chuẩn bị huyết tương từ mẫu máu toàn phần 2K-EDTA. Tham khảo sổ tay hướng dẫn cho bộ dụng cụ tách chiết tương ứng để biết thêm thông tin chi tiết.

Nếu huyết tương mới được sử dụng để tách chiết axit nucleic trong cùng một ngày, hãy bảo quản ở 2–8 °C cho đến khi xử lý tiếp. Để bảo quản lâu hơn, hãy giữ huyết tương đông lạnh ở –30 đến –15 °C hoặc –90 đến –65 °C. Khuyến cáo sử dụng phần nhỏ, để tránh đông lạnh – rã đông mẫu huyết tương. Việc đông lạnh – rã đông nhiều lần dẫn đến sự biến tính và kết tủa các protein, có thể làm giảm sản lượng axit nucleic lưu thông tự do thu được.

Các mẫu DNA bộ gen và DNA lưu thông tự do

DNA bộ gen tách chiết từ mô FFPE và DNA lưu thông tự do tách chiết từ huyết tương nên được bảo quản ở 2–8 °C để bảo quản trong thời gian ngắn (lên đến 24 giờ) và –30 đến –15 °C (hoặc –90 đến –65 °C) nếu cần bảo quản lâu dài. Tránh đông lạnh – rã đông không cần thiết đối với gDNA và ccfDNA đã tách chiết. Không được rã đông quá ba lần các dịch rửa giải đông lạnh.

Quy trình thực hiện

Giao thức: Tách chiết và chuẩn bị DNA

Những việc cần làm trước khi bắt đầu

- Đảm bảo rằng người vận hành đã được đào tạo về cách sử dụng các dụng cụ và bộ dụng cụ tách chiết cần thiết để tách chiết DNA và chuẩn bị mẫu. Nếu có yêu cầu, việc đào tạo về dụng cụ có thể được cung cấp khi lắp đặt (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).
- Đọc phần “Vật tư Yêu cầu nhưng Không được Cung cấp” của mỗi sổ tay bộ dụng cụ tách chiết để xác định các phụ kiện cần thiết cho mỗi quy trình:
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (số danh mục 937236) để chuẩn bị gDNA tự động (từ các mẫu FFPE)
- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (số danh mục 937556) để chuẩn bị ccfDNA tự động (từ các mẫu huyết tương)
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (số danh mục 60404) để chuẩn bị gDNA theo cách thủ công (từ các mẫu FFPE)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (số danh mục 61504) để chuẩn bị ccfDNA theo cách thủ công (từ các mẫu huyết tương)

Giao thức: tách chiết gDNA từ các mẫu FFPE

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit chỉ được thử nghiệm kết hợp với QIAGEN Deparaffinization Solution (số danh mục 19093 hoặc 939018) để khử paraffin đoạn FFPE với bộ dụng cụ tách chiết DNA sau:

- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (số danh mục 937236) để tách chiết tự động
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (số danh mục 60404) để tách chiết thủ công

Những điểm quan trọng trước khi bắt đầu

Áp dụng cho các giao thức tách chiết tự động và tách chiết thủ công:

- Đảm bảo rằng thuốc thử tách chiết DNA chưa hết hạn và đã được vận chuyển và bảo quản trong các điều kiện phù hợp.
- Không sử dụng các thành phần đã hết hạn hoặc được bảo quản không đúng cách.
- Có thể kết hợp từ một đến bốn đoạn mô FFPE, mỗi đoạn có độ dày 10 µm hoặc từ hai đến tám đoạn có độ dày lên đến 5 µm trong một lần chuẩn bị.
- Chỉ sử dụng Deparaffinization Solution để khử paraffin FFPE, theo quy trình “Giao thức tiền xử lý để sử dụng với QIASymphony DSP DNA Mini Kit” trên trang 33 hoặc “Giao thức: Giao thức tiền xử lý để sử dụng với QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit” trên trang 36.

Lưu ý: Deparaffinization Solution không được cung cấp cùng với bộ dụng cụ tách chiết và nên được đặt hàng riêng (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).

- Sử dụng RNase A để giảm thiểu hàm lượng RNA (có trong quy trình “Giao thức: Khử paraffin đoạn FFPE với QIAGEN Deparaffinization Solution” trên trang 33).

Lưu ý: RNase A không được cung cấp cùng với bộ dụng cụ tách chiết và nên được đặt hàng riêng (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).

- Có thể cần pha loãng mẫu trước khi xét nghiệm qPCR (xem “Giao thức: định lượng và chuẩn hóa gDNA”, trang 41) hoặc để bảo quản.
- DNA được phân lập từ các mẫu FFPE thường có trọng lượng phân tử thấp hơn DNA từ các mẫu tươi hoặc đông lạnh. Mức độ phân mảnh phụ thuộc vào loại và tuổi của mẫu, cũng như các điều kiện được sử dụng để cố định.
- Để bảo quản DNA sau khi tách chiết, xem “Các mẫu DNA bộ gen và DNA lưu thông tự do”, trang 29.

Giao thức: Tách chiết gDNA tự động từ các mẫu FFPE bằng QIASymphony SP

Nếu sử dụng QIASymphony DSP DNA Mini Kit (số danh mục 937236) để tách chiết tự động, hãy thực hiện tách chiết DNA theo hướng dẫn trong sổ tay, lưu ý những điều sau:

- Chỉ sử dụng Deparaffinization Solution để khử paraffin FFPE, theo quy trình “Giao thức tiền xử lý để sử dụng với QIASymphony DSP DNA Mini Kit”, trang 33.

Lưu ý: Deparaffinization Solution không được cung cấp cùng với bộ dụng cụ tách chiết và nên được đặt hàng riêng (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).

- Chọn giao thức Tissue_LC_200_V7_DSP trên dụng cụ QIASymphony SP (để biết thêm chi tiết, hãy tham khảo giao thức *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue_LC_200_V7_DSP*)
- Sử dụng 50 µl thể tích rửa giải.
- Để biết mọi thông tin bổ sung liên quan đến dụng cụ QIASymphony SP, hãy tham khảo hướng dẫn sử dụng kèm theo dụng cụ.

Giao thức: Tách chiết gDNA thủ công từ các mẫu FFPE

Nếu sử dụng QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (số danh mục 60404) để tách chiết thủ công, hãy thực hiện tách chiết DNA theo hướng dẫn trong sổ tay, lưu ý những điều sau:

- Chỉ sử dụng Deparaffinization Solution để khử paraffin FFPE, theo quy trình “Giao thức: Giao thức tiền xử lý để sử dụng với QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit”, trang 36.

Lưu ý: Deparaffinization Solution không được cung cấp cùng với bộ dụng cụ tách chiết và nên được đặt hàng riêng (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).

- Sử dụng 50 µl thể tích rửa giải.

Giao thức: Khử paraffin đoạn FFPE với QIAGEN Deparaffinization Solution

Giao thức tiền xử lý để sử dụng với QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Giao thức tiền xử lý này được sử dụng với QIASymphony DSP DNA Mini Kit (để tách chiết tự động) và dựa trên giao thức *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue_LC_200_V7_DSP* (Phương pháp 1: khử paraffin bằng Deparaffinization Solution).

Những điểm quan trọng trước khi bắt đầu

- Cân bằng tất cả các chất đệm về nhiệt độ phòng (15–25 °C) và cân bằng Deparaffinization Solution về 20–25 °C.
- Các hạt từ QIASymphony lọc đồng thời RNA và DNA nếu cả hai có trong mẫu. Để giảm thiểu hàm lượng RNA trong mẫu, thêm RNase A vào mẫu trong bước được chỉ định trong giao thức tiền xử lý bên dưới.
- Deparaffinization Solution, RNase A và Buffer ATL không được cung cấp cùng với QIASymphony DSP DNA Mini Kit và phải được đặt hàng riêng (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).

Những việc cần làm trước khi bắt đầu

- Làm nóng trước bộ trộn nhiệt hoặc máy hấp lắ–ủ đến 56 °C để sử dụng trong bước 7.
- Kiểm tra chất đệm ATL xem có chất kết tủa trắng không. Nếu cần, hòa tan chất kết tủa theo quy trình được mô tả trong giao thức *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue_LC_200_V7_DSP*.

Quy trình thực hiện

Bắt đầu với chỉ các khối FFPE

1. Sử dụng dao mổ, cắt bỏ paraffin dư thừa khỏi khối mẫu. Cắt từ một đến bốn đoạn có chiều dày 10 µm hoặc từ hai đến tám đoạn có chiều dày 5 µm.

Lưu ý: Nếu bề mặt mẫu đã tiếp xúc với không khí, hãy loại bỏ 2–3 đoạn đầu tiên.

- Đặt ngay (các) đoạn vào ống mẫu 2 ml tương thích với giá đựng ống mẫu của QIASymphony SP (không đi kèm; ví dụ: Sarstedt, số danh mục 72.693).
- Tiếp tục với bước 4 bên dưới (Đối với tất cả các mẫu).

Bắt đầu với chỉ các đoạn FFPE trên lam kính

- Nhỏ 1 giọt Deparaffinization Solution vào mỗi lam kính bằng cách sử dụng pipet chuyên dụng để chuẩn bị mẫu.
- Nạo vật liệu mẫu bằng dao mổ vô trùng sử dụng một lần để lấy toàn bộ mô. Đặt ngay đoạn tổng hợp vào ống mẫu 2 ml tương thích với giá đựng ống mẫu của QIASymphony SP (không đi kèm; ví dụ: Sarstedt, số danh mục 72.693).
- Tiếp tục với bước 4 bên dưới (đối với tất cả các mẫu).

Đối với tất cả các mẫu

- Thêm 200 µl Buffer ATL vào các đoạn.
- Thêm 20 µl proteinase K.

Lưu ý: Sử dụng proteinase K từ giá đỡ enzym của QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

- Thêm 160 µl hoặc 320 µl Deparaffinization Solution (xem Bảng 2) và trộn bằng cách xoáy.

Bảng 2. Thể tích Deparaffinization Solution yêu cầu

Độ dày của đoạn	Số lượng các đoạn	Thể tích Deparaffinization Solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Đặt ống vào Máy trộn nhiệt hoặc máy hấp lactic và ủ ở 56 °C trong 1 giờ, lactic ở 1.000 vòng/phút cho đến khi mô ly giải hoàn toàn.

Lưu ý: Thời gian ly giải thay đổi tùy thuộc vào loại mô được xử lý. Đối với hầu hết các mô, ly giải hoàn thành trong vòng 1 giờ. Nếu ly giải không hoàn thành sau 1 giờ, thể hiện ở sự hiện diện của vật liệu không hòa tan, thì thời gian ly giải có thể kéo dài hoặc vật liệu không hòa tan có thể được tạo thành viên bằng cách ly tâm. Có thể ly giải qua đêm mà không ảnh hưởng đến việc chuẩn bị.

8. Ủ ở 90 °C trong vòng 1 giờ.

Lưu ý: Việc ủ ở 90 °C trong Buffer ATL đảo ngược một phần sự biến đổi formaldehyde của axit nucleic. Thời gian ủ lâu hơn hoặc nhiệt độ ủ cao hơn có thể khiến DNA bị phân mảnh nhiều hơn. Nếu chỉ sử dụng một khối gia nhiệt, để mẫu ở nhiệt độ phòng sau khi ủ ở 56 °C cho đến khi khối gia nhiệt đạt đến 90 °C.

9. Để giảm thiểu hàm lượng RNA trong mẫu, thêm 2 µl RNase A (100 mg/ml) vào pha dưới và ủ trong 2 phút ở nhiệt độ phòng trước khi tiếp tục với bước 10. Để mẫu nguội đến nhiệt độ phòng trước khi thêm RNase A.

10. Ly tâm ở tốc độ tối đa trong 1 phút ở nhiệt độ phòng.

11. Cẩn thận chuyển các ống (chứa cả hai pha) sang giá đựng mẫu của QIASymphony SP.

12. Tiến hành tách chiết theo các hướng dẫn trong *Sổ tay QIASymphony DSP DNA Mini Kit* (sử dụng 50 µl thể tích rửa giải).

Giao thức: Giao thức tiền xử lý để sử dụng với QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Giao thức tiền xử lý này được sử dụng với QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (để tách chiết thủ công) và dựa trên “Giao thức Bổ sung của QIAGEN: Lọc DNA bộ gen từ mô FFPE bằng QIAamp DNA FFPE Tissue Kit và Deparaffinization Solution”.

Những điểm quan trọng trước khi bắt đầu

- Thực hiện tất cả các bước ly tâm ở nhiệt độ phòng (15–25 °C).
- Cân bằng tất cả các chất đệm về nhiệt độ phòng; cân bằng Deparaffinization Solution về 20–25 °C.
- Deparaffinization Solution, RNase A và Buffer ATL không được cung cấp cùng với QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit và phải được đặt hàng riêng (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).

Những việc cần làm trước khi bắt đầu

- Làm nóng trước bộ trộn nhiệt hoặc máy ủ quỹ đạo đã làm nóng đến 56 °C để sử dụng trong các bước 6 và 10. Nếu không có bộ trộn nhiệt hoặc máy ủ quỹ đạo nóng, có thể sử dụng khối gia nhiệt hoặc bồn nước để thay thế.
- Nếu Buffer AL hoặc Buffer ATL có chứa chất kết tủa, hãy hòa tan chất kết tủa theo quy trình được mô tả trong QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.
- Đảm bảo rằng Buffer AW1 và Buffer AW2 đã được chuẩn bị theo hướng dẫn trong *Sổ tay QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

Quy trình thực hiện

Bắt đầu với chỉ các khối FFPE

1. Sử dụng dao mổ, cắt bỏ paraffin dư thừa khỏi khối mẫu. Cắt thành các đoạn dày 5–10 µm.
Lưu ý: Nếu bề mặt mẫu đã tiếp xúc với không khí, hãy loại bỏ 2–3 đoạn đầu tiên.
2. Đặt ngay (các) đoạn vào ống ly tâm nhỏ 1,5 ml hoặc 2 ml (không đi kèm).
3. Tiếp tục với bước 4 bên dưới (đối với tất cả các mẫu).

Bắt đầu với chỉ các đoạn FFPE trên lam kính

1. Nhỏ 1 giọt Deparaffinization Solution vào mỗi lam kính bằng cách sử dụng pipet chuyên dụng để chuẩn bị mẫu.
2. Nạo vật liệu mẫu bằng dao mổ để lấy toàn bộ mô. Đặt phần tổng hợp vào ống ly tâm nhỏ 1,5 ml hoặc 2 ml (không đi kèm).
3. Tiếp tục với bước 4 bên dưới (đối với tất cả các mẫu).

Đối với tất cả các mẫu

4. Thêm 160 µl hoặc 320 µl Deparaffinization Solution (Bảng 3) và xoay mạnh trong 10 giây.

Bảng 3. Thể tích Deparaffinization Solution yêu cầu

Độ dày của đoạn	Số lượng các đoạn	Thể tích Deparaffinization Solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

5. Ly tâm nhanh để thu mẫu ở đáy ống.
6. Ủ ở 56 °C trong 3 phút và để nguội ở nhiệt độ phòng (15–25 °C).
7. Thêm 180 µl Buffer ATL và trộn bằng cách xoay.
8. Ly tâm trong 1 phút ở 11.000 x g (10.000 vòng/phút). Hai pha xuất hiện (xanh dương và trong suốt).
9. Thêm 20 µl proteinase K vào pha dưới, trong suốt. Trộn nhẹ nhàng bằng cách hút pipet lên xuống.
10. Ủ ở 56 °C trong vòng 1 giờ (hoặc cho đến khi mẫu đã ly giải hoàn toàn).

11. Ủ ở 90 °C trong vòng 1 giờ.

Việc ủ ở 90 °C trong Buffer ATL đảo ngược một phần sự biến đổi formaldehyde của axit nucleic. Thời gian ủ lâu hơn hoặc nhiệt độ ủ cao hơn có thể khiến DNA bị phân mảnh nhiều hơn.

Lưu ý: Nếu chỉ sử dụng một khối gia nhiệt, để mẫu ở nhiệt độ phòng (15–25 °C) sau khi ủ ở 56 °C ở bước 10 cho đến khi khối gia nhiệt đạt đến 90 °C cho bước 11.

12. Ly tâm ống 1,5 ml trong thời gian ngắn để loại bỏ các giọt từ bên trong nắp.

13. Chuyển pha dưới, trong suốt vào một ống ly tâm nhỏ 2 ml mới.

14. Thêm 2 µl RNase A (100 mg/ml) và ủ trong 2 phút ở nhiệt độ phòng.

15. Tiếp tục với bước 12 (thêm Buffer AL) của *Sổ tay QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* (sử dụng 50 µl thể tích rửa giải).

Giao thức: tách chiết ccfDNA từ các mẫu huyết tương

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit đã được thử nghiệm kết hợp với các bộ dụng cụ tách chiết DNA sau:

- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (số danh mục 937556) để tách chiết ccfDNA tự động (từ các mẫu huyết tương)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (số danh mục 61504) để tách chiết ccfDNA theo cách thủ công (từ các mẫu huyết tương)


Những điểm quan trọng trước khi bắt đầu

Áp dụng cho các giao thức tách chiết tự động và tách chiết thủ công:

- Đảm bảo rằng thuốc thử tách chiết DNA chưa hết hạn và đã được vận chuyển và bảo quản trong các điều kiện phù hợp.
- Không sử dụng các thành phần đã hết hạn hoặc được bảo quản không đúng cách.
- Vật liệu ban đầu để lọc ccfDNA phải là huyết tương được chuẩn bị từ mẫu máu toàn phần 2K-EDTA. Các mẫu có thể tươi hoặc đông lạnh (miễn là chúng không được đông lạnh và rã đông nhiều lần).
- Nồng độ của các axit nucleic lưu thông tự do trong dịch sinh học như huyết tương thường thấp và thay đổi đáng kể giữa các cá nhân. Do đó, ccfDNA tách chiết từ mẫu huyết tương sẽ không được định lượng cũng như không được chuẩn hóa (không pha loãng) và được sử dụng trực tiếp trong phản ứng qPCR.
- Để bảo quản DNA sau khi tách chiết, tham khảo phần “Các mẫu DNA bộ gen và DNA lưu thông tự do”, trang 29.

Giao thức: Tách chiết ccfDNA tự động từ các mẫu huyết tương bằng QIASymphony SP

Nếu sử dụng QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (số danh mục 937556) để tách chiết tự động, hãy thực hiện tách chiết DNA theo hướng dẫn trong sổ tay, lưu ý những điều sau:

- Chọn giao thức circDNA_2000_DSP_V1 trên dụng cụ QIASymphony SP (để biết chi tiết về giao thức, hãy tham khảo *QIASymphony SP Protocol Sheet circDNA_2000_DSP_V1*)
-  Thẻ tích mẫu được đề xuất cho circDNA_2000_DSP là 2 ml. Tuy nhiên, chúng tôi khuyên bạn nên bắt đầu với 2,4 ml để tránh bất kỳ sự cố tách chiết nào trong quá trình hút pipet ban đầu, như được quy định trong “Hướng dẫn Xử lý sự cố” của *Sổ tay QIASymphony DSP Circulating DNA Kit*. Nếu không có đủ mẫu, hãy thêm PBS vô trùng (không đi kèm) vào mẫu đến thể tích mẫu cần thiết trước khi nạp mẫu.
- Sử dụng 60 µl thể tích rửa giải.
- Để biết mọi thông tin bổ sung liên quan đến dụng cụ QIASymphony SP, hãy tham khảo hướng dẫn sử dụng kèm theo dụng cụ.

Giao thức: Tách chiết ccfDNA thủ công từ các mẫu huyết tương

Nếu sử dụng QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (số danh mục 61504) để lọc thủ công, hãy thực hiện tách chiết DNA theo hướng dẫn trong sổ tay lưu ý những điều sau:

- Quá trình lọc axit nucleic lưu thông được thực hiện từ 2 ml huyết tương.
- Cần có ống góp chân không (ví dụ: QIAvac 24 Plus với QIAvac Connecting System) và bơm chân không có khả năng tạo ra chân không –900 đến –800 mbar (ví dụ: QIAGEN Vacuum Pump) cho giao thức.
- Sử dụng 60 µl thể tích rửa giải.

Giao thức: định lượng và chuẩn hóa gDNA

Những việc cần làm trước khi bắt đầu

Nếu sử dụng quy trình tách chiết tự động, chọn cột “Validity of result” (Tính hợp lệ của kết quả) cho mỗi mẫu trên tệp kết quả QIASymphony SP sau khi lượt chạy kết thúc:

- Trạng thái hợp lệ: Tiến hành định lượng gDNA.
- Trạng thái không rõ ràng: Có thể được xử lý tùy thuộc vào nguồn gốc của nhân (để biết chi tiết về nguyên nhân có thể có của việc phát sinh nhân “unclear” (không rõ ràng), hãy tham khảo Hướng dẫn Sử dụng QIASymphony SP/AS).
- Trạng thái không hợp lệ: Mẫu bị từ chối. Lặp lại bước tách chiết.

Quy trình thực hiện

Cần định lượng gDNA tách chiết từ các mẫu FFPE.

Nếu nồng độ đo được nhỏ hơn 4 ng/μl, mẫu phải được tách chiết lại với nhiều đoạn hơn (tối đa là tám đoạn 5 μm hoặc bốn đoạn 10 μm).

Nếu nồng độ đo được trên 6 ng/μl, mẫu phải được pha loãng đến 5 ng/μl bằng Nước để pha loãng mẫu được cung cấp trong *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, theo công thức:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Trong đó

C_i: Nồng độ ban đầu của gDNA tách chiết

C_f: Nồng độ cuối cùng được nhắm đích = 5 ng/μl

V_f: Thể tích cuối cùng cần thiết để thực hiện lượt chạy *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR (tức là 20 μl + thể tích bổ sung cho lỗi hút pipet)

V_i: Thể tích ban đầu của gDNA tách chiết được hút pipet và pha loãng với Nước để pha loãng mẫu được cung cấp trong *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (Thể tích nước cần thêm = V_f – V_i)

Mỗi phản ứng PCR được tối ưu hóa cho 25 ng gDNA được pha loãng trong thể tích mẫu cuối cùng 5 μ l. Vì mỗi mẫu được xét nghiệm với bốn hỗn hợp phản ứng *EGFR* nên cần tổng cộng 100 ng cho mỗi mẫu xét nghiệm.

Lưu ý: Đảm bảo rằng chất đệm rửa giải thích hợp được sử dụng để hiệu chuẩn dụng cụ định lượng.

Không nên định lượng ccfDNA tách chiết từ các mẫu huyết tương. Mỗi phản ứng PCR được tối ưu hóa cho 5 μ l ccfDNA tách chiết tinh sạch. Vì mỗi mẫu được xét nghiệm với bốn hỗn hợp phản ứng *EGFR* nên cần tổng cộng 20 μ l cho mỗi mẫu xét nghiệm.

Giao thức: Đánh giá đột biến *EGFR* bằng qPCR trên dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM

Những điểm quan trọng trước khi bắt đầu

- Đảm bảo rằng người vận hành được đào tạo về cách sử dụng các dụng cụ cho qPCR. Nếu có yêu cầu, việc đào tạo về dụng cụ có thể được cung cấp khi lắp đặt (xem “Thông tin Đặt hàng”, trang 110).
- Đọc “Các biện pháp phòng ngừa”, trang 23 và làm quen với tất cả các thành phần của bộ dụng cụ trước khi sử dụng.
- Phải chạy *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit trên dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* sử dụng Rotor-Gene AssayManager phiên bản 2.1 (trở lên) kết hợp với Gamma plug-in phiên bản 1.0.0 (trở lên) được liên kết với Hồ sơ Xét nghiệm chuyên dụng cho FFPE hoặc huyết tương.
- Hãy dành thời gian để làm quen với dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, phần mềm Rotor-Gene AssayManager và Gamma plug-in trước khi bắt đầu giao thức. Xem hướng dẫn sử dụng dụng cụ, Rotor-Gene AssayManager và Gamma plug-in để biết chi tiết.
- Rotor-Gene AssayManager phiên bản 2.1 cho phép tự động giải thích kết quả PCR. Các thông số chu kỳ bị khóa cho lượt chạy.
- Nếu bạn đang sử dụng phần mềm Rotor-Gene AssayManager phiên bản 2.1, Gamma Plug-in và hồ sơ xét nghiệm lần đầu tiên, vui lòng tham khảo phần “Phụ lục A: Cài đặt phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in và Nhập Hồ sơ Xét nghiệm” trên trang 103 để biết hướng dẫn cài đặt. Nếu phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in và hồ sơ xét nghiệm đã được cài đặt và nhập vào máy tính của bạn, hãy tiếp tục với các hướng dẫn bên dưới.
- Nếu bạn đang sử dụng quy trình tách chiết tự động, chọn cột “Validity of result” (Tính hợp lệ của kết quả) cho mỗi mẫu trên tệp kết quả QIASymphony SP sau khi lượt chạy kết thúc, xem “Giao thức: định lượng và chuẩn hóa gDNA”, trang 41.

* Đảm bảo rằng các dụng cụ và thiết bị đã được kiểm tra và hiệu chuẩn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

- Nếu bạn đang sử dụng gDNA tách chiết từ FFPE, mẫu phải được định lượng và pha loãng đến 5 ng/ μ l, xem “Giao thức: định lượng và chuẩn hóa gDNA”, trang 41.
- Nếu bạn đang sử dụng ccfDNA tách chiết từ huyết tương, các mẫu phải được sử dụng ở dạng không pha loãng.

Thiết lập qPCR

Khi sử dụng *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, nên xét nghiệm sáu mẫu DNA trong cùng một thí nghiệm để tối ưu hóa việc sử dụng các mẫu chứng và hỗn hợp phản ứng. Tuy nhiên, có thể xét nghiệm tối đa 16 mẫu trong cùng một thí nghiệm.

Những việc cần làm trước khi bắt đầu

- Làm lạnh Loading Block (72 x 0.1ml tubes) trong tủ lạnh (2–8 °C).
- Trước mỗi lần sử dụng, rã đông tất cả các thành phần cần thiết.

Lưu ý: Không thực hiện quá 1 giờ ở nhiệt độ phòng cho bước rã đông để tránh bất kỳ sự biến chất vật liệu nào. Nếu cần thêm thời gian, hãy bảo quản các thành phần ở 2–8 °C trong tối đa 8 giờ.

- Làm sạch khu vực bàn máy dành riêng cho việc chuẩn bị hỗn hợp PCR để giảm nguy cơ nhiễm bẩn mẫu hoặc nuclease.
- Xoáy các ống có chứa mẫu chứng, hỗn hợp Đoạn mồi và Đoạn dò và hỗn hợp chính PCR (3–5 giây), sau đó ly tâm một thời gian ngắn trước khi sử dụng.

Quy trình thực hiện

1. Chuẩn bị bốn Hỗn hợp Phản ứng PCR trong các ống 1,5 ml hoặc 2 ml (không đi kèm), tức là trộn từng hỗn hợp Đoạn mồi và Đoạn dò (Hỗn hợp T790M & L861Q, Thêm đoạn & Hỗn hợp G719X, Hỗn hợp L858R & C797S hoặc Mất đoạn & Hỗn hợp S768I) với Hỗn hợp chính PCR, theo số lượng mẫu cần xử lý.

Thể tích cần thiết cho mỗi thành phần bộ dụng cụ để tạo ra Hỗn hợp Phản ứng được trình bày trong Bảng 4. Thể tích phản ứng PCR cuối cùng là 25 µl sau khi thêm 5 µl DNA mẫu hoặc mẫu đối chứng lần chạy. Thể tích bổ sung được bao gồm để bù cho sự thay đổi khi hút pipet và cho phép chuẩn bị đủ hỗn hợp phản ứng cho số lượng mẫu xét nghiệm và mẫu chứng theo kế hoạch, ví dụ: sáu mẫu cộng với hai mẫu chứng.

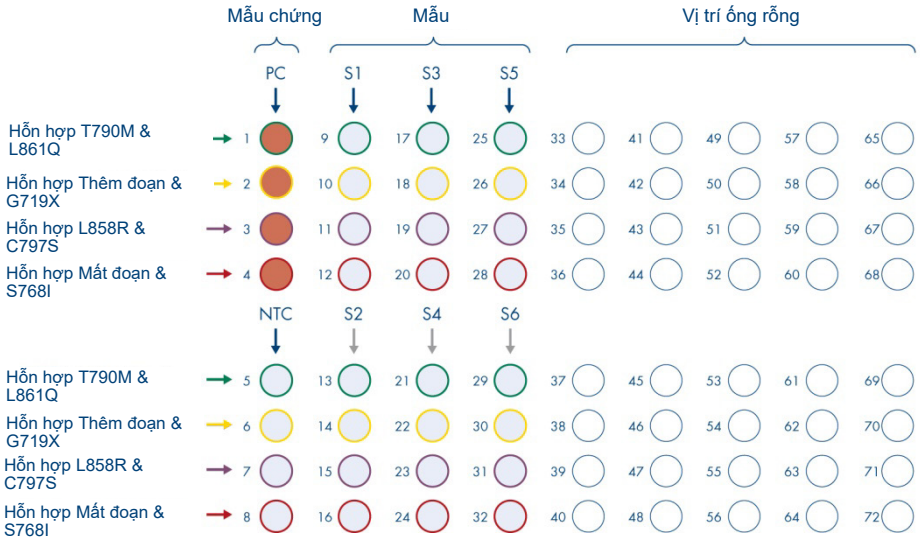
Bảng 4. Chuẩn bị Hỗn hợp Phản ứng

Thành phần	1 phản ứng (µl)	8 + 1 phản ứng (µl)*
Hỗn hợp Đoạn mồi và Đoạn dò <i>EGFR</i>	7,5	67,5
Hỗn hợp chính PCR	12,5	112,5
Tổng thể tích của Hỗn hợp Phản ứng	20	180
Phân phối Hỗn hợp Phản ứng	20 µl một ống	
Phân phối mẫu xét nghiệm	5 µl một ống	
Tổng thể tích trên mỗi phản ứng	25 µl	

* Một thể tích phản ứng bổ sung được bao gồm để bù trừ cho lỗi hút pipet: một ống bổ sung cho tối đa 10 vị trí ống và hai ống bổ sung cho tối đa 20 vị trí ống.

- Đưa tất cả các thành phần của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit vào lại buồng đông lạnh để tránh bất kỳ sự biến chất vật liệu nào.
- Xoáy Hỗn hợp Phản ứng trong 3–5 giây và ly tâm trong thời gian ngắn.
- Đặt các ống dạng dải PCR trên một Loading Block (72 x 0.1 ml tubes) đã làm lạnh và pha chế 20 µl Hỗn hợp Phản ứng *EGFR* vào mỗi ống dạng dải sau khi thiết lập khối nạp được hiển thị trong Hình 6.

Lưu ý: Nên pha chế 20 µl hỗn hợp phản ứng bằng cách hút pipet ngược.



Hình 6. Thiết lập khối nạp cho một thí nghiệm với *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, xét nghiệm sáu mẫu. Vị trí 1–32 như sau. PC: Mẫu chứng dương *EGFR*; NTC: Mẫu chứng không mẫu (nước); Mẫu 1 (S1) đến Mẫu 6 (S6): Mẫu DNA. Hỗn hợp Phản ứng: Hỗn hợp T790M & L861Q *EGFR*, Hỗn hợp Thêm đoạn & G719X *EGFR*, Hỗn hợp L858R & C797S *EGFR*, Hỗn hợp Mất đoạn & S768I *EGFR*. Tất cả các vị trí còn lại đều là vị trí ống rỗng.

Lưu ý: Cả hai mẫu FFPE và DNA huyết tương đều có thể được chạy trong cùng một thí nghiệm. Điều này yêu cầu chạy cả hai hồ sơ xét nghiệm FFPE và Plasma trong cùng một thí nghiệm và cách đặt đĩa cụ thể. Tham khảo Phụ lục B: Chạy Hồ sơ Xét nghiệm FFPE và Huyết tương trong Cùng một Thí nghiệm (trang 107) để biết chi tiết.

- Thêm 5 µl Nước cho NTC vào các ống NTC được chỉ định (Hình 6) để thu được tổng thể tích là 25 µl. Trộn nhẹ nhàng bằng cách hút pipet lên xuống. Đóng tất cả các ống có chứa NTC.
- Xoáy và ly tâm trong thời gian ngắn các mẫu DNA và Mẫu chứng dương tính với *EGFR* (Positive Control, PC). Sau đó, thêm 5 µl mẫu hoặc mẫu PC vào các ống tương ứng (Hình 6) để thu được tổng thể tích là 25 µl. Trộn nhẹ nhàng bằng cách hút pipet lên xuống.
- Đóng tất cả các ống và kiểm tra chắc chắn không có bọt khí ở đáy ống.

Lưu ý: Thay đổi đầu tip giữa mỗi lần thêm mẫu để tránh nhiễm bẩn.

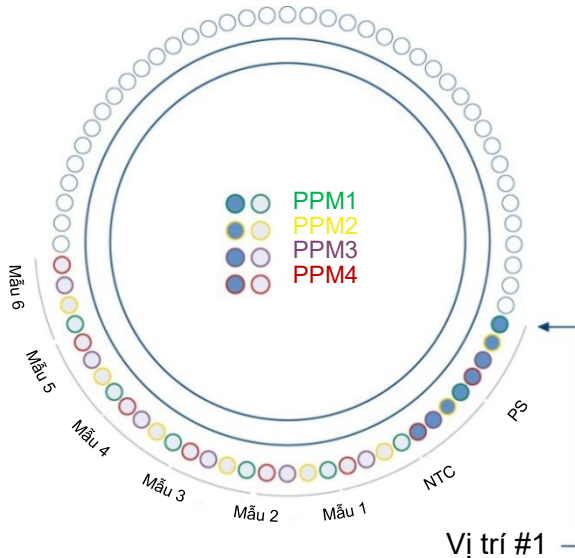
Giao thức: Chuẩn bị dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM


- Đặt rôto 72 vị trí trên ngăn chứa rôto dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Lắp đầy các rôto bằng các ống dạng dải theo các vị trí được chỉ định, bắt đầu từ vị trí 1, như được hiển thị trong Hình 7.

Lưu ý: Đảm bảo ống đầu tiên được lắp vào vị trí 1 và các ống dạng dải được đặt theo đúng hướng và vị trí như được thể hiện.

- Tất cả các vị trí không sử dụng nên được lấp đầy bằng các ống dạng dải có nắp trống.

Lưu ý: Chúng tôi khuyên bạn nên giữ bốn mẫu chứng dương ở vị trí 1 đến 4 và bốn mẫu chứng không mẫu ở vị trí 5 đến 8 vì bộ phân tích tự động trong hồ sơ xét nghiệm dựa trên cách sắp xếp này. Nếu một bố cục khác được sử dụng, sẽ thu được kết quả bất thường hoặc không hợp lệ.



Hình 7. Thiết lập rôto cho một thí nghiệm với *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit. Từ vị trí 1 PC: Mẫu chứng dương tính với EGFR; NTC: Mẫu chứng không mẫu (nước); PPM 1: Hỗn hợp T790M & L861Q EGFR; PPM 2: Hỗn hợp Thêm đoạn & G719X EGFR; PPM 3: Hỗn hợp L858R & C797S EGFR; PPM 4: Hỗn hợp Mất đoạn & S768I EGFR; Mẫu 1 đến Mẫu 6: Mẫu DNA. Lưu ý: Tất cả các vị trí còn lại  phải được lấp đầy bằng các ống rỗng.

11. Gắn vòng khóa.

12. Nạp dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM với rôto và vòng khóa. Đóng nắp dụng cụ.

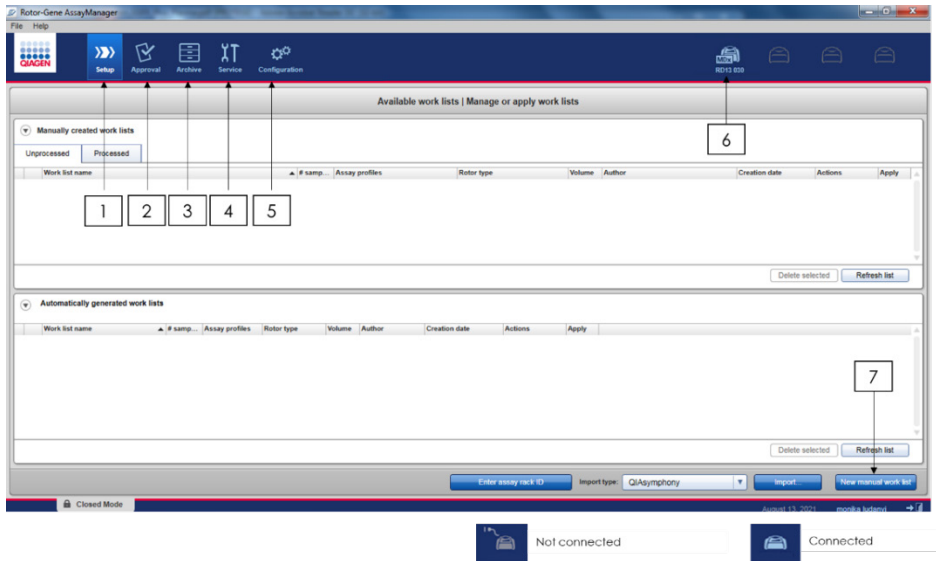
Tạo danh sách công việc và bắt đầu chạy qPCR

Lưu ý: Danh sách công việc có thể được tạo và lưu trước khi chuẩn bị mẫu hoặc khi thiết lập thí nghiệm trên dụng cụ, như được mô tả trong sổ tay này.

13. Bật dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

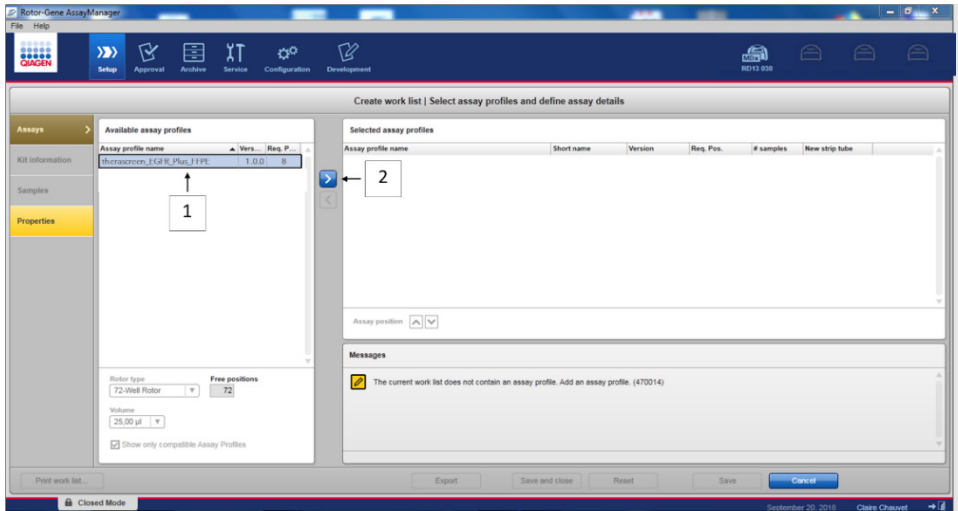
14. Mở phần mềm **Rotor-Gene AssayManager v2.1**.

15. Đăng nhập người dùng với vai trò **Người vận hành** ở chế độ đóng. Nhấp vào **OK**. Cửa sổ sau sẽ xuất hiện.



Hình 8. Rotor-Gene AssayManager v2.1. 1 = tab setup (thiết lập). Tab này cho phép quản lý hoặc áp dụng các danh sách công việc 2 = tab Approval (Phê duyệt). Tab này cho phép bạn tìm các thí nghiệm trước đó. 3 = tab Archive (Lưu trữ). Tab này cho phép bạn tìm các thí nghiệm được phê duyệt trước đó. 4 = tab Service (Dịch vụ). Trong tab này, lịch sử kiểm tra của từng tệp do phần mềm tạo ra được báo cáo. 5 = tab Configuration (Cấu hình). Tab này cho phép cấu hình tất cả các thông số phần mềm. 6 = biểu tượng dụng cụ Rotor-Gene Q (RGQ); thông báo cho người dùng biết liệu một máy luân nhiệt nhất định đã được kết nối hay chưa. Có thể kết nối tối đa bốn dụng cụ RGQ với cùng một máy tính. 7 = New manual work list (Danh sách công việc thủ công mới).

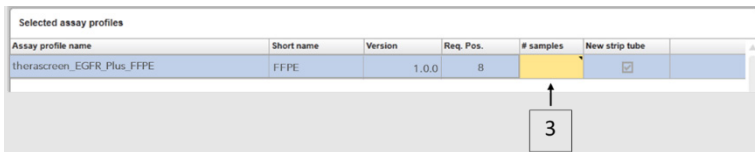
16. Kiểm tra xem RGQ có được phần mềm phát hiện chính xác hay không trước khi bắt đầu chạy. Để biết thêm thông tin, xem “Môi trường Máy luân nhiệt” trong *Hướng dẫn Sử dụng Ứng dụng Lỗi Rotor-Gene AssayManager v2.1*.
17. Nhấp vào **New manual work list** (Danh sách công việc thủ công mới) trong trình quản lý danh sách công việc (môi trường “Setup” (Thiết lập)) (Hình 8).
18. Chọn hồ sơ xét nghiệm EGFR liên quan từ danh sách các hồ sơ xét nghiệm có sẵn:
 - Để xét nghiệm các mẫu gDNA từ FFPE: theascreen_EGFR_Plus_FFPE
 - Để xét nghiệm các mẫu ccfDNA từ huyết tương: theascreen_EGFR_Plus_Plasma



Hình 9. Lựa chọn hồ sơ xét nghiệm. 1 = Hồ sơ xét nghiệm có sẵn; 2 = Chuyển hồ sơ xét nghiệm sang danh sách công việc

Lưu ý: Có thể chạy cả hai hồ sơ xét nghiệm FFPE và Huyết tương trong cùng một thí nghiệm. Tham khảo Phụ lục B: Chạy Hồ sơ Xét nghiệm FFPE và Huyết tương trong Cùng một Thí nghiệm, trang 107, để biết chi tiết.

19. Nhấp vào **Move** (Di chuyển) để chuyển hồ sơ xét nghiệm đã chọn sang danh sách **Selected assay profiles** (Hồ sơ xét nghiệm đã chọn).
20. Nhập số lượng mẫu vào trường tương ứng.

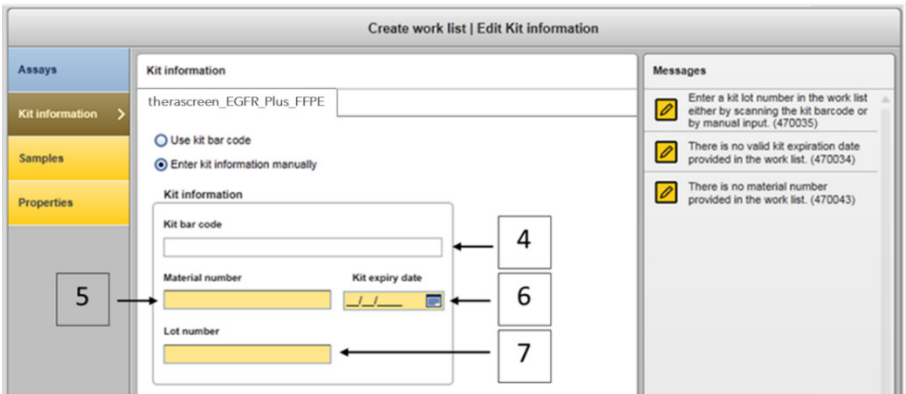


Hình 10. Tạo danh sách công việc: định nghĩa chi tiết xét nghiệm. 3 = số lượng mẫu

Lưu ý: Số lượng mẫu không tương ứng với số lượng ống và không bao gồm các mẫu chứng.

21. Chọn tab “Kit Information” (Thông tin về Bộ dụng cụ). Nhập thông tin bộ dụng cụ EGFR sau đây, được in trên nhãn của hộp bộ dụng cụ *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR:

- Số vật liệu: 1114551
- Ngày hết hạn hợp lệ
- Số lô



Hình 11. Tạo danh sách công việc: Chỉnh sửa thông tin bộ dụng cụ. 4 = mã vạch bộ dụng cụ. Tab này cho biết mã vạch của bộ dụng cụ (nếu mã vạch được nhập, các trường khác sẽ được điền tự động). 5 = Material number (Số vật liệu). 6 = Kit expiry date (Hạn sử dụng bộ dụng cụ). 7 = Lot number (Số lô). Những thông tin này có sẵn trên hộp bộ dụng cụ.

Lưu ý: Tất cả các trường phải được điền và chuyển sang màu xanh dương khi thông tin hợp lệ được nhập.

22. Chọn tab “Samples” (Mẫu). Một danh sách với các chi tiết mẫu được hiển thị. Danh sách này thể hiện bố cục dự kiến của rôto.
23. Nhập nhận dạng mẫu vào danh sách này cũng như bất kỳ thông tin mẫu tùy chọn nào làm chú thích cho từng mẫu.

Create work list | Edit samples

Pos.	Style	Sample ID	Status	Sample type	Targets	Assay	Sample comment
1	█	Positive Control		PC	T790M, L861Q,.... Insertions, G719X,.... L858R, C797S,.... Deletions, S768I,....	FFPE	
2							
3							
4							
5	█	NTC		NTC	T790M, L861Q,.... Insertions, G719X,.... L858R, C797S,.... Deletions, S768I,....	FFPE	
6							
7							
8							
9	█	Sample 1		Test	T790M, L861Q,.... Insertions, G719X,.... L858R, C797S,.... Deletions, S768I,....	FFPE	9
10							
11							
12							
13	█	Sample 2		Test	T790M, L861Q,.... Insertions, G719X,.... L858R, C797S,.... Deletions, S768I,....	FFPE	8
14							
15							
16							
17	█	Sample 3		Test	T790M, L861Q,.... Insertions, G719X,.... L858R, C797S,.... Deletions, S768I,....	FFPE	
18							
19							
20							
21	█	Sample 4		Test	T790M, L861Q,....	FFPE	

Hình 12. Nhập thông tin mẫu. 8 = ID mẫu. 9 = Chú thích mẫu (tùy chọn).

24. Chọn Properties (Thuộc tính) và nhập tên danh sách công việc (người dùng có thể nhập bất kỳ tên danh sách công việc hợp lệ nào).

Create work list | Edit properties

Assays	Kit information	Samples	Properties
Properties			
Work list name			
<input type="text" value=""/> ← 10 Default name			
Work list			
<input checked="" type="checkbox"/> is editable <input type="checkbox"/> work list is complete (can be applied)			
↑ 12		↑ 11	
Created			
Last modified			
Last applied			
External order ID			

Hình 13. Properties (Thuộc tính). 10 = Tên danh sách công việc. 11 = Chọn tùy chọn “work list is complete” (danh sách công việc đã hoàn thành). 12 = bỏ chọn “is editable” (có thể chỉnh sửa)

Lưu ý: Ô “**is editable**” (có thể chỉnh sửa) (Hình 13) xác định danh sách công việc còn có thể chỉnh sửa hay không. Vì vậy, nếu danh sách công việc có thể áp dụng và không được thay đổi sau đó, ô này phải được bỏ chọn.

Lưu ý: Danh sách công việc có thể được áp dụng trực tiếp hoặc được lưu và chạy sau.

25. Chọn hộp kiểm **worklist is complete (can be applied)** (danh sách công việc đã hoàn thành (có thể áp dụng)).

26. Lưu danh sách công việc.

Tùy chọn: Danh sách công việc có thể được in và điều này có thể giúp chuẩn bị và thiết lập qPCR. Để in danh sách công việc, nhấp vào **Print work list** (In danh sách công việc). Các chi tiết mẫu được bao gồm như một phần của danh sách công việc này.

27. Chọn danh sách công việc tương ứng từ trình quản lý danh sách công việc và nhấp vào **Apply** (Áp dụng). Ngoài ra, nếu danh sách công việc vẫn mở, nhấp vào **Apply** (Áp dụng).

28. Nhập tên thí nghiệm vào trường **Experiment name** (Tên thí nghiệm).

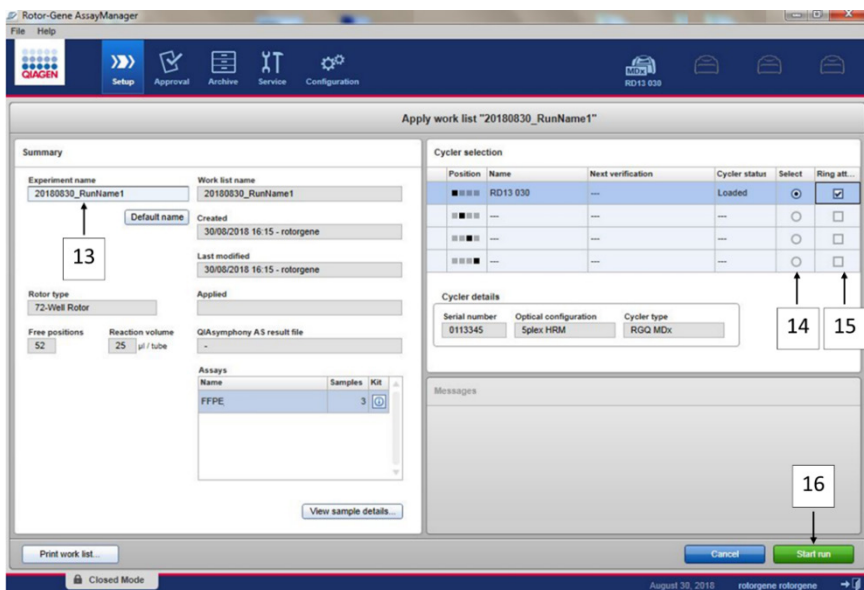
29. Trong danh sách **Cycler selection** (Chọn máy luân nhiệt), chọn máy luân nhiệt để sử dụng.

Lưu ý: Phải sử dụng dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*.

30. Đảm bảo rằng vòng khóa đã được gắn đúng cách và chọn ô **Ring attached** (Đã gắn vòng).

31. Nhấp vào **Start run** (Bắt đầu chạy). Lướt chạy qPCR bắt đầu (Hình 14).

* Ở một số quốc gia, có thể sử dụng dụng cụ Rotor-Gene Q 5plex HRM có ngày sản xuất từ tháng 5 năm 2011 hoặc sau đó nếu phù hợp. Bạn có thể xem ngày sản xuất từ số sê-ri ở mặt sau của dụng cụ. Số sê-ri có định dạng “mmyynnn” trong đó “mm” cho biết tháng sản xuất bằng chữ số, “yy” cho biết hai chữ số cuối của năm sản xuất và “nnn” cho biết mã nhận dạng dụng cụ duy nhất.



Hình 14. Khởi chạy. 13 = Nhập tên thí nghiệm; 14 = chọn máy luân nhiệt; 15 = xác nhận vòng khóa được gắn; 16 = nhấn vào start run (bắt đầu chạy) để khởi chạy.

Phát hành và báo cáo kết quả qPCR

Chức năng chung của môi trường Approval (Phê duyệt) được mô tả trong *Hướng dẫn Sử dụng Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

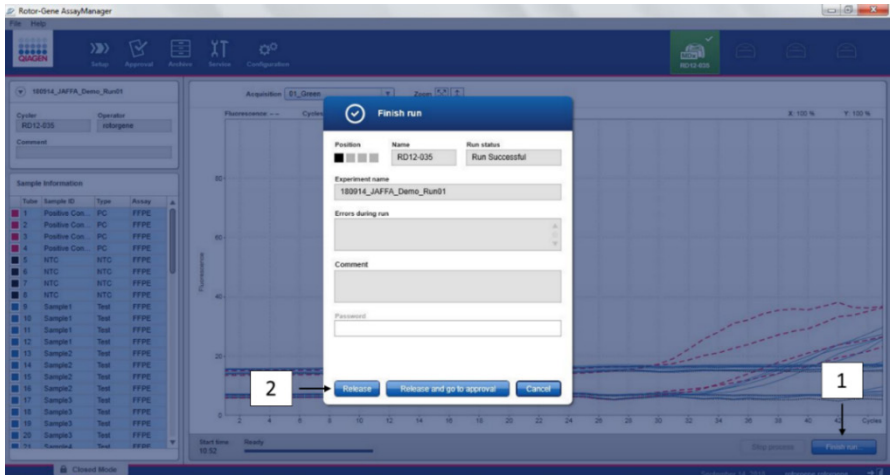
Sau khi chạy xong và máy luân nhiệt đã được phát hành, thí nghiệm sẽ được lưu trữ trong cơ sở dữ liệu nội bộ. Việc phân tích dữ liệu thu được được thực hiện tự động tùy thuộc vào plug-in tương ứng với hồ sơ xét nghiệm và các quy tắc và giá trị thông số được xác định bởi hồ sơ xét nghiệm.

32. Sau khi chạy xong, nhấn vào **Finish run** (Kết thúc lượt chạy) (Hình 15).

Lưu ý: Cho đến khi bước này hoàn tất, thí nghiệm không được lưu trong cơ sở dữ liệu nội bộ.

33. Phát hành và phê duyệt lượt chạy.

- Đối với người dùng đã đăng nhập bằng vai trò Người phê duyệt, nhấp vào **Release and go to approval** (Phát hành và đi tới phê duyệt).
- Đối với người dùng đã đăng nhập bằng vai trò Người vận hành, nhấp vào **Release** (Phát hành).



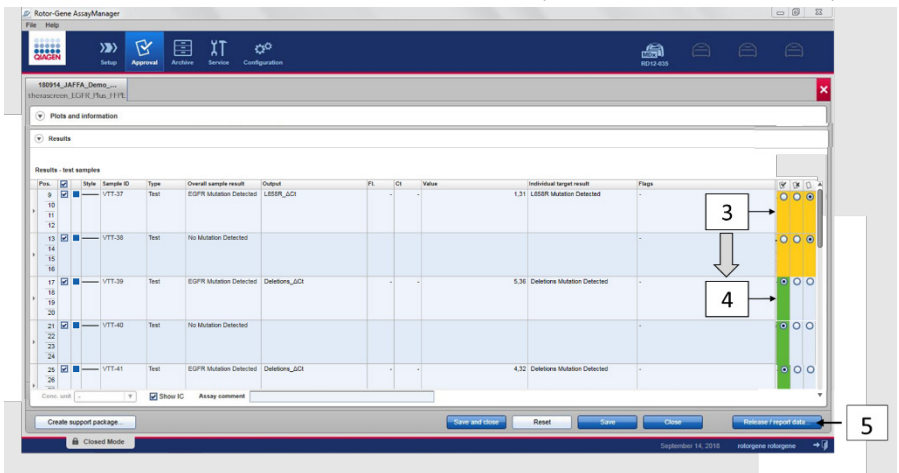
Hình 15. Kết thúc lượt chạy. Kết thúc lượt chạy (1) và Phát hành lượt chạy (2)

34. Phát hành kết quả.

- Nếu bạn nhấp vào **Release and go to approval** (Phát hành và đi tới phê duyệt), kết quả thí nghiệm được hiển thị trong môi trường Approval (Phê duyệt).
 - Nếu bạn nhấp vào **Release** (Phát hành) với vai trò người dùng, một người dùng có vai trò Người phê duyệt cần đăng nhập và chọn môi trường Approval (Phê duyệt).
35. Lọc xét nghiệm sẽ được phê duyệt bằng cách chọn các tùy chọn bộ lọc và nhấp vào **Apply** (Áp dụng). Chọn xét nghiệm mong muốn trong danh sách các xét nghiệm đã lọc bằng cách sử dụng hộp kiểm và nhấp vào **Start Approval** (Bắt đầu Phê duyệt).
36. Sử dụng các nút chọn (Hình 16) để chấp nhận hoặc từ chối mẫu.

Lưu ý: Mẫu có thể bị từ chối trong trường hợp có lỗi xử lý của người vận hành hoặc có các đường cong bất thường (xảo ảnh).

37. Xem lại kết quả và nhấp vào **Release/Report data** (Phát hành/Báo cáo dữ liệu).



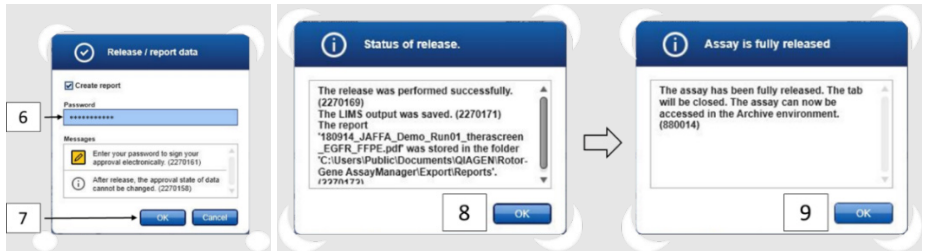
Hình 16. Xem lại và phát hành dữ liệu. Xem lại và chấp nhận (ü) hoặc từ chối (û) kết quả cho mỗi mẫu: màu ô thay đổi từ vàng sang màu xanh lá, ví dụ vậy, nếu dữ liệu được phê duyệt (3, 4). Sau đó, nhấp vào “Release / report data” (Phát hành/báo cáo dữ liệu) (5).

38. Nhập mật khẩu nếu cần và nhấp vào OK. Báo cáo được tạo ở Định dạng Tài liệu Di động Adobe (.pdf) và lưu trữ tự động trong thư mục được xác định trước. Đường dẫn thư mục mặc định là **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\Reports**.

Lưu ý: Bạn có thể thay đổi đường dẫn và thư mục trong môi trường Configuration (Cấu hình).

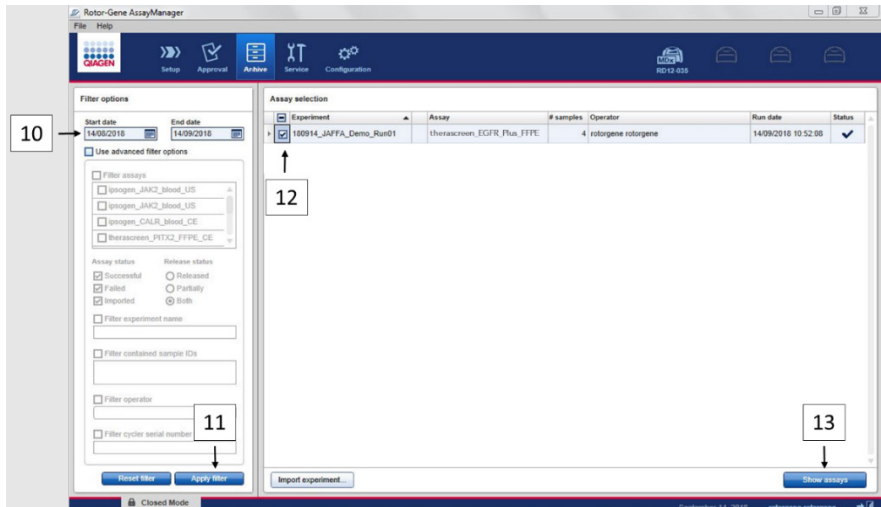
Lưu ý: Đồng thời, tệp LIMS được tự động tạo và lưu trữ trong thư mục được xác định trước. Đường dẫn thư mục mặc định là **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\LIMS**

39. Đóng tệp pdf và quay lại Rotor-Gene AssayManager. Nhấp vào **OK** cho mỗi lời nhắc.



Hình 17. Release/Report data (Phát hành/Báo cáo dữ liệu). Nhập mật khẩu (6) sau đó nhấn vào OK (7). Báo cáo PDF được tạo và mở ra; đóng báo cáo PDF: tệp LIMS được tạo tự động và thông báo phát hành xuất hiện, nhấn vào OK (8). Xét nghiệm hiện đã được phát hành đầy đủ: nhấn vào OK để chuyển đến môi trường Archive (Lưu trữ) (9).

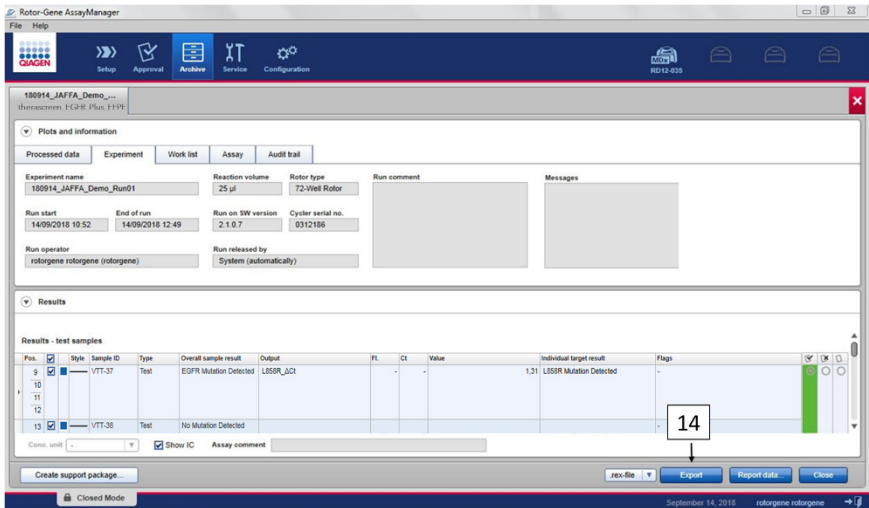
40. Chuyển đến tab “Archive” (Lưu trữ) để xuất tệp .rex, tương ứng với dữ liệu thô. Tìm thí nghiệm của bạn bằng cách sử dụng các tùy chọn bộ lọc và nhấn vào “show assays” (hiển thị xét nghiệm) (Hình 18)



Hình 18. Chọn thí nghiệm của bạn trong môi trường Archive (Lưu trữ). Ví dụ: lọc theo ngày (10) và áp dụng bộ lọc (11). Chọn thí nghiệm (12) rồi nhấn vào “Show assays” (Hiện thị xét nghiệm) (13).

41. Nhấp vào **Export .rex file** (Xuất tệp .rex) và nhấp vào **OK** để lưu.

Lưu ý: Bạn có thể chọn một vị trí để lưu tệp .rex (đường dẫn mặc định là **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\ExperimentsforClosedMode**). Đường dẫn và thư mục này cũng có thể được thay đổi trong tab “specify the .rex file export destination” (chỉ định đích xuất tệp .rex).



Hình 19. Xuất tệp .rex bằng cách nhấp vào nút “Export” (Xuất) (14).

Lưu ý: Cần có gói hỗ trợ từ lần chạy để bộ phận Hỗ trợ kỹ thuật của QIAGEN hỗ trợ xử lý sự cố. Các gói hỗ trợ có thể được tạo ra từ các môi trường Approval (Phê duyệt) hoặc Archive (Lưu trữ). Để biết thêm thông tin, xem “Tạo gói hỗ trợ” trong *Hướng dẫn Sử dụng Ứng dụng Lỗi Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

Ngoài gói hỗ trợ, lịch sử kiểm tra từ ±1 ngày từ thời điểm xảy ra sự cố có thể hữu ích. Có thể truy xuất lịch sử kiểm tra trong môi trường Service (Dịch vụ). Để biết thêm thông tin, xem *Hướng dẫn Sử dụng Ứng dụng Lỗi Rotor-Gene AssayManager v2.1*.

42. Dỡ dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM và thải bỏ các ống dạng dải theo các quy định về an toàn tại địa phương của bạn.

Giải thích Kết quả [nếu có]

Phân tích kết quả *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit cho từng mẫu chứng và mẫu được thực hiện tự động bởi Rotor-Gene AssayManager v2.1 được liên kết với Gamma Plug-in v1.0 và hồ sơ xét nghiệm EGFR.

Hồ sơ xét nghiệm EGFR phân tích các đường cong khuếch đại và có thể làm mất hiệu lực các đường cong không phù hợp, tùy thuộc vào hình dạng và biên độ nhiễu của chúng. Nếu trường hợp này xảy ra, nhãn sẽ được liên kết với đường cong không hợp lệ (xem Bảng 6, trang 63).

Mẫu chứng

Rotor-Gene AssayManager v2.1 phân tích các mẫu chứng lần chạy:

- NTC được chọn vì không có khuếch đại đặc hiệu.
- Tính hợp lệ của Mẫu chứng dương dựa trên sự tuân thủ các giá trị CT với các thông số kỹ thuật được xác định trước.
- Nếu bất kỳ mẫu chứng lần chạy nào trong số này không phù hợp, nhãn “ASSAY_INVALID” sẽ được kích hoạt. Nếu nhãn này được kích hoạt, lượt chạy được coi là không hợp lệ và thí nghiệm cần được thực hiện lại (sơ đồ quy trình quyết định cho các xét nghiệm lại được trình bày trong Hình 20).
- **Lưu ý:** Báo cáo được tạo ở cuối lượt chạy hiển thị kết quả thu được trên các mẫu chứng lần chạy, với các nhãn không hợp lệ (xem Bảng 6, trang 63) phía trước dữ liệu không hợp lệ.

Nếu tất cả các mẫu chứng trong lượt chạy phù hợp, thì Rotor-Gene AssayManager v2.1 phân tích các mẫu xét nghiệm. Các mẫu DNA từ cả FFPE và huyết tương được phân tích theo cùng một quy trình nhưng với các tiêu chí cụ thể được ghi lại trong hồ sơ xét nghiệm tương ứng.

Mẫu

Mẫu chứng nội Exon 2

Tính hợp lệ của Mẫu chứng nội Exon 2 dựa trên sự tuân thủ của giá trị Ct với các thông số kỹ thuật được xác định trước. Mẫu chứng nội phải hợp lệ để có thể giải thích kết quả mẫu. Mẫu chứng nội hợp lệ cho biết có đủ đầu vào và chất lượng DNA cũng như không có các chất gây nhiễu hay không. Trong trường hợp không hợp lệ, hãy tham khảo sơ đồ quy trình quyết định được trình bày trong Hình 20.

Phát hiện đột biến EGFR

Việc có hoặc không có đột biến EGFR trong mỗi mẫu xét nghiệm được đánh giá, dựa trên delta Ct giữa khuếch đại đột biến và khuếch đại mẫu chứng nội (các đích T790M_ΔCt, L861Q_ΔCt, v.v.) đối với mẫu FFPE và dựa trên khuếch đại đột biến đối với mẫu huyết tương (CT).

Bán định lượng đột biến EGFR

Một ước tính bán định lượng về nồng độ đột biến trong ccfDNA từ huyết tương được đưa ra cho các đích liên quan (được liệt kê trong Tóm tắt và giải thích) dưới dạng giới hạn dưới và giới hạn trên của khoảng tin cậy. Số lượng bản sao đột biến trên mỗi millilit huyết tương được ước tính, tức là giới hạn dưới và giới hạn trên của khoảng tin cậy được đưa ra bởi các đích T790M_CN_LL, L861Q_CN_LL, v.v.

Kết quả cho mỗi đích được hiển thị trong cột **Result** (Kết quả) của báo cáo.

Kết luận của phân tích đối với mỗi mẫu được hiển thị trong cột **Overall Sample Result** (Kết quả Mẫu Tổng thể) của báo cáo (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả mẫu tổng thể và hành động

Kết quả mẫu tổng thể	Loại mẫu	Mô tả	Hành động
Hợp lệ	Mẫu chứng (Mẫu chứng dương, NTC)	Mẫu chứng Hợp lệ	Không áp dụng
Không hợp lệ*	Mẫu chứng (Mẫu chứng dương, NTC)	Mẫu chứng Không hợp lệ (giá trị CT nằm ngoài phạm vi chấp nhận được xác định trước)	Lặp lại toàn bộ lượt chạy (tức là cả bốn hỗn hợp phản ứng EGFR, tất cả các mẫu)
Phát hiện Đột biến EGFR**	Mẫu Xét nghiệm	Ít nhất một đột biến EGFR đã được phát hiện†	Không áp dụng
Không phát hiện đột biến**	Mẫu Xét nghiệm	Không phát hiện đột biến EGFR	Không áp dụng
Không hợp lệ (liên kết với nhãn ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE)‡	Mẫu Xét nghiệm	Giá trị CT được phát hiện nằm dưới phạm vi chấp nhận đối với mẫu chứng nội. Đầu vào DNA có thể quá cao.	Pha loãng mẫu trước khi xét nghiệm lại. Xét nghiệm lại (các) mẫu liên quan với cả bốn hỗn hợp phản ứng EGFR trong một lần chạy qPCR mới.
Không hợp lệ (liên kết với nhãn ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE)‡	Mẫu Xét nghiệm	Giá trị CT được phát hiện nằm trên phạm vi chấp nhận đối với mẫu chứng nội. Mẫu có thể không chứa đủ DNA có thể khuếch đại hoặc có thể chứa chất ức chế.	Xét nghiệm lại (các) mẫu liên quan với cả bốn hỗn hợp phản ứng EGFR trong một lần chạy qPCR mới. Nếu mẫu đã được xét nghiệm lại một lần trước đó, hãy lặp lại bước tách chiết và xét nghiệm lại trong một lần chạy qPCR mới. Nếu nghi ngờ có chất ức chế, hãy thử pha loãng mẫu trước khi xét nghiệm lại (chỉ đối với huyết tương). Để biết thêm thông tin, hãy tham khảo Bảng 6 trên trang 63.

Bảng tiếp tục ở trang sau

Bảng tiếp tục từ trang trước

Bảng 5. Kết quả mẫu tổng thể và hành động (tiếp)

Kết quả mẫu tổng thể	Loại mẫu	Mô tả	Hành động
Không hợp lệ (liên kết với nhãn ASSAY_IC_NO_CT_VALUE)*	Mẫu Xét nghiệm	Không phát hiện thấy tín hiệu nào cho mẫu chứng nội.	Xét nghiệm lại (các) mẫu liên quan với cả bốn hỗn hợp phân ứng EGFR trong một lần chạy qPCR mới.
Không hợp lệ (khác)	Mẫu Xét nghiệm	Không hợp lệ do đường cong bất thường hoặc nguyên nhân khác (tham khảo Bảng 6, trang 63)	Nếu mẫu đã được xét nghiệm lại một lần trước đó, hãy lặp lại bước tách chiết và xét nghiệm lại trong một lần chạy qPCR mới. Nếu nghi ngờ có chất ức chế, hãy thử pha loãng mẫu trước khi xét nghiệm lại (chỉ đối với huyết tương). Để biết thêm thông tin, hãy tham khảo Bảng 6 trên trang 63

* Khi các mẫu chứng không hợp lệ, các giá trị CT không hợp lệ được hiển thị giữa các dấu ngoặc vuông để cung cấp thông tin.

** Đối với các đột biến trong phạm vi của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (được liệt kê trong Bảng 1)

† Để xác định (các) đột biến EGFR được phát hiện, hãy tham khảo đích ΔCt (ví dụ: T790M_ ΔCt), cột kết quả đích (ví dụ: Phát hiện T790M). Đối với kết quả bán định lượng (số lượng bản sao trên millilit huyết tương đối với ccf DNA), hãy tham khảo đích X_{CN_LL} và X_{CN_UL} (trong đó X = tên đột biến), cột giá trị, để có giới hạn dưới và giới hạn trên của khoảng bán định lượng.

Lưu ý: & ASSAY (XÉT NGHIỆM) đại diện cho T790M_L861Q / INSERTIONS_G719X / L858R_C797S / DELETIONS_S768I

Nhãn

Kết quả không hợp lệ được liên kết với các nhãn được hiển thị trong cột **Flag** (Nhãn) của báo cáo Rotor-Gene AssayManager.

Nhãn mẫu không hợp lệ có thể được chỉ định cho một mẫu hoặc đích trong quá trình phân tích bằng Rotor-Gene AssayManager v2.1, được xác định trong Bảng 6. Để biết các nhãn phổ biến được bao gồm trong Gamma Plug-in, hãy tham khảo *Hướng dẫn Sử dụng Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

Bảng 6. Thông tin nhân

Nhãn	Mô tả
ANALYSIS_FAILED	Xét nghiệm được đặt thành không hợp lệ vì phân tích không thành công. Liên hệ Bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật QIAGEN
ASSAY_INVALID	Mẫu không hợp lệ vì ít nhất một chất kiểm soát bên ngoài không hợp lệ.
CONSECUTIVE_FAULT	Đích được sử dụng để tính toán đích này không hợp lệ.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Đường cong khuếch đại dữ liệu thô cho thấy một hình dạng lệch với trạng thái đã thiết lập cho xét nghiệm này. Có khả năng cao là kết quả không chính xác hoặc giải thích sai kết quả.
FLAT_BUMP	Đường cong khuếch đại cho thấy một hình dạng giống nốt dẹt, sai lệch với trạng thái đã thiết lập cho xét nghiệm này. Có khả năng cao là kết quả không chính xác hoặc giải thích sai kết quả (ví dụ: xác định sai giá trị C_T).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Tỷ lệ thay đổi huỳnh quang đối với mẫu này so với ống mẫu có mức thay đổi huỳnh quang lớn nhất thấp hơn giới hạn xác định.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Đường cong khuếch đại đi qua ngưỡng hơn một lần. Không thể xác định C_T rõ ràng.
TARGET_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE*	Một tín hiệu không hợp lệ đã được phát hiện trong mẫu chứng không mẫu
OTHER_TARGET_INVALID	Một đích khác cho cùng một mẫu không hợp lệ.
ASSAY_IC_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE& ASSAY_IC_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE&	Giá trị C_T được phát hiện nằm ngoài phạm vi chấp nhận đối với mẫu chứng nội trong ống Mẫu chứng dương.
ASSAY_IC_PC_NO_CT_VALUE&	Không phát hiện tín hiệu nào cho mẫu chứng nội trong ống Mẫu chứng dương.
TARGET_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE** TARGET_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE**	Giá trị C_T được phát hiện nằm ngoài phạm vi chấp nhận đối với xét nghiệm đột biến trong ống Mẫu chứng dương.

Bảng tiếp tục ở trang sau

Bảng tiếp tục từ trang trước
Bảng 6. Thông tin nhân (tiếp)

Nhãn	Mô tả
TARGET_PC_NO_CT_VALUE**	Không phát hiện tín hiệu nào cho kênh đích trong ống Mẩu chứng dương.
RUN_FAILED	Xét nghiệm Không hợp lệ được đặt thành không hợp lệ do sự cố với máy luân nhiệt hoặc kết nối máy luân nhiệt.
RUN_STOPPED	Xét nghiệm Không hợp lệ được đặt thành không hợp lệ vì đã dừng chạy theo cách thủ công.
ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE&	Giá trị C _T được phát hiện nằm dưới phạm vi chấp nhận đối với mẫu chứng nội trong mẫu xét nghiệm. Đầu vào DNA có thể quá cao: pha loãng mẫu trước khi xét nghiệm lại.
ASSAY_IC_NO_CT_VALUE&	Không phát hiện tín hiệu nào cho mẫu chứng nội trong mẫu xét nghiệm.
ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Giá trị C _T được phát hiện nằm trên phạm vi chấp nhận đối với mẫu chứng nội trong mẫu xét nghiệm. Mẫu có thể không chứa đủ DNA có thể khuếch đại hoặc có thể chứa chất ức chế.
SATURATION	Huỳnh quang dữ liệu thô đang bão hòa mạnh trước điểm uốn của đường cong khuếch đại.
SPIKE	Đỉnh trong huỳnh quang dữ liệu thô được phát hiện trong đường cong khuếch đại nhưng nằm ngoài khu vực trong đó CT được xác định.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Phát hiện đỉnh trong đường cong khuếch đại gần với C _T .
NO_BASELINE	Không tìm thấy đường cơ sở ban đầu. Không thể thực hiện phân tích tiếp theo
STEEP_BASELINE	Phát hiện đường cơ sở dốc lên cho huỳnh quang dữ liệu thô trong đường cong khuếch đại.
STRONG_BASELINE_DIP	Phát hiện đường cơ sở dốc xuống cho huỳnh quang dữ liệu thô trong đường cong khuếch đại.

Bảng tiếp tục ở trang sau

Bảng tiếp tục từ trang trước

Bảng 6. Thông tin nhãn (tiếp)

Nhãn	Mô tả
STRONG_NOISE	Phát hiện nhiễu mạnh bên ngoài pha tăng của đường cong khuếch đại.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Phát hiện nhiễu mạnh trong pha (mú) tăng của đường cong khuếch đại.
TARGET_ΔCT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	ΔC _T được phát hiện thấp hơn mong đợi đối với hỗn hợp phản ứng đột biến đích của mẫu xét nghiệm
TARGET_CT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	C _T được phát hiện thấp hơn mong đợi đối với hỗn hợp phản ứng đột biến đích của mẫu xét nghiệm
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Phát hiện đường cơ sở dạng sóng cho huỳnh quang dữ liệu thô trong đường cong khuếch đại.

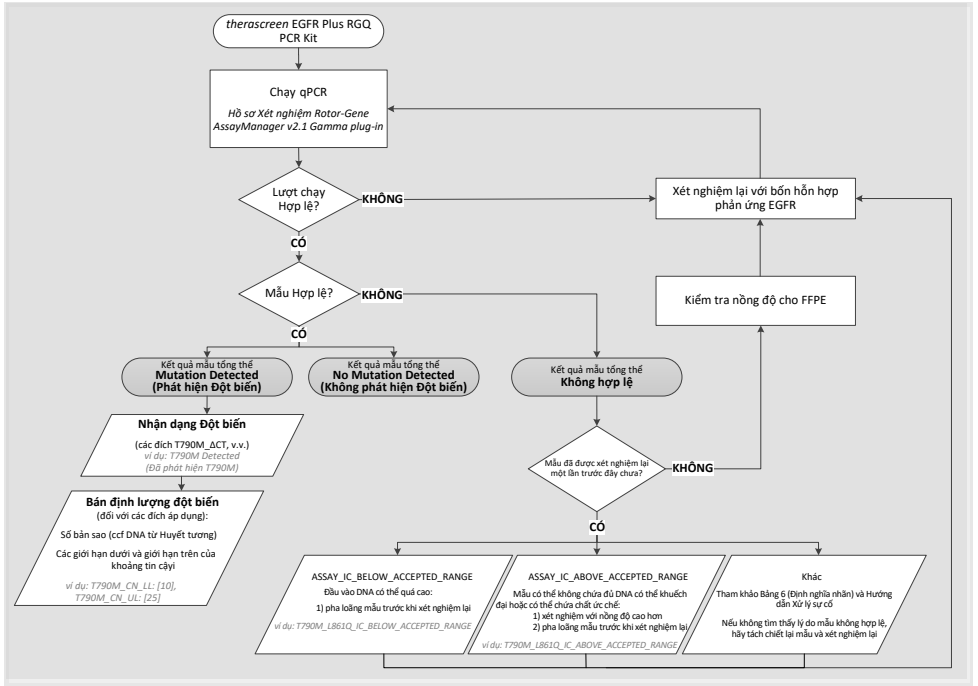
* TARGET (ĐÍCH) đại diện cho T790M, L861Q, T790M_L861Q_IC, INSERTIONS, G719X, INSERTIONS_G719X_IC, L858R, C797S, L858R_C797S_IC, DELETIONS, S768I, DELETIONS_S768I_IC

** TARGET (ĐÍCH) đại diện cho T790M, L861Q, INSERTIONS, G719X, L858R, C797S, DELETIONS, S768I & ASSAY (XÉT NGHIỆM) đại diện cho T790M_L861Q / INSERTIONS_G719X / L858R_C797S / DELETIONS_S768I

Xét nghiệm lại

Trong trường hợp kết quả không hợp lệ, hãy tham khảo “Hướng dẫn Xử lý sự cố”, trang 95, để tìm hiểu nguyên nhân lỗi và có khả năng xác định bất kỳ lỗi nào cần được chỉnh sửa.

Quy trình xét nghiệm lại được tóm tắt trong Hình 20.



Hình 20. Sơ đồ quy trình quyết định *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.

Nếu một hoặc một số mẫu chứng lần chạy không hợp lệ, lần chạy phải được lặp lại với 4 Hỗn hợp Phản ứng EGFR. Ví dụ: nếu mẫu chứng dương không đáp ứng tiêu chí hợp lệ đối với Hỗn hợp T790M & L861Q, nhưng hợp lệ đối với tất cả các Hỗn hợp Phản ứng EGFR khác, bốn Hỗn hợp phải được xét nghiệm lại với tất cả các mẫu.

Nếu một hoặc một số mẫu không hợp lệ, các mẫu liên quan phải được xét nghiệm lại với 4 Hỗn hợp Phản ứng EGFR. Tùy thuộc vào nhãn được hiển thị bởi RGAM, hãy pha loãng mẫu của bạn trước khi xét nghiệm lại hoặc xét nghiệm lại với nồng độ cao hơn.

Nếu không tìm thấy lý do mẫu không hợp lệ:

-
- Kiểm tra xem các mẫu của bạn đã được xử lý và bảo quản như mô tả trong phần “Bảo quản và Xử lý Mẫu” chưa.
 - Tách chiết lại mẫu FFPE của bạn với nhiều phần hơn trước khi xét nghiệm lại.
 - Tách chiết lại mẫu FFPE của bạn bằng cách chọn một vùng khối u lớn hơn trước khi xét nghiệm lại.
 - Xin lưu ý rằng tất cả các hiệu suất đã được thiết lập bằng cách sử dụng DNA tách chiết từ FFPE ở 5 ng/μl và/hoặc 5 μl ccfDNA tinh sạch được tách chiết từ huyết tương.

Để biết các giải thích khác về tính không hợp lệ của mẫu, vui lòng tham khảo “Hướng dẫn Xử lý sự cố” trang 95.

Hạn chế

Kết quả từ sản phẩm này phải được giải thích trong bối cảnh của tất cả các phát hiện lâm sàng và phòng thí nghiệm có liên quan và không được sử dụng một mình để chẩn đoán.

Sản phẩm sẽ được sử dụng bởi các chuyên gia phòng thí nghiệm được đào tạo về quy trình sinh học phân tử, quy trình chẩn đoán trong ống nghiệm và được đào tạo về cách sử dụng hệ thống QIASymphony SP, dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM, Rotor-Gene AssayManager và Gamma plug-in.

Sản phẩm chỉ được thiết kế để sử dụng trên máy luân nhiệt Rotor-Gene Q MDx real-time PCR, dòng 5plex HRM kết hợp với phần mềm Rotor-Gene AssayManager và Gamma plug-in bằng cách sử dụng hồ sơ xét nghiệm chuyên dụng *therascreen EGFR Plus*.

Chúng tôi khuyên bạn nên sử dụng Deparaffinization Solution (bao gồm xử lý RNase A), QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit, QIASymphony DSP DNA Mini Kit và QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

Cần tuân thủ nghiêm ngặt *Hướng dẫn Sử dụng theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit* để có kết quả tối ưu. Việc pha loãng thuốc thử khác với những gì mô tả trong sổ tay này không được khuyến khích và sẽ làm giảm hiệu năng. Tất cả các thuốc thử được cung cấp trong *therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit* chỉ được sử dụng với các thuốc thử khác được cung cấp trong cùng một bộ dụng cụ. Sử dụng thuốc thử từ các lô bộ dụng cụ khác nhau trong cùng một lần chạy có thể ảnh hưởng đến hiệu năng.

Điều quan trọng là phải đánh giá số lượng gDNA từ mẫu FFPE trước khi thực hiện phân tích mẫu bằng *therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit*. Quy trình tách chiết nên được lặp lại nếu số lượng gDNA không đủ để phân tích đột biến. gDNA nên được pha loãng nếu nồng độ quá cao để phân tích đột biến.

Cần chú ý đến ngày hết hạn và điều kiện bảo quản in trên hộp và nhãn của tất cả các thành phần. Không sử dụng các thành phần đã hết hạn hoặc được bảo quản không đúng cách.

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit chỉ được xác nhận đối với huyết tương được thu ở 2K EDTA và FFPE từ bệnh nhân NSCLC.

Việc sử dụng sản phẩm này không được phê chuẩn và/hoặc việc sửa đổi các thành phần sẽ làm mất hiệu lực trách nhiệm của QIAGEN.

Đặc tính Hiệu năng

Giới hạn trống

Giới hạn trống (Limit of Blank, LOB) được xác định bằng cách sử dụng 77 mẫu FFPE kiểu tự nhiên của NSCLC EGFR và 75 mẫu Huyết tương của người hiến khỏe mạnh (ít nhất 60 phép đo cho mỗi lô thuốc thử, 3 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng). LOB được xác định cho mỗi xét nghiệm nhất định, là giá trị LOB thấp nhất thu được. Kết quả LOB được tóm tắt trong Bảng 7.

Bảng 7. Tóm tắt kết quả giới hạn trống cho *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit

Đích EGFR	LoB FFPE (Δ Ct)	LoB Huyết tương (Δ Ct)
T790M	11,49	40,23
L861Q	15,31	35,54
Thêm đoạn	11,32	38,42
G719X	14,47	45,00
L858R	10,52	37,54
C797S	15,06	45,00
Mất đoạn	14,15	45,00
S768I	14,64	45,00

Tỷ lệ dương tính giả là dưới 1% cho tất cả các đích EGFR ngoại trừ L858R trong FFPE (1,2%) và cho các Thêm đoạn trong mẫu Huyết tương (1,08%)

Giới hạn Phát hiện

Giới hạn phát hiện (Limit of Detection, LOD) của mỗi đột biến trong số 42 đột biến EGFR được xác định trên các mẫu FFPE và Huyết tương dương tính thấp với EGFR (3 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng). Kết quả LOD được tóm tắt trong Bảng 8.

Bảng 8. Tóm tắt kết quả giới hạn phát hiện cho *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit

Exon	Đột biến	ID COSMIC	Thay đổi base	FFPE Phần trăm đột biến	Huyết tương Bản sao trên mỗi ml
18	G719A	6239	c.2156G>C	5,09%	794
	G719S	6252	c.2155G>A	35,00%	149
	G719C	6253	c.2155G>T	1,10%	161
19	Mất đoạn	26038	c.2233_2247del15	2,02%	100
		13550	c.2235_2248>AATTC	0,61%	75
		6223	c.2235_2249del15	0,54%	75
		6225	c.2236_2250del15	0,74%	75
		18427	c.2237_2257>TCT	1,00%	75
		6220	c.2238_2255del18	0,22%	75
		12367	c.2237_2254del18	0,80%	75
		12384	c.2237_2255>T	0,36%	75
		12678	c.2237_2251del15	0,25%	75
		13551	c.2235_2252>AAT	0,65%	75
		13552	c.2235_2251>AATTC	1,00%	75
		12386	c.2237_2252>T	0,78%	75

Bảng tiếp tục ở trang sau

Bảng tiếp tục từ trang trước

Bảng 8. Tóm tắt kết quả giới hạn phát hiện cho thetascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit (tiếp)

Exon	Đột biến	ID COSMIC	Thay đổi base	FFPE Phần trăm đột biến	Huyết tương Bản sao trên mỗi ml
19	Mất đoạn	12416	c.2237_2253>TTGCT	0,60%	75
		12728	c.2236_2253del18	0,79%	75
		12422	c.2238_2248>GC	0,79%	100
		12382	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	2,99%	589
		6218	c.2239_2247delTTAAGAGAA	35,00%	1.100
		12387	c.2239_2258>CA	0,93%	75
		12370	c.2240_2257del18	0,77%	75
		12403	c.2239_2256>CAA	0,92%	75
		6255	c.2239_2256del18	0,16%	75
		12383	c.2239_2251>C	0,72%	75
		12419	c.2238_2252>GCA	0,40%	75
		6210	c.2240_2251del12	0,92%	75
		23571	c.2238_2252del15	1,10%	75
		12369	c.2240_2254del15	0,78%	75
		13556	c.2253_2276del24	0,89%	75
		12385	c.2235_2255>AAT	0,71%	75

Bảng tiếp tục ở trang sau

Bảng tiếp tục từ trang trước

Bảng 8. Tóm tắt kết quả giới hạn phát hiện cho theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit (tiếp)

Exon	Đột biến	ID COSMIC	Thay đổi base	FFPE Phần trăm đột biến	Huyết tương Bản sao trên mỗi ml
20	S768I	6241	c.2303G>T	0,69%	167
	Thêm đoạn	12376	c.2307_2308insGCCAGCGTG	0,76%	150
		12378	c.2310_2311insGGT	3,04%	131
		12377	c.2319_2320insCAC	0,64%	51
		13428	c.2311_2312insGCGTGGACA	0,76%	100
		13558	c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	0,89%	100
	T790M	6240	c.2369C>T	1,80%	174
	C797Sa	6493937	c.2389T>A	1,11%	126
	C797Sb	5945664	c.2390G>C	0,62%	125
	21	L858R	6224	c.2573T>G	0,75%
L861Q		6213	c.2582T>A	0,65%	43

Đầu vào DNA

Đầu vào gDNA được tối ưu hóa để sử dụng kết hợp với *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được đánh giá trên các mẫu FFPE dương tính với EGFR cho 9 đích EGFR (T790M, L861Q, G719A, G719C, G719S, L858R, C797Sa, C797Sb và S768I) (3 đầu vào gDNA khác nhau, 10 phép đo cho mỗi mẫu đầu vào, 1 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng). Kết quả cho thấy đầu vào tối ưu sẽ được sử dụng là 25 ng (5 ng/μl).

Đầu vào ccfDNA được tối ưu hóa để sử dụng kết hợp với *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit không được đánh giá trên các mẫu Huyết tương.

Khả năng lặp lại

Khả năng lặp lại được xác định trên một EGFR dương tính và một FFPE âm tính và các mẫu huyết tương. Đối với mỗi xét nghiệm EGFR, khả năng lặp lại được đánh giá trên một đột biến EGFR nhất định, được xét nghiệm trên 2 mức độ đột biến (trung bình và thấp). Mỗi mức được xét nghiệm lặp lại trên ít nhất 43 lần chạy được thực hiện trong 20 ngày, với tối thiểu 78 phép đo cho mỗi mức đột biến và mỗi xét nghiệm (3 dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 3 người vận hành, 3 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng). Phân tích định lượng kết quả khả năng lặp lại được tóm tắt trong Bảng 9 đối với mẫu FFPE và trong Bảng 10 đối với mẫu huyết tương.

Bảng 9. Tóm tắt kết quả khả năng lặp lại cho theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit trên mẫu FFPE

Hộp hợp EGFR Plus	Địch EGFR Plus	Mức Độ biến được Xét nghiệm	Giữa những người vận hành		Giữa các dụng cụ		Giữa các lọ dụng cụ		Giữa các ngày		Giữa các lần chạy		Trong cùng lần chạy		Tổng	
			SD*	CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	thấp	0,04	0,51	0,11	1,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	4,13	0,17	2,08	0,4	4,84
		trung bình	0,05	1,03	0,14	2,63	0,00	0	0,00	0,00	0,34	6,41	0,18	3,43	0,41	7,8
	L861Q	thấp	0,00	0,00	0,36	8,14	0,00	0,00	0,00	0	0,34	7,63	0,26	5,9	0,56	12,62
		trung bình	0,00	0,00	0,23	11,27	0,03	1,27	0,00	0	0,35	16,92	0,21	10,02	0,47	22,7
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,81	0,00	0	0,4	1,59	0,11	0,45	0,46	1,84
	Ins_G719X	Thêm đoạn	thấp	0,15	3,10	0,23	4,55	0,30	6,00	0,00	0	0,64	12,93	0,35	6,97	0,83
trung bình			0,00	0,00	0,23	11,95	0,21	10,79	0,29	15,29	0,49	25,23	0,17	8,59	0,67	34,69
G719X		thấp	0,00	0,00	0,52	9,14	0,48	8,49	0,55	9,7	0,78	13,78	0,27	4,74	1,21	21,5
		trung bình	0,00	0,00	0,49	13,33	0,48	12,82	0,52	14,06	0,63	17,02	0,33	8,84	1,12	30,13
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,00	0,00	0,27	1,05	0,28	1,12	0,21	0,81	0,72	2,83	0,18	2,83	0,86	3,39
L858R_C797S		L858R	thấp	0,00	0,00	0,41	5,76	0,21	2,93	0,43	6,02	0,23	3,25	0,41	5,74	0,79
	trung bình		0,16	3,40	0,38	8,28	0,00	0,00	0,45	9,72	0,24	5,32	0,38	8,29	0,76	16,48
	C797S	thấp	0,00	0,00	0,52	9,13	0,24	4,19	0,00	0	0,22	3,82	0,31	5,35	0,69	12
		trung bình	0,00	0,00	0,35	11,31	0,29	9,23	0,26	8,5	0,36	11,72	0,21	6,69	0,67	21,62
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0,20	0,79	0,29	1,11	0,15	0,59	0,44	1,72	0,4	1,58	0,21	0,83	0,74	2,92
	Del_S768I	Mất đoạn	thấp	0,17	3,10	0,16	2,85	0,00	0,00	0,00	0	0,39	6,95	0,24	4,41	0,51
trung bình			0,20	5,91	0,24	7,14	0,00	0,00	0,00	0	0,42	12,64	0,15	4,53	0,54	16,31
S768I		thấp	0,06	0,74	0,35	4,43	0,35	4,43	0,18	2,32	0,42	5,36	0,25	3,2	0,72	9,18
		trung bình	0,15	2,58	0,27	4,64	0,34	5,82	0,32	5,38	0,31	5,25	0,24	4,17	0,68	11,66
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,00	0,00	0,14	0,56	0,28	1,12	0,26	1,02	0,32	1,26	0,15	0,61	0,54	2,13

* SD: Độ lệch chuẩn

** %CV: Hệ số biến thiên

Bảng 10. Tóm tắt kết quả khả năng lặp lại cho theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit trên mẫu huyết tương

Hỗn hợp EGFR Plus	Đích EGFR Plus	Mức đột biến được Xét nghiệm	Giữa những người vận hành		Giữa các SD dụng cụ		Giữa các lô dụng cụ		Giữa các ngày		Giữa các lần chạy		Trong cùng lần chạy		Tổng	
			SD*	%CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	thấp	0,1	0,28	0	0	0,16	0,46	0	0	0,29	0,8	0,45	1,27	0,57	1,6
		trung bình	0,16	0,49	0	0	0,12	0,36	0	0	0,26	0,79	0,24	0,73	0,41	1,23
	L861Q	thấp	0,24	0,76	0,3	0,96	0,2	0,63	0,38	1,23	0,33	1,06	0,29	0,94	0,72	2,33
		trung bình	0,14	0,49	0,27	0,93	0,18	0,63	0,18	0,63	0,34	1,18	0,18	0,63	0,55	1,93
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0,22	0,84	0,11	0,41	0,32	1,22	0	0	0,42	1,63	0,15	0,57	0,6	2,31
	Ins_G719X	Thêm đoạn	thấp	0,15	0,48	0,08	0,26	0,14	0,46	0,05	0,15	0,1	0,32	0,31	0,99	0,4
trung bình			0,13	0,43	0	0	0,06	0,22	0,1	0,35	0	0	0,16	0,55	0,24	0,81
G719X		thấp	0,53	1,84	0,2	0,71	0,14	0,47	0,52	1,8	0,68	2,35	0,15	0,51	1,05	3,62
		trung bình	0,13	0,47	0,21	0,76	0,39	1,42	0	0	0,57	2,05	0,13	0,47	0,75	2,69
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,33	1,24	0,1	0,4	0,25	0,97	0	0	0,43	1,63	0,16	0,6	0,63	2,31
L858R_C797S		L858R	thấp	0,19	0,56	0	0	0,1	0,3	0,28	0,82	0,33	1	0,3	0,89	0,57
	trung bình		0,17	0,55	0	0	0,09	0,3	0,22	0,71	0,3	0,96	0,18	0,57	0,45	1,47
	C797S	thấp	0,12	0,39	0,32	1,01	0,26	0,82	0,14	0,46	0,11	0,36	0,28	0,89	0,54	1,72
		trung bình	0,09	0,3	0,28	0,98	0,2	0,7	0	0	0,24	0,83	0,12	0,41	0,45	1,55
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0		0,31	1,06	0,31	1,08	0,08	0,28	0,28	0,97	0,23	0,8	0,57	1,99
	Del_S768I	Mất đoạn	thấp	0,66	1,99	0	0	0	0	0,18	0,54	0,84	2,52	0,28	0,84	1,12
trung bình			0,46	1,5	0	0	0	0	0	0	0,66	2,16	0,28	0,9	0,85	2,78
S768I		thấp	0,53	1,66	0,16	0,49	0,33	1,04	0,34	1,06	0,66	2,07	0,14	0,44	0,99	3,11
		trung bình	0,14	0,45	0,24	0,78	0,25	0,81	0,24	0,77	0,35	1,13	0,12	0,39	0,57	1,87
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,47	1,8	0,2	0,78	0,26	1,08	0	0	0,45	1,71	0,14	0,52	0,74	2,83

* SD: Độ lệch chuẩn

** %CV: Hệ số biến thiên

Một phân tích định tính đã được thực hiện trên kết quả khả năng lặp lại của FFPE và huyết tương và cho thấy rằng tỷ lệ phát hiện đột biến EGFR độc lập với lô bộ dụng cụ xét nghiệm, dụng cụ Rotor-Gene Q và người vận hành.

Khả năng tái lập

Khả năng tái lập được xác định trên một EGFR dương tính và một FFPE âm tính và các mẫu huyết tương. Đối với mỗi xét nghiệm EGFR, khả năng lặp lại được đánh giá trên một đột biến EGFR nhất định, được xét nghiệm trên 2 mức độ đột biến (trung bình và thấp). Mỗi mức được xét nghiệm trong 5 bản sao trên ít nhất 75 lần chạy (25 lần chạy tại mỗi địa điểm) được thực hiện trong ít nhất 5 ngày, với tối thiểu 70 phép đo cho mỗi mức độ đột biến và mỗi xét nghiệm (3 địa điểm, một dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tại mỗi địa điểm, một người vận hành tại mỗi địa điểm, một lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng). Phân tích định lượng kết quả khả năng tái lập được tóm tắt trong Bảng 11 đối với mẫu FFPE và trong Bảng 12 đối với mẫu huyết tương.

Bảng 11. Tóm tắt kết quả khả năng tái lập cho *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit trên mẫu FFPE

Hỗn hợp EGFR Plus	Địch EGFR Plus	Mức Độ biến được Xét nghiệm	Trong cùng lần chạy		Giữa các ngày		Giữa các địa điểm		Tổng	
			SD*	CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	thấp	0,23	2,7	0,48	5,48	0,12	1,38	0,54	6,26
		trung bình	0,19	3,42	0,44	7,95	0,13	2,29	0,5	8,95
	L861Q	thấp	0,22	4,85	0,7	15,48	0,31	6,81	0,79	17,59
		trung bình	0,21	8,7	0,66	27,6	0	0	0,69	28,93
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0,14	0,55	0,62	2,46	0,38	1,53	0,74	2,95
	Ins_G719X	Thêm đoạn	thấp	0,28	5,29	0,21	4,02	0	0	0,35
trung bình			0,15	7,11	0,15	6,87	0,09	3,99	0,23	10,66
G719X		thấp	0,25	4	0,2	3,14	0,29	4,56	0,43	6,83
		trung bình	0,18	4,18	0,22	5,11	0,26	6,01	0,39	8,92
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,14	0,54	0,14	0,54	0,15	0,61	0,25	0,97
L858R_C797S		L858R	thấp	0,27	3,4	0,15	1,92	0,33	4,11	0,45
	trung bình		0,22	4,23	0,15	2,92	0,31	5,96	0,42	7,87
	C797S	thấp	0,3	4,97	0,12	2,07	0,12	1,93	0,35	5,72
		trung bình	0,19	5,23	0,16	4,52	0,2	5,59	0,32	8,89
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0,12	0,46	0,21	0,82	0,05	0,18	0,24	0,96
	Del_S768I	Mất đoạn	thấp	0,24	4,16	0,24	4,16	0,19	3,33	0,37
trung bình			0,15	4,43	0,11	3,12	0,16	4,65	0,25	7,14
S768I		thấp	0,26	3,29	0,2	2,54	0,14	1,85	0,35	4,55
		trung bình	0,21	3,66	0,28	4,76	0,13	2,25	0,37	6,41
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,12	0,49	0,11	0,45	0,26	1,02	0,31	1,22

* SD: Độ lệch chuẩn

** %CV: Hệ số biến thiên

Bảng 12. Tóm tắt kết quả khả năng tái lập cho *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit trên mẫu huyết tương

Hỗn hợp EGFR Plus	Đích EGFR Plus	Mức Độ biến được Xét nghiệm	Trong cùng lần chạy		Giữa các ngày		Giữa các địa điểm		Tổng	
			SD*	%CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	thấp	0,34	0,93	0,26	0,73	0,14	0,4	0,45	1,25
		trung bình	0,2	0,58	0,22	0,66	0,24	0,73	0,38	1,14
	L861Q	thấp	0,35	1,11	0,19	0,6	0,17	0,55	0,43	1,37
		trung bình	0,19	0,65	0,16	0,56	0,23	0,81	0,34	1,18
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0,18	0,67	0,86	3,28	0,47	1,8	1	3,8
	Ins_G719X	Thêm đoạn	thấp	0,29	0,93	0	0	0	0	0,3
trung bình			0,19	0,65	0	0	0	0	0,2	0,67
G719X		thấp	0,39	1,3	0,64	2,15	0,85	2,86	1,13	3,81
		trung bình	0,24	0,87	0,33	1,19	0,25	0,9	0,48	1,72
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,19	0,72	0,21	0,82	0,16	0,63	0,33	1,26
L858R_C797S		L858R	thấp	0,37	1,1	0,35	1,04	0,47	1,38	0,69
	trung bình		0,17	0,55	0,35	1,12	0,48	1,54	0,62	1,98
	C797S	thấp	0,29	0,94	0,23	0,74	0,31	0,98	0,48	1,54
		trung bình	0,2	0,68	0,18	0,63	0,35	1,22	0,44	1,53
	Kiểu tự nhiên	Không áp dụng	0,3	1,04	0,38	1,31	0,34	1,18	0,59	2,05
	Del_S768I	Mất đoạn	thấp	0,3	0,91	0,38	1,16	0,54	1,62	0,73
trung bình			0,21	0,69	0,32	1,04	0,52	1,7	0,65	2,11
S768I		thấp	0,17	0,53	0,27	0,84	0,39	1,21	0,5	1,57
		trung bình	0,2	0,66	0,17	0,56	0,28	0,92	0,39	1,26
Kiểu tự nhiên		Không áp dụng	0,17	0,65	0,19	0,71	0,3	1,13	0,39	1,49

* SD: Độ lệch chuẩn

** %CV: Hệ số biến thiên

Một phân tích định tính đã được thực hiện trên kết quả khả năng tái lập của FFPE và huyết tương và cho thấy rằng tỷ lệ phát hiện đột biến EGFR độc lập với địa điểm.

Các chất gây nhiễu

Tổng cộng 36 chất có khả năng gây nhiễu đã được xét nghiệm trên 2 mẫu FFPE và huyết tương dương tính với EGFR và một mẫu âm tính với EGFR (Bảng 13). Các chất nội sinh có khả năng gây nhiễu và các chất ngoại sinh có thể được tìm thấy trong một mẫu trước khi chuẩn bị DNA được trộn với các mẫu ở mức tối đa có liên quan về mặt lâm sàng. Các chất ngoại sinh có khả năng gây nhiễu do quy trình chuẩn bị DNA được trộn lẫn với DNA được tách chiết ở mức được tính toán trong trường hợp xấu nhất. Mỗi mẫu (mẫu chứng và trộn với chất có khả năng gây nhiễu) được xét nghiệm trong 6 bản sao, kết quả là tổng số 51 lần chạy (1 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng). Phân tích định lượng không cho thấy bất kỳ tác động gây nhiễu nào của các chất được xét nghiệm.

Bảng 13. Các chất có khả năng gây nhiễu được xét nghiệm trên mẫu FFPE

Chất được xét nghiệm	Nồng độ xét nghiệm
Formalin 4–10%	4,10E–05%
Sáp paraffin	4,10E–05%
Deparaffinization solution	4,10E–05%
ATL (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1,30E–05%
Proteinase K	4,00E–05%
RNAse A	1,99E–07%
Chất đệm AL (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1,99E–03%
Ethanol 96–100%	1,99E–03%
AW1 (QIAamp FFPE Wash Buffer)	1,00E–01%
AW2 (QIAamp FFPE Wash Buffer)	1,00E+00%
QSB1 (QIASymphony FFPE Buffer)	4,19E–07%
MBS (QIASymphony FFPE Magnetic Beads Solution)	6,15E–09%
QSW1 (QIASymphony FFPE Wash Buffer)	8,80E–04%
QSW2 (QIASymphony FFPE Wash Buffer)	8,80E–02%
AVE (QIASymphony FFPE Elution Buffer)	5,00E+00%
ATE (QIAamp FFPE Tissue Elution Buffer)	5,00E+00%

Bảng 14. Các chất có khả năng gây nhiễu được xét nghiệm trên mẫu huyết tương

Chất được xét nghiệm	Nồng độ xét nghiệm
Buffer ACL (QIAamp Plasma Lysis Buffer)	5,77E-05%
Buffer ACB (QIAMP Plasma Buffer)	2,92E-04%
Buffer ACW1 (QIAamp Plasma Wash Buffer)	1,00E-03%
Buffer ACW2 (QIAamp Plasma Wash Buffer)	1,25E-02%
Ethanol 96-100%	1,25E-01%
Buffer AVE (QIAamp Plasma Elution Buffer)	5,00E+00%
MBS3 (QIAAsymphony Plasma Magnetic Beads Solution)	3,48E-05%
Proteinase K	7,49E-05%
QSB4 (QIAAsymphony Plasma Buffer)	5,57E-04%
QSW8 (QIAAsymphony Plasma Wash Buffer)	1,11E-01%
QSW9 (QIAAsymphony Plasma Wash Buffer)	4,62E-01%
QSW10 (QIAAsymphony Plasma Wash Buffer)	5,00E+00%
QSE1/QSE2 (QIAAsymphony Plasma Elution Buffer)	5,00E+00%
Axit ethylenediaminetetraacetic (EDTA)	3,39E+00 µmol/L
Bilirubin không tiếp hợp	684 µmol/L
Bilirubin tiếp hợp	475 µmol/L
Haemoglobin	10 g/L
Triglyceride	16,94 mmol/L
Xylene	684 µmol/L
Chloroform	5,00E+00%

Độ đặc hiệu và phản ứng chéo

Độ đặc hiệu và phản ứng chéo của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được đánh giá bằng cách kiểm tra khả năng của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit trong việc phát hiện và xác định chính xác (khi có thể) đột biến EGFR được trình bày trong Bảng 1. Đối với các mẫu FFPE, nghiên cứu được thực hiện trên tất cả các đột biến đích EGFR. Độ đặc hiệu của các mẫu huyết tương được đánh giá trên các đột biến đích C797Sa và C797Sb. Tất cả các mẫu đều được xét nghiệm một lần cho mỗi lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, 3 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng. Nghiên cứu cho thấy rằng tất cả các đột biến đích được phát hiện bằng xét nghiệm EGFR dự kiến và không có tín hiệu nào được quan sát thấy với các xét nghiệm khác.

Việc phát hiện đột biến hiếm gặp L858Q không nhắm đích bằng *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit cũng được đánh giá bằng cách xét nghiệm các mẫu FFPE và huyết tương. Nghiên cứu này chỉ ra rằng đột biến L858Q không được phát hiện bởi xét nghiệm C797S và có thể được phát hiện bởi xét nghiệm L858R ở tỷ lệ phần trăm đột biến cao (FFPE) và số lượng bản sao cao (huyết tương).

Nhiễm bản chéo và khả năng mang sang

Sự nhiễm bản chéo của 4 quy trình EGFR Plus, tức là sử dụng 4 phương pháp chuẩn bị DNA, được đánh giá bằng cách sử dụng các điều kiện khác nhau xen kẽ các mẫu dương tính và âm tính với EGFR. Ít nhất 3 lần chạy trên mỗi quy trình EGFR Plus đã được thực hiện (1 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng cho mỗi quy trình) và không có quy trình nào trong số 4 quy trình bị nhiễm bản chéo.

Trong quá trình đánh giá nhiễm bản chéo, việc mang sang giữa bốn quy trình EGFR Plus đã được đánh giá và cho thấy không có tình trạng mang sang nào giữa các lần chạy.

Khung thời gian Sử dụng

Khung thời gian tối đa từ khi chuẩn bị đĩa qPCR đến khi khởi chạy qPCR được xác định cho mỗi xét nghiệm EGFR trên một đột biến EGFR nhất định, được xét nghiệm trên một mức đột biến thấp (một dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, 1 người vận hành, 1 lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được sử dụng). 8 mẫu dương tính FFPE khác nhau đã được xét nghiệm ngay sau khi chuẩn bị đĩa qPCR và sau 3 giờ, 6 giờ và 24 giờ lưu trữ ở +2 °C/+8 °C. Khung thời gian tối đa có thể chấp nhận được là 24 giờ; tuy nhiên, bạn nên chạy qPCR trên *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit càng sớm càng tốt sau khi chuẩn bị đĩa (tức là, sau khi nạp tất cả các mẫu cần xét nghiệm).

Hiệu suất Lâm sàng

Độ chính xác: So sánh với phương pháp tham chiếu phân tích

Nghiên cứu đã chứng minh mức độ phù hợp cao giữa *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và (các) phương pháp phân tích độ chính xác. Các phương pháp tham chiếu và giải quyết sự khác biệt được sử dụng: PNA qPCR - trong Karachaliou et al., 2015 và Mayo-de-las-Casas et al., 2017; Sanger bi-directional sequencing; Next-generation sequencing, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit V2, CE (số danh mục 874111) và *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, CE (số danh mục 870311).

Kết quả được phân tích để đánh giá Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Dương tính (Positive Percent Agreement, PPA), Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Âm tính (Negative Percent Agreement, NPA) và Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Tổng thể (Overall Percent Agreement, OPA) về tình trạng đột biến EGFR (MT hoặc WT) và đích EGFR (xác định đột biến) cho mẫu FFPE và huyết tương giữa *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và phương pháp Tham chiếu tương ứng và theo phương pháp giải quyết sự khác biệt.

Trong nghiên cứu, 170 mẫu FFPE đã được xét nghiệm và 148 mẫu cho kết quả có thể giải thích hợp lệ (148 trạng thái mẫu và 155 trạng thái đích).

Khi kết quả của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được so sánh với kết quả của phương pháp Tham chiếu tương ứng, 4 trạng thái mẫu EGFR (MT hoặc WT) cho thấy sự không phù hợp. Sau khi phân tích phương pháp giải quyết sự khác biệt, số lượng trạng thái mẫu không phù hợp (MT hoặc WT) giảm xuống còn một trạng thái mẫu âm tính giả, khác biệt. PPA, NPA và OPA với khoảng tin cậy (Confidence Interval, CI) 95% hai phía tương ứng được tóm tắt trong Bảng 15 và Bảng 16.

Bảng 15. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi mẫu - so sánh *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và Phương pháp Tham chiếu cho các mẫu FFPE

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Tổng thể	97,30%	93,22%	99,26%
Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Dương tính (độ nhạy)	93,65%	84,53%	98,24%
Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Âm tính (tính đặc hiệu)	100,00%	95,75%	100,00%

Bảng 16. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi mẫu sau nghiên cứu không phù hợp đối với các mẫu FFPE

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Tổng thể	99,32%	96,29%	99,98%
Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Dương tính (độ nhạy)	98,33%	91,06%	99,96 %
Định chuẩn Tỷ lệ Phần trăm Âm tính (tính đặc hiệu)	100,00%	95,89%	100,00%

Khi kết quả của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được so sánh với kết quả của phương pháp Tham chiếu tương ứng, 9 trạng thái đích EGFR cho thấy sự không phù hợp (Bảng 17). Sau khi phân tích phương pháp giải quyết sự khác biệt, số lượng trạng thái đích không phù hợp giảm xuống còn 3 trạng thái đích khác biệt, 2 âm tính giả và 1 dương tính giả (Bảng 18). PPA, NPA và OPA với khoảng tin cậy (Confidence Interval, CI) 95% hai phía tương ứng được tóm tắt trong Bảng 19 và Bảng 20.

Bảng 17. Chi tiết trạng thái đột biến FFPE trên mỗi đích – so sánh *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và Phương pháp Tham chiếu

	Phương pháp tham chiếu	WT	T790M	L861Q	Thêm đoạn	G719X	L858R	C797S	Mất đoạn	Ex21 MT	Tổng
		<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit									
WT		85	1	-	-	2	-	-	2	1	91
T790M		2	2	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q		-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Thêm đoạn		1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X		-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R		-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S		-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Mất đoạn		-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tổng		88	3	1	1	3	19	1	38	1	155

Bảng 18. Chi tiết trạng thái đột biến FFPE cho mỗi đích sau nghiên cứu không phù hợp

<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"><i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit</div> <div style="flex: 1; border-bottom: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 5px; font-size: 8px;">Phương pháp tham chiếu và giải quyết sự khác biệt</div> </div>	WT	T790M	L861Q	Thêm đoạn	G719X	L858R	C797S	Mất đoạn	Ex21 MT	Tổng
	WT	89	-	-	-	2	-	-	-	-
T790M	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Thêm đoạn	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R	-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Mất đoạn	-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tổng	90	4	1	1	3	19	1	36	-	155

Bảng 19. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi đích – so sánh *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và Phương pháp Tham chiếu cho các mẫu FFPE

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm tổng thể	94,19%	89,26%	97,31%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm dương tính (độ nhạy)	91,04%	81,52%	96,64%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm âm tính (tính đặc hiệu)	96,59%	90,36%	99,29%

Bảng 20. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi đích sau nghiên cứu không phù hợp đối với các mẫu FFPE

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm tổng thể	98,06%	94,44%	99,60%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm dương tính (độ nhạy)	96,92%	89,32%	99,62%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm âm tính (tính đặc hiệu)	98,89%	93,96%	99,97%

Trong nghiên cứu, 106 mẫu Huyết tương đã được xét nghiệm và 106 mẫu cho kết quả có thể giải thích hợp lệ (106 trạng thái mẫu và 121 trạng thái đích).

Khi kết quả của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được so sánh với kết quả của phương pháp Tham chiếu tương ứng, 9 trạng thái mẫu EGFR (MT hoặc WT) cho thấy sự không phù hợp. Sau khi phân tích phương pháp giải quyết sự khác biệt, số lượng trạng thái mẫu không phù hợp (MT hoặc WT) giảm xuống 3 trạng thái mẫu khác biệt, 1 âm tính giả, và 2 dương tính giả. PPA, NPA và OPA với khoảng tin cậy (Confidence Interval, CI) 95% hai phía tương ứng được tóm tắt trong Bảng 21 và Bảng 22.

Bảng 21. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi mẫu - so sánh *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và Phương pháp Tham chiếu cho các mẫu Huyết tương

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm tổng thể	91,51%	84,49%	96,04%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm dương tính (độ nhạy)	87,27%	75,52%	94,73%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm âm tính (tính đặc hiệu)	96,08%	86,54%	99,52%

Bảng 22. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi mẫu sau nghiên cứu không phù hợp đối với các mẫu Huyết tương

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm tổng thể	97,17%	91,95%	99,41%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm dương tính (độ nhạy)	97,96%	89,15%	99,95%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm âm tính (tính đặc hiệu)	96,49%	89,89%	99,57%

Khi kết quả của *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được so sánh với kết quả của phương pháp Tham chiếu tương ứng, 18 trạng thái đích EGFR cho thấy sự không phù hợp (Bảng 23). Sau khi phân tích phương pháp giải quyết sự khác biệt, số lượng trạng thái đích không phù hợp giảm xuống còn 5 trạng thái đích khác biệt, 3 dương tính giả và 2 âm tính giả (Bảng 24). PPA, NPA và OPA với khoảng tin cậy (Confidence Interval, CI) 95% hai phía tương ứng được tóm tắt trong Bảng 25 và Bảng 26.

Bảng 23. Chi tiết trạng thái đột biến Huyết tương trên mỗi đích – so sánh *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và Phương pháp Tham chiếu

Phương pháp tham chiếu	WT	T790M	L861Q	Thêm đoạn	L858R	C797S	Mất đoạn	Tổng
	<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit							
WT	49	6			6		1	62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Thêm đoạn				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Mất đoạn	4					1	30	35
Tổng	53	14	2	1	19	1	31	121

Bảng 24. Chi tiết trạng thái đột biến Huyết tương cho mỗi đích sau nghiên cứu không phù hợp

Phương pháp tham chiếu và giải quyết sự khác biệt	WT	T790M	L861Q	Thêm đoạn	L858R	C797S	Mất đoạn	Tổng
	<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit							
WT	60	1			1			62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Thêm đoạn				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Mất đoạn	3						32	35
Tổng	63	9	2	1	14	0	32	121

Bảng 25. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi đích – so sánh *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit và Phương pháp Tham chiếu cho các mẫu Huyết tương

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm tổng thể	85,12%	77,51%	90,94%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm dương tính (độ nhạy)	80,60%	69,11%	89,24%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm âm tính (tính đặc hiệu)	90,74%	79,70%	96,92%

Bảng 26. Phân tích Định chuẩn của trạng thái đột biến tổng thể trên mỗi đích sau nghiên cứu không phù hợp đối với các mẫu Huyết tương

		Giới hạn dưới khoảng tin cậy 95%	Giới hạn trên khoảng tin cậy 95%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm tổng thể	95,87%	90,62%	98,64%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm dương tính (độ nhạy)	96,55%	88,09%	99,58%
Định chuẩn tỷ lệ phần trăm âm tính (tính đặc hiệu)	95,24%	86,71%	99,01%

Tài liệu tham khảo

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., Suzuki, T., Fukuhara, T., Maemondo, M., and Kimura, Y. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive 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. Lynch, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med. 2004 May 20;350(21):2129-39. Epub 2004 Apr 29.
 10. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) Nucleic Acids Res. 17, 2503.
 11. Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotech. 17, 804.

Hướng dẫn Xử lý sự cố

Hướng dẫn xử lý sự cố này có thể hữu ích trong việc giải quyết bất kỳ vấn đề nào có thể phát sinh. Để biết thêm thông tin, xem thêm trang Câu hỏi thường gặp tại Trung tâm Hỗ trợ Kỹ thuật của chúng tôi: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Các nhà khoa học thuộc bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật QIAGEN luôn sẵn lòng trả lời bất kỳ câu hỏi nào của bạn về thông tin và/hoặc giao thức trong sổ tay này hoặc các công nghệ mẫu và xét nghiệm (để biết thông tin liên hệ, truy cập www.qiagen.com).

Nhận xét và gợi ý

Lượt chạy không hợp lệ do Mẫu chứng dương không hợp lệ

- | | |
|---|--|
| a) Một thành phần của hỗn hợp phản ứng không được thêm vào | Kiểm tra xem hỗn hợp phản ứng đã được chuẩn bị chính xác chưa.
Kiểm tra xem tất cả các thành phần của hỗn hợp phản ứng qPCR đã được thêm vào hay chưa.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |
| b) Hỗn hợp phản ứng bị biến tính | Bộ dụng cụ đã được đông lạnh và rã đông quá nhiều lần, thành phần bộ dụng cụ không được bảo quản ở -30 đến -15 °C, hoặc hỗn hợp đoạn mồi và đoạn dò không được bảo vệ khỏi ánh sáng.
Kiểm tra các điều kiện bảo quản và ngày hết hạn (xem nhãn) của thuốc thử và sử dụng bộ dụng cụ mới.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |
| c) Thẻ tích hút pipet quá thấp: thẻ tích hút pipet có thể không chính xác | Kiểm tra chương trình hút pipet và thiết lập phản ứng. Kiểm tra 5 μ l mẫu chứng đã được thêm vào chưa.
Kiểm tra và hiệu chuẩn lại các ống pipet, nếu cần, trước khi lặp lại lần chạy qPCR. |
| d) Lỗi với dụng cụ Rotor-Gene Q MDx | Kiểm tra nhật ký bảo trì dụng cụ.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |
| e) Lỗi trong các phụ kiện của dụng cụ Rotor-Gene Q MDx | 72-Well Rotor có thể bị khóa không chính xác.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |

Nhận xét và gợi ý

- | | |
|---|---|
| f) Đảo ngược ID ống dạng dải và/hoặc mẫu | Kiểm tra chương trình hút pipet và thiết lập phản ứng.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |
| g) Các mẫu chứng bị thiếu hoặc nạp ở vị trí không chính xác | Đảm bảo rằng mẫu chứng chính xác được nạp vào đúng vị trí.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |
| h) Trộn không đủ các mẫu chứng | Chưa hoàn thành việc rửa đông mẫu chứng trước khi việc nạp hoặc trộn mẫu chứng với hỗn hợp phản ứng (hút pipet lên xuống) chưa được thực hiện chính xác.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |
| i) Đóng ống không hiệu quả | Ống không được đóng nắp hiệu quả, dẫn đến bay hơi trong lượt chạy qPCR.
Lặp lại lượt chạy qPCR. |
| j) Các điều kiện bảo quản cho một hoặc nhiều thành phần bộ dụng cụ không tuân thủ các hướng dẫn được đưa ra trong “Điều kiện bảo quản” (trang 26) | Kiểm tra các điều kiện bảo quản và ngày hết hạn (xem nhãn bộ dụng cụ) của thuốc thử và sử dụng bộ dụng cụ mới, nếu cần. |
| k) <i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit đã hết hạn | Kiểm tra các điều kiện bảo quản và ngày hết hạn (xem nhãn bộ dụng cụ) của thuốc thử và sử dụng bộ dụng cụ mới, nếu cần. |
| l) Đường cong khuếch đại không chính xác (xảo ảnh) | Kiểm tra đường cong tương ứng để tìm các đường cong bất thường (ví dụ: đường thẳng).
Lặp lại lượt chạy qPCR. |

Nhận xét và gợi ý

Lượt chạy không hợp lệ do khuếch đại trong Mẫu chứng Không mẫu

- a) Nhiễm bẩn chéo hoặc nhiễm thuốc thử
- Luôn xử lý mẫu, các thành phần bộ dụng cụ và vật tư tiêu hao phù hợp với các thực hành được khuyến nghị để ngăn ngừa nhiễm bẩn mang sang.
- Đảm bảo rằng các đầu tip được thay đổi giữa các lần hút pipet các loại thuốc thử khác nhau hoặc khi nạp các ống khác nhau. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng qPCR bằng vật liệu chuyên dụng (ống pipet, đầu tip, v.v.).
- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng qPCR và phản ứng NTC trong một khu vực chuyên dụng mà không có chất nền DNA (DNA, plasmid hoặc các sản phẩm PCR) được đưa vào.
- Nếu xác định có nhiễm bẩn chéo, hãy thay thế tất cả các thuốc thử.
- Lặp lại lượt chạy qPCR.
- b) Đường cong khuếch đại không chính xác (xảo ảnh)
- Kiểm tra đường cong tương ứng để tìm các đường cong bất thường (ví dụ: đường thẳng).
- Lặp lại lượt chạy qPCR.
- c) Đảo ngược ID ống dạng dài và/hoặc mẫu
- Kiểm tra chương trình hút pipet và thiết lập phản ứng.
- Lặp lại lượt chạy qPCR.
- d) Lỗi với dụng cụ Rotor-Gene Q MDx
- Kiểm tra nhật ký bảo trì dụng cụ.
- Ví dụ, lệch hướng ống kính có thể dẫn đến nền cao hơn hoặc xảo ảnh. Nếu cần chỉnh ống kính không phải là một phần của kế hoạch bảo trì của bạn, vui lòng liên hệ với bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật của QIAGEN để biết thêm thông tin và can thiệp có thể có.

Mẫu không hợp lệ do không có khuếch đại hoặc khuếch đại thấp trong Mẫu chứng nội

- a) Nồng độ DNA mẫu quá thấp
- therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được tối ưu hóa cho nồng độ hoạt động 5 ng/μl (DNA từ FFPE) và 5 μl ccfDNA tách chiết tinh sạch từ mẫu huyết tương.
- Kiểm tra nồng độ (đối với FFPE).
- Lặp lại bước qPCR cho mẫu.

Nhận xét và gợi ý

- | | |
|---|---|
| b) Chất lượng mẫu DNA kém | <p>Kiểm tra nồng độ (đối với FFPE).</p> <p>Lặp lại bước qPCR với một mẫu thay thế (lý tưởng là mới cắt).</p> <p>Lặp lại lượt chạy với nồng độ mẫu cao hơn.</p> <p>Lưu ý: Xét nghiệm nồng độ gDNA cao hơn có thể tạo ra C_T exon 2 sớm hơn, nhưng sẽ làm tăng nguy cơ ức chế. Do đó, C_T exon 2 có thể muộn hơn với nồng độ thấp hơn.</p> |
| c) Sự hiện diện của chất ức chế trong mẫu | <p>Pha loãng mẫu và lặp lại lượt chạy với nồng độ mẫu thấp hơn.</p> <p>Lưu ý: Xét nghiệm nồng độ thấp hơn có thể cho tín hiệu exon 2 sớm hơn nếu chất ức chế có mặt trong mẫu ở mức 5 ng/μl.</p> <p>Tách chiết lại mẫu (FFPE) với nhiều phần hơn và lặp lại lượt chạy.</p> <p>Lưu ý: Bằng cách rửa giải nhiều đoạn hơn trong cùng một thể tích, nồng độ chất ức chế có thể tăng lên khi mẫu được chuẩn hóa ở 5 ng/μl.</p> |
| d) Thể tích hút pipet quá thấp: thể tích hút pipet có thể không chính xác | <p>Kiểm tra chương trình hút pipet và thiết lập phản ứng. Kiểm tra 5 μl mẫu đã được thêm vào chưa.</p> <p>Kiểm tra và hiệu chuẩn lại các ống pipet, nếu cần, trước khi lặp lại lần chạy qPCR.</p> |
| e) Đóng ống không hiệu quả | <p>Ống không được đóng nắp hiệu quả, dẫn đến bay hơi trong lượt chạy qPCR.</p> <p>Lặp lại bước qPCR cho mẫu.</p> |
| f) Các điều kiện bảo quản cho một hoặc nhiều thành phần bộ dụng cụ không tuân thủ các hướng dẫn được đưa ra trong “Điều kiện bảo quản” (trang 26) | <p>Kiểm tra các điều kiện bảo quản và ngày hết hạn (xem nhãn bộ dụng cụ) của thuốc thử và sử dụng bộ dụng cụ mới, nếu cần.</p> |
| g) <i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit đã hết hạn | <p>Kiểm tra các điều kiện bảo quản và ngày hết hạn (xem nhãn bộ dụng cụ) của thuốc thử và sử dụng bộ dụng cụ mới, nếu cần.</p> |

Nhận xét và gợi ý

- | | |
|---------------------------|--|
| h) Huỳnh quang bất thường | Không viết lên ống. Thận trọng khi xử lý ống. Đeo găng tay. Kiểm tra trực quan ống phản ứng PCR xem có các hạt từ tính màu đen (bắt nguồn từ quá trình tách chiết QIAsymphony tự động). Có thể loại bỏ các hạt như mô tả trong sổ tay bộ dụng cụ tách chiết tương ứng. |
|---------------------------|--|

Mẫu không hợp lệ do sự khuếch đại sớm của Mẫu chứng nội trong mẫu

- | | |
|---|--|
| a) Nồng độ DNA mẫu quá cao | <i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit được tối ưu hóa cho nồng độ hoạt động 5 ng/μl (FFPE).
Đối với gDNA từ FFPE: Kiểm tra nồng độ DNA. Nếu DNA không ở nồng độ này, hãy pha loãng DNA.
Đối với ccfDNA từ huyết tương: Pha loãng mẫu.
Lặp lại bước qPCR cho mẫu. |
| b) Thể tích được hút pipet quá lớn: Thể tích hút pipet có thể không chính xác | Kiểm tra chương trình hút pipet và thiết lập phản ứng. Kiểm tra 5 μl mẫu đã được thêm vào chưa.
Kiểm tra và hiệu chuẩn lại các ống pipet, nếu cần, trước khi lặp lại lần chạy qPCR cho mẫu. |
| c) Đường cong khuếch đại có thể không chính xác | Kiểm tra đường cong tương ứng để tìm dương tính giả (ví dụ; đường cong thẳng thay vì khuếch đại theo hàm mũ).
Lặp lại bước qPCR cho mẫu. |
| d) Huỳnh quang bất thường | Không viết lên ống. Thận trọng khi xử lý ống. Đeo găng tay. Kiểm tra trực quan ống phản ứng PCR xem có các hạt từ tính màu đen (bắt nguồn từ quá trình tách chiết QIAsymphony tự động). Có thể loại bỏ các hạt như mô tả trong sổ tay bộ dụng cụ tách chiết tương ứng. |

Nhận xét và gợi ý

- e) Lỗi với dụng cụ Rotor-Gene Q MDx Kiểm tra nhật ký bảo trì dụng cụ.
Ví dụ, lệch hướng ống kính có thể dẫn đến nền cao hơn. Nếu căn chỉnh ống kính không phải là một phần của kế hoạch bảo trì của bạn, vui lòng liên hệ với bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật của QIAGEN để biết thêm thông tin và can thiệp có thể có.

Mẫu không hợp lệ do Δ CT hoặc CT sớm không mong muốn

- a) Mẫu không hợp lệ — CT quá thấp hoặc dưới phạm vi ngưỡng Thiết lập lần chạy PCR mới để lặp lại mẫu, chú ý chặt chẽ đến các bước trộn.













Kiểm soát Chất lượng

Theo Hệ thống Quản lý Chất lượng được chứng nhận ISO của QIAGEN, mỗi lô *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit được kiểm nghiệm theo các quy cách đã được xác định trước để bảo đảm chất lượng sản phẩm phù hợp.

Việc kiểm soát chất lượng bộ dụng cụ hoàn chỉnh đã được thực hiện trên một dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Bộ dụng cụ này được sản xuất theo tiêu chuẩn ISO 13485. Chứng chỉ phân tích có sẵn theo yêu cầu tại www.qiagen.com/support.

Biểu tượng

Các biểu tượng sau đây có thể xuất hiện trong các Hướng dẫn Sử dụng hoặc trên bao bì và nhãn dán:

Biểu tượng	Định nghĩa biểu tượng
	Chứa thuốc thử đủ cho <N> phản ứng
	Hạn sử dụng
	Thiết bị y tế chẩn đoán trong ống nghiệm
	Số danh mục
	Số lô
	Số vật liệu (nghĩa là nhãn thành phần)
	Thành phần
	Chứa
	Số
	Mã số Thương phẩm Toàn cầu
Rn	R là bản sửa đổi Hướng dẫn Sử dụng và n là số sửa đổi
	Giới hạn nhiệt độ
	Nhà sản xuất

Biểu tượng

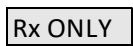
Định nghĩa biểu tượng



Tham khảo hướng dẫn sử dụng



Tránh xa ánh sáng mặt trời



Chỉ sử dụng theo toa



Cảnh báo/thận trọng

Thông tin Liên hệ

Để được hỗ trợ kỹ thuật và biết thêm thông tin, vui lòng xem Trung tâm Hỗ trợ Kỹ thuật của chúng tôi tại www.qiagen.com/Support, gọi 00800-22-44-6000 hoặc liên hệ với một trong các Bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật của QIAGEN hoặc các nhà phân phối địa phương (xem bìa sau hoặc truy cập www.qiagen.com).

Phụ lục A: Cài đặt phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in và Nhập Hồ sơ Xét nghiệm

Những điểm quan trọng trước khi bắt đầu

- Phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1 phải được cài đặt trên máy tính được kết nối với dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM. Để tải xuống phần mềm, hãy truy cập trang sản phẩm Rotor-Gene AssayManager v2.1 tại **www.qiagen.com/9025620** > **Resources (Tài nguyên)** > **Operating Software (Phần mềm Vận hành)**. Để biết chi tiết về cài đặt phần mềm Ứng dụng Lỗi Rotor-Gene AssayManager v2.1, tham khảo *Hướng dẫn Sử dụng Ứng dụng Lỗi Rotor-Gene AssayManager v2.1*.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit yêu cầu một plug-in cụ thể: Gamma Plug-in. Để truy cập phiên bản mới nhất của plug-in này, hãy truy cập trang sản phẩm Rotor-Gene AssayManager v2.1 tại **www.qiagen.com/9025620** > **Resources (Tài nguyên)** > **Operating Software (Phần mềm Vận hành)**. Plug-in này phải được cài đặt trên máy tính đã cài đặt ít nhất là Rotor-Gene AssayManager phiên bản 2.1.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit cũng yêu cầu hồ sơ xét nghiệm. Hồ sơ xét nghiệm này chứa tất cả các thông số cần thiết cho chu kỳ PCR và phân tích dữ liệu tự động. Hai hồ sơ xét nghiệm có sẵn để sử dụng với *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:
 - Một hồ sơ dành riêng cho xét nghiệm các mẫu gDNA từ FFPE:
therascreen_EGFR_Plus_FFPE
 - Một hồ sơ dành riêng cho xét nghiệm các mẫu ccfDNA từ huyết tương:
therascreen_EGFR_Plus_Plasma
- Hồ sơ xét nghiệm tương ứng với các tệp “.iap” có thể được tải xuống từ trang sản phẩm *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit tại **www.qiagen.com**. Phải nhập hồ sơ xét nghiệm vào phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1.

Quy trình thực hiện

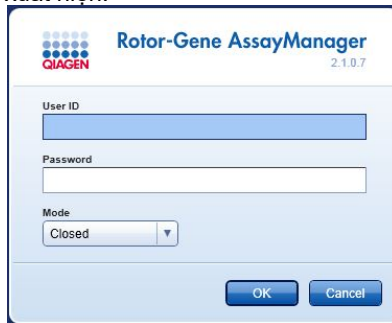
Chi tiết liên quan đến việc cài đặt Gamma Plug-in và nhập hồ sơ xét nghiệm vào phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1 như sau.

Việc cài đặt và nhập Gamma Plug-in và hồ sơ xét nghiệm được trình bày chi tiết trong *Hướng dẫn Sử dụng Ứng dụng Lỗi Rotor-Gene AssayManager v2.1* và *Hướng dẫn Sử dụng Gamma Plug-In*.

1. Tải xuống Gamma Plug-in từ trang web của QIAGEN.
2. Để cài đặt, nhấp đúp vào tệp **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_x.msi** (x≥0) và làm theo hướng dẫn cài đặt. Để biết mô tả chi tiết quy trình này, vui lòng tham khảo phần về “Cài đặt plug-in” trong *Hướng dẫn Sử dụng Ứng dụng Lỗi Rotor-Gene AssayManager v2.1*.
3. Sau khi cài đặt thành công plug-in, một người có quyền quản trị viên đối với phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1 sẽ cần nhập phiên bản hồ sơ xét nghiệm mới nhất như sau.
 - 3a. Đi tới Windows Explorer và lưu AP trong thư mục này: “
C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Import\AssayProfiles.

- 3b. Nhấp vào biểu tượng Rotor-Gene Assay Manager v2.1. 

Cửa sổ đăng nhập sẽ xuất hiện.

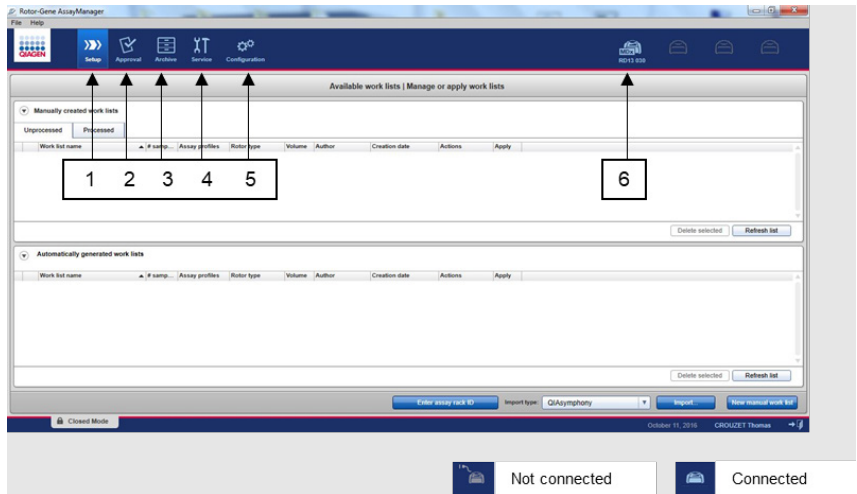


The screenshot shows the login interface for Rotor-Gene AssayManager v2.1.0.7. It features a light blue background with the QIAGEN logo and product name at the top. Below the logo, there are three input fields: 'User ID', 'Password', and a 'Mode' dropdown menu currently set to 'Closed'. At the bottom of the dialog, there are two buttons: 'OK' and 'Cancel'.

Hình 21. Rotor-Gene AssayManager v2.1.

3c. Nhập ID người dùng và mật khẩu của bạn. Để tùy chọn **Mode** (Chế độ) là **Closed** (Đóng). Nhấp vào **OK**.

Không gian làm việc Rotor-Gene AssayManager xuất hiện.



Hình 22. Rotor-Gene AssayManager v2.1. 1 = tab Setup (Thiết lập). Tab này cho phép quản lý hoặc áp dụng các danh sách công việc 2 = tab Approval (Phê duyệt). Tab này cho phép bạn tìm các thí nghiệm trước đó. 3 = tab Archive (Lưu trữ). Tab này cho phép bạn tìm các thí nghiệm được phê duyệt trước đó. 4 = tab Service (Dịch vụ). Trong tab này, lịch sử kiểm tra của từng tệp do phần mềm tạo ra được báo cáo. 5 = tab Configuration (Cấu hình). Tab này cho phép cấu hình tất cả các thông số phần mềm. 6 = biểu tượng dụng cụ Rotor-Gene Q (RGQ); thông báo cho người dùng biết liệu một máy luân nhiệt nhất định đã được kết nối hay chưa. Có thể kết nối tối đa bốn dụng cụ RGQ với cùng một máy tính.

3d. Đối với an toàn quy trình toàn hệ thống, thực hiện các cài đặt cấu hình bắt buộc này cho chế độ đóng:

- Chọn tab Settings (Cài đặt) trong môi trường Configuration (Cấu hình).
- Trong bảng Work list (Danh sách công việc) ở chế độ Closed (Đóng), chọn các ô **Material number required** (Số vật liệu yêu cầu), **Valid expiry date** (Ngày hết hạn hợp lệ) và **Lot number required** (Số lô yêu cầu).

Lưu ý: Những cài đặt cấu hình này chỉ có thể được thực hiện bởi người có quyền Quản trị viên.


-
- 3e. Trong môi trường Configuration (Cấu hình), chọn tab Assay Profiles (Hồ sơ Xét nghiệm).
 - 3f. Nhấp vào **Import** (Nhập).
 - 3g. Trong hộp thoại Open file (Mở tệp), chọn **therascreen_EGFR_Plus_FFPE_V1_0_0.iap** làm hồ sơ xét nghiệm EGFR thứ nhất.
 - 3h. Nhấp vào Open (Mở).
Sau đó, hồ sơ xét nghiệm được tải và thêm vào danh sách các hồ sơ xét nghiệm có sẵn và có thể được sử dụng trong môi trường Setup (Thiết lập)
 - 3i. Lặp lại các bước 3e–3h để nạp và thêm **therascreen_EGFR_Plus_Plasma_V1_0_0.iap** làm hồ sơ xét nghiệm thứ hai.
Lưu ý: Không thể nhập cùng một phiên bản của hồ sơ xét nghiệm hai lần.

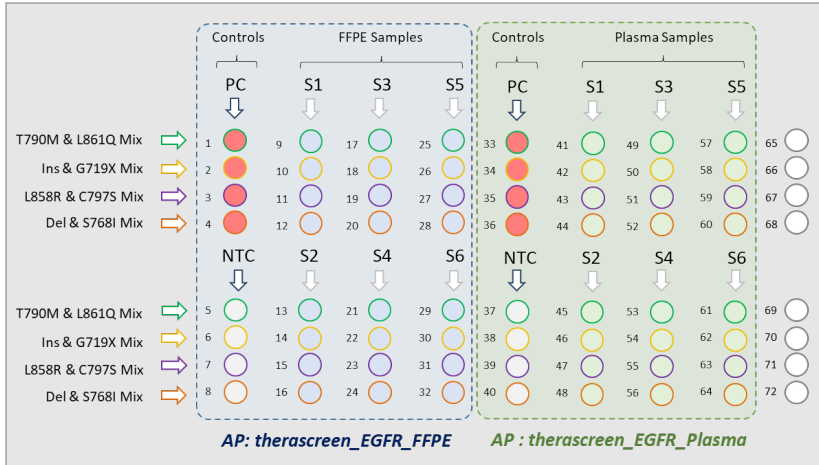
Phụ lục B: Chạy Hồ sơ Xét nghiệm FFPE và Huyết tương trong Cùng một Thí nghiệm

Hai hồ sơ xét nghiệm có sẵn để sử dụng với *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:

- Để xét nghiệm các mẫu gDNA từ FFPE: **therascreen_EGFR_Plus_FFPE**
- Để xét nghiệm các mẫu ccfDNA từ huyết tương: **therascreen_EGFR_Plus_Plasma**.

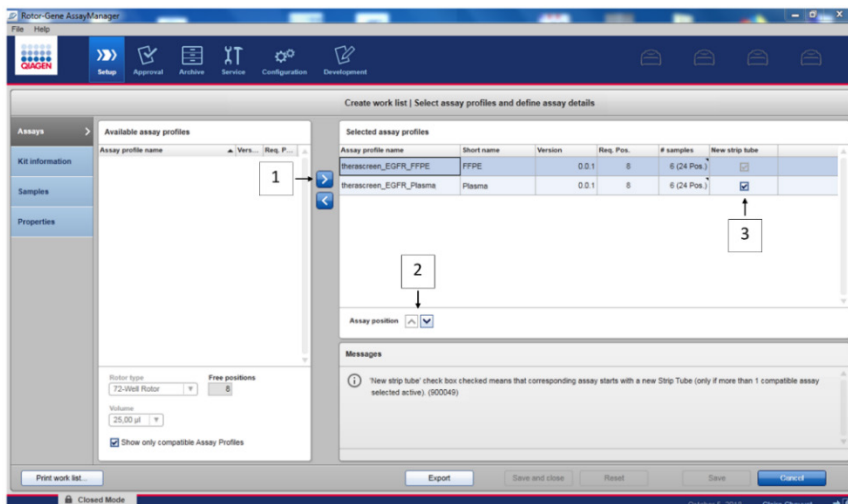
Để chạy cả hai hồ sơ xét nghiệm FFPE và Huyết tương trong cùng một thí nghiệm:

1. Thiết lập thí nghiệm qPCR như hướng dẫn trong “Thiết lập qPCR” và “Giao thức: Chuẩn bị dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM” của “Giao thức: Đánh giá đột biến *EGFR* bằng qPCR trên dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM” (bắt đầu trên trang 43).
 -  Cần có một cách đặt đĩa cụ thể (Hình 23) khi chạy hai hồ sơ xét nghiệm trong cùng một thí nghiệm:
 - Các mẫu chứng (Mẫu chứng dương, NTC) phải được thêm hai lần và được đặt trong các vị trí ống trước các mẫu cho mỗi loại mẫu (FFPE và huyết tương), như trình bày trong Hình 23.
 - Tất cả các mẫu có cùng loại mẫu (FFPE hoặc huyết tương) phải được xét nghiệm trong các vị trí ống tiếp theo. Thứ tự mà hai loại mẫu được xét nghiệm (tức là trước tiên là FFPE hoặc huyết tương) không quan trọng.
 - Không được có các vị trí ống rỗng giữa vị trí cuối cùng chứa mẫu từ loại mẫu thứ nhất (ví dụ trong Hình 23, vị trí 32 chứa mẫu S6 FFPE) và vị trí thứ nhất chứa Mẫu chứng dương liên quan đến xét nghiệm loại mẫu thứ hai (ví dụ: trong Hình 23, Mẫu chứng dương ở vị trí 33 liên quan đến hồ sơ xét nghiệm Huyết tương).



Hình 23. Cách đặt đĩa để xét nghiệm mẫu FFPE và Huyết tương trong cùng một thí nghiệm qPCR. PC: Mẫu chứng dương EGFRv3; NTC: Mẫu chứng không mẫu (nước); AP: hồ sơ xét nghiệm; Hỗn hợp Phản ứng: Hỗn hợp EGFRv3 T790M & L861Q, Hỗn hợp Thêm đoạn EGFRv3 & G719X, Hỗn hợp EGFRv3 L858R & C797S, Hỗn hợp Mất đoạn EGFRv3 & S768I. Mẫu 1 (S1) đến Mẫu 6 (S6): Mẫu DNA. ○ = vị trí ống rỗng.

- Tiến hành các bước 13–17 của quy trình “Tạo danh sách công việc và bắt đầu chạy qPCR” (bắt đầu trên trang 48).
 - Nhập hai hồ sơ xét nghiệm liên tiếp theo hướng dẫn trong bước 18 và 19 của “Tạo danh sách công việc và bắt đầu chạy qPCR” (trang 48). Đảm bảo rằng các hồ sơ xét nghiệm được nhập theo đúng thứ tự được quy định bởi cách đặt đĩa, ví dụ: nếu sử dụng cách đặt đĩa từ Hình 23, hãy nhập hồ sơ xét nghiệm FFPE trước, sau đó nhập hồ sơ xét nghiệm Huyết tương.
- Lưu ý:** Có thể thay đổi vị trí hồ sơ xét nghiệm nếu cần để đảm bảo rằng hồ sơ xét nghiệm được đọc theo đúng thứ tự (Hình 24).
- Chọn ô **New strip tube** (Ống dạng dải mới) để cho biết rằng xét nghiệm tương ứng bắt đầu với một ống dạng dải mới (Hình 24).



Hình 24. Vị trí xét nghiệm. 1 = chọn và chuyển hai hồ sơ xét nghiệm vào danh sách công việc. 2 = Có thể thay đổi vị trí xét nghiệm: di chuyển hồ sơ xét nghiệm lên hoặc xuống bằng các mũi tên. 3 = Chọn ô “New strip tube” (Ống dạng dải mới).

5. Tiếp tục quy trình từ bước 20, trang 48.

Thông tin Đặt hàng

Sản phẩm	Mục lục	Số danh mục
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit (24)	Cho 24 phản ứng: Hỗn hợp T790M & L861Q, Hỗn hợp Thêm đoạn & G719X, Hỗn hợp L858R & C797S, Hỗn hợp Mất đoạn & S768I, Hỗn hợp chính PCR, Mẫu chứng dương <i>EGFR</i> , Nước không có RNase/DNase	874611
Rotor-Gene Q và các phụ kiện		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Máy luân nhiệt real-time PCR và bộ phân tích High Resolution Melt với 5 kênh (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) cộng với kênh HRM, máy tính xách tay, phần mềm, phụ kiện, bảo hành 1 năm đối với các bộ phận và nhân công, cài đặt và đào tạo	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Máy luân nhiệt real-time PCR và bộ phân tích High Resolution Melt với 5 kênh (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) cộng với kênh HRM cộng với kênh HRM, máy tính xách tay, phần mềm, phụ kiện, bảo hành 1 năm đối với các bộ phận và nhân công, không bao gồm cài đặt và đào tạo	9002032
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Khối nhôm cho thiết lập phản ứng thủ công với pipet một kênh trong 72 x ống 0,1 ml	9018901

Sản phẩm	Mục lục	Số danh mục
72-Well Rotor	Để giữ Strip Tubes and Caps 0,1 ml; yêu cầu Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Để khóa Strip Tubes and Caps, 0,1 ml trong 72-Well Rotor	9018904
Rotor Holder	Giá đỡ độc lập bằng kim loại để lắp các ống và Rotor-Discs® vào các rôto	9018908
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 dài, mỗi dài 4 ống và nắp cho 1.000 phản ứng	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 dài, mỗi dài 4 ống và nắp cho 10.000 phản ứng	981106
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Phần mềm xét nghiệm thường quy kết hợp với các dụng cụ Rotor-Gene Q và Rotor-Gene Q MDx	9024203
Rotor-Gene AssayManager v2.1 License (1)	Giấy phép duy nhất để cài đặt phần mềm Rotor-Gene AssayManager v2.1 trên một máy tính	9025620
QIASymphony SP*		
QIASymphony SP System	Mô-đun chuẩn bị mẫu QIASymphony: bao gồm cài đặt và đào tạo, bảo hành 1 năm đối với các bộ phận và nhân công	9001751
QIASymphony SP	Mô-đun chuẩn bị mẫu QIASymphony: bao gồm bảo hành 1 năm đối với các bộ phận và nhân công	9001297

* Đối với các phụ kiện QIASymphony SP, vui lòng tham khảo các sổ tay liên quan.

Sản phẩm	Mục lục	Số danh mục
Các sản phẩm liên quan		
Deparaffinization Solution (16 ml)	2 x 8 ml Deparaffinization Solution	19093
Deparaffinization Solution (50 ml)	1 x 50 ml Deparaffinization Solution	939018
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Cho 50 lần chuẩn bị DNA: 50 QIAamp MinElute® Columns, Proteinase K, Chất đệm và Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Cho 50 lần chuẩn bị: Cột QIAamp Mini, Chất đệm, DNA Chất mang, QIAGEN Proteinase K và ống	61504
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Cho 192 lần chuẩn bị, 200 µl mỗi lần: Bao gồm 2 hộp thuốc thử và giá đỡ enzym và phụ kiện	937236
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	Hộp thuốc thử, phụ kiện và lọ proteinase K cho 192 lần chuẩn bị, mỗi lần 2.000 µl hoặc 4.000 µl	937556
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7.000 đơn vị/ml, dung dịch)	19101
Buffer ATL (4 x 50ml)	4 x 50 ml chất đệm ly giải	939016

Để biết thông tin cập nhật về cấp phép và tuyên bố từ chối trách nhiệm cụ thể theo sản phẩm, xem sổ tay hoặc hướng dẫn sử dụng bộ dụng cụ QIAGEN tương ứng. Sổ tay và hướng dẫn sử dụng bộ dụng cụ QIAGEN có sẵn tại www.qiagen.com hoặc có thể được yêu cầu từ bộ phận Dịch vụ Kỹ thuật QIAGEN hoặc nhà phân phối tại địa phương của bạn.

Lịch sử Sửa đổi Tài liệu

Lần sửa đổi	Mô tả
R1, tháng 3 năm 2022	Phát hành lần đầu

Trang này được để trống có chủ ý

Thỏa thuận Cấp phép Giới hạn cho *therascreen*[®] EGFR Plus RGQ PCR Kit

Việc sử dụng sản phẩm này biểu thị thỏa thuận của bất kỳ người mua hoặc người dùng sản phẩm nào với các điều khoản sau:

1. Sản phẩm chỉ có thể được sử dụng theo các giao thức được cung cấp kèm theo sản phẩm và sổ tay này và chỉ được sử dụng với các thành phần có trong bảng. QIAGEN không cấp giấy phép theo bất kỳ tài sản trí tuệ nào để sử dụng hoặc kết hợp các thành phần kèm theo của bảng này với bất kỳ thành phần nào không có trong bảng này trừ khi được mô tả trong các giao thức được cung cấp cùng với sản phẩm, sổ tay này và các giao thức bổ sung có sẵn tại www.qiagen.com. Một số giao thức bổ sung này đã được người dùng QIAGEN cung cấp cho người dùng QIAGEN. Các giao thức này chưa được QIAGEN kiểm tra kỹ lưỡng hoặc tối ưu hóa. QIAGEN không bảo hành chúng cũng không đảm bảo rằng chúng không vi phạm các quyền của bên thứ ba.
2. Ngoài các giấy phép được nêu rõ ràng, QIAGEN không bảo đảm rằng bộ xét nghiệm này và/hoặc (các) công dụng của bộ xét nghiệm không vi phạm các quyền của bên thứ ba.
3. Bộ xét nghiệm này và các thành phần của bộ xét nghiệm được cấp phép sử dụng một lần và không được tái sử dụng, tôn trang hoặc bán lại.
4. QIAGEN đặc biệt từ chối bất kỳ giấy phép nào khác, được thể hiện rõ ràng hoặc ngụ ý ngoài những giấy phép được nêu.
5. Người mua và người dùng bộ xét nghiệm này đồng ý không thực hiện hoặc cho phép bất kỳ ai khác thực hiện các bước có thể dẫn đến hoặc tạo điều kiện cho bất kỳ hành vi nào bị cấm ở trên. QIAGEN có thể thực thi các lệnh cấm của Thỏa thuận Cấp phép Hạn chế này tại bất kỳ Tòa án nào và sẽ thu hồi tất cả các chi phí điều tra và Tòa án, bao gồm phí luật sư, trong bất kỳ hành động nào để thực thi Thỏa thuận Cấp phép Hạn chế này hoặc bất kỳ quyền sở hữu trí tuệ nào liên quan đến bộ xét nghiệm và/hoặc các thành phần của bộ xét nghiệm.

Để biết các điều khoản cấp phép được cập nhật, hãy truy cập www.qiagen.com.

Việc mua sản phẩm này cho phép người mua sử dụng nó để thực hiện các dịch vụ chẩn đoán cho chẩn đoán trong ống nghiệm ở người. Không cấp bằng sáng chế chung hoặc giấy phép nào khác theo đây ngoài quyền sử dụng cụ thể từ việc mua hàng này.

Thương hiệu: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], *therascreen*[®], QIAamp[®], QIAasymphony[®], MinElute[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®], Rotor-Disc[®] (Tập đoàn QIAGEN); CAL Fluor[®] (Biosearch Technologies, Inc.); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc).

Tháng 3 năm 2022 HB-2963-001 1126175 © 2022 QIAGEN, tất cả quyền được bảo lưu.

Đặt hàng www.qiagen.com/shop | Hỗ trợ Kỹ thuật support.qiagen.com |
Trang web www.qiagen.com
