

Ιούνιος 2020

# Εγχειρίδιο *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit



Έκδοση 2

**IVD**

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Για χρήση με τα όργανα Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

**CE**

**REF**

874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R7 **MAT**

1121935EL

# Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση .....	5
Σύνοψη και επεξήγηση .....	6
Αρχή της διαδικασίας.....	9
Υλικά που παρέχονται .....	14
Περιεχόμενα του κιτ.....	14
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται .....	15
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	17
Γενικές προφυλάξεις .....	17
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων .....	19
Συνθήκες μεταφοράς.....	19
Συνθήκες αποθήκευσης .....	19
Χειρισμός και αποθήκευση δοκιμίων .....	21
Διαδικασία .....	22
Εκχύλιση και παρασκευή του DNA.....	22
Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων .....	23
Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR .....	37
Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Αυτοματοποιημένη μέθοδος).....	51
Ενδείξεις του Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package.....	53
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	58
Έλεγχος ποιότητας.....	59
Περιορισμοί .....	59

Χαρακτηριστικά επιδόσεων .....	61
Αναλυτικές επιδόσεις.....	61
Όριο τυφλού (Limit of Blank, LOB), εύρος εργασίας, οριακές τιμές αποκοπής και εύρος οριακών τιμών αποκοπής ΔC <sub>T</sub> .....	61
Επίδραση του εισαγόμενου DNA στις τιμές ΔC <sub>T</sub> .....	63
Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα.....	63
Ακρίβεια: Σύγκριση με την αναλυτική μέθοδο αναφοράς.....	64
Τιμές ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD).....	65
Παρεμβολές.....	67
Αναπαραγωγιμότητα .....	68
Κλινική απόδοση .....	72
Δεδομένα κλινικών εκβάσεων: GIOTRIF® .....	72
Δεδομένα κλινικών εκβάσεων: IRESSA®.....	74
Βιβλιογραφία .....	77
Σύμβολα .....	79
Παράρτημα Α: Μη αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit .....	80
Γενικές πληροφορίες .....	80
Πρωτόκολλο: Δημιουργία ενός προφίλ θερμοκρασίας .....	80
Διαδικασία (μη αυτοματοποιημένη) .....	92
Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων (μη αυτοματοποιημένη) .....	92
Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR (μη αυτοματοποιημένη) .....	92
Πρωτόκολλο: Ρύθμιση του <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit σε όργανο Rotor-Gene Q .....	93
Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Μη αυτοματοποιημένη μέθοδος) .....	99

---

Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης.....	99
Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων .....	101
Ανάλυση δεδομένων ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR .....	102
Παράρτημα Β: Εγκατάσταση του λογισμικού <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package .....	111
Στοιχεία επικοινωνίας .....	115
Πληροφορίες παραγγελιών.....	116
Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου .....	118

---

## Προβλεπόμενη χρήση

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit είναι μια in vitro διαγνωστική εξέταση για την ανίχνευση 29 σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου EGFR. Επιτρέπει την ποιοτική αξιολόγηση της κατάστασης μετάλλαξης σε δείγματα νεοπλασιών από ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Τα αποτελέσματα προορίζονται για την υποστήριξη του κλινικού ιατρού στον προσδιορισμό ασθενών με NSCLC που ενδέχεται να επωφεληθούν από τη θεραπεία με αναστολείς κινάσης τυροσίνης του EGFR.

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit εξετάζει δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) νεοπλασματικό ιστό ασθενών με NSCLC, με χρήση του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται από εκπαιδευμένο προσωπικό σε επαγγελματικό εργαστηριακό περιβάλλον.

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση.

## Σύνοψη και επεξήγηση

Οι μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο EGFR απαντώνται σε καρκίνους στον άνθρωπο (1, 2). Η παρουσία αυτών των μεταλλάξεων συσχετίζεται με ανταπόκριση σε ορισμένες θεραπείες με αναστολείς κινάσης τυροσίνης σε ασθενείς με NSCLC (Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα) (3–8). Τέτοιες μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο EGFR απαντώνται στον γενικό πληθυσμό ασθενών με NSCLC σε συχνότητα περίπου 10% για ασθενείς από τις ΗΠΑ, την Ευρώπη ή την Αυστραλία και έως 30% για ασθενείς από την Ιαπωνία και την Ταϊβάν (1, 2, 9).

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit είναι ένα έτοιμο προς χρήση προϊόν για την ανίχνευση 29 μεταλλάξεων στο γονίδιο EGFR που σχετίζεται με τον καρκίνο, με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) σε όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Ο συνδυασμός των τεχνολογιών Scorpions® (10) και ARMS (Amplification Refractory Mutation System — Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση) (11), επιτρέπει στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit να ανιχνεύει 29 μεταλλάξεις στα εξόνια 18, 19, 20 και 21 του ογκογονιδίου EGFR, έναντι ενός υποβάθρου γονιδιωματικού DNA άγριου τύπου (Πίνακας 1). Συνοψίζοντας:

- 19 ελλείψεις στο εξόνιο 19 (ανιχνεύει την παρουσία οποιασδήποτε από τις 19 ελλείψεις, αλλά δεν τις διακρίνει)
- Τρεις προσθήκες στο εξόνιο 20 (ανιχνεύει την παρουσία οποιασδήποτε από τις τρεις προσθήκες, αλλά δεν τις διακρίνει)
- G719X (ανιχνεύει την παρουσία των G719S, G719A ή G719C, αλλά δεν τα διακρίνει)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι εξαιρετικά επιλεκτικές και, ανάλογα με τη συνολική ποσότητα του DNA που υπάρχει, μπορούν να ανιχνεύσουν ένα χαμηλό ποσοστό μεταλλαγμένου DNA σε υπόβαθρο γονιδιωματικού DNA άγριου τύπου. Αυτή η επιλεκτικότητα καθώς και τα όρια ανίχνευσης είναι ανώτερα από άλλες τεχνολογίες, όπως η μέθοδος ανίχνευσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με ενζυμική μέθοδο (Sanger).

**Πίνακας 1. Κατάλογος μεταλλάξεων και αναγνωριστικών COSMIC**

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

\* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Κατάλογος σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

**Πίνακας 1. Κατάλογος μεταλλάξεων και αναγνωριστικών COSMIC**

Εξόνιο	Μετάλλαξη	COSMIC* ID	Αλλαγή βάσης
20	S768I	6241	2303G>T
	Προσθήκες	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

\* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Κατάλογος σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

\*\* Οι μεταλλάξεις COSM6254 (2239\_2253del15) και COSM12369(2240\_2254del15) οδηγούν στην έλλειψη 15 ζευγών βάσεων από την αλληλουχία EGFR. Η ίδια τελική αλληλουχία δημιουργείται και από τις δύο μεταλλάξεις οι οποίες είναι πανομοιότυπες. Συνεπώς, η μετάλλαξη COSM6254 (2239\_2253del15) έχει αφαιρεθεί από την πιο πρόσφατη έκδοση του COSMIC (v83) και οι δύο μεταλλάξεις εκπροσωπούνται πλέον από την COSM12369 (2240\_2254del15). Πρόκειται για ενέργεια σύμφωνη με την κατευθυντήρια οδηγία της HGVS για την εκπροσώπηση της ευρύτερης έλλειψης 3'. Η εξέταση *therascreen* EGFR δεν διακρίνει μεταξύ των 19 μεταλλάξεων έλλειψης και οποιοδήποτε αποτέλεσμα θετικό για έλλειψη χαρακτηρίζεται «Deletions» (Έλλειψη). Η αλλαγή επηρεάζει μόνο την τεκμηρίωση και δεν αφορά το kit ή την ικανότητά του να ανιχνεύει μεμονωμένες μεταλλάξεις.



# Αρχή της διαδικασίας

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit αποτελείται από οκτώ διαφορετικά δείγματα αντιδράσεων ενίσχυσης PCR: επτά για ειδικές για μεταλλάξεις αντιδράσεις στα εξόνια 18, 19, 20 και 21 του ογκογονιδίου EGFR και ένα υλικό ελέγχου άγριου τύπου στο εξόνιο 2. Τα κυριότερα συστατικά του kit περιγράφονται παρακάτω.

## ARMS

Η ειδική για αλληλόμορφα ή μεταλλάξεις ενίσχυση επιτυγχάνεται με τη χρήση της τεχνολογίας ARMS. Η *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) είναι αποτελεσματική στη διάκριση μεταξύ σωστής και εσφαλμένης αντιστοίχισης στο 3' άκρο ενός εκκινητή PCR. Ειδικές μεταλλαγμένες αλληλουχίες υφίστανται επιλεκτική ενίσχυση, ακόμη και σε δείγματα στα οποία η πλειοψηφία των αλληλουχιών δεν παρουσιάζει μετάλλαξη. Όταν υπάρχει πλήρης αντιστοίχιση του εκκινητή, η απόδοση της ενίσχυσης είναι πλήρης. Σε περίπτωση εσφαλμένης αντιστοίχισης της 3' βάσης, πραγματοποιείται μόνο ενίσχυση υποβάθρου χαμηλού επιπέδου.

## Scorpions

Η ανίχνευση ενίσχυσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Scorpions. Η τεχνολογία Scorpions συνίσταται σε διλειτουργικά μόρια που περιέχουν έναν εκκινητή PCR ομοιοπολικά συνδεδεμένο με έναν ιχνηθέτη. Το φθορισμοφόρο στον ιχνηθέτη αυτόν αλληλεπιδρά με έναν παρεμποδιστή, που περιλαμβάνεται επίσης στον ιχνηθέτη, ο οποίος μειώνει τον φθορισμό. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, όταν ο ιχνηθέτης δεσμεύεται στο αμπλικόνιο, το φθορισμοφόρο και ο παρεμποδιστής διαχωρίζονται, προκαλώντας ανιχνεύσιμη αύξηση του φθορισμού.

## Μορφή kit

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit περιλαμβάνει οκτώ αναλύσεις:

- Μία ανάλυση υλικού ελέγχου (CTRL)
- Επτά αναλύσεις μετάλλαξης

Όλα τα μείγματα αντίδρασης περιλαμβάνουν αντιδραστήρια για την ανίχνευση στόχων επισημασμένων με καρβοξυφλουορεσκεΐνη (FAM™), καθώς και μια ανάλυση εσωτερικού υλικού ελέγχου επισημασμένη με εξαχλωροφλουορεσκεΐνη (HEX™). Η ανάλυση εσωτερικού υλικού ελέγχου ανιχνεύει την παρουσία αναστολέων που ενδέχεται να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Η ενίσχυση FAM μπορεί να υπερισχύσει της ενίσχυσης εσωτερικού υλικού ελέγχου. Ως εκ τούτου, η ανάλυση εσωτερικού υλικού ελέγχου χρησιμοποιείται για να υποδείξει απλά ότι τυχόν απουσία ενίσχυσης FAM αποτελεί αληθώς αρνητικό αποτέλεσμα και όχι αποτυχία της αντίδρασης PCR.

## Αναλύσεις

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit περιλαμβάνει μια διαδικασία δύο βημάτων. Στο πρώτο βήμα εκτελείται η ανάλυση υλικού ελέγχου για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου EGFR DNA ενός δείγματος. Στο δεύτερο βήμα εκτελούνται τόσο οι αναλύσεις μετάλλαξης όσο και η ανάλυση υλικού ελέγχου για ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας μεταλλαγμένου DNA.

### Ανάλυση υλικού ελέγχου

Η ανάλυση υλικού ελέγχου, που είναι επισημασμένη με FAM, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου EGFR DNA σε ένα δείγμα. Η ανάλυση υλικού ελέγχου ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 2 του γονιδίου EGFR. Οι εκκινητές και ο ιχνηθέτης Scorpions έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποφεύγουν τυχόν γνωστούς πολυμορφισμούς του EGFR.

### Αναλύσεις μετάλλαξης

Κάθε ανάλυση μετάλλαξης περιέχει έναν ιχνηθέτη Scorpions επισημασμένο με FAM και έναν εκκινητή ARMS για τον διαχωρισμό μεταξύ του DNA άγριου τύπου και ενός ειδικού μεταλλαγμένου DNA.

---

## Υλικά ελέγχου

**Σημείωση:** Όλες οι εκτελέσεις πειραμάτων πρέπει να περιέχουν θετικά και αρνητικά υλικά ελέγχου.

### Θετικό υλικό ελέγχου

Κάθε εκτέλεση πρέπει να περιέχει θετικό υλικό ελέγχου στα σωληνάρια 1–8. Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit περιέχει ένα θετικό υλικό ελέγχου EGFR (Positive Control, PC) για χρήση ως πρότυπο στην αντίδραση θετικού υλικού ελέγχου. Τα αποτελέσματα θετικού υλικού ελέγχου θα αξιολογηθούν, για να διασφαλιστεί ότι η απόδοση του kit βρίσκεται εντός των καθορισμένων κριτηρίων αποδοχής.

### Αρνητικό υλικό ελέγχου

Κάθε εκτέλεση πρέπει να περιέχει αρνητικό υλικό ελέγχου («υλικό ελέγχου χωρίς πρότυπο»: NTC) στα σωληνάρια 9–16. Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit περιέχει νερό για NTC για χρήση ως «πρότυπο» στην αντίδραση υλικού ελέγχου χωρίς πρότυπο. Το υλικό ελέγχου χωρίς πρότυπο χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση πιθανής μόλυνσης κατά την προετοιμασία της εκτέλεσης και για την αξιολόγηση της απόδοσης της αντίδρασης εσωτερικού υλικού ελέγχου.

## Αξιολόγηση αντίδρασης εσωτερικού υλικού ελέγχου

Κάθε μείγμα αντίδρασης περιέχει ένα εσωτερικό υλικό ελέγχου (Internal Control, IC) επιπλέον στην αντίδραση-στόχο. Η μη επιτυχής έκβαση υποδεικνύει είτε την ύπαρξη αναστολέων, που ενδέχεται να οδηγήσει σε ανακριβή αποτελέσματα, είτε την ύπαρξη σφάλματος ρύθμισης της ανάλυσης από τον χειριστή για το συγκεκριμένο σωληνάριο. Στο εσωτερικό υλικό ελέγχου (Internal Control, IC) χρησιμοποιείται μια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία-στόχος που δεν σχετίζεται με το ογκογονίδιο EGFR, ένας μη επισημασμένος εκκινητής και ένας εκκινητής *Scorpiions* επισημασμένος με HEX για τη διάκρισή του από τους επισημασμένους με FAM εκκινητές *Scorpiions* στα μείγματα αντίδρασης υλικού ελέγχου και μετάλλαξης. Η ενίσχυση FAM μπορεί να υπερσχύσει της ενίσχυσης με το εσωτερικό υλικό ελέγχου (Internal Control, IC), με αποτέλεσμα η τιμή του IC C<sub>T</sub> (HEX) που προκύπτει να βρίσκεται ενδεχομένως εκτός του καθορισμένου εύρους. Τα αποτελέσματα FAM παραμένουν έγκυρα για αυτά τα δείγματα.

## Αξιολόγηση δειγμάτων

Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση του μείγματος αντίδρασης υλικού ελέγχου (σωληνάριο CTRL) που παρέχεται με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit για την αξιολόγηση του συνολικά ενισχύσιμου EGFR DNA σε ένα δείγμα. Η ανάλυση υλικού ελέγχου ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 2 του γονιδίου EGFR. Συνιστάται να προετοιμάζετε τα δείγματα μόνο με την ανάλυση υλικού ελέγχου χρησιμοποιώντας το EGFR PC ως θετικό υλικό ελέγχου και νερό ως «πρότυπο» για το υλικό ελέγχου χωρίς πρότυπο.

**Σημείωση:** Η αξιολόγηση του DNA θα πρέπει να βασίζεται στην PCR και ενδέχεται να διαφέρει από την ποσοτικοποίηση βάσει των μετρήσεων απορρόφησης. Παρέχεται πρόσθετο μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου (σωληνάριο CTRL) για αξιολόγηση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA σε δείγματα πριν από την ανάλυση με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

---

## Πλατφόρμα και λογισμικό

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit έχει σχεδιαστεί ειδικά για χρήση με όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM είναι προγραμματισμένο για διαφορετικές παραμέτρους κύκλου, ή «εκτελέσεις», με το *therascreen* EGFR CE Assay Package.

Το *therascreen* EGFR CE Assay Package περιλαμβάνει δύο πρότυπα: το «*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template» (για την αξιολόγηση του δείγματος) και το «*therascreen* EGFR CE Locked Template» (για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR). Τα πρότυπα αυτά περιλαμβάνουν τις παραμέτρους ανάλυσης PCR και υπολογίζουν τα αποτελέσματα.

Επιπλέον, είναι δυνατή η χρήση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit με το λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3, σε ανοιχτή κατάσταση λειτουργίας (δηλ. χωρίς χρήση του Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Για λεπτομέρειες, βλ. «Παράρτημα Α: Μη αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit».

# Υλικά που παρέχονται

## Περιεχόμενα του kit

<b>therascreen EGFR RGQ PCR Kit</b>				<b>(24)</b>
<b>Αρ. καταλόγου</b>				<b>874111</b>
<b>Αριθμός αντιδράσεων</b>				<b>24</b>
<b>Χρώμα</b>	<b>Ταυτότητα</b>	<b>Αναγνωριστικό σωληναρίου</b>		<b>Όγκος</b>
Κόκκινο	Control Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου)	1	CTRL	2 × 600 μl
Πορφυρό	T790M Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης T790M)	2	T790M	600 μl
Πορτοκαλί	Deletions Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης ελλείψεων)	3	Del	600 μl
Ροζ	L858R Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης L858R)	4	L858R	600 μl
Πράσινο	L861Q Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης L861Q)	5	L861Q	600 μl
Κίτρινο	G719X Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης G719X)	6	G719X	600 μl
Γκρι	S768I Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης S768I)	7	S768I	600 μl
Μπλε	Insertions Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης προσθηκών)	8	Ins	600 μl
Μπεζ	EGFR Positive Control (Θετικό υλικό ελέγχου EGFR)	9	PC	300 μl
Πράσινο της μέντας	Taq DNA Polymerase (Taq DNA πολυμεράση)	Taq	2 × 80 μl	2 × 80 μl
Λευκό	Nuclease-free water for No Template Control (Νερό χωρίς νουκλεάση για υλικό ελέγχου χωρίς πρότυπο)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Λευκό	Nuclease-free water for Dilution (Νερό χωρίς νουκλεάση για αραιώση)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
<i>Εγχειρίδιο του therascreen EGFR RGQ PCR Kit</i>				<b>1</b>

# Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

## Αντιδραστήρια

- Κιτ εκχύλισης DNA (βλ. «Εκχύλιση και παρασκευή του DNA»)

## Αναλώσιμα και γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός

- Ειδικές πιπέτες\* (ρυθμιζόμενες) για προετοιμασία δειγμάτων
- Ειδικές πιπέτες\* (ρυθμιζόμενες) για την προετοιμασία του κύριου μείγματος PCR
- Ειδικές πιπέτες\* (ρυθμιζόμενες) για τη διοχέτευση του προτύπου DNA
- Ρύγχη πιπέτας χωρίς DNάση, RNάση και DNA με φίλτρα (για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης συνιστάται η χρήση ρυγχών πιπέτας με φραγμό αερολυμάτων)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, για χρήση με 72-Well Rotor (αρ. κατ. 981103 ή 981106)
- Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου χωρίς DNάση, RNάση και DNA για την προετοιμασία κύριων μειγμάτων
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, μονάδα αλουμινίου για μη αυτοματοποιημένη προετοιμασία αντίδρασης με μονοκάναλη πιπέτα (αρ. κατ. 9018901)
- Συσκευή θέρμανσης και ανακίνησης (thermomixer)\*, θερμαινόμενος επωαστήρας τροχιακής κίνησης\*, θερμαντικό μπλοκ\* ή υδατόλουτρο\* με δυνατότητα επώασης στους 90°C
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος\* με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης των 2 ml
- Αναμείκτης περιδίνησης\*

\* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα και ο εξοπλισμός έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

## Εξοπλισμός για PCR

- Όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM με κανάλια φθορισμού για Cycling Green και Cycling Yellow (ανίχνευση FAM και HEX, αντίστοιχα)\*†
- Λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή μεταγενέστερη
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package, έκδοση 3.0.6 (διαθέσιμο για λήψη στον ιστότοπο του προϊόντος *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit έκδοση 2 στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Πλοηγηθείτε στο **Product Resources** (Πόροι προϊόντος) > **Supplementary Protocols** (Συμπληρωματικά πρωτόκολλα) για να πραγματοποιήσετε λήψη του πακέτου προσδιορισμού.)

**Σημείωση:** Για το λογισμικό Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package απαιτείται λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή μεταγενέστερη.

\* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα και ο εξοπλισμός έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

† Σε ορισμένες χώρες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το όργανο Rotor-Gene Q 5plex HRM με ημερομηνία παραγωγής Μαΐου 2011 ή μεταγενέστερη, κατά περίπτωση. Η ημερομηνία παραγωγής μπορεί να προσδιοριστεί από τον αριθμό σειράς στο πίσω μέρος του οργάνου. Ο αριθμός σειράς αναγράφεται σε μορφή «μμεεααα», όπου το «μμ» υποδεικνύει τον μήνα παραγωγής σε ψηφία, το «εε» υποδεικνύει τα δύο τελευταία ψηφία του έτους παραγωγής και το «ααα» υποδεικνύει το μοναδικό αναγνωριστικό του οργάνου.



# Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheets, SDS). Διατίθενται στο Διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), όπου μπορείτε να βρείτε, να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα SDS για κάθε kit της QIAGEN καθώς και για τα περιεχόμενά του.

Για πληροφορίες ασφάλειας σχετικά με το όργανο Rotor-Gene Q, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη που παρέχεται με το όργανο.

Απορρίψτε τα απόβλητα των δειγμάτων και των αναλύσεων σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς ασφάλειας.

## Γενικές προφυλάξεις

Πάντα να λαμβάνετε υπόψη τα εξής.

- Η εξέταση προορίζεται για χρήση με δοκίμια ιστού FFPE NSCLC.
- Αποθηκεύετε και εξάγετε τα θετικά υλικά (δοκίμια και θετικά υλικά ελέγχου) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.

- Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή της μόλυνσης των αντιδράσεων PCR με συνθετικό υλικό ελέγχου. Συνιστάται η χρήση ξεχωριστών, ειδικών πιπेटών για την προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης και την προσθήκη του προτύπου DNA. Η προετοιμασία και η διοχέτευση των μειγμάτων αντίδρασης πρέπει να πραγματοποιείται σε ξεχωριστό χώρο από εκείνον στον οποίο πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του προτύπου. Τα σωληνάρια Rotor-Gene Q δεν πρέπει να ανοίγονται μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης PCR. Αυτό αποσκοπεί στην αποτροπή τυχόν εργαστηριακής λοίμωξης από προϊόντα που προκύπτουν μετά την ανάλυση PCR.
- Όλες οι χημικές ουσίες και τα βιολογικά υλικά είναι εν δυνάμει επικίνδυνα. Τα δοκίμια και τα δείγματα είναι εν δυνάμει μολυσματικά και πρέπει να αντιμετωπίζονται ως βιολογικά επικίνδυνα υλικά.
- Τα αντιδραστήρια για το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit έχουν αραιωθεί σε βέλτιστο βαθμό. Μην εκτελείτε περαιτέρω αραιώσεις των αντιδραστηρίων, καθώς ενδέχεται να προκληθεί υποβάθμιση των επιδόσεων. Μην χρησιμοποιείτε όγκους αντίδρασης (μείγμα αντίδρασης συν δείγμα) κάτω από 25 μl, καθώς στην περίπτωση αυτή αυξάνεται ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.
- Όλα τα αντιδραστήρια που παρέχονται στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit προορίζονται για χρήση αποκλειστικά με τα άλλα αντιδραστήρια που παρέχονται στο ίδιο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Μην αντικαθιστάτε τα αντιδραστήρια στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ή μεταξύ διαφορετικών *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, καθώς ενδέχεται να επηρεαστούν οι επιδόσεις.
- Χρησιμοποιείτε μόνο την *Taq* DNA πολυμεράση (σωληνάριο *Taq*) που παρέχεται με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Μην την αντικαθιστάτε με *Taq* DNA πολυμεράση άλλων κιτ ίδιου ή διαφορετικού τύπου ή με *Taq* DNA πολυμεράση άλλου προμηθευτή.
- Μην χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.

**Σημείωση:** Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή εξέταση των δειγμάτων με έμφαση στην αποφυγή εσφαλμένης εισαγωγής δείγματος καθώς και τυχόν σφαλμάτων φόρτωσης και διοχέτευσης με πιπέτα.

**Σημείωση:** Τα αντιδραστήρια έχουν εγκριθεί για μη αυτοματοποιημένη προετοιμασία. Εάν χρησιμοποιήσετε αυτοματοποιημένη μέθοδο, ενδέχεται να μειωθεί ο αριθμός πιθανών αντιδράσεων, καθώς σε αυτά τα όργανα απαιτείται πλήρωση «νεκρών όγκων» με αντιδραστήρια.

# Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

## Συνθήκες μεταφοράς

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit μεταφέρεται σε ξηρό πάγο και πρέπει να είναι κατεψυγμένο κατά την παραλαβή. Εάν το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit δεν είναι κατεψυγμένο κατά την παραλαβή, εάν η εξωτερική συσκευασία έχει ανοιχτεί κατά τη μεταφορά ή εάν στο κιβώτιο αποστολής δεν περιλαμβάνονται το δελτίο συσκευασίας, οι οδηγίες χρήσης ή τα αντιδραστήρια, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο (βλ. το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τον ιστότοπο **www.qiagen.com**).

## Συνθήκες αποθήκευσης

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit θα πρέπει να αποθηκεύεται αμέσως μετά την παραλαβή στους -30 έως -15°C σε καταψύκτη σταθερής θερμοκρασίας, σε σκοτεινό χώρο. Τα Scorpions (όπως όλα τα επισημασμένα με φθορισμό μόρια) πρέπει να προστατεύονται από το φως, ώστε να αποφευχθεί η φωτολεύκανση και η υποβάθμιση των επιδόσεων. Το kit παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον αποθηκεύεται υπό τις συνιστώμενες συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχική του συσκευασία.

Μετά το άνοιγμα, τα αντιδραστήρια μπορούν να αποθηκευτούν στην αρχική τους συσκευασία σε θερμοκρασία -30 έως -15 °C για 12 μήνες ή μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης, όποιο επέλθει πρώτο. Η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη θα πρέπει να αποφεύγεται. Συνιστάται οι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης να μην ξεπερνούν τους οκτώ.

Η απόψυξη των αντιδραστηρίων πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C) για τουλάχιστον 1 ώρα και μέχρι 4,5 ώρες το μέγιστο. Όταν τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα προς χρήση, μπορείτε να προετοιμάσετε τις αντιδράσεις PCR, ενώ θα πρέπει να φορτώσετε αμέσως στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM τα σωληνάρια Rotor-Gene Q που περιέχουν τα κύρια μείγματα και το δείγμα DNA. Ο συνολικός χρόνος από την έναρξη της προετοιμασίας PCR έως την έναρξη της εκτέλεσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει:

- τις 6 ώρες, σε περίπτωση αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος  
**Σημείωση:** Ο χρόνος αυτός περιλαμβάνει την προετοιμασία PCR και την αποθήκευση.
- τις 18 ώρες, σε περίπτωση αποθήκευσης σε ψυγείο (2–8°C)  
**Σημείωση:** Ο χρόνος αυτός περιλαμβάνει την προετοιμασία PCR και την αποθήκευση.

**Σημείωση:** Για να διασφαλιστεί βέλτιστη δραστηριότητα και απόδοση, τα Scorpions (όπως όλα τα επισημασμένα με φθορισμό μόρια) πρέπει να προστατεύονται από το φως, ώστε να αποφευχθεί η φωτολεύκανση.

**Σημείωση:** Για βέλτιστη χρήση των αντιδραστηρίων του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, τα δείγματα θα πρέπει να εξετάζονται σε παρτίδες. Εάν τα δείγματα υποβληθούν σε εξέταση μεμονωμένα, θα χρησιμοποιηθούν περισσότερα αντιδραστήρια και θα μειωθεί ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να εξεταστούν με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

# Χειρισμός και αποθήκευση δοκιμίων

**Σημείωση:** Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.

Το υλικό δείγματος πρέπει να είναι γονιδιωματικό DNA ανθρώπινης προέλευσης, που έχει εκχυλιστεί από ιστό FFPE. Η μεταφορά των δοκιμίων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την τυπική μεθοδολογία της παθολογοανατομίας, για τη διασφάλιση της ποιότητάς τους.

Τα νεοπλασματικά δείγματα δεν είναι ομοιογενή και τα δεδομένα από ένα δείγμα νεοπλασίας ενδέχεται να μη συμφωνούν με άλλες τομές της ίδιας νεοπλασίας. Επίσης, τα νεοπλασματικά δείγματα ενδέχεται να περιέχουν μη νεοπλασματικό ιστό. Το DNA από μη νεοπλασματικό ιστό δεν αναμένεται να περιέχει τις μεταλλάξεις που ανιχνεύονται από το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Για να προετοιμάσετε δείγματα ιστού για εκχύλιση DNA:

- Χρησιμοποιώντας πρότυπα υλικά και μεθόδους, μονιμοποιήστε το δοκίμιο ιστού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης (Neutral Buffered Formalin, NBF) 10% και συνεχίστε με τον εγκλεισμό του δοκιμίου ιστού σε παραφίνη. Με τη χρήση μικροτόμου, δημιουργήστε διαδοχικές τομές 5 μm από ένα μπλοκ παραφίνης και τοποθετήστε τις σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Απευθυνθείτε σε εκπαιδευμένο άτομο (π.χ. παθολογοανατόμο) για την αξιολόγηση μιας τομής με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E), ώστε να επιβεβαιώσει την παρουσία νεοπλασίας.
- Οι τομές που έχουν υποστεί χρώση δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση DNA.
- Αποθηκεύστε όλα τα μπλοκ FFPE και τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Μπορείτε να αποθηκεύσετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για έως και 1 μήνα πριν από την εκχύλιση του DNA.

# Διαδικασία

## Εκχύλιση και παρασκευή του DNA

Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων αυτού του κιτ προσδιορίστηκαν με χρήση DNA που εκχυλίστηκε με το QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (αρ. κατ. 60404). Αυτό το κιτ θα πρέπει να χρησιμοποιείται για παρασκευή του DNA, αν είναι διαθέσιμο στη χώρα σας. Εάν χρησιμοποιείτε το λειτουργικά ισοδύναμο QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (αρ. κατ. 56404), εκτελέστε την εκχύλιση DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου, **προσέχοντας τα εξής**:

- Μη χρησιμοποιείτε το Deparaffinization Solution της QIAGEN. Για την αποπαραφίνωση χρησιμοποιείτε μόνο τη μέθοδο ξυλολίου/αιθανόλης που περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε αιθανόλη\* καθαρότητας μοριακής βιολογίας για όλα τα βήματα που απαιτούνται.
- Απομακρύνετε με απόξεση ολόκληρη την περιοχή του ιστού από τις δύο τομές και μεταφέρετε τον ιστό σε ένα επισημασμένο σωληνάριο μικροφυγόκεντρου, χρησιμοποιώντας καινούργιο νυστέρι για κάθε δείγμα.
- Η διάσπαση με πρωτεΐνάση K (βήμα 11 στο *Εγχειρίδιο QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) πρέπει να πραγματοποιηθεί για 1 ώρα ± 5 λεπτά στους 56°C ± 3°C.
- Η διάσπαση με πρωτεΐνάση K (βήμα 12 στο *Εγχειρίδιο QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) πρέπει να πραγματοποιηθεί για 1 ώρα ± 5 λεπτά στους 90°C ± 3°C.
- Μη χρησιμοποιείτε το βήμα με τη ριβονουκλεάση που περιγράφεται στο *Εγχειρίδιο QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Τα δείγματα πρέπει να εκλουστούν με 120 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (ATE) από το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (βήμα 20 στο *Εγχειρίδιο QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*).

\* Μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη που περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη.

- Μπορείτε να αποθηκεύσετε το γονιδιωματικό DNA σε θερμοκρασία 2–8°C για 1 εβδομάδα μετά την εκχύλιση ή σε θερμοκρασία -30 έως -15°C για έως και 8 εβδομάδες πριν από τη χρήση.

**Σημείωση:** Από όλες τις αναλύσεις στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit δημιουργούνται προϊόντα PCR μικρού μήκους. Ωστόσο, το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit δεν είναι αποτελεσματικό όταν το DNA είναι ιδιαίτερα κατακερματισμένο.

## Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου DNA στα δείγματα με χρήση του «*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template» που περιλαμβάνεται στο Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package για αυτοματοποιημένη αξιολόγηση των δειγμάτων.

**Σημείωση:** Για τη μη αυτοματοποιημένη αξιολόγηση δειγμάτων DNA βλ. «Παράρτημα A: Μη αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit».

### Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Για να παραχθούν σωστά αποτελέσματα, διασφαλίστε ότι διενεργείται η περιγραφόμενη διαδικασία ανάμειξης σε κάθε στάδιο ανάμειξης της διαδικασίας ρύθμισης της ανάλυσης.
- Είναι δυνατή η αξιολόγηση έως και 24 δειγμάτων χρησιμοποιώντας το μείγμα ανάλυσης υλικού ελέγχου που διατίθεται.
- Πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε την ενότητα «Γενικές Προφυλάξεις».
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM πριν προχωρήσετε στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου.
- Μην στροβιλίζετε την *Taq* DNA πολυμεράση (σωληνάριο *Taq*) ή οποιοδήποτε μείγμα περιέχει *Taq* DNA πολυμεράση, καθώς ενδέχεται να αδρανοποιηθεί το ένζυμο.

- Αναρροφήστε την *Taq*, τοποθετώντας το ρύγχος της πιπέτας ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφευχθεί η επικάλυψη του ρύγχους με περίσσεια ενζύμου.
- Χρησιμοποιήστε το μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου (σωληνάριο CTRL) για την αξιολόγηση του DNA πριν από την εξέταση.

**Σημείωση:** Για την αξιολόγηση αυτή, είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται το μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου όπως περιγράφεται παρακάτω και όχι φασματοφωτομετρία ή άλλες εναλλακτικές μέθοδοι. Ενδέχεται να μην είναι δυνατή η ενίσχυση DNA που είναι αποδομημένο σε μεγάλο βαθμό, παρόλο που οι εκκινητές δημιουργούν μικρά θραύσματα DNA.

- Για την αποτελεσματική χρήση των αντιδραστηρίων στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, ομαδοποιείτε τα δείγματα DNA σε παρτίδες όσο γίνεται περισσότερο για τη δημιουργία ολοκληρωμένων εκτελέσεων προσδιορισμών. Εάν τα δείγματα υποβληθούν σε εξέταση μεμονωμένα ή σε μικρότερους αριθμούς, χρησιμοποιούνται περισσότερα αντιδραστήρια και μειώνεται ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να εξεταστούν με ένα *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι είναι εγκατεστημένο το λογισμικό *therascreen* EGFR CE Assay Package πριν χρησιμοποιήσετε το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM για πρώτη φορά (βλ. «Παράρτημα Β: Εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* EGFR CE Assay Package»).
- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται εντελώς για τουλάχιστον 1 ώρα και μέχρι 4,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), να αναμειγνύονται με αναστροφή 10 φορές και να φυγοκεντρίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Βεβαιωθείτε ότι η *Taq* βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από κάθε χρήση. Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.



- Αναμείξτε όλα τα δείγματα **αναστρέφοντας 10 φορές** και φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

## Διαδικασία

1. Αποψύξτε το μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου (CTRL), το νερό χωρίς νουκλεάση για υλικό ελέγχου χωρίς πρότυπο (No Template Control, NTC) και το θετικό υλικό ελέγχου (Positive Control, PC) EGFR σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C) για τουλάχιστον 1 ώρα και μέχρι 4,5 ώρες το πολύ.

Οι χρόνοι απόψυξης των αντιδραστηρίων, προετοιμασίας PCR και αποθήκευσης πριν από την έναρξη της εκτέλεσης υποδεικνύονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2. Χρόνοι απόψυξης, χρόνοι προετοιμασίας PCR και θερμοκρασίες αποθήκευσης**

Ελάχιστος χρόνος απόψυξης	Μέγιστος χρόνος απόψυξης	Θερμοκρασία αποθήκευσης μετά την προετοιμασία PCR	Μέγιστος χρόνος προετοιμασίας PCR και αποθήκευσης
1 ώρα	4,5 ώρες	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C)	6 ώρες
1 ώρα	4,5 ώρες	2-8°C	18 ώρες

**Σημείωση:** Η προετοιμασία PCR πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C). Ο όρος «αποθήκευση» αναφέρεται στον χρόνο μεταξύ της ολοκλήρωσης της προετοιμασίας PCR και της έναρξης της εκτέλεσης PCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

**Σημείωση:** Αφήστε την *Taq* να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25 °C) συγχρόνως με τα άλλα αντιδραστήρια (βλ. «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων»). Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

2. Όταν τα αντιδραστήρια έχουν αποψυχθεί, αναμείξτε τα **αναστρέφοντας κάθε σωληνάριο 10 φορές** για την αποφυγή τοπικών συγκεντρώσεων αλάτων και στη συνέχεια φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

3. Προετοιμάστε επαρκή ποσότητα κύριου μείγματος υλικού ελέγχου (Μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου [CTRL] συν *Taq*) για τα δείγματα DNA, μια αντίδραση EGFR PC και μια αντίδραση NTC σύμφωνα με τους όγκους που παραθέτει ο Πίνακας 3. Συμπεριλάβετε αντιδραστήρια για ένα επιπλέον δείγμα, ώστε να υπάρχει επαρκής περίσσεια υλικού για την προετοιμασία της PCR.

**Σημείωση:** Το κύριο μείγμα περιέχει όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση PCR, εκτός από το δείγμα.

**Πίνακας 3. Προετοιμασία κύριου μείγματος ανάλυσης υλικού ελέγχου**

Συστατικό	Όγκος
Μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου (CTRL)	19,5 μl × (n + 1)*
<i>Taq</i> DNA πολυμεράση ( <i>Taq</i> )	0,5 μl × (n + 1)
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>20 μl/αντίδραση</b>

\* n = αριθμός αντιδράσεων (δείγματα συν υλικά ελέγχου). Παρασκευάστε αρκετή ποσότητα κύριου μείγματος για ένα επιπλέον δείγμα (n + 1), ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για την προετοιμασία της PCR. Η τιμή n δεν πρέπει να υπερβαίνει τον αριθμό 26 (24 δείγματα συν 2 υλικά ελέγχου).

**Σημείωση:** Κατά την προετοιμασία του κύριου μείγματος, προστίθεται αρχικά ο απαιτούμενος όγκος του μείγματος αντίδρασης υλικού ελέγχου στο σχετικό σωληνάριο και στο τέλος προστίθεται η *Taq*.

4. Αναμείξτε σχολαστικά το κύριο μείγμα αναρροφώντας και **διοχετεύοντας προσεκτικά με πιπέτα 10 φορές**. Τοποθετήστε τον κατάλληλο αριθμό σειρών σωληναρίων στο μπλοκ φόρτωσης σύμφωνα με τη διάταξη στον Πίνακα 4. Προσθέστε αμέσως 20 μl κύριου μείγματος σε κάθε σωληνάριο της σειράς PCR.

Τα πώματα παραμένουν στον πλαστικό περιέκτη μέχρι να τα χρειαστείτε. Για την αξιολόγηση των δειγμάτων DNA, προστίθεται κύριο μείγμα ανάλυσης υλικού ελέγχου σε ένα σωληνάριο PC, σε ένα σωληνάριο NTC και σε ένα σωληνάριο για κάθε δείγμα.

**Πίνακας 4. Διάταξη αναλύσεων αξιολόγησης δειγμάτων DNA στο μπλοκ φόρτωσης. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις θέσεις στο μπλοκ φόρτωσης και υποδεικνύουν την τελική θέση του ρότορα.**

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

5. Προσθέστε αμέσως 5 μl νερού για NTC στο σωληνάριο που βρίσκεται στη θέση 2 και τοποθετήστε το πώμα στο σωληνάριο.
6. Προσθέστε 5 μl από κάθε δείγμα στα σωληνάρια δείγματος (θέσεις σωληναρίων 3–26) και τοποθετήστε τα πώματα στα σωληνάρια.
7. Προσθέστε 5 μl EGFR PC στο σωληνάριο που βρίσκεται στη θέση 1 και τοποθετήστε το πώμα στο σωληνάριο.  
**Σημείωση:** Φροντίστε να αποφύγετε σφάλματα φόρτωσης ή διοχέτευσης με πιπέτα, ώστε να διασφαλίσετε ότι θα γίνει σωστά η προσθήκη του NTC, των δειγμάτων και του PC στα κατάλληλα σωληνάρια. Επισημάνετε τα πώματα των σωληναρίων, ώστε να εμφανίζεται η κατεύθυνση φόρτωσης των σωληναρίων στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
8. Αφού τοποθετήσετε τα πώματα σε όλα τα σωληνάρια PCR, ελέγξτε οπτικά τη στάθμη πλήρωσης των σωληναρίων δείγματος για να διασφαλίσετε ότι έχει προστεθεί δείγμα σε όλα τα σωληνάρια.
9. **Αναστρέψτε όλα τα σωληνάρια PCR 4 φορές για να αναμειχθούν τα δείγματα και τα μείγματα αντίδρασης.**
10. Τοποθετήστε τις σειρές σωληναρίων PCR στις κατάλληλες θέσεις του 72-Well Rotor, σύμφωνα με τη διάταξη στον Πίνακα 4.

Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, τοποθετήστε πωματισμένα, κενά σωληνάρια σε όλες τις κενές θέσεις.

11. Τοποθετήστε αμέσως τον 72-Well Rotor μέσα στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) είναι τοποθετημένος στο πάνω μέρος του ρότορα για την ασφάλιση των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.

**Σημείωση:** Εάν χρησιμοποιείτε τη μη αυτοματοποιημένη αξιολόγηση δειγμάτων, βλ. «Παράρτημα A: Μη αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit».

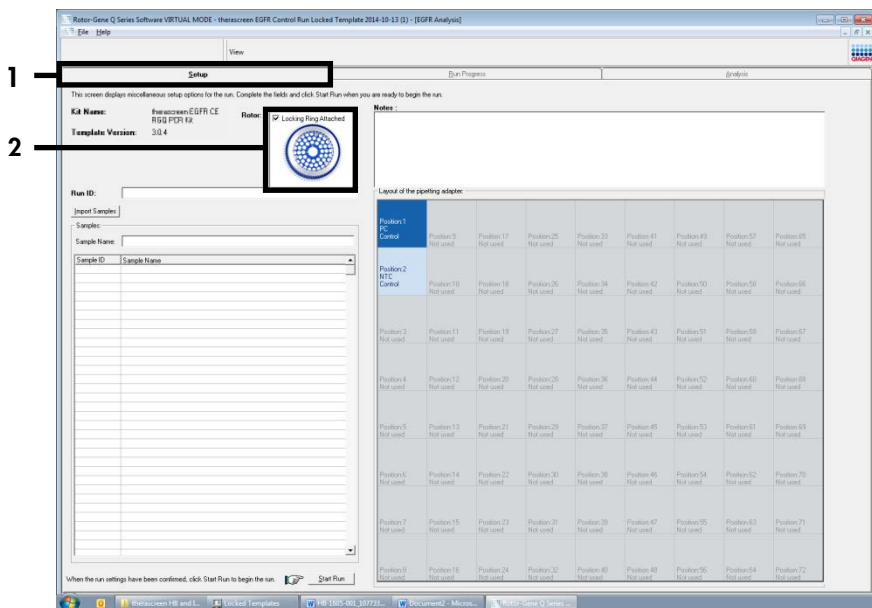
12. Κάντε διπλό κλικ στο εικονίδιο του ***therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template** (Κλειδωμένο πρότυπο εκτέλεσης υλικού ελέγχου EGFR CE) στην επιφάνεια εργασίας του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q MDx για να κάνετε εκκίνηση του λογισμικού Rotor-Gene Q (Εικόνα 1).



therascreen EGFR CE  
Control Run Locked  
Template

**Εικόνα 1.** Εικονίδιο κλειδωμένου πρότυπου EGFR CE για την εκτέλεση ανάλυσης υλικού ελέγχου (αξιολόγηση δείγματος).

13. Ανοίγει η καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) βάσει προεπιλογής (Εικόνα 2). Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος σωστά και κατόπιν επιλέξτε το πλαίσιο **Locking Ring Attached** (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κλείστε το καπάκι του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.



Εικόνα 2. Καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) (1) και πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος) (2).

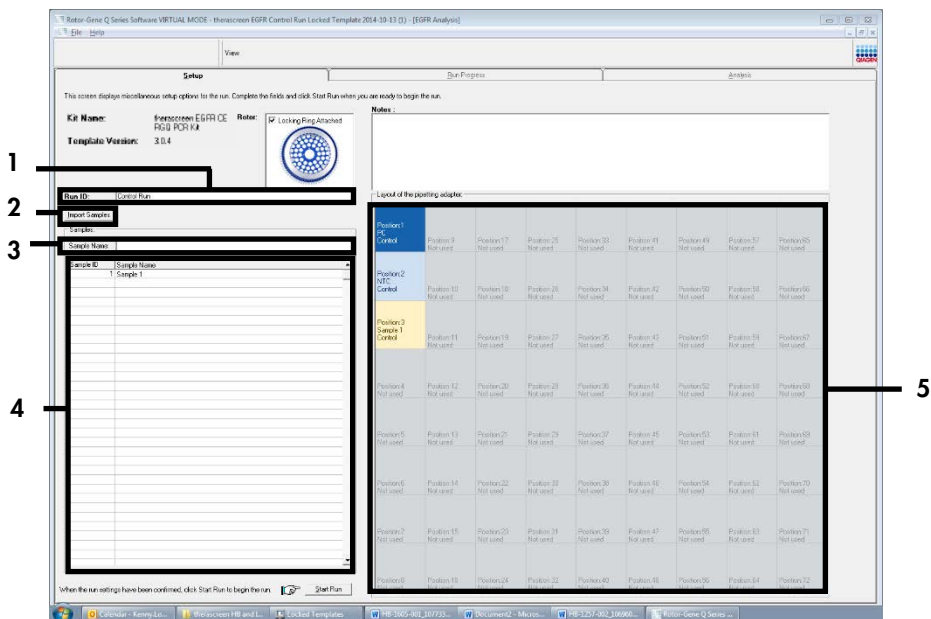
14. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό εκτέλεσης στο πεδίο **Run ID** (Αναγνωριστικό εκτέλεσης) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας. Εισαγάγετε το όνομα δείγματος στο πεδίο **Sample Name** (Όνομα δείγματος) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο **Return** (Enter).

Με αυτόν τον τρόπο προστίθεται το όνομα δείγματος στην παρακάτω λίστα δειγμάτων και αντιστοιχίζεται στο δείγμα ένα «Sample ID» (Αναγνωριστικό δείγματος) (1, 2, 3 κ.λπ.). Επιπλέον, ενημερώνεται το παράθυρο «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα) στη δεξιά πλευρά ώστε να συμπεριλαμβάνει το όνομα δείγματος (Εικόνα 3).

**Σημείωση:** Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει εισαγωγή ονομάτων δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε μορφή \*.smr (αρχείο δείγματος Rotor-Gene Q) ή \*.csv (τιμές διαχωρισμένες με κόμματα) με τη χρήση της λειτουργίας **Import Samples** (Εισαγωγή δειγμάτων). Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, τα ονόματα των δειγμάτων συμπληρώνονται αυτόματα.

**Σημείωση:** Στον πίνακα «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα), ελέγξτε εάν η προσθήκη του ονόματος δείγματος επισημαίνεται με αλλαγή χρώματος και εάν το όνομα δείγματος βρίσκεται στη θέση δείγματος (Εικόνα 3).

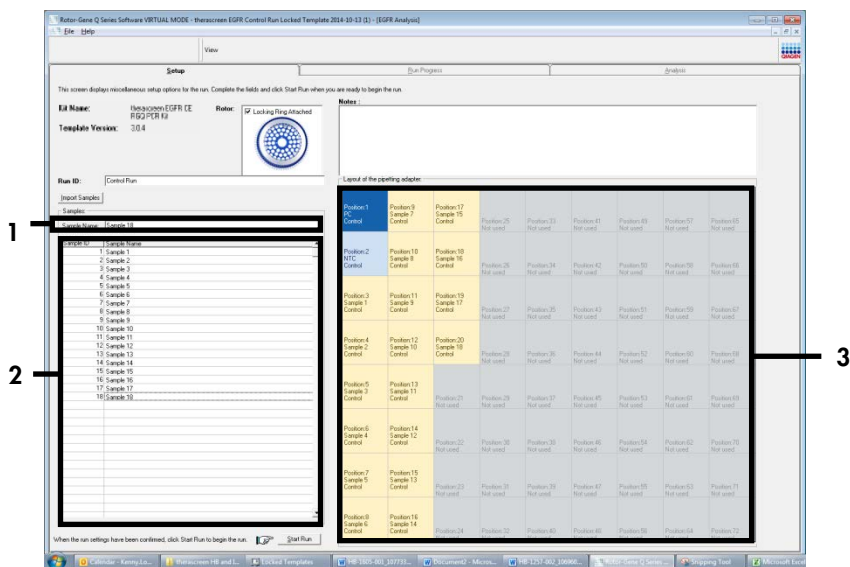
**Σημείωση:** Τα ονόματα δειγμάτων που περιέχουν περισσότερους από 8 χαρακτήρες ενδέχεται να μην εμφανίζονται ολόκληρα στον πίνακα «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διοχέτευσης με πιπέτα).



**Εικόνα 3.** Συμπλήρωση των πεδίων «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης ανάλυσης) και «Sample Name» (Όνομα δείγματος). 1 = πεδίο διαλόγου «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης ανάλυσης), 2 = πίνακας «Import Samples» (Εισαγωγή δειγμάτων), 3 = πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος), 4 = «Sample List» (Λίστα δειγμάτων), 5 = πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διοχέτευσης με πιπέτα).

15. Επαναλάβετε το βήμα 14 για να εισαγάγετε τα ονόματα όλων των πρόσθετων δειγμάτων (Εικόνα 4).

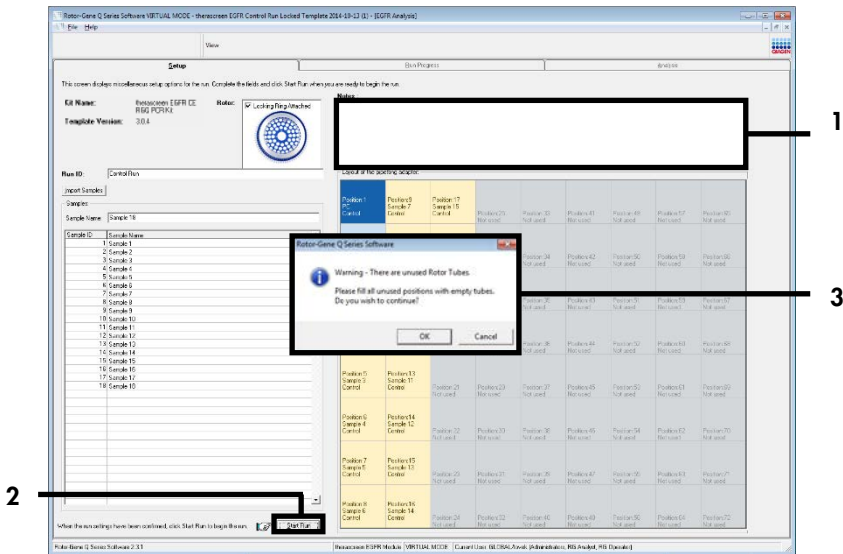
**Σημείωση:** Για να επεξεργαστείτε ένα όνομα δείγματος, κάντε κλικ στο **Sample Name** (Όνομα δείγματος) της λίστας δειγμάτων. Το επιλεγμένο δείγμα εμφανίζεται στο παραπάνω πεδίο **Sample Name** (Όνομα δείγματος). Επεξεργαστείτε το όνομα δείγματος σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο **Return** (ή Enter) για να ενημερωθεί το όνομα.



**Εικόνα 4.** Εισαγωγή πρόσθετων ονομάτων δειγμάτων στο πεδίο «Sample Name» (Όνομα δείγματος). 1 = πεδίο διαλόγου «Sample Name» (Όνομα δείγματος), 2 = «Sample List» (Λίστα δειγμάτων), 3 = πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα).

16. Όταν συμπληρώσετε όλα τα ονόματα δειγμάτων, επαληθεύστε την ορθότητά τους. Προσθέστε τυχόν επιπλέον πληροφορίες στο πεδίο **Notes** (Σημειώσεις) αν είναι απαραίτητο και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο κουμπί **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης) (Εικόνα 5).

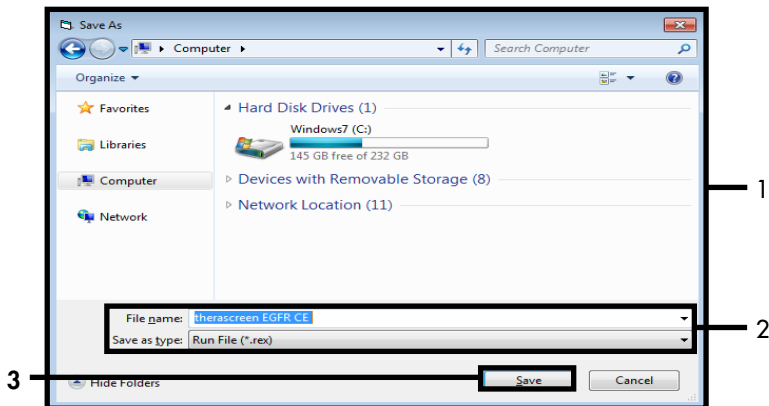
**Σημείωση:** Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, εμφανίζεται ένα μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) (Εικόνα 5) για να υπενθυμίσει στον χρήστη ότι πρέπει να τοποθετήσει πωματισμένα, κενά σωληνάρια σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει ένα κενό σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται και κάντε κλικ στο OK για να συνεχίσετε. Ανοίγει το παράθυρο «Save As» (Αποθήκευση ως).



Εικόνα 5. Πεδίο «Notes» (Σημειώσεις) (1), κουμπί «Start Run» (Έναρξη εκτέλεσης) (2) και μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) σχετικά με τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται (3).



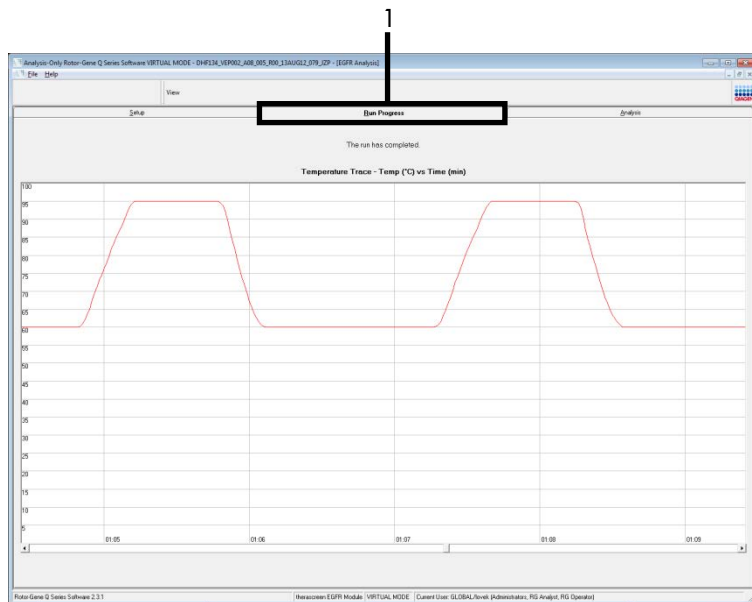
17. Επιλέξτε ένα κατάλληλο όνομα αρχείου και αποθηκεύστε την εκτέλεση PCR ως αρχείο εκτέλεσης \*.rex στην επιλεγμένη θέση. Κάντε κλικ στην επιλογή «**Save**» (Αποθήκευση) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Παράθυρο «Save As» (Αποθήκευση ως) (1). 2 = πεδία «File Name» (Όνομα αρχείου) και «Save as type» (Αποθήκευση ως τύπος), 3 = «Save» (Αποθήκευση).

Ξεκινά η εκτέλεση ανάλυσης PCR.

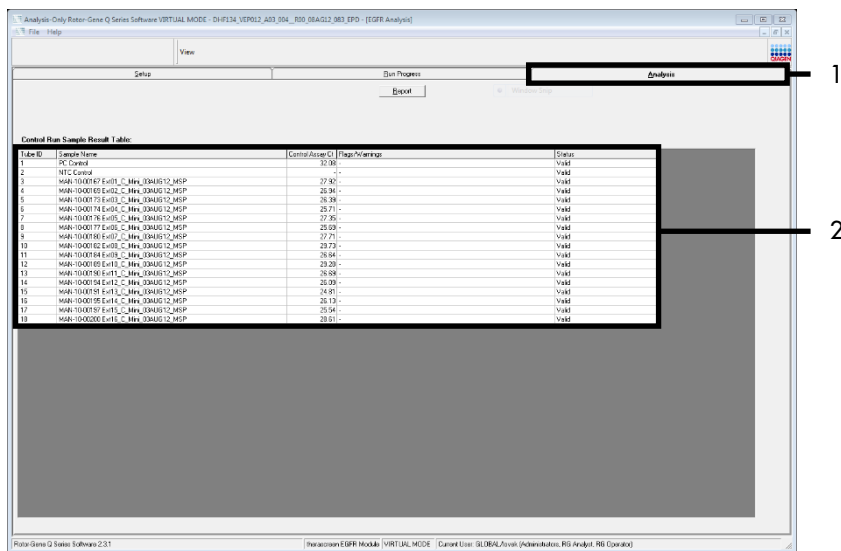
**Σημείωση:** Κατά την έναρξη της εκτέλεσης, ανοίγει η καρτέλα «Run Progress» (Πρόοδος εκτέλεσης), που υποδεικνύει την παρακολούθηση της θερμοκρασίας και τον υπολειπόμενο χρόνο της εκτέλεσης (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7. Καρτέλα «Run Progress» (Πρόοδος εκτέλεσης ανάλυσης) (1).**

**Σημείωση:** Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης ανάλυσης, ανοίγει η καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση). Εάν η καρτέλα Analysis (Ανάλυση) δεν ανοίξει, κάντε κλικ στην καρτέλα Analysis (Ανάλυση) (Εικόνα 8).

**Σημείωση:** Μια επεξήγηση της μεθόδου υπολογισμού παρουσιάζεται στην ενότητα «Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Αυτοματοποιημένη μέθοδος)».



Εικόνα 8. Καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) (1) και αναφορά αποτελεσμάτων [2 = «Control Run Sample Result Table» (Πίνακας αποτελεσμάτων εκτέλεσης υλικού ελέγχου δειγμάτων)].

Τα αποτελέσματα υλικού ελέγχου αναφέρονται στον πίνακα «Control Run Sample Result Table» (Πίνακας αποτελεσμάτων εκτέλεσης υλικού ελέγχου δειγμάτων) που παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 8).

**Υλικά ελέγχου εκτέλεσης ανάλυσης (PC και NTC, θέσεις σωληναρίου 1 και 2, αντίστοιχα).** Εάν τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός των αποδεκτών περιοχών τιμών, εμφανίζεται για το καθένα η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο). Διαφορετικά, εμφανίζεται αποτέλεσμα «Invalid» (Μη έγκυρο).

**C<sub>T</sub> αντίδρασης υλικού ελέγχου δείγματος > 31,10, εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο).** Η ποσότητα του DNA δεν επαρκεί για την ανάλυση της μετάλλαξης. Επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Εάν η ποσότητα του DNA εξακολουθεί να μην επαρκεί, εκχυλίστε περισσότερο νεοπλασματικό ιστό, εάν υπάρχει.

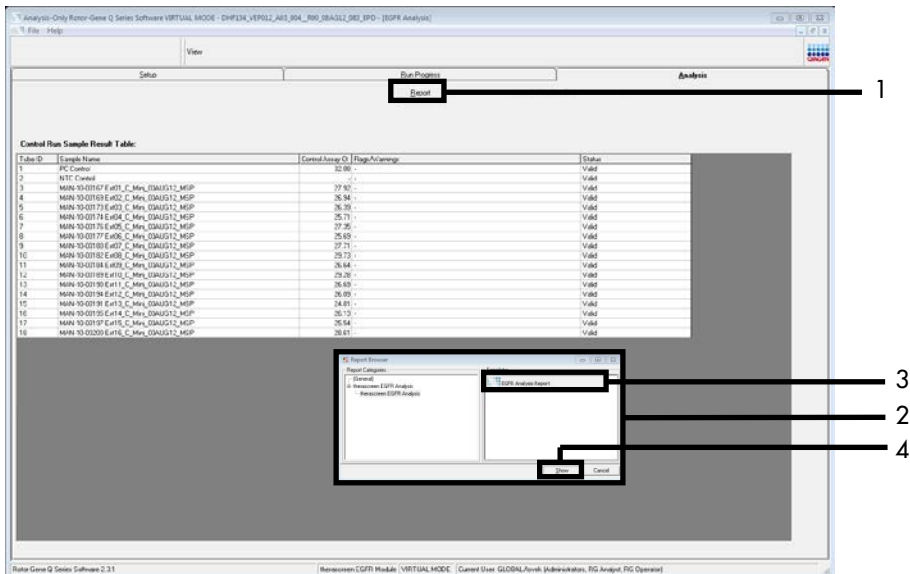
**C<sub>T</sub> αντίδρασης υλικού ελέγχου δείγματος < 23,70, εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο).** Η συγκέντρωση του DNA είναι εξαιρετικά υψηλή για την ανάλυση της μετάλλαξης. Αραιώστε με νερό χωρίς νουκλεάση για αραιώση (Dil.) και επαναλάβετε την εξέταση. Αραιώστε μέχρι η τιμή C<sub>T</sub> να κυμαίνεται μεταξύ 23,70 και 31,10. Με αραιώση σε αναλογία 1:1 η τιμή C<sub>T</sub> αυξάνεται κατά περίπου 1,0.

**C<sub>T</sub> αντίδρασης υλικού ελέγχου δείγματος μεταξύ 23,70 και 31,10 (23,70 ≤ C<sub>T</sub> υλικού ελέγχου ≤ 31,10), εμφανίζεται η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο). Η συγκέντρωση του DNA είναι κατάλληλη για την ανάλυση της μετάλλαξης.**

**Σημείωση:** Εάν απαιτείται επανάληψη εκχύλισης ή αραίωση, επαναλάβετε την αντίδραση υλικού ελέγχου για να βεβαιωθείτε ότι η συγκέντρωση του DNA είναι κατάλληλη για χρήση.

18. Κάντε κλικ στο **Report** (Αναφορά) για να δημιουργήσετε ένα αρχείο αναφοράς. Ανοίγει το παράθυρο «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών). Επιλέξτε **EGFR CE Analysis Report** (Αναφορά ανάλυσης EGFR CE) στην ενότητα «Templates» (Πρότυπα) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **Show** (Εμφάνιση) (Εικόνα 9).

**Σημείωση:** Για να αποθηκεύσετε τις αναφορές σε εναλλακτική τοποθεσία σε μορφή αρχείου web, κάντε κλικ στο κουμπί **Save As** (Αποθήκευση ως) που βρίσκεται στην επάνω αριστερή γωνία κάθε αναφοράς.



**Εικόνα 9. Επιλογή «EGFR CE Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης EGFR CE). 1 = «Report» (Αναφορά), 2 = παράθυρο «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών), 3 = επιλογή «EGFR Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης EGFR), 4 = «Show» (Εμφάνιση).**

## Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR

Το παρόν πρωτόκολλο προορίζεται για την ανίχνευση των μεταλλάξεων EGFR. Μετά την επιτυχή αξιολόγηση ενός δείγματος DNA, αυτό μπορεί να υποβληθεί σε εξέταση με τις αναλύσεις μετάλλαξης του EGFR, με τη χρήση αυτοματοποιημένου λογισμικού.

**Σημείωση:** Για τη μη αυτοματοποιημένη ανίχνευση μεταλλάξεων, βλ. «Παράρτημα Α: Μη αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit».

### Σημαντικές υποδείξεις πριν από την εκκίνηση

- Για να παραχθούν σωστά αποτελέσματα, διασφαλίστε ότι διενεργείται η περιγραφόμενη διαδικασία ανάμειξης σε κάθε στάδιο ανάμειξης της διαδικασίας ρύθμισης της ανάλυσης.
- Πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε την ενότητα «Γενικές προφυλάξεις».
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM πριν προχωρήσετε στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου.
- Μετά την επιτυχή αξιολόγησή του, ένα δείγμα DNA μπορεί να υποβληθεί σε εξέταση με χρήση των αναλύσεων μετάλλαξης του EGFR.
- Για αποτελεσματική χρήση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, τα δείγματα πρέπει να ομαδοποιούνται σε παρτίδες των επτά. Εάν το μέγεθος της παρτίδας είναι μικρότερο, θα υποβληθούν σε εξέταση λιγότερα δείγματα με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Ένα δείγμα πρέπει να εξεταστεί με τη χρήση όλων των μειγμάτων αντίδρασης που παρέχονται στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Μη στροβιλίζετε την *Taq* ή οποιοδήποτε μείγμα που περιέχει *Taq*, καθώς υπάρχει κίνδυνος αδρανοποίησης του ενζύμου.
- Αναρροφήστε την *Taq* τοποθετώντας προσεκτικά το ρύγχος της πιπέτας ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφευχθεί η επικάλυψη του ρύγχους με περίσσεια ενζύμου.

## Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Βεβαιωθείτε ότι είναι εγκατεστημένο το λογισμικό *therascreen* EGFR CE Assay Package πριν χρησιμοποιήσετε το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM για πρώτη φορά (βλ. «Παράρτημα Β: Εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* EGFR CE Assay Package»).
- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται εντελώς για τουλάχιστον 1 ώρα και μέχρι 4,5 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C), να αναμειγνύονται **με αναστροφή 10 φορές** και να φυγοκεντρίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- **Αναμείξτε όλα τα δείγματα αναστρέφοντας 10 φορές** και φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Βεβαιωθείτε ότι η *Taq* βρίσκεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C) πριν από κάθε χρήση. Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

## Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα σωληνάρια μείγματος αντίδρασης, το νερό για NTC και τον EGFR PC σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C) για τουλάχιστον 1 ώρα και μέχρι 4,5 ώρες το πολύ.  
Οι χρόνοι απόψυξης των αντιδραστηρίων, προετοιμασίας PCR και αποθήκευσης πριν από την έναρξη της εκτέλεσης υποδεικνύονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Χρόνοι απόψυξης, χρόνοι προετοιμασίας PCR και θερμοκρασίες αποθήκευσης

Ελάχιστος χρόνος απόψυξης	Μέγιστος χρόνος απόψυξης	Θερμοκρασία αποθήκευσης μετά την προετοιμασία PCR	Μέγιστος χρόνος προετοιμασίας PCR και αποθήκευσης
1 ώρες	4,5 ώρες	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C)	6 ώρες
1 ώρες	4,5 ώρες	2-8°C	18 ώρες

**Σημείωση:** Η προετοιμασία PCR πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25°C). Ο όρος «Αποθήκευση» αναφέρεται στον χρόνο μεταξύ της ολοκλήρωσης της προετοιμασίας της PCR και της έναρξης εκτέλεσης της PCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

**Σημείωση:** Αφήστε την *Taq* (σωληνάριο *Taq*) να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25 °C) συγχρόνως με τα άλλα αντιδραστήρια (βλ. «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων»). Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

- Όταν τα αντιδραστήρια έχουν αποψυχθεί, **αναμείξτε τα αναστρέφοντας κάθε σωληνάριο 10 φορές** για την αποφυγή τοπικών συγκεντρώσεων αλάτων και στη συνέχεια φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Προετοιμάστε επαρκείς ποσότητες κυρίων μειγμάτων ανάλυσης (μείγμα αντίδρασης ανάλυσης συν *Taq*) για τα δείγματα DNA, μια αντίδραση EGFR PC και μια αντίδραση NTC σύμφωνα με τους όγκους που αναφέρονται στον Πίνακα 6. Συμπεριλάβετε αντιδραστήρια για ένα επιπλέον δείγμα, ώστε να υπάρχει επαρκής περίσσεια υλικού για την προετοιμασία της PCR.

Τα κύρια μείγματα περιέχουν όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση PCR, εκτός από το δείγμα.

**Πίνακας 6. Προετοιμασία κύριων μειγμάτων ανάλυσης**

Ανάλυση	Σωληνάριο μείγματος αντίδρασης	Όγκος μείγματος αντίδρασης	Όγκος <i>Taq</i> DNA πολυμεράσης (σωληνάριο <i>Taq</i> )
Υλικό ελέγχου	CTRL	19,5 μl × (n + 1)*	0,5 μl × (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 μl × (n + 1)	0,5 μl × (n + 1)
Ελλείψεις	Del	19,5 μl × (n + 1)	0,5 μl × (n + 1)
L858R	L858R	19,5 μl × (n + 1)	0,5 μl × (n + 1)
L861Q	L861Q	19,5 μl × (n + 1)	0,5 μl × (n + 1)
G719X	G719X	19,5 μl × (n + 1)	0,5 μl × (n + 1)
S768I	S768I	19,5 μl × (n + 1)	0,5 μl × (n + 1)
Προσθήκες	Ins	19,5 μl × (n + 1)	0,5 μl × (n + 1)

\* n = αριθμός αντιδράσεων (δείγματα συν υλικά ελέγχου). Παρασκευάστε αρκετή ποσότητα κύριου μείγματος για ένα επιπλέον δείγμα (n + 1), ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για την προετοιμασία της PCR. Η τιμή n δεν πρέπει να υπερβαίνει την τιμή επτά (συν υλικά ελέγχου), καθώς ο μέγιστος αριθμός δειγμάτων που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία σε μια εκτέλεση ανάλυσης είναι επτά.

4. Αναμείξτε σχολαστικά τα κύρια μείγματα ανάλυσης αναρροφώντας και **διοχετεύοντας προσεκτικά με πιπέτα 10 φορές**. Τοποθετήστε τον κατάλληλο αριθμό σειρών σωληναρίων στο μπλοκ φόρτωσης σύμφωνα με τη διάταξη στον Πίνακα 7. Προσθέστε αμέσως 20 μl από το κατάλληλο κύριο μείγμα ανάλυσης σε κάθε σωληνάριο της σειράς PCR.

Τα πώματα παραμένουν στον πλαστικό περιέκτη μέχρι να τα χρειαστείτε.

**Πίνακας 7. Διάταξη αναλύσεων υλικού ελέγχου και μετάλλαξης στο μπλοκ φόρτωσης. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις θέσεις στο μπλοκ φόρτωσης και υποδεικνύουν την τελική θέση του ρότορα.**

Ανάλυση	Υλικά ελέγχου		<u>Θέση</u>						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Υλικό ελέγχου	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Ελλείψεις	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Προσθήκες	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. Προσθέστε αμέσως 5 μl νερού για NTC στα σωληνάρια που βρίσκονται στις θέσεις 9–16 και τοποθετήστε τα πώματα στα σωληνάρια.

6. Προσθέστε 5 μl από κάθε δείγμα στα σωληνάρια δειγμάτων (θέσεις σωληναρίων 17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64 και 65–72) και τοποθετήστε τα πώματα στα σωληνάρια.

7. Προσθέστε 5 μl EGFR PC στα σωληνάρια που βρίσκονται στις θέσεις 1–8 και τοποθετήστε τα πώματα στα σωληνάρια.

Φροντίστε να αποφύγετε σφάλματα φόρτωσης ή διοχέτευσης με πιπέτα, ώστε να διασφαλίσετε ότι θα γίνει σωστά η προσθήκη του NTC, των δειγμάτων και του EGFR PC στα κατάλληλα σωληνάρια.



Κάθε σωληνάριο πρέπει να περιέχει συνολικό όγκο αντίδρασης 25 μl (20 μl κύριο μείγματος ανάλυσης που παρασκευάστηκε στο βήμα 3 (Πίνακας 6) συν 5 μl NTC/δείγματος/PC). Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις θέσεις στο μπλοκ φόρτωσης και υποδεικνύουν την τελική θέση του ρότορα.

Επισημάνετε τα πώματα των σωληναρίων ώστε να εμφανίζεται η κατεύθυνση φόρτωσης των σωληναρίων στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Αφού τοποθετήσετε τα πώματα σε όλα τα σωληνάρια PCR, ελέγξτε οπτικά τη στάθμη πλήρωσης των σωληναρίων δείγματος για να διασφαλίσετε ότι έχει προστεθεί δείγμα σε όλα τα σωληνάρια.
9. **Αναστρέψτε όλα τα σωληνάρια PCR 4 φορές για να αναμειχθούν τα δείγματα και τα μείγματα αντίδρασης.**
10. Τοποθετήστε τις σειρές σωληναρίων PCR στις κατάλληλες θέσεις του 72-Well Rotor, σύμφωνα με τη διάταξη στον Πίνακα 7.  

Σε κάθε εκτέλεση ανάλυσης PCR μπορεί να συμπεριληφθούν το ανώτερο 7 δείγματα. Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, τοποθετήστε πωματισμένα, κενά σωληνάρια σε όλες τις κενές θέσεις.
11. Τοποθετήστε αμέσως τον 72-Well Rotor μέσα στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) είναι τοποθετημένος στο πάνω μέρος του ρότορα για την ασφάλιση των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.  

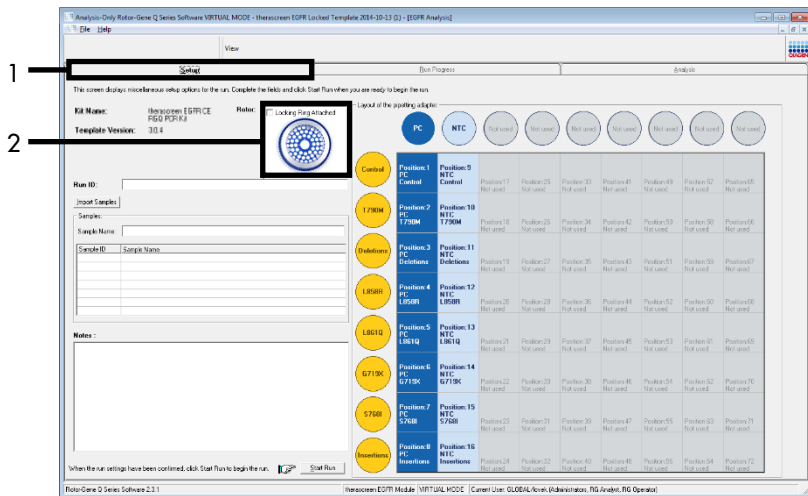
**Σημείωση:** Εάν χρησιμοποιείτε τη μη αυτοματοποιημένη ανίχνευση μεταλλάξεων του EGFR, βλ. «Παράρτημα Α: Μη αυτόματο πρωτόκολλο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit».
12. Κάντε διπλό κλικ στο εικονίδιο του ***therascreen* EGFR CE Locked Template** (Κλειδωμένο πρότυπο EGFR CE) στην επιφάνεια εργασίας του φορητού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM για να κάνετε εκκίνηση του λογισμικού Rotor-Gene Q (Εικόνα 10).



## therascreen EGFR CE Locked Template

Εικόνα 10. Εικονίδιο κλειδωμένου πρότυπου EGFR CE (ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR).

13. Ανοίγει η καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) βάσει προεπιλογής (Εικόνα 11). Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος σωστά και κατόπιν επιλέξτε το πλαίσιο **Locking Ring Attached** (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κλείστε το καπάκι του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.



Εικόνα 11. Καρτέλα «Setup» (Ρυθμίσεις) (1) και πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος) (2).

14. Εισαγάγετε το αναγνωριστικό εκτέλεσης στο πεδίο **Run ID** (Αναγνωριστικό εκτέλεσης) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας. Εισαγάγετε το όνομα δείγματος στο πεδίο **Sample Name** (Όνομα δείγματος) σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο **Return** (Enter).

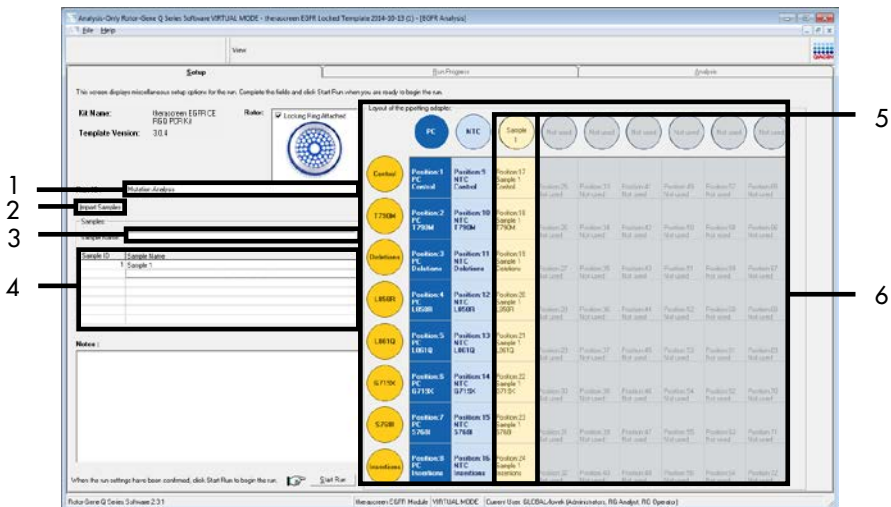
Με αυτόν τον τρόπο προστίθεται το όνομα δείγματος στην παρακάτω λίστα δειγμάτων και αντιστοιχίζεται στο δείγμα ένα «Sample ID» (Αναγνωριστικό δείγματος) (1, 2, 3 κ.λπ.). Επιπλέον, ενημερώνεται το παράθυρο «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα) στη δεξιά πλευρά ώστε να συμπεριλαμβάνει το όνομα δείγματος (Εικόνα 12).

**Σημείωση:** Εναλλακτικά, μπορεί να γίνει εισαγωγή ονομάτων δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε μορφή \*.smp (αρχείο δείγματος Rotor-Gene Q) ή \*.csv (τιμές διαχωρισμένες με κόμματα) με τη χρήση του κουμπιού **Import Samples** (Εισαγωγή δειγμάτων). Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, τα ονόματα των δειγμάτων συμπληρώνονται αυτόματα.

**Σημείωση:** Στον πίνακα «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διανομής με πιπέτα), ελέγξτε εάν η προσθήκη του ονόματος δείγματος επισημαίνεται με αλλαγή χρώματος και εάν το όνομα δείγματος βρίσκεται στη θέση δείγματος (Εικόνα 12).

**Σημείωση:** Μπορείτε να προσθέσετε έως και 7 δείγματα. Τα αναγνωριστικά δειγμάτων (στους κύκλους δειγμάτων) αντιστοιχίζονται αυτόματα με τιμές από 1 έως 7.

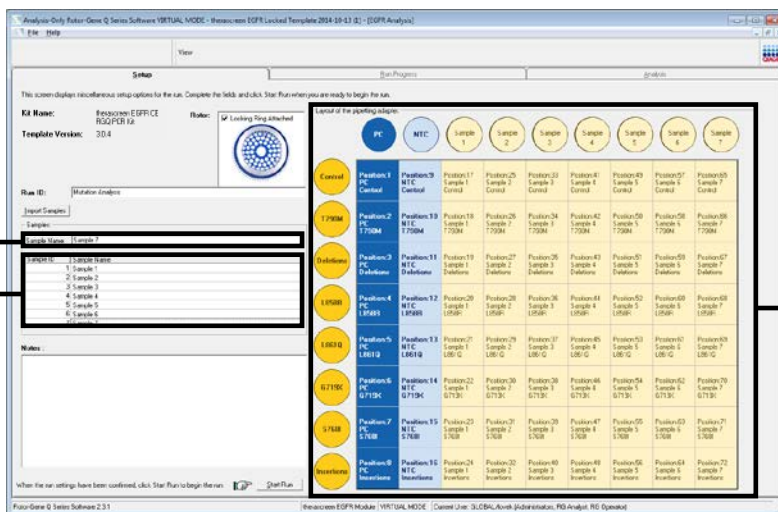
**Σημείωση:** Τα ονόματα δείγματος που περιέχουν περισσότερους από 8 χαρακτήρες ενδέχεται να μην εμφανίζονται ολόκληρα στον πίνακα «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διοχέτευσης με πιπέτα).



**Εικόνα 12. Συμπλήρωση των πεδίων «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης ανάλυσης) και «Sample Name» (Όνομα δείγματος).** 1 = πεδίο «Run ID» (Αναγνωριστικό εκτέλεσης ανάλυσης), 2 = κουμπί «Import Samples» (Εισαγωγή δειγμάτων), 3 = πεδίο «Sample Name» (Όνομα δείγματος), 4 = «Sample List» (Λίστα δειγμάτων), 5 = πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διοχέτευσης με πιπέτα), 6 = Επισημασμένος κύκλος δείγματος και από κάτω στήλη 8 αναλύσεων.

15. Επαναλάβετε το βήμα 14 για να εισαγάγετε τα ονόματα όλων των πρόσθετων δειγμάτων (Εικόνα 13).

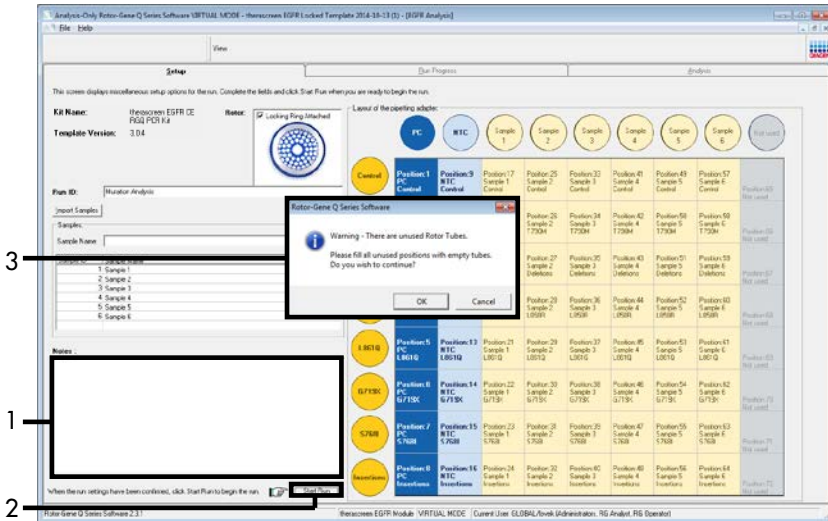
**Σημείωση:** Για να επεξεργαστείτε ένα όνομα δείγματος, κάντε κλικ στο **Sample Name** (Όνομα δείγματος) της λίστας δειγμάτων. Το επιλεγμένο δείγμα εμφανίζεται στο παραπάνω πεδίο **Sample Name** (Όνομα δείγματος). Επεξεργαστείτε το όνομα δείγματος σύμφωνα με την τοπική σύμβαση ονομασίας και πατήστε το πλήκτρο **Return** (ή Enter) για να ενημερωθεί το όνομα.



**Εικόνα 13. Εισαγωγή πρόσθετων ονομάτων δειγμάτων στο πεδίο «Sample Name» (Όνομα δείγματος). 1 = πεδίο «Sample Name» (Όνομα δείγματος), 2 = «Sample List» (Λίστα δειγμάτων), 3 = πίνακας «Layout of the pipetting adapter» (Διάταξη προσαρμογέα διοχέτευσης με πιπέτα).**

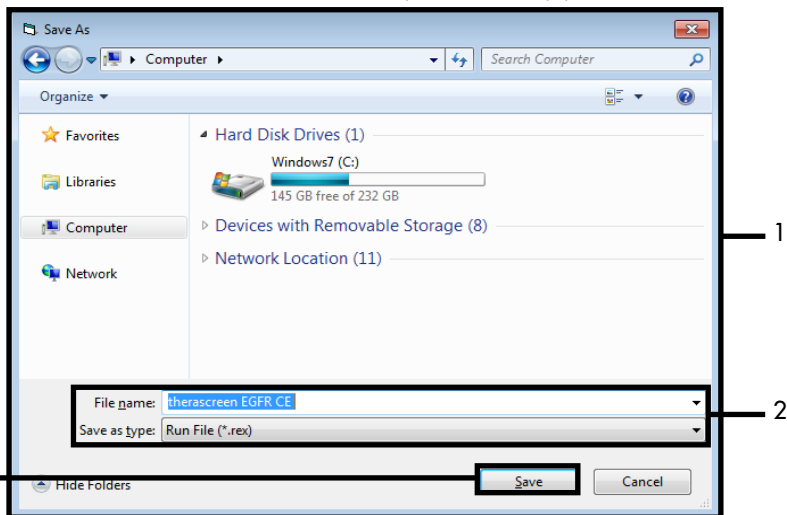
16. Όταν συμπληρώσετε όλα τα ονόματα δειγμάτων, επαληθεύστε την ορθότητά τους. Προσθέστε τυχόν επιπλέον πληροφορίες στο πεδίο **Notes** (Σημειώσεις) αν είναι απαραίτητο και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο κουμπί **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης) (Εικόνα 14).

**Σημείωση:** Εάν υπάρχουν κενές θέσεις στον ρότορα, εμφανίζεται ένα μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) (Εικόνα 14) για να υπενθυμίσει στον χρήστη ότι πρέπει να τοποθετήσει πωματισμένα, κενά σωληνάκια σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει ένα κενό σωληνάριο με πώμα σε όλες τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται και κάντε κλικ στο **OK** για να συνεχίσετε.



Εικόνα 14. Πεδίο «Notes» (Σημειώσεις) (1), κουμπί «Start Run» (Έναρξη εκτέλεσης) (2) και μήνυμα «Warning» (Προειδοποίηση) σχετικά με τις θέσεις του ρότορα που δεν χρησιμοποιούνται (3).

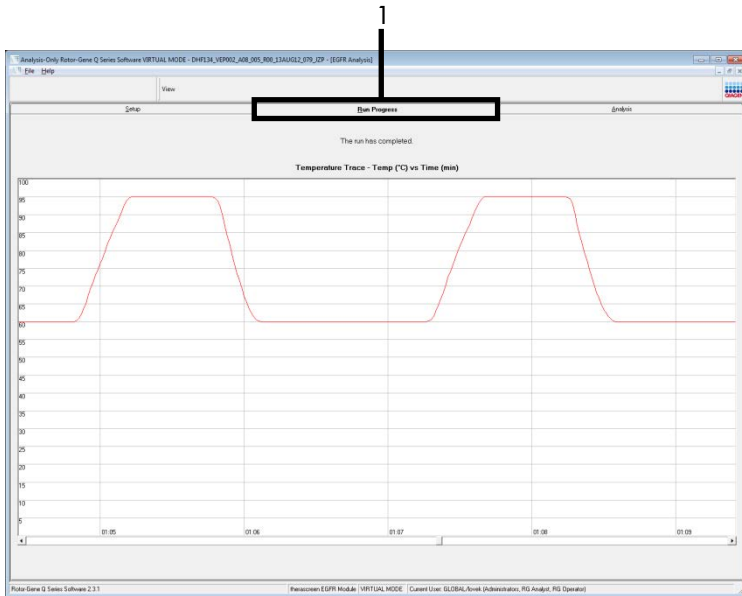
17. Ανοίγει το παράθυρο «Save As» (Αποθήκευση ως). Εισαγάγετε ένα κατάλληλο όνομα αρχείου και αποθηκεύστε την εκτέλεση PCR ως αρχείο εκτέλεσης \*.rex στην επιλεγμένη θέση. Κάντε κλικ στην επιλογή «**Save**» (Αποθήκευση) (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15. Παράθυρο «Save As» (Αποθήκευση ως) (1).** 2 = πεδία «File Name» (Όνομα αρχείου) και «Save as type» (Αποθήκευση ως τύπος), 3 = «Save» (Αποθήκευση).

Ξεκινά η εκτέλεση ανάλυσης PCR.

**Σημείωση:** Κατά την έναρξη της εκτέλεσης, ανοίγει η καρτέλα «Run Progress» (Πρόοδος εκτέλεσης), που υποδεικνύει την παρακολούθηση της θερμοκρασίας και τον υπολειπόμενο χρόνο της εκτέλεσης (Εικόνα 16).



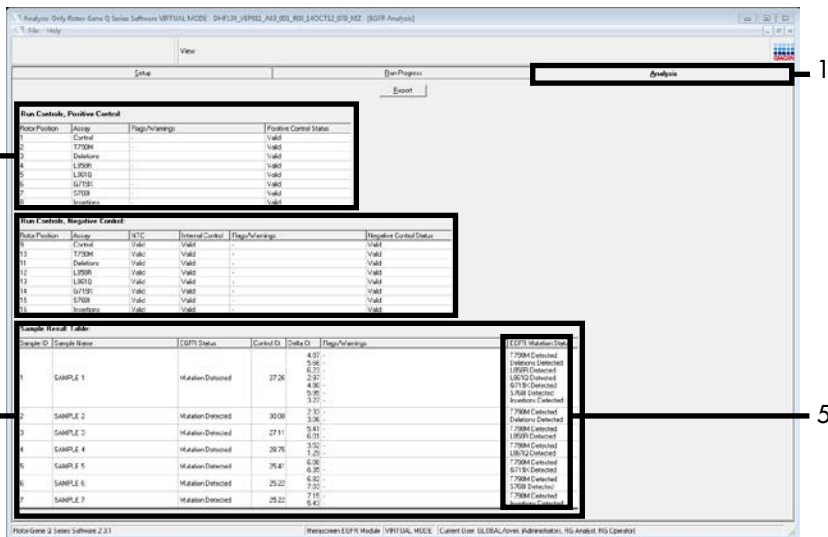
**Εικόνα 16. Καρτέλα «Run Progress» (Πρόσδος εκτέλεσης ανάλυσης).**

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης ανάλυσης, ανοίγει η καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση).

**Σημείωση:** Εάν η καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) δεν ανοίξει, κάντε κλικ στην καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) (Εικόνα 17).

**Σημείωση:** Μια επεξήγηση της μεθόδου υπολογισμού παρουσιάζεται στην ενότητα «Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Αυτοματοποιημένη μέθοδος)».





Εικόνα 17. Καρτέλα «Analysis» (Ανάλυση) (1) και αναφορά αποτελεσμάτων. 2 = πίνακας «Run Controls, Positive Control» (Υλικά ελέγχου εκτέλεσης ανάλυσης, θετικό υλικό ελέγχου), 3 = πίνακας «Run Controls, Negative Control» (Υλικά ελέγχου εκτέλεσης ανάλυσης, αρνητικό υλικό ελέγχου), 4 = «Sample Result Table» (Πίνακας αποτελεσμάτων δειγμάτων), 5 = πίνακας «Mutation Status» (Κατάσταση μετάλλαξης).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αναφέρονται ως εξής (Εικόνα 18).

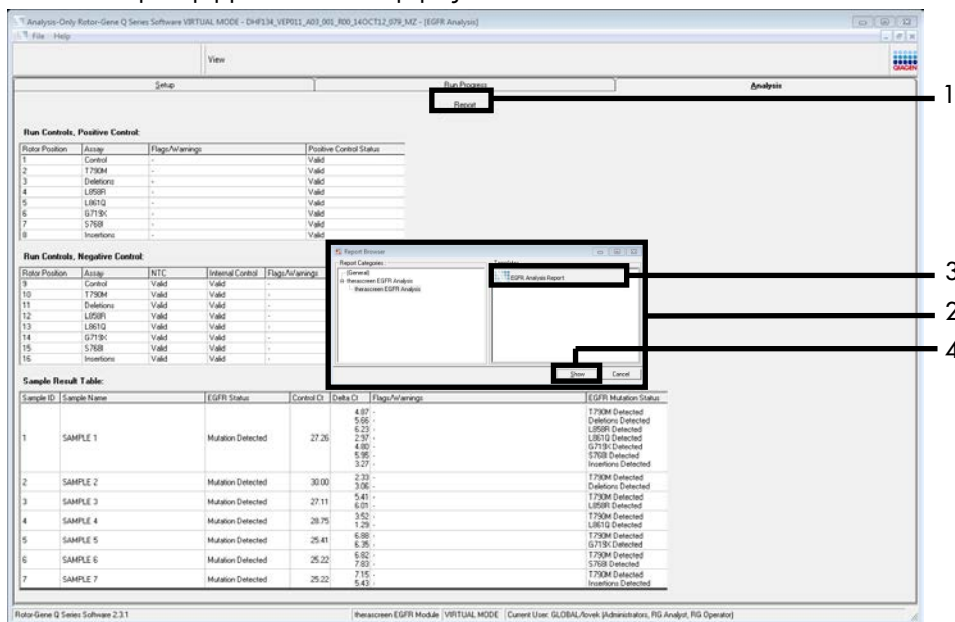
**Run Controls, Positive Control** (Υλικά ελέγχου εκτέλεσης ανάλυσης, θετικό υλικό ελέγχου): Εάν τα αποτελέσματα είναι εντός του αποδεκτού εύρους τιμών, στο πεδίο «Positive Control Status» (Κατάσταση θετικού υλικού ελέγχου) εμφανίζεται η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο), διαφορετικά εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο).

**Run Controls, Negative Control** (Υλικά ελέγχου εκτέλεσης ανάλυσης, αρνητικό υλικό ελέγχου): Εάν και το αποτέλεσμα «NTC» (Υλικό ελέγχου χωρίς πρότυπο) και το αποτέλεσμα «Internal Control» (Εσωτερικό υλικό ελέγχου) είναι εντός του αποδεκτού εύρους τιμών, στο πεδίο «Negative Control Status» (Κατάσταση αρνητικού υλικού ελέγχου) εμφανίζεται η ένδειξη «Valid» (Έγκυρο), διαφορετικά εμφανίζεται η ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο).

**Sample Result Table** (Πίνακας αποτελεσμάτων δειγμάτων): Για τα θετικά για μετάλλαξη δείγματα, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις αναφέρονται στη στήλη «EGFR Mutation Status» (Κατάσταση μετάλλαξης EGFR).

18. Κάντε κλικ στο **Report** (Αναφορά) για να δημιουργήσετε ένα αρχείο αναφοράς. Ανοίγει το παράθυρο «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών). Επιλέξτε EGFR CE **Analysis Report** (Αναφορά ανάλυσης EGFR CE) στην ενότητα **Templates** (Πρότυπα) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **Show** (Εμφάνιση) (Εικόνα 18).

**Σημείωση:** Για να αποθηκεύσετε μια αναφορά σε εναλλακτική τοποθεσία σε μορφή αρχείου web, κάντε κλικ στο κουμπί Save As (Αποθήκευση ως) που βρίσκεται στην επάνω αριστερή γωνία κάθε αναφοράς.



**Εικόνα 18. Επιλογή «EGFR CE Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης EGFR CE).** 1 = «Report» (Αναφορά), 2 = πίνακας «Report Browser» (Φυλλομετρητής αναφορών), 3 = «EGFR CE Analysis Report» (Αναφορά ανάλυσης EGFR CE), 4 = «Show» (Εμφάνιση).

# Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Αυτοματοποιημένη μέθοδος)

Η ανάλυση και οι προσδιορισμοί μετάλλαξης διεξάγονται αυτόματα από το λογισμικό *therascreen* EGFR Assay Package μόλις ολοκληρωθεί μια εκτέλεση ανάλυσης. Ακολουθούν πληροφορίες που εξηγούν τον τρόπο με τον οποίο το λογισμικό *therascreen* EGFR Assay Package διεξάγει την ανάλυση και τους προσδιορισμούς μετάλλαξης.

**Σημείωση:** Για τη μη αυτοματοποιημένη ανάλυση των αποτελεσμάτων, βλ. «Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Μη αυτοματοποιημένη μέθοδος)».

Ο κύκλος PCR στον οποίο ο φθορισμός από μια συγκεκριμένη αντίδραση συμπίπτει με μια προκαθορισμένη τιμή κατωφλίου, ορίζεται ως η τιμή  $C_T$ . Οι τιμές  $C_T$  υποδεικνύουν την ποσότητα συγκεκριμένου εισαγόμενου DNA. Οι χαμηλές τιμές  $C_T$  υποδεικνύουν υψηλότερα επίπεδα εισαγόμενου DNA και οι υψηλές τιμές  $C_T$  υποδεικνύουν χαμηλότερα επίπεδα εισαγόμενου DNA. Οι αντιδράσεις με τιμή  $C_T$  ταξινομούνται ως θετικές για ενίσχυση.

Με το λογισμικό Rotor-Gene Q παρεμβάλλονται σήματα φθορισμού μεταξύ δύο οποιωνδήποτε καταχωρημένων τιμών. Επομένως, οι τιμές  $C_T$  μπορεί να είναι οποιοσδήποτε πραγματικός αριθμός (χωρίς περιορισμό σε ακέραιους αριθμούς) εντός του εύρους από 0 έως 40. Για το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, η τιμή κατωφλίου έχει οριστεί σε 0,075 σχετικές μονάδες φθορισμού για το πράσινο (FAM) κανάλι και σε 0,02 σχετικές μονάδες φθορισμού για το κίτρινο (HEX) κανάλι. Οι τιμές αυτές διαμορφώνονται αυτόματα στο *therascreen* EGFR Assay Package. Τα υλικά ελέγχου της ανάλυσης (PC και NTC, καθώς και IC) αξιολογούνται, ώστε να διασφαλιστεί ότι επιτυγχάνονται αποδεκτές τιμές  $C_T$  και ότι οι αντιδράσεις εκτελούνται σωστά.

Υπολογίζονται οι τιμές  $\Delta C_T$  των δειγμάτων, για κάθε ανάλυση μετάλλαξης, με τη χρήση της εξίσωσης:

$$\Delta C_T = [\text{τιμή } C_T \text{ ανάλυσης μετάλλαξης}] - [\text{τιμή } C_T \text{ ανάλυσης υλικού ελέγχου}]$$

Τα δείγματα ταξινομούνται ως θετικά για μετάλλαξη, εάν η τιμή  $\Delta C_T$  που δίνουν είναι εντός του εύρους οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  για τη συγκεκριμένη ανάλυση. Με τιμή  $\Delta C_T$  άνω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής, το δείγμα ενδέχεται να περιέχει μετάλλαξη σε ποσοστό μικρότερο από αυτό που μπορεί να ανιχνευθεί από το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (εκτός των ορίων των αναλύσεων) ή να είναι αρνητικό για μετάλλαξη και να αναφέρεται με την ένδειξη «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη). Με τιμή  $\Delta C_T$  κάτω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής, το δείγμα αναφέρεται με την ένδειξη «Invalid» (Μη έγκυρο).

Οι αντιδράσεις μετάλλαξης χωρίς ενίσχυση ταξινομούνται ως «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη). Οι τιμές  $\Delta C_T$  που υπολογίζονται από την ενίσχυση υποβάθρου αναμένεται να είναι μεγαλύτερες από το ανώτατο όριο του εύρους οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  και το δείγμα ταξινομείται ως «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμφανίζονται ως «Mutation Detected» (Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη), «No Mutation Detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη), «Invalid» (Μη έγκυρο) ή, σε περίπτωση αποτυχίας του υλικού ελέγχου εκτέλεσης, ως «Run Control Failed» (Αποτυχία υλικού ελέγχου εκτέλεσης). Για τα θετικά για μετάλλαξη δείγματα, αναφέρονται συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Μια νεοπλασία μπορεί να εμφανίζει περισσότερες από μία μεταλλάξεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αναφέρονται περισσότερες από μία μεταλλάξεις.

---

## Ενδείξεις του Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package

Ο Πίνακας 8 (επόμενη σελίδα) παραθέτει τις πιθανές ενδείξεις που ενδέχεται να δημιουργηθούν από το Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package, τη σημασία τους και τις ενέργειες που πρέπει να εκτελεστούν.

Τα ονόματα των ενδείξεων δομούνται ώστε να παρέχουν πληροφορίες για το συστατικό του κιτ που επηρεάζεται, το δείγμα ή το υλικό ελέγχου που επηρεάζεται, καθώς και το είδος της αποτυχίας.

Για παράδειγμα:

- **PC\_CTRL\_ASSAY\_FAIL** = Θετικό υλικό ελέγχου (PC), η ανάλυση υλικού ελέγχου (CTRL\_ASSAY) δεν είναι επιτυχής (FAIL)
- **NTC\_INT\_CTRL\_FAIL** = Υλικό ελέγχου χωρίς πρότυπο (NTC), το εσωτερικό υλικό ελέγχου (INT\_CTRL) δεν είναι επιτυχής (FAIL)
- **SAMPLE\_CTRL\_HIGH\_CONC** = Δείγμα (SAMPLE), η ανάλυση υλικού ελέγχου (CTRL) έχει υψηλή συγκέντρωση (HIGH\_CONC).

**Πίνακας 8. Ενδείξεις, επεξηγήσεις και ενέργειες που πρέπει να εκτελεστούν**

<b>Ένδειξη</b>	<b>Επεξήγηση</b>	<b>Ενέργεια</b>
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — η τιμή FAM C <sub>T</sub> για το θετικό υλικό ελέγχου στην αντίδραση υλικού ελέγχου είναι εκτός εύρους.	Επαναλάβετε ολόκληρη την ανάλυση PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — η τιμή FAM C <sub>T</sub> για μία ή περισσότερες αντιδράσεις υλικού ελέγχου μετάλλαξης είναι εκτός εύρους.	Επαναλάβετε ολόκληρη την ανάλυση PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στο θετικό υλικό ελέγχου (μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου).	Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR, προσέχοντας ιδιαίτερα τα στάδια ανάμειξης.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στο θετικό υλικό ελέγχου (μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης).	Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR, προσέχοντας ιδιαίτερα τα στάδια ανάμειξης.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — εσωτερικό υλικό ελέγχου πάνω από το εύρος τιμών για αρνητικό υλικό ελέγχου.	Επαναλάβετε ολόκληρη την ανάλυση PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — εσωτερικό υλικό ελέγχου κάτω από το εύρος τιμών για αρνητικό υλικό ελέγχου.	Επαναλάβετε ολόκληρη την ανάλυση PCR.
NTC_INVALID_CT	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — μη έγκυρη τιμή FAM (μικρότερη του ορίου) για αρνητικό υλικό ελέγχου.	Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR, προσέχοντας ιδιαίτερα τα στάδια ανάμειξης.
NTC_INVALID_DATA	Μη έγκυρη εκτέλεση ανάλυσης PCR — δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στο αρνητικό υλικό ελέγχου.	Επαναλάβετε ολόκληρη την εκτέλεση PCR, προσέχοντας ιδιαίτερα τα στάδια ανάμειξης.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Μη έγκυρο δείγμα — δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στο υλικό ελέγχου δείγματος.	Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε την εξέταση των σχετικών δειγμάτων, προσέχοντας ιδιαίτερα τα στάδια ανάμειξης.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Μη έγκυρο δείγμα — η τιμή FAM C <sub>T</sub> είναι εξαιρετικά χαμηλή στο υλικό ελέγχου δείγματος.	Αραιώστε το δείγμα για να αυξηθεί η τιμή C <sub>T</sub> του υλικού ελέγχου. Η αραιώση αυτή πρέπει να υπολογιστεί βάσει της υπόθεσης ότι η αραιώση σε αναλογία 1:1 με το νερό που παρέχεται στο κιτ αυξάνει την τιμή C <sub>T</sub> κατά 1,0. Μετά την αραιώση του δείγματος, προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης μεταλλάξεων για να επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Εναλλακτικά, εάν το δείγμα έχει αραιωθεί έπειτα από την εκτέλεση ανάλυσης αξιολόγησης του δείγματος DNA, προχωρήστε απευθείας στην εκτέλεση ανάλυσης ανίχνευσης μεταλλάξεων του EGFR με το αραιωμένο δείγμα.

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

Ένδειξη	Επεξήγηση	Ενέργεια
SAMPLE_CTRL_FAIL	Μη έγκυρο δείγμα — η τιμή FAM C <sub>T</sub> είναι εξαιρετικά υψηλή στην αντίδραση υλικού ελέγχου δείγματος.	Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για να επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Εάν το δείγμα βρεθεί μη έγκυρο κατά την επανάληψη της εκτέλεσης ανάλυσης PCR και εάν η ποσότητα DNA είναι ακόμα ανεπαρκής, πραγματοποιήστε εκχύλιση σε 2 ακόμα τομές ιστού FFPE, αν υπάρχουν. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για την εξέταση αυτής της εκχύλισης. Εάν το δείγμα είναι μη έγκυρο, επαναλάβετε την εκτέλεση ανάλυσης PCR με τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση ανάλυσης, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω εξέταση.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Η τιμή C <sub>T</sub> είναι εξαιρετικά υψηλή (ή δεν υπάρχει τιμή C <sub>T</sub> ) για το εσωτερικό υλικό ελέγχου (HEX), κανάλι FAM αρνητικό για μετάλλαξη.	<p>Για δείγματα που παράγουν την ένδειξη SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID με την ανίχνευση (ή μη) μιας μετάλλαξης σε ένα κλινικά σχετικό μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης, τα αποτελέσματα αναφέρονται και δεν απαιτείται περαιτέρω εξέταση.</p> <p>Αραιώστε το δείγμα με το νερό που παρέχεται στο kit, λαμβάνοντας υπόψη την υπόθεση ότι η αραιώση σε αναλογία 1:1 θα αυξήσει την τιμή C<sub>T</sub> της αντίδρασης υλικού ελέγχου κατά 1,0, διασφαλίζοντας ότι ο τελικός όγκος είναι &gt; 40 μl (π.χ. 40 μl DNA και 40 μl νερό από το σωληνάριο με την ένδειξη DIL).</p> <p>Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για να επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης ανάλυσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκχυλίστε το δείγμα από δύο ακόμα τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για την εξέταση αυτής της εκχύλισης.</p> <p>Εάν το αποτέλεσμα της δεύτερης εκχύλισης είναι μη έγκυρο, προβείτε σε αραιώση όπως περιγράφεται παραπάνω.</p> <p>Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση ανάλυσης, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω εξέταση.</p>

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

Ένδειξη	Επεξήγηση	Ενέργεια
SAMPLE_INT_CTRL_ EARLY_CT	Μη έγκυρο σωληνάριο μετάλλαξης — η τιμή HEX C <sub>T</sub> είναι εξαιρετικά χαμηλή για το δείγμα (εσωτερικό υλικό ελέγχου)	<p>Για δείγματα που παράγουν την ένδειξη SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID με την ανίχνευση (ή μη) μιας μετάλλαξης σε ένα κλινικά σχετικό μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης, τα αποτελέσματα αναφέρονται και δεν απαιτείται περαιτέρω εξέταση.</p> <p>Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για να επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης ανάλυσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκτελέστε εκχύλιση από 2 επιπλέον τομές ιστού FFPE, αν υπάρχουν.</p> <p>Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για την εξέταση αυτής της εκχύλισης. Εάν προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, επαναλάβετε την εκτέλεση ανάλυσης PCR με τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση ανάλυσης, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω εξέταση.</p>
SAMPLE_INVALID_ DATA	Μη έγκυρο σωληνάριο μετάλλαξης — δεν είναι δυνατή η ερμηνεία των δεδομένων φθορισμού στο εσωτερικό υλικό ελέγχου.	<p>Για δείγματα που παράγουν την ένδειξη SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID με την ανίχνευση (ή μη) μιας μετάλλαξης σε ένα κλινικά σχετικό μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης, τα αποτελέσματα αναφέρονται και δεν απαιτείται περαιτέρω εξέταση.</p> <p>Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για να επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος. Εάν μετά την επανάληψη της εκτέλεσης ανάλυσης PCR προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, εκτελέστε εκχύλιση από 2 επιπλέον τομές ιστού FFPE, αν υπάρχουν.</p> <p>Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR για την εξέταση αυτής της εκχύλισης. Εάν προκύψει μη έγκυρο αποτέλεσμα, επαναλάβετε την εκτέλεση ανάλυσης PCR με τη δεύτερη εκχύλιση. Εάν το δείγμα δεν δώσει έγκυρο αποτέλεσμα μετά από αυτήν την εκτέλεση ανάλυσης, του αντιστοιχίζεται απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης και δεν πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω εξέταση.</p>

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα



Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

Ένδειξη	Επεξήγηση	Ενέργεια
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	Το αποτέλεσμα ενός δείγματος για μία ή περισσότερες μεταλλάξεις είναι θετικό, ενώ συγχρόνως τα αποτελέσματα του ίδιου δείγματος για μία ή περισσότερες μεταλλάξεις είναι μη έγκυρα.	<p>Για δείγματα που παράγουν την ένδειξη SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID με την ανίχνευση (ή μη) μιας μετάλλαξης σε ένα κλινικά σχετικό μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης, τα αποτελέσματα αναφέρονται και δεν απαιτείται περαιτέρω εξέταση.</p> <p>Για δείγματα που παράγουν την ένδειξη SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID με τη λήψη αποτελέσματος INVALID (Μη έγκυρο) σε ένα κλινικά σχετικό μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης, επανεξετάστε το δείγμα με όλα τα μείγματα αντίδρασης σύμφωνα με την ενέργεια που αντιστοιχεί στην εκάστοτε ένδειξη μη έγκυρου δείγματος.</p> <p>Εάν παραχθεί η ένδειξη SAMPLE_INT_CTRL_FAIL σε συνδυασμό με οποιαδήποτε άλλη ένδειξη για το επηρεαζόμενο δείγμα, τότε πρέπει να αραιωθεί το δείγμα στο οποίο αναφέρεται η ένδειξη SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR και εξετάστε εκ νέου το δείγμα.</p> <p>Για δείγματα που παράγουν την ένδειξη SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID με τη λήψη αποτελέσματος INVALID (Μη έγκυρο) σε ένα κλινικά σχετικό μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης από την επανάληψη της εκτέλεσης PCR, πραγματοποιήστε εκχύλιση δείγματος από 2 ακόμα τομές FFPE. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR με όλα τα μείγματα αντίδρασης για την εξέταση αυτής της εκχύλισης.</p> <p>Εάν το δείγμα δώσει ξανά μη έγκυρο αποτέλεσμα για ένα κλινικά σχετικό μείγμα αντίδρασης μετάλλαξης, επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος με όλα τα μείγματα αντίδρασης σύμφωνα με την ενέργεια της εκάστοτε ένδειξης μη έγκυρου αποτελέσματος. Εάν παραχθεί η ένδειξη SAMPLE_INT_CTRL_FAIL σε συνδυασμό με οποιαδήποτε άλλη ένδειξη για το επηρεαζόμενο δείγμα, τότε πρέπει να αραιωθεί το δείγμα στο οποίο αναφέρεται η ένδειξη SAMPLE_INT_CTRL_FAIL. Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση ανάλυσης PCR και εξετάστε εκ νέου αυτό το δείγμα.</p> <p>Εάν παρατηρηθεί η ένδειξη SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID κατά την εκτέλεση της επανάληψης, αποδίδεται στο δείγμα μια απροσδιόριστη κατάσταση μετάλλαξης.</p>
MUTATION_EARLY _CT	Μη έγκυρο δείγμα — Η τιμή $\Delta C_T$ είναι εξαιρετικά χαμηλή ή η τιμή $C_T$ είναι κάτω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής	Προετοιμάστε μια νέα εκτέλεση PCR για να επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος, προσέχοντας ιδιαίτερα τα στάδια ανάμειξης.

# Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης (για πληροφορίες επικοινωνίας, δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφτείτε τον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Παρατηρήσεις και προτάσεις

### Τα δείγματα NTC δίνουν θετικά αποτελέσματα στο κανάλι Green FAM

Παρατηρήθηκε μόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR

Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε θυγατρικούς κλώνους.

Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.

Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

### Δεν ανιχνεύεται σήμα με το θετικό υλικό ελέγχου EGFR

- |  |   |
|--|---|
| α) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για την ανάλυση των δεδομένων της PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο.  | Για την ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού <i>Cycling Green</i> για την ανάλυση αντίδρασης PCR του EGFR και το κανάλι φθορισμού <i>Cycling Yellow</i> για την ανάλυση αντίδρασης PCR εσωτερικού υλικού ελέγχου. |
| β) Εσφαλμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM  | Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο. Εάν το αποτέλεσμα είναι εσφαλμένο, επαναλάβετε την εκτέλεση της ανάλυσης.   |
| γ) Εσφαλμένη διευθέτηση της PCR  | Ελέγξτε τα βήματά εργασίας σας με χρήση του πλάνου διοχέτευσης με πιπέτα και, εάν χρειάζεται, επαναλάβετε την PCR.  |
| δ) Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα συστατικά του kit δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων» (σελίδα 18) | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο kit, εάν χρειαστεί.   |
| ε) Η ημερομηνία λήξης του <i>therascreen EGFR RGQ PCR Kit</i> έχει παρέλθει  | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του kit) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο kit, εάν χρειαστεί.   |

# Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *therascreen EGFR RGQ PCR Kit* ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση της ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

## Περιορισμοί

Τα αποτελέσματα που εξάγονται από το προϊόν αυτό πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο όλων των σχετικών κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αυτόνομα για διαγνωστικούς σκοπούς.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση αποκλειστικά από προσωπικό ειδικά καταρτισμένο και εκπαιδευμένο σε *in vitro* διαγνωστικές διαδικασίες και σε συνδυασμό με όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση αποκλειστικά σε κυκλοποιητή *real-time PCR* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Η αυστηρή συμμόρφωση με το Εγχειρίδιο του *therascreen EGFR RGQ PCR Kit* είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται η αραίωση των αντιδραστηρίων με τρόπο που δεν προβλέπεται από το παρόν εγχειρίδιο, καθώς ενδέχεται να προκληθεί υποβάθμιση των επιδόσεων.

Είναι σημαντικό να έχει προηγηθεί αξιολόγηση τόσο της ποσότητας όσο και της ποιότητας του DNA στο δείγμα προτού πραγματοποιηθεί ανάλυσή του με χρήση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Παρέχεται πρόσθετο μείγμα αντίδρασης υλικού ελέγχου για να διαπιστωθεί ότι η τιμή C<sub>T</sub> είναι αποδεκτή για την ανάλυση. Δεν είναι απαραίτητη η εκτέλεση μετρήσεων απορρόφησης, καθώς δεν συσχετίζονται με τις τιμές C<sub>T</sub> στα δείγματα κατακερματισμένου DNA.

Οι εκκινητές του μείγματος αντίδρασης ελλείψεων EGFR έχουν σχεδιαστεί ώστε να στοχεύουν πολλαπλές ελλείψεις εξονίου 19, καλύπτοντας τα νουκλεοτίδια 55174772 έως 55174795 (GRCh38 chr7), δηλ. εύρος 23 bp.

Παρόλο που η ανάλυση ελλείψεων εξονίου 19 έχει επικυρωθεί αναλυτικά και έχει αποδειχθεί ότι ανιχνεύει 14 συγκεκριμένες ελλείψεις στο εξόνιο 19 (βλ. λίστα στον Πίνακα 1 του παρόντος εγχειριδίου), είναι ωστόσο δυνατό να ενισχυθούν επιπλέον μεταλλάξεις (συμπεριλαμβανομένων, ενδεικτικά, επιπλέον ελλείψεων εξονίου 19, προσθηκών εξονίου 19 και της μετάλλαξης L747P) με το σετ εκκινητών ελλείψεων.

Εάν υπάρχουν, οι εν λόγω επιπλέον μεταλλάξεις θα οδηγήσουν σε αποτέλεσμα «Deletions Detected» (Ανιχνεύθηκαν ελλείψεις) για ένα συγκεκριμένο δείγμα ασθενούς.

Επιπλέον, είναι δυνατό να ανιχνευθεί η μετάλλαξη L858Q από την ανάλυση L858R. Συνεπώς, εάν σε ένα δείγμα ασθενούς, υπάρχει μετάλλαξη L858Q, μπορεί να προκύψει αποτέλεσμα «L858R Detected» (Ανιχνεύθηκε L858R).

Επιστάται η προσοχή στις ημερομηνίες λήξης και τις συνθήκες αποθήκευσης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.

# Χαρακτηριστικά επιδόσεων

## Αναλυτικές επιδόσεις

Τα ειδικά χαρακτηριστικά επιδόσεων του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit προσδιορίστηκαν βάσει μελετών όπου χρησιμοποιήθηκαν δοκίμια ιστού FFPE που συλλέχθηκαν από ασθενείς με NSCLC, καθώς και μονιμοποιημένες σε φορμόλη και εγκλεισμένες σε παραφίνη ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (κυτταρικές σειρές FFPE). Η παραγωγή των κυτταρικών σειρών FFPE έγινε με τη χρήση κυτταρικής σειράς από καρκίνωμα πνεύμονα (A549) ώστε να παραχθούν κυτταρικές σειρές που έφεραν τις επιθυμητές ειδικές μεταλλάξεις EGFR. Όταν δεν υπήρχαν διαθέσιμα δοκίμια ιστού ή κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA.

Όριο τυφλού (Limit of Blank, LOB), εύρος εργασίας, οριακές τιμές αποκοπής και εύρος οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$

Εξετάστηκαν συνολικά 417 δείγματα FFPE σε μια μελέτη σύμφωνα με τις οδηγίες NCCLS EP17-A (2004) (12) για τον προσδιορισμό του LOB και των οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  για κάθε ανάλυση μετάλλαξης. Επιπλέον, καθορίστηκε το εύρος εργασίας. Το εύρος οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  περιλαμβάνει ο Πίνακας 9.

**Πίνακας 9. Καθορισμένο εύρος οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub> για κάθε ανάλυση μετάλλαξης**

<b>Ανάλυση</b>	<b>Εύρος C<sub>T</sub></b>	<b>ΔΕύρος οριακών τιμών αποκοπής C<sub>T</sub> (ΔC<sub>T</sub>)</b>
T790M	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 7,40
Ελλείψεις	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,00
L858R	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
L861Q	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
G719X	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
S768I	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
Προσθήκες	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,00

Το εύρος τιμών αντίδρασης υλικού ελέγχου C<sub>T</sub> ορίστηκε από 23,70 έως 31,10 C<sub>T</sub>.

Οι οριακές τιμές αποκοπής της ανάλυσης και το εύρος εργασίας επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση προτύπων και επιπλέον δειγμάτων FFPE. Κατά την επιβεβαίωση, οι οριακές τιμές αποκοπής αξιολογήθηκαν για την ικανότητα διάκρισης της ορθής μετάλλαξης σε υπόβαθρο DNA άγριου τύπου, με την αξιολόγηση κάθε ανάλυσης με εισαγόμενο γονιδιωματικό DNA σε υψηλή συγκέντρωση και εισαγόμενο DNA μετάλλαξης σε υψηλή συγκέντρωση (βλ. «Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα»). Αξιολογήθηκε επίσης η επίδραση του εισαγόμενου DNA στον προσδιορισμό μετάλλαξης (βλ. «Επίδραση του εισαγόμενου DNA στις τιμές ΔC<sub>T</sub>»). Εισάγεται χαμηλότερο όριο στο εύρος για να αποκλειστούν τα πλασματικά ευρήματα φθορισμού PCR.

Για την αξιολόγηση των επιδόσεων του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit απουσία προτύπου και για να διασφαλιστεί ότι ένα τυφλό δείγμα ή ένα δείγμα με DNA άγριου τύπου δεν παράγει αναλυτικό σήμα που ενδέχεται να υποδεικνύει χαμηλή συγκέντρωση μετάλλαξης, αξιολογήθηκαν δείγματα χωρίς πρότυπο και NSCLC EGFR DNA άγριου τύπου. Τα αποτελέσματα δεν κατέδειξαν θετικούς προσδιορισμούς μετάλλαξης για τα δείγματα NTC και τα δείγματα FFPE άγριου τύπου.

## Επίδραση του εισαγόμενου DNA στις τιμές $\Delta C_T$

Το επίπεδο εισαγόμενου DNA ορίζεται ως η συνολική ποσότητα ενισχύσιμου EGFR DNA σε ένα δείγμα, η οποία καθορίζεται από τις τιμές  $C_T$  της αντίδρασης υλικού ελέγχου. Για να καταδειχθεί ότι οι επιδόσεις του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit είναι σταθερές σε ολόκληρο το εύρος τιμών  $C_T$  αντίδρασης υλικού ελέγχου (23,70–31,10), εξετάστηκαν και οι 7 αναλύσεις μετάλλαξης EGFR έναντι μιας σειράς αραιώσεων 6 σημείων σε αναλογία 1 προς 3 (DNA που εκχυλίστηκε από κυτταρικές σειρές FFPE). Η τιμή-στόχος  $C_T$  για την αραιώση 1, για κάθε μετάλλαξη, ήταν περίπου 24,70. Η τελική αραιώση έδωσε  $C_T$  περίπου 32–33, που ήταν εκτός του εύρους τιμών  $C_T$  για την αντίδραση υλικού ελέγχου. Συνολικά, οι τιμές  $\Delta C_T$  που μετρήθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα εισαγωγής ολικού DNA ήταν σταθερές σε ολόκληρο το εύρος εργασίας του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Εξετάστηκε το EGFR DNA άγριου τύπου σε υψηλό επίπεδο εισαγόμενου DNA για την αξιολόγηση της μη ειδικής ενίσχυσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι χαμηλότερες τιμές  $\Delta C_T$  υπερέβαιναν τις καθορισμένες οριακές τιμές αποκοπής, καταδεικνύοντας απουσία μη ειδικής ενίσχυσης.

Οι κυτταρικές σειρές FFPE σε υψηλό επίπεδο εισαγόμενου DNA εξετάστηκαν έναντι όλων των μειγμάτων αντίδρασης για την αξιολόγηση της πιθανής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας. Τα αποτελέσματα δεν κατέδειξαν επίδραση λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των αντιδράσεων μετάλλαξης. Οι ελάχιστες τιμές  $\Delta C_T$  ήταν όλες υψηλότερες από τις αντίστοιχες οριακές τιμές αποκοπής της ανάλυσης για όλα τα μη αντιστοιχισμένα μείγματα αντίδρασης και τα δείγματα DNA.

## Ακρίβεια: Σύγκριση με την αναλυτική μέθοδο αναφοράς

Μια μελέτη κατέδειξε την ύπαρξη συνέπειας στην ανίχνευση μεταλλάξεων του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, η οποία σχετίζεται με την αμφίδρομη αλληλούχιση με τη μέθοδο Sanger. Σε αυτήν τη μελέτη εξετάστηκαν 360 δείγματα FFPE.

Αναλύθηκαν δείγματα που έδωσαν έγκυρα αποτελέσματα τόσο με τη μέθοδο Sanger όσο και με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit για την αξιολόγηση της θετικής ποσοστιαίας συμφωνίας (Positive Percent Agreement, PPA), της αρνητικής ποσοστιαίας συμφωνίας (Negative Percent Agreement, NPA) και της συνολικής ποσοστιαίας συμφωνίας (Overall Percent Agreement, OPA). Αυτά τα ποσοστά, μαζί με τα αντίστοιχα αμφίπλευρα διαστήματα εμπιστοσύνης (ΔΕ) 95%, συνοψίζονται στον Πίνακα 10.

**Πίνακας 10. Ανάλυση συμφωνίας**

Κριτήριο	Ποσοστό συμφωνίας (N)	ΔΕ 95%
Θετική ποσοστιαία συμφωνία	99,4% (157/158)	96,5–100,0%
Αρνητική ποσοστιαία συμφωνία	86,6% (175/202)	81,2–91,0%
Συνολική ποσοστιαία συμφωνία	92,2% (332/360)	89,0–94,8%

Για τα 28 ασυνεπή αποτελέσματα συνολικής εκατοστιαίας συμφωνίας:

- Για 1 δείγμα (3,6%) προέκυψε αποτέλεσμα άγριου τύπου (δηλ. δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit αλλά ανιχνεύθηκε μετάλλαξη με τη μέθοδο Sanger.
- Για 27 δείγματα (96,4%) ανιχνεύθηκε μετάλλαξη με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit αλλά προέκυψε αποτέλεσμα άγριου τύπου με τη μέθοδο Sanger.



---

## Τιμές ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)

Διενεργήθηκε μια μελέτη για τον προσδιορισμό του ορίου LOD καθεμιάς από 29 μεταλλάξεις EGFR. Το όριο LOD ορίστηκε ως η χαμηλότερη ποσότητα μεταλλαγμένου DNA σε υπόβαθρο DNA άγριου τύπου στην οποία ένα μεταλλαγμένο δείγμα δίνει θετικά για μετάλλαξη αποτελέσματα σε 95% των αποτελεσμάτων εξέτασης ( $C_{95}$ ).

Για τον προσδιορισμό του ορίου LOD της κάθε μετάλλαξης, παρασκευάστηκαν δείγματα με διαφορετικά ποσοστά μετάλλαξης σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση εισαγόμενου DNA και εξετάστηκαν με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (Πίνακας 11). Το όριο LOD για κάθε ανάλυση υπολογίστηκε με λογιστική παλινδρόμηση. Για την επαλήθευση του ορίου LOD, εξετάστηκαν δείγματα μετάλλαξης στο LOD που προσδιορίστηκε και έγινε επαλήθευση του ποσοστού θετικών αποτελεσμάτων.

**Πίνακας 11. Οι τιμές LOD καθορίστηκαν με τη χρήση κλινικών δοκιμών FFPE σε χαμηλά και υψηλά επίπεδα εισαγόμενου DNA κυτταρικών σειρών FFPE ή πλασμιδίων**

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

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα

Εξόνιο	Μετάλλαξη	COSMIC* ID	Αλλαγή βάσης	LOD (ποσοστό μεταλλαγμένου)	
				Χαμηλό	Υψηλό
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 <sup>†</sup>	2,18 <sup>‡</sup>
	Προσθήκες	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 <sup>†</sup>	– <sup>§</sup>
		12378	2310_2311insGGT	4,91 <sup>†</sup>	1,31 <sup>†</sup>
		12377	2319_2320insCAC	2,40 <sup>†</sup>	0,65 <sup>†</sup>
	T790M	6240	2369C>T	9,72 <sup>†</sup>	5,09 <sup>†</sup>
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 <sup>†</sup>	1,13 <sup>†</sup>
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 <sup>†</sup>	0,66 <sup>†</sup>

\* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Κατάλογος σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

<sup>†</sup> Οι τιμές LOD καθορίστηκαν με τη χρήση κυτταρικών σειρών

<sup>‡</sup> Οι τιμές LOD καθορίστηκαν με τη χρήση πλασμιδίων

<sup>§</sup> Οι τιμές LOD καθορίστηκαν με τη χρήση κλινικών δειγμάτων

<sup>†</sup> Δεν έγινε αξιολόγηση

## Παρεμβολές

### Επίδραση νεκρωτικού ιστού

Τα κλινικά δοκίμια NSCLC FFPE με περιεχόμενο νεκρωτικού ιστού έως 50%, τόσο για τα EGFR μεταλλαγμένα όσο και τα άγριου τύπου δείγματα, δεν δημιούργησαν παρεμβολές στα αποτελέσματα προσδιορισμού του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

### Εξωγενείς ουσίες

Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες που ήταν παρούσες στη διαδικασία εκχύλισης DNA εξετάστηκαν σε μεταλλαγμένα και άγριου τύπου δείγματα σε συγκέντρωση 10×: κηρός παραφίνης, ξυλόλιο, αιθανόλη και πρωτεΐνωση Κ. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι αυτές οι ουσίες δεν δημιούργησαν παρεμβολές στα αποτελέσματα προσδιορισμού του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Αναπαραγωγιμότητα

### Αναπαραγωγιμότητα από παρτίδα σε παρτίδα

Το σύστημα εξέτασης με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit χρησιμοποιεί 2 ξεχωριστά κιτ: το QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ή το QIAamp DNA FFPE Tissue Kit για την απομόνωση του DNA και το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit για την ενίσχυση του DNA και την ανίχνευση της κατάστασης μετάλλαξης EGFR. Η αναπαραγωγιμότητα από παρτίδα σε παρτίδα και η εναλλαξιμότητα καταδείχθηκαν με τη χρήση 3 παρτίδων του QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit και 3 παρτίδων του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Το συνολικό ποσοστό σωστών προσδιορισμών στις παρτίδες ήταν 97,8% (317/324) για την ανάλυση μεταλλάξεων EGFR και 100% (379/379) για τα δείγματα άγριου τύπου.

### Χειρισμός δοκιμίων

Η αναπαραγωγιμότητα του QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit εξετάστηκε με τη χρήση τομών οι οποίες λήφθηκαν από τρία μπλοκ δοκιμίων FFPE και συγκεκριμένα ένα δείγμα μετάλλαξης έλλειψης στο εξόνιο 19 (2235-2249 del15), ένα δείγμα μετάλλαξης στο εξόνιο 21 L858R και ένα δείγμα άγριου τύπου. Για κάθε δοκίμιο, οι εκχυλίσσεις εκτελέστηκαν εις διπλούν σε 3 κέντρα και εξετάστηκαν σε 3 μη διαδοχικές ημέρες επί διάστημα 6 ημερών, δίνοντας συνολικά 18 σημεία δεδομένων ανά δοκίμιο. Σε κάθε κέντρο, 2 χειριστές διεξήγαγαν την εξέταση χρησιμοποιώντας 1 παρτίδα του QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 παρτίδα ανά κέντρο, 3 παρτίδες συνολικά) σε συνδυασμό με την ίδια παρτίδα αντιδραστηρίων του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit σε όλα τα κέντρα. Τα αποτελέσματα όλων των μεταλλαγμένων και άγριου τύπου δοκιμίων ήταν έγκυρα και οδήγησαν στο αναμενόμενο αποτέλεσμα προσδιορισμού (σωστοί προσδιορισμοί = 100%, 18/18 για κάθε δοκίμιο), γεγονός που υποστηρίζει την αναπαραγωγιμότητα και την επαναληψιμότητα για το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit στο προαναλυτικό βήμα της απομόνωσης του DNA.

---

## Ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα

Η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit διερευνήθηκε με την εξέταση DNA το οποίο εκχυλίστηκε από κλινικά δοκίμια NSCLC FFPE ή κυτταρικές σειρές FFPE, που αντιπροσώπευαν και τις επτά αναλύσεις μετάλλαξης στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν επίσης κλινικά δοκίμια NSCLC FFPE άγριου τύπου (Πίνακας 12).

Εφαρμόστηκε ένα σχέδιο μελέτης πινάκων για να αξιολογηθεί η αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης μέσω της εξέτασης δειγμάτων σε 3 εργαστήρια (κέντρα), με 3 παρτίδες του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 παρτίδες σε 3 κέντρα), με 2 χειριστές ανά κέντρο, σε 2 όργανα ανά κέντρο, όπου το κάθε δείγμα (που παρασκευάστηκε σε επίπεδο κοντά στο όριο LOD) εξετάστηκε εις διπλούν, επί συνολικό διάστημα 16 ημερών. Η αναπαραγωγιμότητα για την κάθε επιμέρους μετάλλαξη εξετάστηκε σε μη διαδοχικές ημέρες σε κάθε κέντρο. Την αναλογία των σωστών προσδιορισμών παραθέτει ο Πίνακας 12 στην επόμενη σελίδα.

**Πίνακας 12. Αναπαραγωγιμότητα ανάλυσης – αναλογία σωστών προσδιορισμών για τις μεταλλάξεις EGFR που εξετάστηκαν**

Εξόνιο	Μετάλλαξη	COSMIC* ID	Προσδιορισμοί		Ποσοστό (%) σωστών Κατώτατο μόνοπλευρο ΔΕ 95%
			Σωστοί/σύνολο σωστών	ποσοστό (%)	
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Ελλείψεις	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
	Προσθήκες	12376	92/92	100	96,80
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
T790M	6240	92/92	100	96,80	
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Άγριου τύπου	—	—	77/78	98,72	94,06

\* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Κατάλογος σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

---

Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διασποράς δειγμάτων για την εκτίμηση της τυπικής απόκλισης και των διαστημάτων εμπιστοσύνης 95%, για τη μεταβλητότητα εντός μίας εκτέλεσης ανάλυσης, μεταξύ εκτελέσεων ανάλυσης, μεταξύ ημερών, μεταξύ παρτίδων και μεταξύ κέντρων. Για όλες τις συνιστώσες διασποράς, ο συνολικός συντελεστής μεταβλητότητας (Coefficient of Variation, CV) ήταν  $\leq 14,11\%$  για όλες τις μεταλλάξεις EGFR που εξετάστηκαν. Για όλα τα μέλη ομάδων μεταλλαγμένων σειρών, ο εκατοστιαίος CV ήταν  $\leq 8,33\%$  μεταξύ παρτίδων, μεταξύ ημερών και μεταξύ εκτελέσεων ανάλυσης. Ο εκατοστιαίος CV για τη μεταβλητότητα εντός μίας εκτέλεσης ανάλυσης (επαναληψιμότητα/ακρίβεια) κυμάνθηκε από 5,99% έως 13,49%.

# Κλινική απόδοση

## Δεδομένα κλινικών εκβάσεων: GIOTRIF®

Η κλινική δοκιμή LUX-Lung 3 ήταν μια διεθνής, πολυκεντρική, ανοιχτή, τυχαίοποιημένη δοκιμή Φάσης 3 της αφατινίμπης έναντι χημειοθεραπείας ως θεραπείας πρώτης γραμμής για ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα σταδίου IIIB ή IV που φέρουν μια μετάλλαξη ενεργοποίησης του EGFR (ClinicalTrials.gov αριθμ. NCT00949650). Η καταλληλότητα ενός ασθενή για ένταξη στη μελέτη προσδιορίστηκε με εξέταση της κατάστασης μετάλλαξης EGFR του ασθενή με τη χρήση της ανάλυσης κλινικής δοκιμής (Clinical Trial Assay, CTA). Η αναδρομική εξέταση των δοκιμών ιστών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Διεξήχθη μια συγκριτική μελέτη για την αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit και της CTA.

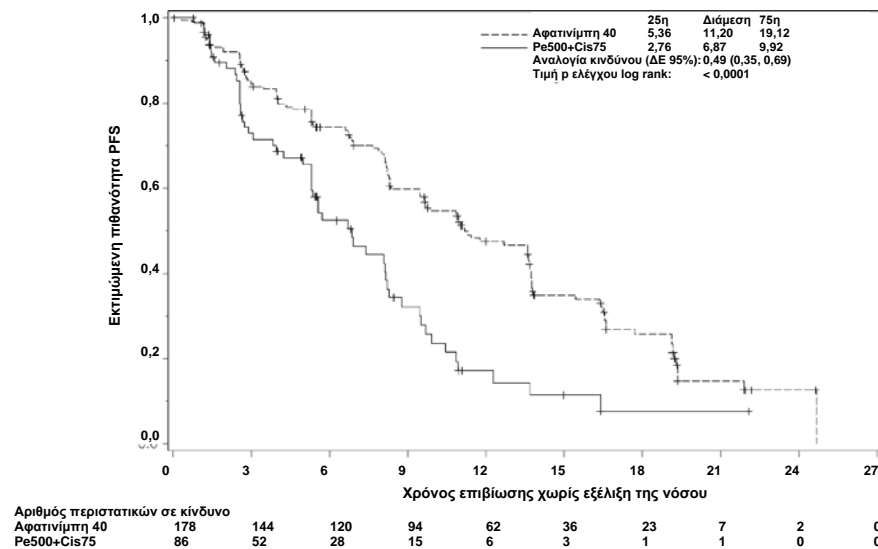
Με βάση τα αποτελέσματα της εξέτασης CTA, 345 ασθενείς ανήκαν στο σύνολο που τυχαιοποιήθηκε (αφατινίμπη: 230 ασθενείς, χημειοθεραπεία: 115 ασθενείς). Η κύρια έκβαση αποτελεσματικότητας ήταν η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression-Free Survival, PFS) που αξιολογήθηκε από μια ανεξάρτητη επιτροπή εξέτασης (Independent Review Committee, IRC). Από τους 345 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν, δείγματα νεοπλασιών από 264 ασθενείς (αφατινίμπη: 178 ασθενείς, χημειοθεραπεία: 86 ασθενείς) εξετάστηκαν αναδρομικά με τη χρήση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Στατιστικά σημαντική βελτίωση της PFS, όπως αυτή καθορίστηκε από IRC, καταδείχθηκε για τους ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν σε αφατινίμπη συγκριτικά με εκείνους που τυχαιοποιήθηκαν σε χημειοθεραπεία, στον συνολικό πληθυσμό CTA+ και στον πληθυσμό *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+. Τα συνολικά αποτελέσματα αποτελεσματικότητας συνοψίζονται στον Πίνακα 13 και την Εικόνα 19.



Πίνακας 13. Κλινικό όφελος των ασθενών που εξετάστηκαν με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit στον πληθυσμό της κλινικής μελέτης LUX-Lung 3

Παράμετρος	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/ Πληθυσμός CTA+ n = 264		Πληθυσμός CTA+, n = 345	
	Χημειοθεραπεία Αφατίνιμπη n = 86	n = 178	Χημειοθεραπεία n = 115	Αφατίνιμπη n = 230
<b>Επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου</b> (Progression-Free Survival, PFS)				
Αριθμός θανάτων ή περιστατικών εξέλιξης της νόσου, N (%)	53 (61,6%)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
Διάμεση τιμή PFS (μήνες)	6,9	11,2	6,9	11,1
Διάμεση τιμή PFS ΔΕ 95%	5,3, 8,2	9,7, 13,7	5,4, 8,2	9,6, 13,6
Αναλογία κινδύνου (Hazard Ratio, HR)	0,49		0,58	
Αναλογία κινδύνου ΔΕ 95%	0,35, 0,69		0,43, 0,78	
P-τιμή (στρωματοποιημένο log-rank test)*	< 0,0001		< 0,001	

\* Στρωματοποίηση ανάλογα με την κατάσταση μετάλλαξης EGFR και τη φυλή.



Εικόνα 19. Καμπύλη Kaplan-Meier για την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression-Free Survival, PFS) από ανεξάρτητη εξέταση ανάλογα με την ομάδα θεραπείας (πληθυσμός *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+).

Η ανάλυση του υποσυνόλου *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ (n = 264) κατέδειξε ότι όσοι ασθενείς έλαβαν θεραπεία με αφατινίμη εμφάνισαν σημαντική αύξηση του χρόνου PFS (διάμεση τιμή PFS 11,2 μήνες έναντι 6,9 μηνών) και είχαν λιγότερες πιθανότητες να σημειωθεί εξέλιξη της νόσου ή θάνατος [HR = 0,49, ΔΕ 95% (0,35, 0,69), p < 0,0001] σε σχέση με τους ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία. Το κλινικό όφελος που παρατηρήθηκε στο υποσύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ήταν συγκρίσιμο με εκείνο που παρατηρήθηκε στον πλήρη πληθυσμό της μελέτης (n = 345).

## Δεδομένα κλινικών εκβάσεων: IRESSA®

Η δοκιμή IFUM (IRESSA Follow-up Measure) ήταν μια ανοικτή μελέτη ενός σκέλους φάσης IV (NCT01203917) για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας/ανεκτικότητας της γεφινιμίτης ως θεραπείας πρώτης γραμμής σε Καυκάσιους ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό NSCLC σταδίου IIIA/B/IV, θετικό σε μετάλλαξη του EGFR. Η μελέτη IFUM σχεδιάστηκε για την αξιολόγηση του αντικειμενικού ποσοστού ανταπόκρισης σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST σε προοπτικά επιλεγμένους Καυκάσιους ασθενείς με NSCLC και μετάλλαξη του EGFR.

Οι κατάλληλοι για συμμετοχή στη μελέτη ασθενείς έπρεπε να φέρουν έλλειψη στο εξόνιο 19 του EGFR, μετάλλαξη αντικατάστασης L858R, L861Q ή G719X και καμία μετάλλαξη T790M ή S768I ή προσθήκες στο εξόνιο 20 σε δοκίμια όγκων, σύμφωνα με τον προοπτικό προσδιορισμό τους βάσει της ανάλυσης κλινικής δοκιμής (Clinical Trial Assay, CTA). Πραγματοποιήθηκε αναδρομική εξέταση δοκιμών από ασθενείς υποψήφιους για συμμετοχή στην κλινική δοκιμή IFUM, με χρήση του βοηθητικού διαγνωστικού *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Διεξήχθη μια συγκριτική μελέτη για την αξιολόγηση της συμφωνίας του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit με τη CTA που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή ασθενών για την κλινική δοκιμή IFUM. Η συνολική συμφωνία των δύο αναλύσεων ως προς την ανίχνευση ελλείψεων στο εξόνιο 19 του EGFR και μετάλλαξης L858R ήταν 98,2% (n = 700/713, ΔΕ 95%: 96,9%, 99,0%) με PPA 88,2% (n = 90/102; ΔΕ 95%: 80,4%, 93,8%) και NPA 99,8% (n = 610/611, ΔΕ 95%: 99,1%, 100,0%).

Ελήφθησαν αποτελέσματα της εξέτασης CTA για 859 υποψήφιους για τη δοκιμή ασθενείς, εκ των οποίων οι 106 ασθενείς ήταν κατάλληλοι για θεραπεία με γεφτινίμπη. Από τα 859 δείγματα για τα οποία ελήφθη αποτέλεσμα βάσει της CTA, τα 765 δείγματα ήταν διαθέσιμα για αναδρομική εξέταση με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, και μεταξύ αυτών 87 δείγματα ήταν θετικά για μετάλλαξη του EGFR βάσει τόσο της CTA όσο και του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Η κύρια έκβαση αποτελεσματικότητας ήταν το αντικειμενικό ποσοστό ανταπόκρισης (Objective Response Rate, ORR) που εκτιμήθηκε βάσει τυφλοποιημένης, ανεξάρτητης κεντρικής αξιολόγησης (Blinded Independent Central Review, BICR) και της αξιολόγησης από ερευνητές. Το κλινικό όφελος που παρατηρήθηκε στο υποσύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ήταν συγκρίσιμο με εκείνο που παρατηρήθηκε σε ολόκληρο τον πληθυσμό της μελέτης.

Τα συνολικά αποτελέσματα αποτελεσματικότητας συνοψίζονται στον Πίνακα 14.

**Πίνακας 14. Κλινικό όφελος των ασθενών που εξετάστηκαν με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit στον πληθυσμό της κλινικής δοκιμής IFUM**

Παράμετρος	Πληθυσμός <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+, n = 87	Πληθυσμός CTA+, n = 106
<b>Αντικειμενικό ποσοστό ανταπόκρισης (Objective Response Rate, ORR) βάσει BICR</b>		
Αριθμός ανταποκρίσεων (N)	42	53
ORR, % (95% CI)	48,3 (38,1-58,6)	50,0 (40,6-59,4)
Διάρκεια διάρκειας ανταπόκρισης (μήνες)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
<b>Αντικειμενικό ποσοστό ανταπόκρισης (Objective Response Rate, ORR) σύμφωνα με τους ερευνητές</b>		
Αριθμός ανταποκρίσεων (N)	62	74
ORR, % (95% CI)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Διάρκεια διάρκειας ανταπόκρισης (μήνες)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

**BICR:** Τυφλοποιημένη, ανεξάρτητη κεντρική αξιολόγηση. **CI:** Διάστημα εμπιστοσύνης. **CTA:** Ανάλυση κλινικής δοκιμής.

**Σημείωση:** «Kit+» είναι τα αποτελέσματα που είναι θετικά για ελλείψεις στο εξόνιο 19 deletions/L8585R/L861Q/G719X.

---

Δεδομένου ότι το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit δεν χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή ασθενών για την κλινική δοκιμή IFUM, διεξήχθησαν επιπρόσθετες αναλύσεις αποτελεσματικότητας για την εξέταση ασθενών που δεν συμπεριλήφθηκαν στη δοκιμή, επειδή τα αποτελέσματά τους από τη CTA ήταν αρνητικά, αλλά θα είχαν θετικά αποτελέσματα με χρήση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (δηλ. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), καθώς και ασθενείς που εισήχθησαν στη μελέτη, αλλά δεν έλαβαν έγκυρα αποτελέσματα από την επανεξέταση με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (δηλ. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit άγνωστο/CTA+). Τα αποτελέσματα από όλες τις υποθετικές αναλύσεις ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοια με εκείνα της κύριας ανάλυσης αποτελεσματικότητας.

---













## Βιβλιογραφία

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* 23, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525.
3. Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-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. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 12, 4416s.
  10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
  11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752.
  12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

# Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση:

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις
	Ημερομηνία λήξης
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού
	Φυλάσσεται προστατευμένο από το φως
	Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας
Rn	Η ένδειξη R αφορά την αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης (εγχειρίδιο) και n είναι ο αριθμός αναθεώρησης
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Προσοχή

# Παράρτημα A: Μη αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Στην παρούσα ενότητα περιλαμβάνονται οδηγίες για τη χρήση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit με το λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή μεταγενέστερη, σε ανοιχτή κατάσταση λειτουργίας (δηλ. χωρίς χρήση του Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

## Γενικές πληροφορίες

- Για μια λίστα με τα υλικά που απαιτούνται, βλ. «Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται».
- Για πλήρεις πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία των δειγμάτων και τη διάταξη των δειγμάτων, βλ. «Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων» και «Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR».
- Πριν από την έναρξη κάθε ανάλυσης, βεβαιωθείτε ότι οι παράμετροι κυκλοποίησης είναι σωστές.

## Πρωτόκολλο: Δημιουργία ενός προφίλ θερμοκρασίας

Προτού ξεκινήσετε, δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας για την ανάλυση με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Οι ίδιες παράμετροι κυκλοποίησης χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση δείγματος DNA και την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR.

## Διαδικασία

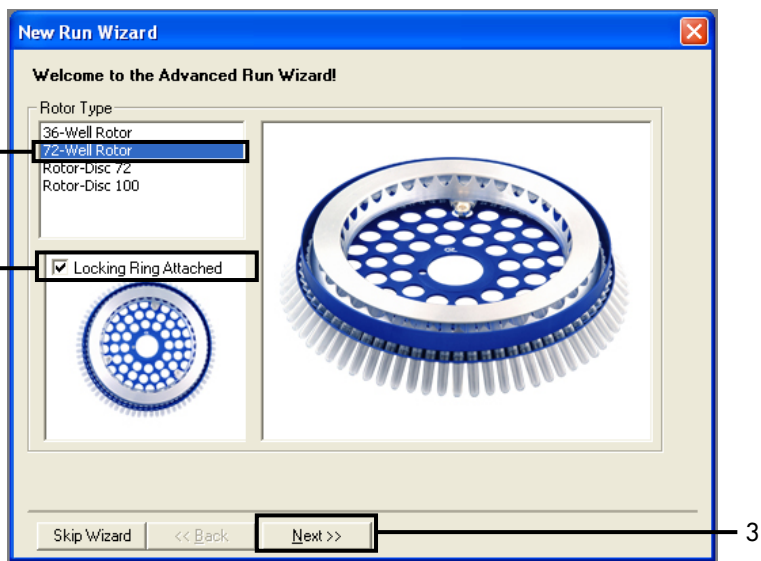
Η σύνοψη των παραμέτρων κυκλοποίησης περιλαμβάνεται στον Πίνακα 15.



Πίνακας 15. Προφίλ θερμοκρασίας

Κύκλοι	Θερμοκρασία	Ωρα	Λήψη δεδομένων
1	95°C	15 λεπτά	Κανένα
40	95°C	30 δευτερόλεπτα	Κανένα
	60°C	60 δευτερόλεπτα	Green και Yellow

1. Κάντε διπλό κλικ στο εικονίδιο του λογισμικού **Rotor-Gene Q Series Software 2.3** στην επιφάνεια εργασίας του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Για να δημιουργήσετε ένα νέο πρότυπο επιλέξτε **Empty Run** (Κενή εκτέλεση) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο **New** (Νέα) για να μεταβείτε στο «**New Run Wizard**» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).
3. Στον τύπο ρότορα επιλέξτε «**72-Well Rotor**» (Ρότορας 72 βυθισμάτων). Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος και επισημάνετε το πλαίσιο **Locking Ring Attached** (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κάντε κλικ στο «**Next**» (Επόμενο) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης). 1 = «Rotor type» (Τύπος ρότορα), 2 = πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος), 3 = «Next» (Επόμενο).

4. Πληκτρολογήστε το όνομα του χειριστή. Προσθέστε τυχόν σημειώσεις και δώστε την τιμή 25 ως όγκο αντίδρασης. Βεβαιωθείτε ότι έχουν καθοριστεί οι τιμές 1, 2, 3... στο πεδίο **Sample Layout** (Διάταξη δειγμάτων). Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 21).

**New Run Wizard**

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

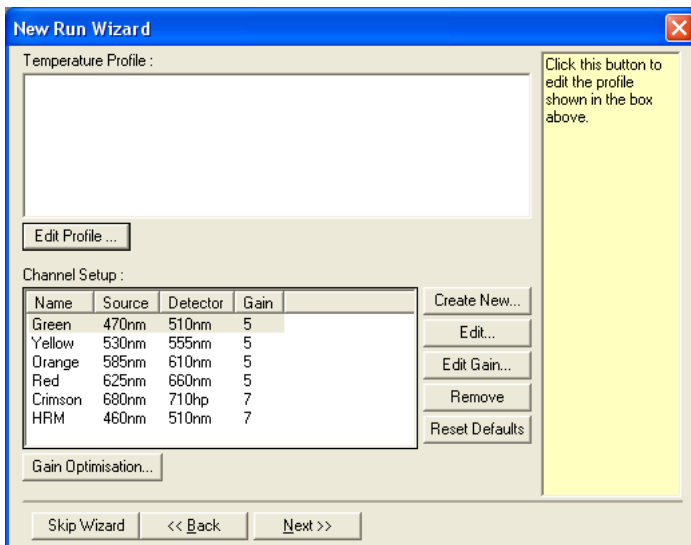
1

2

3

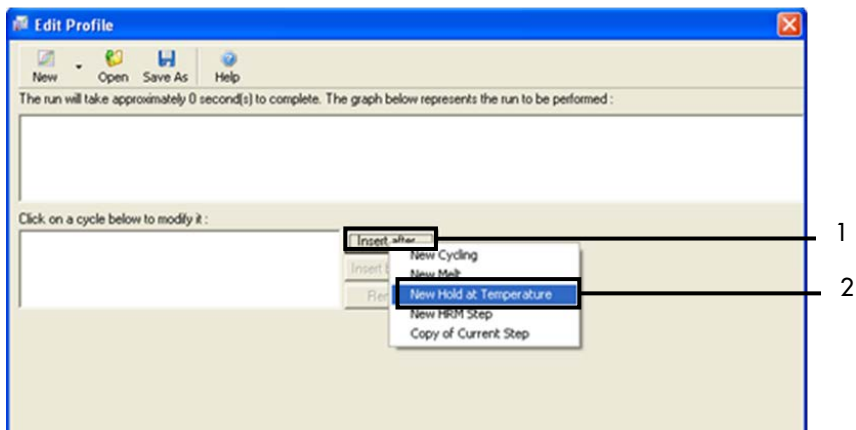
**Εικόνα 21. Εισαγωγή ονόματος χειριστή και όγκων αντίδρασης.** 1 = πεδίο διαλόγου «Operator» (Χειριστής) και πεδίο διαλόγου «Notes» (Σημειώσεις), 2 = πεδίο «Reaction Volume» (Όγκος αντίδρασης) και πεδίο «Sample Layout» (Διάταξη δειγμάτων), 3 = «Next» (Επόμενο).

5. Κάντε κλικ στο Edit Profile (Επεξεργασία προφίλ) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης) (Εικόνα 22) και επιλέξτε τις παραμέτρους εκτέλεσης σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα.



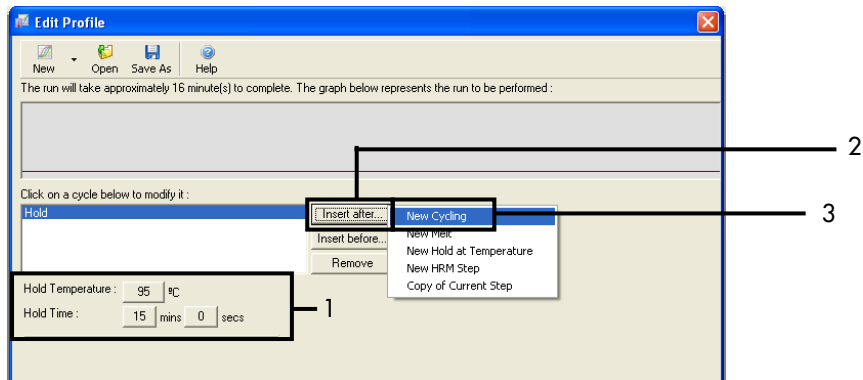
Εικόνα 22. «Edit Profile» (Επεξεργασία προφίλ) στο «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).

6. Κάντε κλικ στο κουμπί **Insert after** (Εισαγωγή μετά από) και επιλέξτε **New Hold at Temperature** (Νέα θερμοκρασία διατήρησης) (Εικόνα 23).



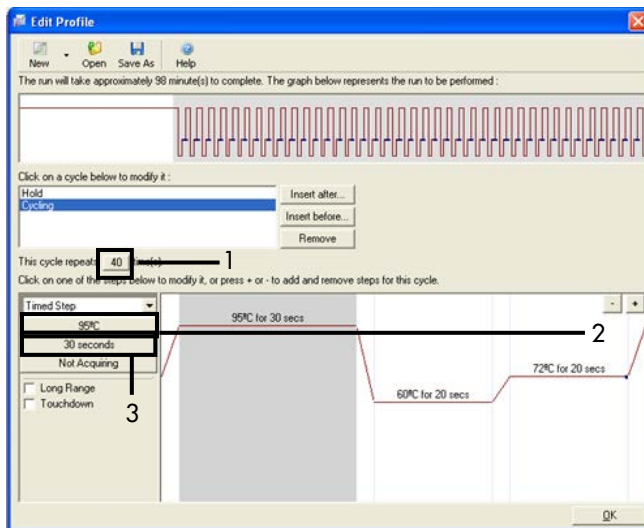
Εικόνα 23. Εισαγωγή ενός αρχικού βήματος επώασης. 1 = «Insert after» (Εισαγωγή μετά από); 2 = «New Hold at Temperature» (Νέα θερμοκρασία διατήρησης).

7. Ρυθμίστε την τιμή του πεδίου **Hold Temperature** (Θερμοκρασία διατήρησης) στους 95 °C και την τιμή του πεδίου **Hold Time** (Χρόνος διατήρησης) σε 15 mins 0 secs (15 λεπτά 0 δευτερόλεπτα). Κάντε κλικ στο **Insert After** (Εισαγωγή μετά από) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **New Cycling** (Νέα κυκλοποίηση) (Εικόνα 24).



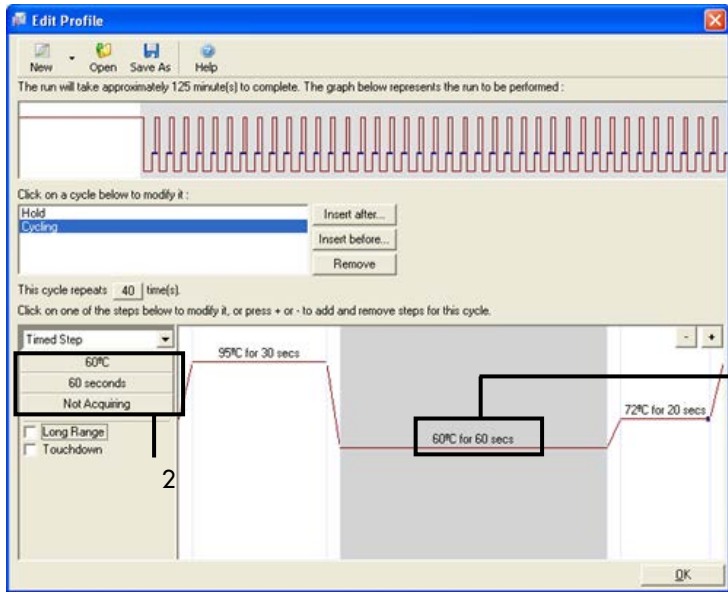
Εικόνα 24. Αρχικό βήμα επώασης στους 95°C. 1 = «Hold Temperature» (Θερμοκρασία διατήρησης) και «Hold Time» (Χρόνος διατήρησης), 2 = «Insert after» (Εισαγωγή μετά από), 3 = «New Cycling» (Νέα κυκλοποίηση).

8. Ορίστε τον αριθμό επαναλήψεων κύκλου σε **40**. Επιλέξτε το πρώτο βήμα και ρυθμίστε σε **95 °C** για **30 δευτερόλεπτα** (Εικόνα 25).



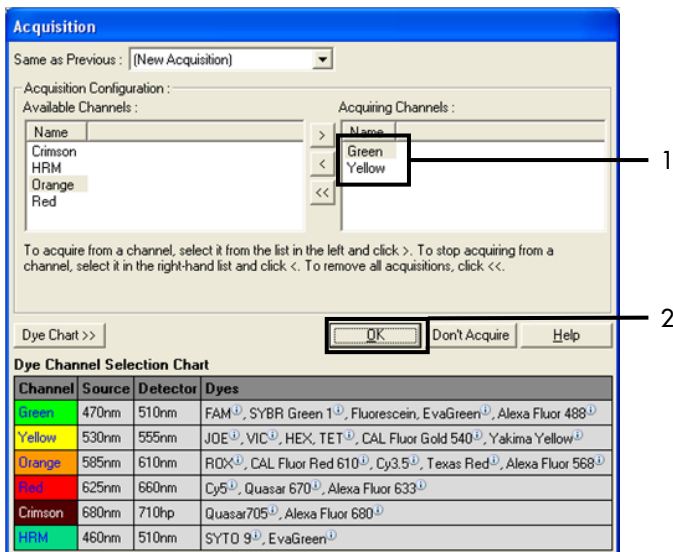
**Εικόνα 25. Βήμα κυκλοποίησης στους 95°C.** 1 = πλαίσιο «Cycle repeats» (Επαναλήψεις κύκλου), 2 = Πρώτο βήμα: ρύθμιση θερμοκρασίας, 3 = Πρώτο βήμα: ρύθμιση χρόνου.

9. Επισημάνετε το δεύτερο βήμα και ρυθμίστε σε **60°C** για **60 δευτερόλεπτα**. Κάντε κλικ στο **Not Acquiring** (Δεν γίνεται λήψη) για να ενεργοποιήσετε τη λήψη δεδομένων σε αυτό το βήμα (Εικόνα 26).



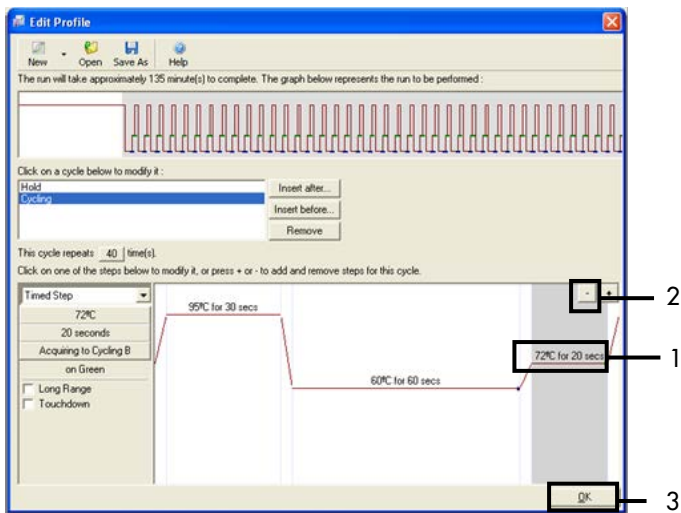
**Εικόνα 26. Βήμα κυκλοποίησης στους 60°C.** 1 = Δεύτερο βήμα: ρύθμιση θερμοκρασίας και χρόνου, 2 = κουμπί «Not Acquiring» (Δεν γίνεται λήψη).

10. Επιλέξτε **Green** και **Yellow** ως κανάλια λήψης. Κάντε κλικ στο > για να μεταφέρετε αυτά τα κανάλια από τη λίστα **Available Channels** (Διαθέσιμα κανάλια) στην ενότητα **Acquiring Channels** (Κανάλια λήψης). Κάντε κλικ στο **OK** (Εικόνα 27).



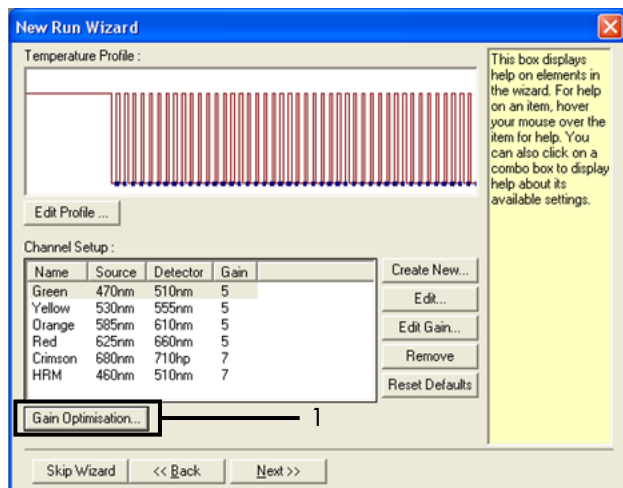
Εικόνα 27. Λήψη στο βήμα κυκλοποίησης των 60°C. 1 = Επιλεγμένα κανάλια, 2 = «OK».

11. Επισημάνετε το τρίτο βήμα και εκτελέστε διαγραφή κάνοντας κλικ στο -. Κάντε κλικ στο **OK** (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Διαγραφή του βήματος επέκτασης. 1 = Τρίτο βήμα, 2 = Διαγραφή, 3 = «OK».

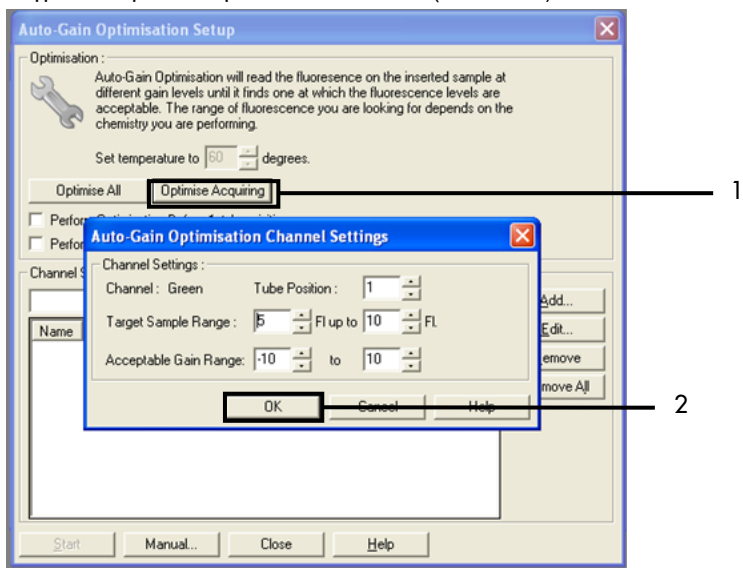
12. Στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου, κάντε κλικ στο **Gain Optimisation** (Βελτιστοποίηση απολαβής) (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Gain Optimisation (Βελτιστοποίηση απολαβής) (1).

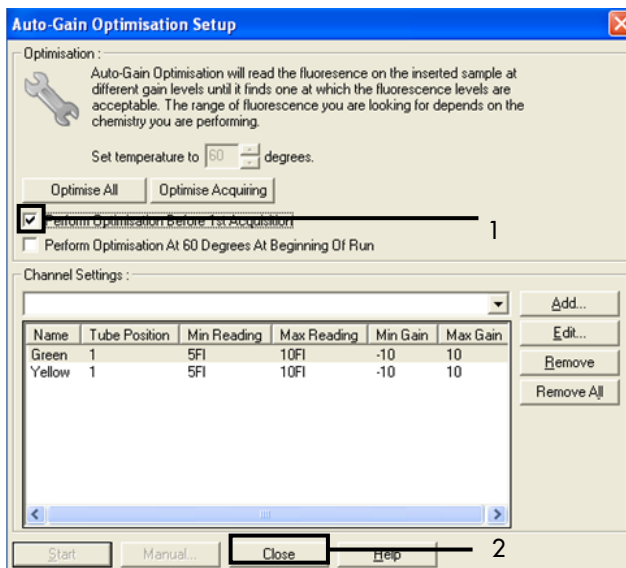


13. Κάντε κλικ στο **Optimise Acquiring** (Βελτιστοποίηση λήψης). Εμφανίζονται οι ρυθμίσεις καναλιού για κάθε κανάλι. Κάντε κλικ στο **OK** για αποδοχή αυτών των προεπιλεγμένων τιμών και για τα δύο κανάλια. (Εικόνα 30).



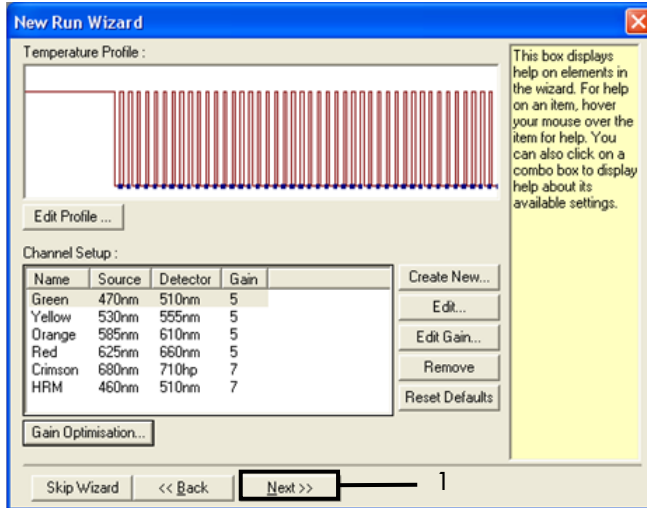
**Εικόνα 30. Αυτόματη βελτιστοποίηση απολαβής για το κανάλι Green.** 1 = «Optimise Acquiring» (Βελτιστοποίηση λήψης), 2 = «OK».

14. Επισημάνετε το πλαίσιο **Perform Optimisation before 1st Acquisition** (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την 1η λήψη) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο κουμπί **Close** (Κλείσιμο) για να επιστρέψετε στον οδηγό (Εικόνα 31).



**Εικόνα 31. Επιλογή των καναλιών Green και Yellow.** 1 = πλαίσιο ελέγχου «Perform Optimisation Before 1st Acquisition» (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την 1η λήψη), 2 = «Close» (Κλείσιμο).

15. Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 32). Κάντε κλικ στο **Save Template** (Αποθήκευση προτύπου) για να αποθηκεύσετε το πρότυπο του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (αρχείο \*.ret) σε κατάλληλη θέση.



Εικόνα 32. «Next» (Επόμενο) (1).

# Διαδικασία (μη αυτοματοποιημένη)

## Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων (μη αυτοματοποιημένη)

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου DNA στα δείγματα και θα πρέπει να διεξάγεται πριν από την ανάλυση μεταλλάξεων EGFR.

- Παρασκευάστε τα δείγματα όπως περιγράφεται στην ενότητα «Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δειγμάτων» μέχρι το βήμα 11.
- Προετοιμάστε την εκτέλεση PCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM όπως περιγράφεται στην ενότητα «Πρωτόκολλο: Ρύθμιση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit σε όργανο Rotor-Gene Q».
- Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με τις οδηγίες στην ενότητα «Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων».

## Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR (μη αυτοματοποιημένη)

- Μετά την επιτυχή αξιολόγηση του δείγματος, αυτό μπορεί να υποβληθεί σε εξέταση για την ανίχνευση μεταλλάξεων του EGFR.
- Παρασκευάστε τα δείγματα όπως περιγράφεται στην ενότητα «Πρωτόκολλο: ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR» μέχρι το βήμα 11.
- Προετοιμάστε την εκτέλεση PCR στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM όπως περιγράφεται στην ενότητα «Πρωτόκολλο: Ρύθμιση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit σε όργανο Rotor-Gene Q».
- Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με τις οδηγίες στην ενότητα «Ανάλυση δεδομένων ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR».

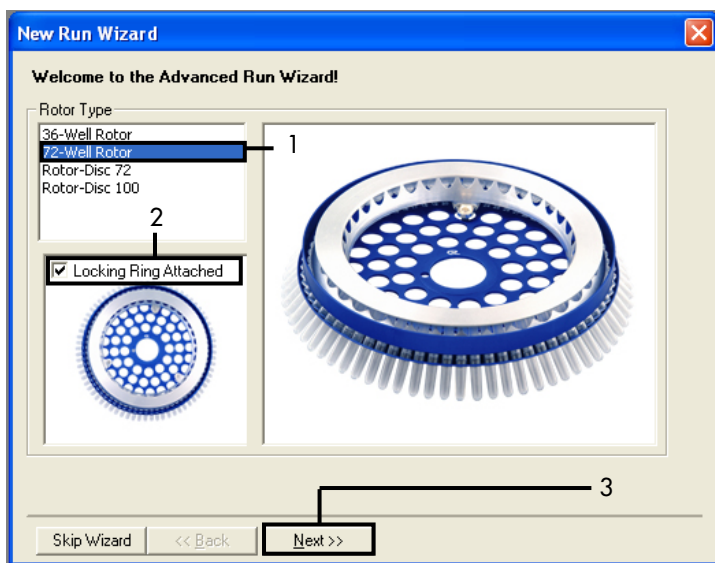
## Πρωτόκολλο: Ρύθμιση του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit σε όργανο Rotor-Gene Q

### Διαδικασία

1. Ανοίξτε το λογισμικό της σειράς Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή μεταγενέστερη και ανοίξτε το κατάλληλο προφίλ θερμοκρασίας για το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (αρχείο \*.ret).

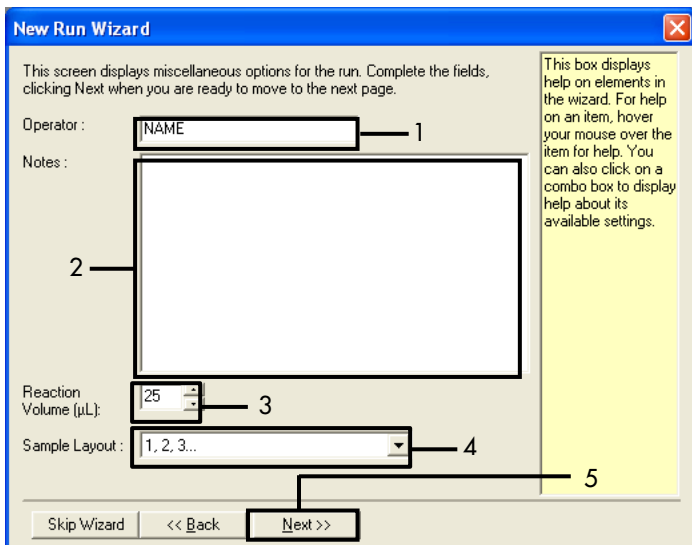
Για οδηγίες σχετικά με τη δημιουργία του προφίλ θερμοκρασίας και τον έλεγχο των παραμέτρων εκτέλεσης, βλ. «Πρωτόκολλο: Δημιουργία ενός προφίλ θερμοκρασίας».

2. Βεβαιωθείτε ότι είναι επιλεγμένος ο σωστός ρότορας και επισημάνετε το πλαίσιο **Locking Ring Attached** (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 33).



Εικόνα 33. Πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) και οθόνη υποδοχής.  
1 = «Rotor type» (Τύπος ρότορα), 2 = πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος),  
3 = «Next» (Επόμενο).

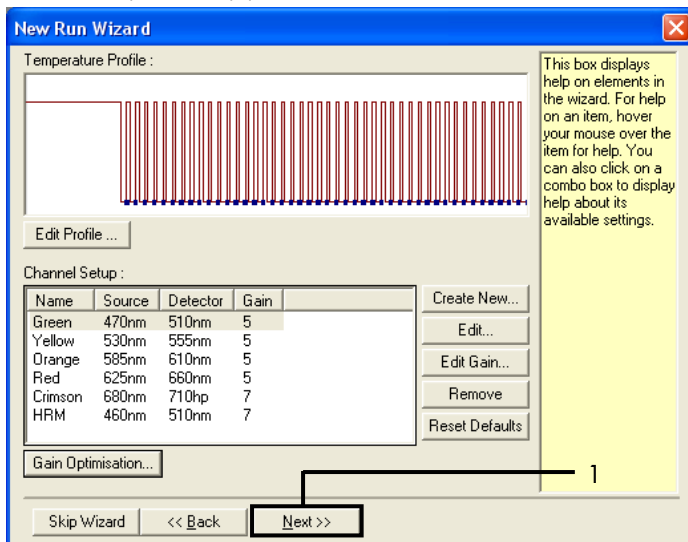
3. Πληκτρολογήστε το όνομα του χειριστή. Προσθέστε τυχόν σημειώσεις, επιβεβαιώστε ότι ο όγκος αντίδρασης έχει οριστεί σε 25 και ότι το πεδίο **Sample Layout** (Διάταξη δειγμάτων) περιέχει την τιμή 1, 2, 3... Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34.** Η οθόνη επιλογών «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης). 1 = «Operator» (Χειριστής), 2 = πεδίο «Notes» (Σημειώσεις), 3 = «Reaction Volume» (Όγκος αντίδρασης), 4 = «Sample Layout» (Διάταξη δειγμάτων), 5 = «Next» (Επόμενο).

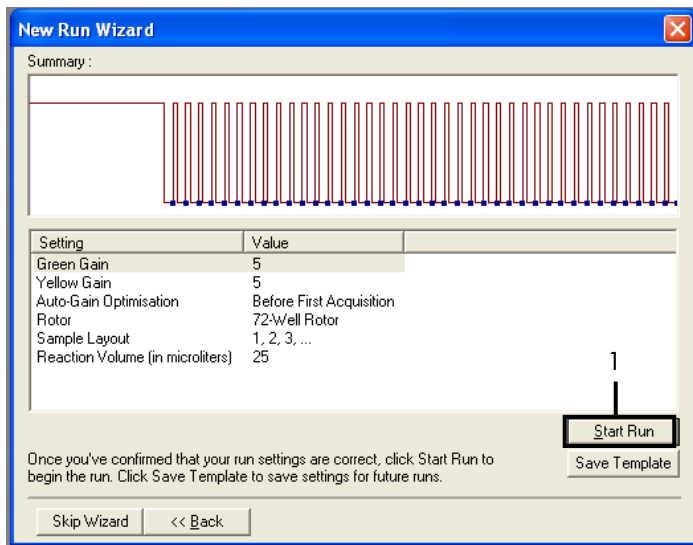
**Σημείωση:** Στο επόμενο παράθυρο είναι δυνατή η επεξεργασία του προφίλ θερμοκρασίας. (Δεν απαιτείται επεξεργασία, επειδή το προφίλ θερμοκρασίας δημιουργήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες στην ενότητα «Πρωτόκολλο: Δημιουργία ενός προφίλ θερμοκρασίας».)

4. Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) και οθόνη επεξεργασίας θερμοκρασίας [1 = «Next» (Επόμενο)].

5. Επαληθεύστε τη σύνοψη και κάντε κλικ στο **Start Run** (Έναρξη εκτέλεσης) για να αποθηκεύσετε το αρχείο εκτέλεσης και να ξεκινήσει η εκτέλεση (Εικόνα 36).



Εικόνα 36. Πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης) και οθόνη σύνοψης [1 = «Start Run» (Έναρξη εκτέλεσης)].

6. Εκτελέστε ένα από τα παρακάτω βήματα στο νέο παράθυρο που εμφανίζεται μετά την έναρξη της εκτέλεσης:

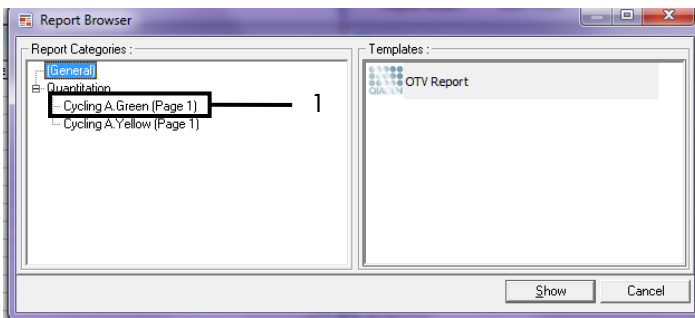
- Εισαγάγετε τα ονόματα των δειγμάτων.
- Πατήστε **Finish** (Τέλος) και εισαγάγετε τα ονόματα των δειγμάτων αργότερα. Για αυτήν τη διαδικασία, επιλέξτε **Sample** (Δείγμα) στη διάρκεια της εκτέλεσης ή αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση.

**Σημαντικό:** Εάν κάνετε κλικ στο Finish and Lock Samples (Τέλος και κλείδωμα δειγμάτων), δεν θα μπορείτε πλέον να επεξεργαστείτε τα ονόματα των δειγμάτων. Θα πρέπει να δίνετε ιδιαίτερη προσοχή κατά τη συμπλήρωση των ονομάτων δειγμάτων, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή δοκιμασία και ανάλυση των δειγμάτων.

**Σημείωση:** Κατά την ονοματοδότηση των δειγμάτων, τα πεδία για τα κενά σωληνάρια θα πρέπει να παραμείνουν κενά στη στήλη «**Name**» (Όνομα).

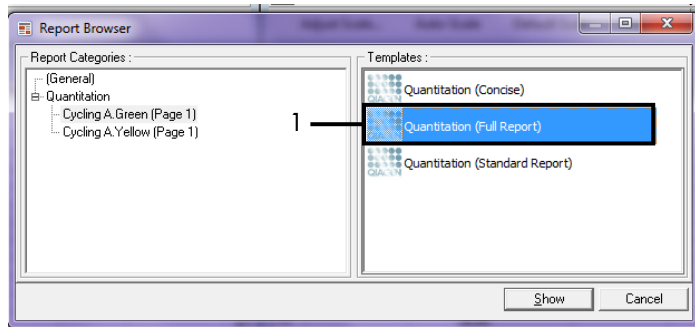


7. Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με την ενότητα «Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων» ή την ενότητα «Ανάλυση δεδομένων ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR», κατά περίπτωση.
8. Εάν απαιτούνται αναφορές ποσοτικοποίησης, κάντε κλικ στο εικονίδιο **Reports** (Αναφορές) στη γραμμή εργαλείων του αρχείου εκτέλεσης για το Rotor-Gene Q.
9. Στον φυλλομετρητή αναφορών, κάντε κλικ στο **Cycling A Green (page 1)** [Cycling A. Green (σελίδα 1)] στο μενού «Report Categories» (Κατηγορίες αναφορών) (Εικόνα 37).



Εικόνα 37. Φυλλομετρητής αναφορών (1 = «Cycling A. Green [Page 1]» [Cycling A. Green (σελίδα 1)]).

10. Επιλέξτε **Quantitation (Full Report)** [Ποσοτικοποίηση (Πλήρης αναφορά)] από το μενού «Templates» (Πρότυπα) (Εικόνα 38).



Εικόνα 38. Αναφορά ποσοτικοποίησης (πλήρης αναφορά) (1).

- 
11. Για να δημιουργήσετε την αναφορά, κάντε κλικ στο **Show** (Εμφάνιση).
  12. Κάντε κλικ στο **Save As** (Αποθήκευση ως) για να αποθηκεύσετε ένα αντίγραφο σε ηλεκτρονική μορφή.
  13. Επαναλάβετε τα βήματα για το **Cycling A Yellow (Page 1)** [Cycling A. Yellow (σελίδα 1)].

# Ερμηνεία αποτελεσμάτων (Μη αυτοματοποιημένη μέθοδος)

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης με το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (για αξιολόγηση δείγματος DNA ή ανάλυση μεταλλάξεων EGFR), προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με τις παρακάτω διαδικασίες:

- Ρυθμίσεις λογισμικού για την ανάλυση
- Ανάλυση της αξιολόγησης δειγμάτων DNA (μη αυτοματοποιημένη)  
**Σημείωση:** Για τη διάταξη των σωληναρίων, ανατρέξτε στον Πίνακα 4.
- Ανάλυση ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR (μη αυτοματοποιημένη)  
**Σημείωση:** Για τη διάταξη των σωληναρίων, ανατρέξτε στον Πίνακα 7.

## Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης

1. Ανοίξτε το κατάλληλο αρχείο εκτέλεσης (\*.rex) με τη χρήση του λογισμικού σειράς Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή μεταγενέστερη.
2. Εάν τα δείγματα δεν έχουν ονομαστεί πριν από την εκτέλεση, κάντε κλικ στο **Edit Samples** (Επεξεργασία δειγμάτων).
3. Εισαγάγετε τα ονόματα δειγμάτων στη στήλη **Name** (Όνομα).  
**Σημείωση:** Αφήστε κενά τα ονόματα τυχόν κενών σωληναρίων.
4. Κάντε κλικ στο **Analysis** (Ανάλυση). Στη σελίδα της ανάλυσης, κάντε κλικ στο **Cycling A. Yellow** για να ελέγξετε το κανάλι Yellow (HEX).
5. Κάντε κλικ στο **Named On** (Ονομασμένα ενεργά).  
**Σημείωση:** Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται ότι τα κενά σωληνάκια δεν εμφανίζονται στην ανάλυση.
6. Επιλέξτε **Dynamic tube** (Δυναμικό σωληνάριο).
7. Επιλέξτε **Slope correct** (Διόρθωση κλίσης).

8. Επιλέξτε **Linear scale** (Γραμμική κλίμακα).
9. Επιλέξτε **Take Off Adj** (Προσαρμογή σημείου μέτρησης) και πληκτρολογήστε τις τιμές **15.01** στο πάνω πλαίσιο [«If take off point was calculated before cycle» (Εάν το σημείο μέτρησης υπολογίστηκε πριν από τον κύκλο)] και **20.01** στο κάτω πλαίσιο [«then use the following cycle and take off point» (τότε να χρησιμοποιηθεί ο επόμενος κύκλος και σημείο μέτρησης)].
10. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο **0.02** και ελέγξτε τις τιμές C<sub>T</sub> για το κανάλι Yellow (HEX).
11. Στη σελίδα της ανάλυσης, κάντε κλικ στο **Cycling A. Green** για να προβάλετε το κανάλι Green (FAM).
12. Επιλέξτε **Named On** (Ονομασμένα ενεργά).
13. Επιλέξτε **Dynamic tube** (Δυναμικό σωληνάριο).
14. Επιλέξτε **Slope correct** (Διόρθωση κλίσης).
15. Επιλέξτε **Linear scale** (Γραμμική κλίμακα).
16. Επιλέξτε **Take Off Adj** (Προσαρμογή σημείου μέτρησης) και πληκτρολογήστε **15.01** στο πάνω πλαίσιο [«If take off point was calculated before cycle» (Εάν το σημείο μέτρησης υπολογίστηκε πριν από τον κύκλο)] και **20.01** στο κάτω πλαίσιο [«then use the following cycle and take off point» (τότε να χρησιμοποιηθεί ο επόμενος κύκλος και σημείο μέτρησης)].
17. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο **0.075** και ελέγξτε τις τιμές C<sub>T</sub> για το κανάλι Green (FAM).

## Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης για την αξιολόγηση δείγματος DNA, ανατρέξτε στην ενότητα «Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης» και αναλύστε τα δεδομένα ως εξής. (Βλ. Πίνακα 4, στη σελίδα 27, για τη διάταξη των σωληναρίων.)

### Ανάλυση υλικών ελέγχου εκτέλεσης

#### Αρνητικό υλικό ελέγχου

Για να διασφαλιστεί ότι δεν έχει σημειωθεί μόλυνση προτύπου, το NTC δεν πρέπει να δώσει τιμή C<sub>T</sub> στο κανάλι Green (FAM) μικρότερη του 40.

Για να διασφαλιστεί ότι η εκτέλεση έχει ρυθμιστεί σωστά, το υλικό ελέγχου NTC πρέπει να εμφανίζει τιμή ενίσχυσης εντός του εύρους 29,85 έως 35,84 στο κανάλι Yellow (HEX). Οι τιμές που ορίζονται κυμαίνονται μεταξύ αυτών των τιμών και τις περιλαμβάνουν.

#### Θετικό υλικό ελέγχου

Ο EGFR PC πρέπει να δώσει μια τιμή C<sub>T</sub> στο κανάλι Green (FAM) εντός του εύρους από 28,13 έως 34,59. Μια τιμή που βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους υποδεικνύει πρόβλημα ρύθμισης της ανάλυσης. Η εκτέλεση της ανάλυσης δεν είναι επιτυχής.

**Σημείωση:** Τα δεδομένα των δειγμάτων δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν το αρνητικό ή το θετικό υλικό ελέγχου δεν είναι επιτυχές.

### Ανάλυση δειγμάτων

Εάν τα υλικά ελέγχου της ανάλυσης για την αξιολόγηση δείγματος DNA είναι έγκυρα, η ανάλυση μπορεί να προχωρήσει. Η τιμή C<sub>T</sub> υλικού ελέγχου για ένα δείγμα πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους από 23,70 έως 31,10 στο κανάλι Green (FAM). Σε περίπτωση που η τιμή C<sub>T</sub> του δείγματος βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες.

- Τιμή ανάλυσης υλικού ελέγχου δείγματος  $C_T < 23,70$

Τα δείγματα με τιμή  $C_T$  υλικού ελέγχου  $< 23,70$  (υψηλή συγκέντρωση DNA) θα προκαλέσουν υπερκορεσμό των αναλύσεων μετάλλαξης και πρέπει να αραιωθούν. Για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων σε χαμηλό επίπεδο, γίνεται αραιώση των υπερβολικά συμπυκνωμένων δειγμάτων, ώστε οι τιμές  $C_T$  να κυμαίνονται εντός του εύρους από 23,70 έως 31,10. Η αραιώση του δείγματος DNA αυξάνει την τιμή  $C_T$  (με αραιώση σε αναλογία 1:1 η τιμή  $C_T$  αυξάνεται κατά περίπου 1,0). Αραιώστε τα δείγματα με τη χρήση του νερού που παρέχεται στο κιτ [Νερό για αραιώση (Dil.)].

- Τιμή ανάλυσης υλικού ελέγχου δείγματος  $C_T > 31,10$

Συνιστάται η εκτέλεση εκ νέου εξαγωγής των δειγμάτων με τιμή  $C_T$  υλικού ελέγχου  $> 31,10$  στο κανάλι Green (FAM). Δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα προτύπου DNA έναρξης για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων EGFR στις καθορισμένες οριακές τιμές αποκοπής για την ανάλυση.

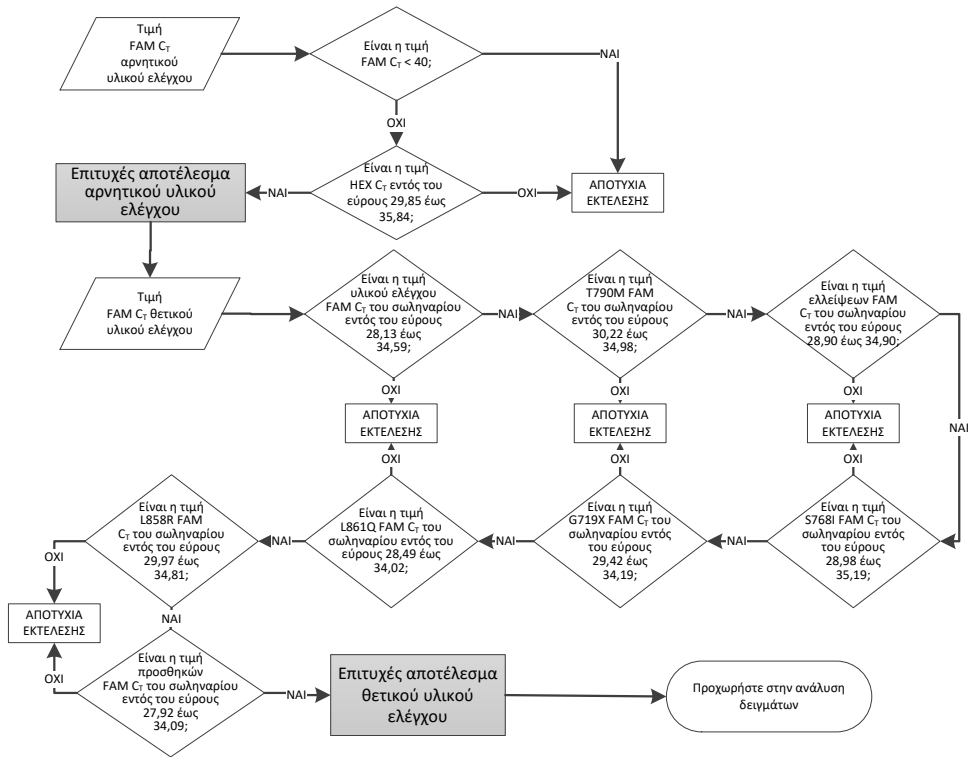
## Ανάλυση δεδομένων ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR

Ένα δείγμα πρέπει πρώτα να περάσει με επιτυχία από αξιολόγηση δείγματος DNA ώστε να μπορέσει να εξεταστεί για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR (βλ. «Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων»).

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR, ανατρέξτε στην ενότητα «Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης» και αναλύστε τα δεδομένα ως εξής. (Για τη διάταξη των σωληναρίων, ανατρέξτε στον Πίνακα 7.)

### Ανάλυση υλικών ελέγχου εκτέλεσης

Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής της ανάλυσης υλικού ελέγχου εκτέλεσης στην Εικόνα 39.



Εικόνα 39. Διάγραμμα ροής για ανάλυση υλικών ελέγχου εκτέλεσης, για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR.

## Αρνητικό υλικό ελέγχου

Για να διασφαλιστεί ότι δεν έχει σημειωθεί μόλυνση προτύπου, το NTC για κάθε ανάλυση μετάλλαξης EGFR δεν πρέπει να δώσει τιμή  $C_T$  στο κανάλι Green (FAM) μικρότερη του 40.

Για να διασφαλιστεί ότι η εκτέλεση έχει ρυθμιστεί σωστά, το υλικό ελέγχου NTC πρέπει να εμφανίζει τιμή ενίσχυσης εντός του εύρους 29,85 έως 35,84 στο κανάλι Yellow (HEX). Οι τιμές που ορίζονται κυμαίνονται μεταξύ αυτών των τιμών και τις περιλαμβάνουν.

## Θετικό υλικό ελέγχου

Για κάθε ανάλυση μετάλλαξης EGFR, ο EGFR PC πρέπει να δώσει μια τιμή C<sub>T</sub> στο κανάλι Green (FAM) εντός του εύρους που φαίνεται στον Πίνακα 16. Μια τιμή που βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους υποδεικνύει πρόβλημα ρύθμισης της ανάλυσης. Η εκτέλεση της ανάλυσης δεν είναι επιτυχής.

**Σημείωση:** Τα δεδομένα των δειγμάτων δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν η ανάλυση του αρνητικού ή του θετικού υλικού ελέγχου δεν είναι επιτυχής.

**Πίνακας 16. Αποδεκτές περιοχές τιμών C<sub>T</sub> για θετικά υλικά ελέγχου αντίδρασης (ανάλυση ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR)**

Μείγμα αντίδρασης	Δείγμα	Κανάλι	Εύρος οριακών τιμών αποκοπής ΔC <sub>T</sub>
Υλικό ελέγχου	PC	Green	28,13 έως 34,59
T790M	PC	Green	30,22 έως 34,98
Ελλείψεις	PC	Green	28,90 έως 34,90
L858R	PC	Green	29,97 έως 34,81
L861Q	PC	Green	28,49 έως 34,02
G719X	PC	Green	29,42 έως 34,19
S768I	PC	Green	28,98 έως 35,19
Προσθήκες	PC	Green	27,92 έως 34,09



## Ανάλυση δειγμάτων – Τιμή C<sub>T</sub> υλικού ελέγχου δείγματος στο κανάλι Green (FAM)

Εάν οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες για την εκτέλεση ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR είναι έγκυροι, η ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR σε δείγματα μπορεί να προχωρήσει.

Η τιμή C<sub>T</sub> υλικού ελέγχου για ένα δείγμα στο κανάλι Green (FAM) πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους από 23,70 έως 31,10. (Για τη διάταξη των σωληναρίων, ανατρέξτε στον Πίνακα 7.)

Σε περίπτωση που η τιμή C<sub>T</sub> υλικού ελέγχου δείγματος βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες.

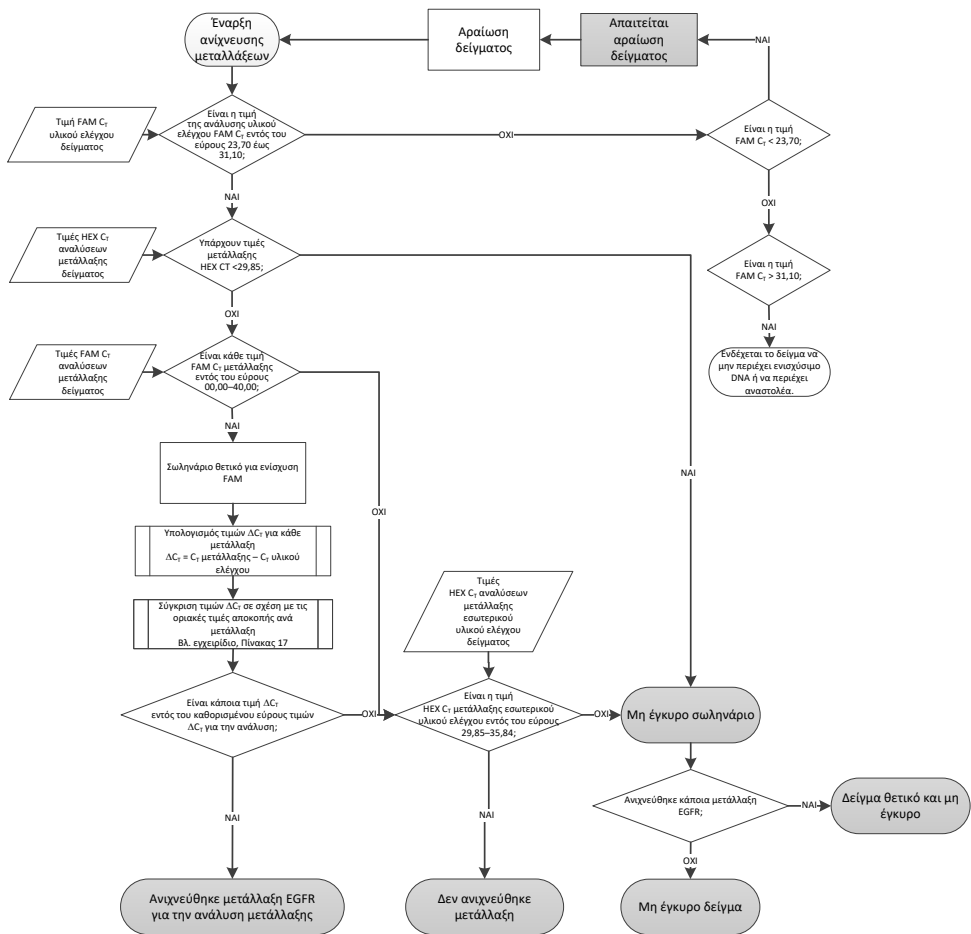
- Τιμή ανάλυσης υλικού ελέγχου δείγματος C<sub>T</sub> < 23,70

Τα δείγματα με τιμή C<sub>T</sub> υλικού ελέγχου < 23,70 (υψηλή συγκέντρωση DNA) θα προκαλέσουν υπερκορεσμό των αναλύσεων μετάλλαξης και πρέπει να αραιωθούν. Για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων σε χαμηλό επίπεδο, γίνεται αραιώση των υπερβολικά συμπυκνωμένων δειγμάτων, ώστε οι τιμές C<sub>T</sub> να κυμαίνονται εντός του εύρους από 23,70 έως 31,10. Η αραιώση του δείγματος DNA αυξάνει την τιμή C<sub>T</sub> (με αραιώση σε αναλογία 1:1 η τιμή C<sub>T</sub> αυξάνεται κατά περίπου 1,0). Αραιώστε τα δείγματα με τη χρήση του νερού που παρέχεται στο kit [Νερό για αραιώση (Dil.)].

- Τιμή ανάλυσης υλικού ελέγχου δείγματος C<sub>T</sub> > 31,10

Συνιστάται η εκτέλεση εκ νέου εξαγωγής των δειγμάτων με τιμή C<sub>T</sub> υλικού ελέγχου > 31,10 στο πράσινο (FAM) κανάλι. Δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα προτύπου DNA έναρξης για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων EGFR στις καθορισμένες οριακές τιμές αποκοπής για την ανάλυση.

Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής ανάλυσης δειγμάτων για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR στην Εικόνα 40.



Εικόνα 40. Διάγραμμα ροής ανάλυσης δειγμάτων για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR.

## Ανάλυση δειγμάτων – Τιμή C<sub>T</sub> εσωτερικού υλικού ελέγχου δείγματος στο κανάλι Yellow (HEX)

**Σημείωση:** Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής ανάλυσης δειγμάτων για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR στην Εικόνα 40.

Πρέπει να αναλυθούν όλα τα σωληνάρια από κάθε δείγμα. Βεβαιωθείτε ότι κάθε σωληνάριο παράγει ένα σήμα HEX εντός του εύρους 29,85 έως 35,84 από τον εσωτερικό υλικού ελέγχου στο κανάλι Yellow (HEX). Υπάρχουν 3 πιθανά αποτελέσματα.

- Εάν η τιμή C<sub>T</sub> του εσωτερικού υλικού ελέγχου είναι μικρότερη από το καθορισμένο εύρος (< 29,85) για οποιοδήποτε ανάλυση μετάλλαξης, τότε το αποτέλεσμα είναι μη έγκυρο ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX). Η ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) για αυτό το σωληνάριο είναι μη έγκυρη.
- Εάν η τιμή C<sub>T</sub> του εσωτερικού υλικού ελέγχου βρίσκεται εντός του καθορισμένου εύρους (29,85 έως 35,84), το αποτέλεσμα είναι θετικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX).  
Η ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) για αυτό το σωληνάριο είναι έγκυρη.
- Εάν η τιμή C<sub>T</sub> του εσωτερικού υλικού ελέγχου υπερβαίνει το καθορισμένο εύρος (> 35,84), το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX).

Εάν υφίσταται ενίσχυση στο κανάλι Green (FAM) και η τιμή ΔC<sub>T</sub> για αυτήν την αντίδραση είναι μικρότερη ή ίση με την τιμή αποκοπής της ανάλυσης για αυτό το σωληνάριο, η ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) είναι έγκυρη. Εάν δεν υπάρχει ενίσχυση στο κανάλι Green (FAM) για το σωληνάριο ή εάν η τιμή ΔC<sub>T</sub> υπερβαίνει την τιμή αποκοπής της ανάλυσης, η ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) είναι μη έγκυρη.

Η ενίσχυση του εσωτερικού υλικού ελέγχου στο κανάλι Yellow (HEX) μπορεί να είναι μη επιτυχής λόγω αναστολής της PCR. Η αραίωση του δείγματος ενδέχεται να μειώσει τη δράση των αναστολέων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι με αυτή την ενέργεια αραιώνεται και το DNA-στόχος στο δείγμα. Αραιώστε τα δείγματα με τη χρήση του νερού που παρέχεται στο kit [Νερό για αραίωση (Dil.)].

## Ανάλυση δειγμάτων – Τιμή C<sub>T</sub> αναλύσεων μετάλλαξης δειγμάτων στο κανάλι Green (FAM)

Οι τιμές στο κανάλι Green (FAM) και για τα επτά μείγματα αντίδρασης μεταλλάξεων EGFR πρέπει να ελέγχονται σε σχέση με τις τιμές που παρατίθενται στον Πίνακα 17. Οι τιμές που καθορίζονται κυμαίνονται μεταξύ των τιμών που φαίνονται και τις περιλαμβάνουν. (Για τη διάταξη των σωληναρίων, ανατρέξτε στον Πίνακα 7.)

**Πίνακας 17. Αποδεκτές τιμές για αντιδράσεις μεταλλάξεων EGFR δειγμάτων στο κανάλι Green (FAM) (ανάλυση ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR)**

Ανάλυση	Εύρος C <sub>T</sub>	Εύρος οριακών τιμών αποκοπής ΔC <sub>T</sub>
T790M	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 7,40
Ελλείψεις	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,00
L858R	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
L861Q	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
G719X	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
S768I	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90
Προσθήκες	0,00 έως 40,00	-10,00 ≥ έως ≤ 8,00

- Εάν η τιμή C<sub>T</sub> του δείγματος στο κανάλι Green (FAM) βρίσκεται εντός του καθορισμένου εύρους τιμών, το δείγμα είναι θετικό για ενίσχυση FAM.
- Εάν η τιμή C<sub>T</sub> του δείγματος στο κανάλι Green (FAM) υπερβαίνει το καθορισμένο εύρος τιμών ή δεν παρατηρείται ενίσχυση, το δείγμα είναι αρνητικό για την ενίσχυση FAM.

Υπολογίστε την τιμή ΔC<sub>T</sub> για κάθε σωληνάριο ανίχνευσης μεταλλάξεων EGFR που είναι θετικό για ενίσχυση FAM όπως υποδεικνύεται παρακάτω, διασφαλίζοντας ότι οι τιμές C<sub>T</sub> μετάλλαξης και υλικού ελέγχου προέρχονται από το ίδιο δείγμα. (Για τη διάταξη των σωληναρίων, ανατρέξτε στον Πίνακα 7.)

$$\Delta C_T = [\text{τιμή } C_T \text{ ανάλυσης μετάλλαξης}] - [\text{τιμή } C_T \text{ ανάλυσης υλικού ελέγχου}]$$

---

Συγκρίνετε την τιμή  $\Delta C_T$  για το δείγμα με το εύρος οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  για την συγκεκριμένη ανάλυση (Πίνακας 17). Διασφαλίστε ότι χρησιμοποιείται το σωστό εύρος οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$ .

Το ανώτατο όριο του εύρους οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  είναι το σημείο πάνω από το οποίο ένα θετικό σήμα μιας ανάλυσης θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται στο σήμα υποβάθρου από έναν εκκινητή ARMS στο DNA άγριου τύπου. Εάν η τιμή  $\Delta C_T$  του δείγματος είναι υψηλότερη από το εύρος οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  για μια ανάλυση, το δείγμα ταξινομείται ως αρνητικό ή εκτός των ορίων ανίχνευσης του kit για τη συγκεκριμένη ανάλυση. Εάν η τιμή του δείγματος είναι κάτω από το χαμηλότερο όριο του εύρους οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$ , αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται σε πλασματικά ευρήματα φθορισμού.

Για κάθε αντίδραση μετάλλαξης, μπορεί να αποδίδεται σε κάθε δείγμα ένας από τους παρακάτω χαρακτηρισμούς:

- Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
- Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη
- Μη έγκυρο

### **Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη**

Θετικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Green (FAM) και η τιμή  $\Delta C_T$  είναι εντός του εύρους οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$ . Εάν για ένα δείγμα ανιχνευθούν πολλαπλές μεταλλάξεις, μπορούν να αναφερθούν όλες.

### **Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη**

Θετικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Green (FAM) και η τιμή  $\Delta C_T$  είναι άνω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$ .

---

Αρνητικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Green (FAM) και θετικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) (ενίσχυση εσωτερικού υλικού ελέγχου).

### **Μη έγκυρο**

Μη έγκυρο ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) (ενίσχυση εσωτερικού υλικού ελέγχου).

Αρνητικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Green (FAM) και αρνητικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) (ενίσχυση εσωτερικού υλικού ελέγχου).

**Σημείωση:** Ένα δείγμα μπορεί να είναι σε ένα σωληνάριο αρνητικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Yellow (HEX) αλλά σε ένα άλλο σωληνάριο θετικό ως προς την ενίσχυση στο κανάλι Green (FAM). Σε αυτή την περίπτωση, αποτέλεσμα «Mutation detected» (Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) στο δεύτερο σωληνάριο μπορεί να θεωρηθεί έγκυρο, αλλά ενδέχεται η συγκεκριμένη μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε να μην είναι η μοναδική δυνατή μετάλλαξη σε αυτό το δείγμα.

Η υπολογισμένη τιμή  $\Delta C_T$  είναι κάτω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  και η τιμή ενίσχυσης στο κανάλι Yellow (HEX) (εσωτερικός υλικού ελέγχου) είναι εντός του αναμενόμενου εύρους.

## Παράρτημα Β: Εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* EGFR CE Assay Package

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit είναι σχεδιασμένο για χρήση με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM και 72-Well Rotor. Το *therascreen* EGFR CE Assay Package διατίθεται για λήψη στον ιστότοπο προϊόντος του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Πλοηγηθείτε στο **Product Resources** (Πόροι προϊόντος) > **Supplementary Protocols** (Συμπληρωματικά πρωτόκολλα) για να πραγματοποιήσετε λήψη του πακέτου ανάλυσης. Το πακέτο περιλαμβάνει τα «*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template» και «*therascreen* EGFR CE Locked Template».

**Σημείωση:** Το *therascreen* EGFR CE Assay Package είναι συμβατό μόνο με το λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή μεταγενέστερη. Βεβαιωθείτε ότι έχει εγκατασταθεί η σωστή έκδοση του λογισμικού Rotor-Gene Q προτού προχωρήσετε την εγκατάσταση του λογισμικού *therascreen* EGFR CE Assay Package. Εάν έχετε όργανο Rotor-Gene Q MDx που συνοδεύεται από παλαιότερη έκδοση του λογισμικού, αναβαθμίστε το με λογισμικό Rotor-Gene Q έκδοσης 2.3.5 ή μεταγενέστερης από τη σελίδα του προϊόντος Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM [στην ενότητα «Product Resources» (Πόροι προϊόντος) στο μενού «Operating Software» (Λογισμικό λειτουργίας), βλ. [www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources)].

### Διαδικασία

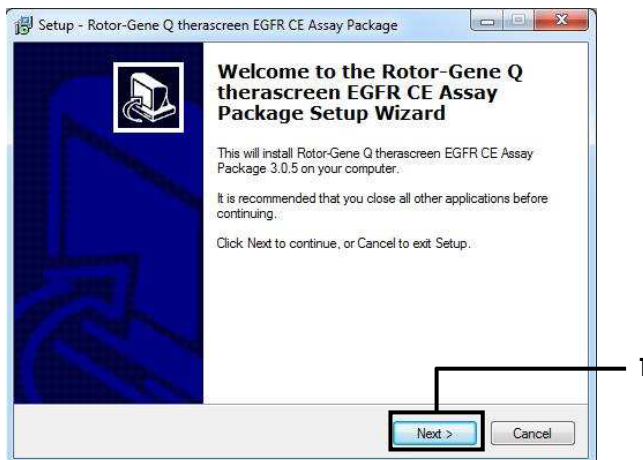
1. Πραγματοποιήστε λήψη του *therascreen* EGFR CE Assay Package στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) και μεταφέρετέ το σε συσκευή αποθήκευσης USB που διαθέτει προστασία από ιούς.

**Σημείωση:** Το πακέτο ανάλυσης είναι διαθέσιμο στον ιστότοπο προϊόντος του *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, έκδοση 2. Μεταβείτε στο **Product Resources** (Πόροι προϊόντος) > **Supplementary Protocols** (Συμπληρωματικά πρωτόκολλα) για να πραγματοποιήσετε λήψη του πακέτου ανάλυσης.

2. Εισαγάγετε τη συσκευή αποθήκευσης USB στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Εντοπίστε το αρχείο του **therascreen EGFR CE Assay Package**.
4. Κάντε δεξί κλικ στο **therascreen EGFR CE Assay Package** και ύστερα επιλέξτε **Extract all** (Εξαγωγή όλων) για να αποσυμπιέσετε το αρχείο.
5. Κάντε διπλό κλικ στο αρχείο **therascreen\_EGFR\_CE\_Assay\_Package\_3.0.6.exe** για να αρχίσει η εγκατάσταση.  
Εναλλακτικά, εντοπίστε και εκκινήστε αυτό το εκτελέσιμο αρχείο χρησιμοποιώντας τον φυλλομετρητή αρχείων στον συνδεδεμένο υπολογιστή.

Ανοίγει ο οδηγός εγκατάστασης του λογισμικού **therascreen EGFR CE Assay Package**.

6. Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) για να συνεχίσετε (Εικόνα 41).

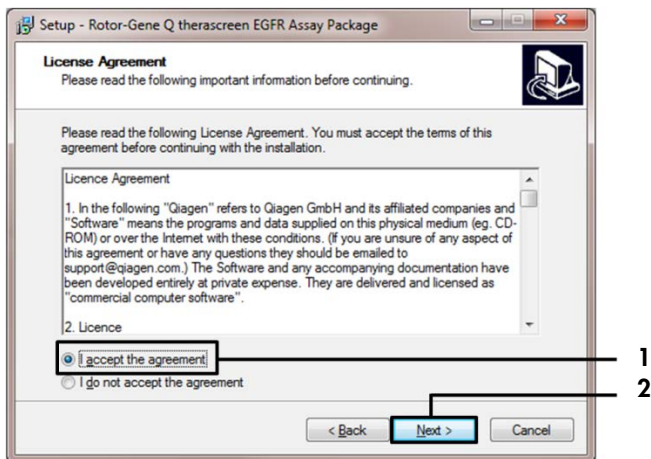


Εικόνα 41. Πλαίσιο διαλόγου οδηγού «Setup» (Εγκατάσταση) [1 = «Next» (Επόμενο)].



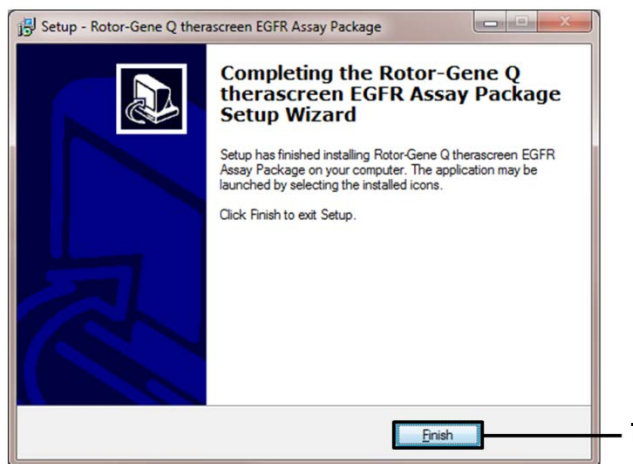
7. Διαβάστε τη σύμβαση άδειας χρήσης στο πλαίσιο διαλόγου και επιλέξτε **I accept the agreement** (Αποδέχομαι τους όρους της συμφωνίας). Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) για να συνεχίσετε (Εικόνα 42).

Η εγκατάσταση ξεκινά αυτόματα.



**Εικόνα 42. Πλαίσιο διαλόγου «License Agreement» (Άδεια χρήσης).** 1 = «I accept the agreement» (Αποδέχομαι τους όρους της συμφωνίας), 2 = «Next» (Επόμενο).

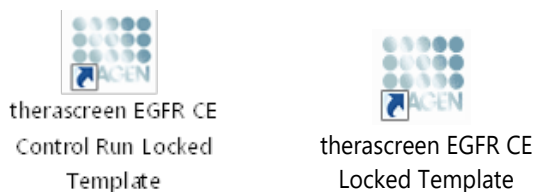
8. Αφού ολοκληρωθεί η εγκατάσταση, πατήστε **Finish** (Τέλος) στο τελικό πλαίσιο διαλόγου οδηγού «Setup» (Εγκατάσταση) (Εικόνα 43).



Εικόνα 43. Ολοκλήρωση του οδηγού εγκατάστασης [1 = «Finish» (Τέλος)].

9. Εκτελέστε επανεκκίνηση του υπολογιστή.

Οι συντομεύσεις για τα πρότυπα «*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template» (Κλειδωμένο πρότυπο εκτέλεσης υλικού ελέγχου EGFR CE *therascreen*) και «*therascreen* EGFR CE Locked Template» (Κλειδωμένο πρότυπο EGFR CE *therascreen*) δημιουργούνται αυτόματα και εμφανίζονται στην επιφάνεια εργασίας (Εικόνα 44).



Εικόνα 44. Εικονίδια Κλειδωμένο πρότυπο ανάλυσης υλικού ελέγχου *therascreen* EGFR CE και Κλειδωμένο πρότυπο *therascreen* EGFR CE.

---

## Στοιχεία επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, καλέστε το 00800-22-44-6000 ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN ή τους κατά τόπους αντιπροσώπους (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Πληροφορίες παραγγελιών

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Ανάλυση υλικού ελέγχου, 7 αναλύσεις μετάλλαξης, θετικό υλικό ελέγχου, <i>Taq</i> DNA πολυμεράση, νερό για NTC και νερό για αραίωση δειγμάτων	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package	Πακέτο πρωτοκόλλου λογισμικού για χρήση με το <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit και το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM της QIAGEN	Λήψη
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit</b>		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Για 50 παρασκευές DNA: Στήλες QIAamp MinElute®, πρωτεϊνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα και Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Για 50 παρασκευές: 50 στήλες QIAamp MinElute, πρωτεϊνάση K, ρυθμιστικά διαλύματα και Collection Tubes (2 ml)	56404
<b>Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM και παρελκόμενα</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντό) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπρονζώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα: περιλαμβάνει εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Μονάδα αλουμινίου για μη αυτοματοποιημένη προετοιμασία αντίδρασης με μονοκάναλη πιπέτα σε σωληνάρια 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 1000 αντιδράσεις	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 ταινίες των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 10.000 αντιδράσεις	981106

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο κιτ QIAGEN ή εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια των κιτ QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ή μπορείτε να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN ή τον διανομέα της περιοχής σας.

# Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Ημερομηνία	Αλλαγές
R5, Ιανουάριος 2019	Προσθήκη εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου (στο εξώφυλλο). Ενημέρωση της ενότητας «Σύμβολα».
R6, Οκτώβριος 2019	Αλλαγή νόμιμου κατασκευαστή (εξώφυλλο) Προσαρμογή ονόματος οργάνου από Rotor-Gene Q MDx σε Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, ώστε να ευθυγραμμιστεί με το όνομα της επικέτας του οργάνου Προσθήκη συνθήκης φύλαξης στην ενότητα «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων» Ενημέρωση του Πίνακα 1 με την προσθήκη σημείωσης για την αφαίρεση της COSM6254 από τη βάση δεδομένων COSMIC Ενημέρωση της ενότητας «Περιορισμοί» με πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση ελλείψεων εξόνιου 19 και τον προσδιορισμό L858R Αφαίρεση συμβόλου EC + REP από το εξώφυλλο και την ενότητα «Σύμβολα»
R7, Ιούνιος 2020	Ενημέρωση του αριθμού έκδοσης του EGFR Assay Package από 3.0.5 σε 3.0.6 Ενημέρωση των παραπομπών στην έκδοση λογισμικού RGQ από 2.3 σε 2.3.5 ή μεταγενέστερη Ενημέρωση του Πίνακα 9 και 17 για την εφαρμογή του νέου εύρους οριακών τιμών αποκοπής και προσαρμογή όλων των σχετικών περιγραφών αντίστοιχα (σε όλο το εγχειρίδιο) Ενημέρωση όλων των κεφαλαίων πρωτοκόλλου ώστε να περιλαμβάνονται πληροφορίες για τη σπουδαιότητα της ανάμειξης στις ενότητες με τίτλο «Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη» και επισήμανση των λεπτομερειών ανάμειξης σε όλα τα στάδια, με προσθήκη σταδίων ανάμειξης κατά περίπτωση Προσθήκη της ένδειξης MUTATION_EARLY_CT στον Πίνακα 8 Αφαίρεση όλων των παραπομπών σε CD και αντικατάσταση με πληροφορίες σχετικά με τη διαδικασία λήψης

#### Συμφωνία άδειας περιορισμένης χρήσης για το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή των παρακάτω όρων εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο σετ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε στοιχεία που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το σετ, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Ορισμένα από αυτά τα πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το σετ ή/και η χρήση(εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το σετ και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η επαντεξεργασία, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλη άδεια, ρητή ή σιωπηρή, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του σετ συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τυχόν ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το kit ή/και τα εξαρτήματά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group), FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); G1OTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca Group). Οι κατατεθείσες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και αν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

Το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit είναι ένα διαγνωστικό προϊόν που φέρει τη σήμανση CE σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 98/79/ΕΚ για τα ιατροτεχνολογικά βοηθήματα που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση *in vitro*. Δεν είναι διαθέσιμο σε όλες τις χώρες.

1121935 06-2020 HB-1909-007 © 2020 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

