

Návod k použití soupravy *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Verze 1



Pro diagnostické použití in vitro

K použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE



870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO



R6

1127512CS

Obsah

Účel použití.....	5
Shrnutí a vysvětlení.....	6
Princip testu.....	7
Formát soupravy.....	7
Analýzy.....	8
Kontroly.....	9
Dodávané materiály.....	10
Obsah soupravy.....	10
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky.....	11
Varování a bezpečnostní opatření.....	12
Informace o bezpečnosti.....	12
Všeobecná bezpečnostní opatření.....	12
Skladování činidel a manipulace s nimi.....	14
Uchovávání alikvotu a manipulace s ním.....	16
Postup.....	17
Protokol: Detekce mutací EGFR.....	18
Protokol: Nastavení přístroje Rotor-Gene Q EGFR.....	22
Analýza dat hodnocení mutace vzorku.....	29
Návod pro řešení potíží.....	36
Kontrola kvality.....	38
Omezení.....	38
Charakteristika funkčních vlastností.....	40

Analytická citlivost – mez slepého vzorku (Limit of Blank, LOB)	40
Limit detekce (limit of detection, LOD)	40
Analytická citlivost – Δ hraniční hodnoty C_T a hraniční rozsah ΔC_T	42
Opakovatelnost a reprodukovatelnost	42
Vliv vstupní hladiny DNA na hodnoty C_T	42
Interferující látky	43
Klinická účinnost	47
Literatura	48
Kontaktní údaje	49
Symboly	50
Příloha A: Podrobné informace o mutacích	52
Informace pro objednání	53
Historie revizí dokumentu	55

Účel použití

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit je diagnostický test in vitro určený k detekci delecí exonu 19, exonu 20 a substitucí 21 (T790M a L858R) v genu EGFR (receptoru epidermálního růstového faktoru), který poskytuje kvalitativní vyhodnocení stavu mutace. Výsledky jsou určeny jako pomůcka pro klinické pracovníky při identifikaci pacientů s NSCLC, kteří by mohli mít prospěch z léčby přípravkem IRESSA® (gefitinib), pokud není možné vyhodnotit alikvot tkáně.

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit je určena k použití kvalifikovanými odborníky v profesionálních laboratořích. Používá alikvoty DNA extrahované z plazmy získané z krve pacientů trpících nemalobuněčným plicním karcinomem (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit je určena pro diagnostické použití in-vitro.

Shrnutí a vysvětlení

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit je souprava k okamžitému použití určená k detekci mutací s rakovinou souvisejícího genu EGFR pomocí polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) na přístrojích Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit umožňuje detekci následujících mutací genu EGFR oproti pozadí genomové DNA divokého typu za využití technologií Scorpions® a ARMS.

- Delece v exonu 19
- T790M
- L858R

Použité metody jsou vysoce selektivní a v závislosti na celkovém množství přítomné DNA dokáže souprava detekovat nízké procento mutace na pozadí genomové DNA divokého typu. Tato selektivita a meze detekce převyšují jiné technologie, jako je sekvencování s barevným terminátorem.

Princip testu

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit využívá k detekci mutací kombinaci dvou technologií – ARMS a Scorpions při real-time PCR.

ARMS

Amplifikace specifické pro alely nebo pro mutace je dosaženo pomocí metody ARMS (Amplification Refractory Mutation System). Taq DNA polymeráza (Taq) je mimořádně účinná při rozlišování mezi shodou a neshodou na 3' konci PCR primeru. Specifické mutované sekvence lze selektivně amplifikovat, dokonce i v alikvotách, kde většina sekvencí mutaci neobsahuje. Pokud se primer zcela shoduje, amplifikace pokračuje s plnou účinností. Pokud se 3' báze neshoduje, probíhá pouze nespecifická amplifikace na nízké úrovni v pozadí reakce.

Scorpions

Detekce amplifikace se provádí pomocí detekčních sond Scorpions. SONDY Scorpions jsou bifunkční molekuly obsahující PCR primer kovalentně vázaný na sondu. Fluorofor na sondě interaguje se zhášečem, který je inkorporovaný k sondě a snižuje fluorescenci. Během PCR reakce, kdy se sonda naváže na amplicon, se fluorofor a zhášeč od sebe oddělí. Tím dojde k nárůstu intenzity fluorescence v reakční zkumavce.

Formát soupravy

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit obsahuje čtyři analýzy:

- Jednu kontrolní analýzu (Ctrl)
- Tři analýzy mutací

Všechny reakční směsi obsahují reakční činidla k detekci cílů označených pomocí FAM™ a analýzu interní kontroly označený HEX™. Interní kontrolní analýza umožňuje detekovat přítomnost inhibitorů, které mohou vést k falešně negativním výsledkům. Amplifikace FAM může nahradit amplifikaci interní kontroly a účelem této interní kontroly je jednoduše ukázat, že zde není žádná amplifikace FAM; jedná se o skutečně negativní výsledek, a nikoli o selhání PCR reakce.

Analýzy

Kontrolní analýza

Kontrolní analýza, značená FAM, se používá ke stanovení celkového množství DNA v alikvotu. Tato analýza amplifikuje oblast exonu 2 genu EGFR. Primer a sonda jsou navrženy tak, aby se vyhnuly všem známým polymorfismům genu EGFR.

Analýzy mutací

Každá analýza mutace zahrnuje sondu Scorpions označenou FAM a primer ARMS pro rozlišení mezi přirozenou DNA divokého typu a specifickou mutovanou DNA.

Kontroly

Všechny cykly experimentů musejí zahrnovat následující kontroly:

Pozitivní kontrola

Každý cyklus musí obsahovat pozitivní kontrolu ve zkumavkách 1–4. Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit obsahuje pozitivní kontrolu EGFR (Positive Control, PC), která se používá jako templát v reakci pozitivní kontroly. Výsledky pozitivní kontroly budou vyhodnoceny, aby se zajistilo, že souprava pracuje v rámci stanovených kritérií přijatelnosti.

Negativní kontrola

Každý cyklus musí obsahovat negativní kontrolu („beztemplátová kontrola“, NTC) ve zkumavkách 9–12. NTC se skládá z vody bez nukleázy (H₂O), která bude použita jako „templát“ pro beztemplátovou kontrolu. Beztemplátová kontrola se používá k vyhodnocení potenciální kontaminace v průběhu nastavení cyklu a k vyhodnocení výkonu reakce interní kontroly.

Hodnocení reakce interní kontroly

Každá reakční směs obsahuje vedle cílové reakce navíc i interní kontrolní reakci. Selhání indikuje, že buď jsou přítomny inhibitory, které mohou způsobit falešné negativní výsledky, nebo pro danou zkumavku došlo k chybě obsluhy při její přípravě.

Jestliže k selhání interní kontroly dojde v důsledku PCR inhibice, zředění alikvotu může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění cílové DNA. Amplifikace FAM může nahradit amplifikaci interní kontroly, takže získaná hodnota IC CT (HEX) bude spadat mimo zadaný rozsah. Výsledky FAM jsou pro tyto alikvoty nadále platné.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Katalogové č.			870311
Počet reakcí			24
Červená	Control Reaction Mix (kontrolní reakční směs)	Ctrl	2 × 600 µl
Fialová	T790M Reaction Mix (reakční směs pro T790M)	T790M	600 µl
Oranžová	Deletions Reaction Mix (reakční směs pro delece)	Del	600 µl
Růžová	L858R Reaction Mix (reakční směs pro L858R)	L858R	600 µl
Běžová	EGFR Positive Control (pozitivní kontrola EGFR)	PC	300 µl
Zelenomodrá	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA polymeráza)	<i>Taq</i>	2 × 80 µl
Bílá	Nuclease-Free Water for No Template Control/Voda bez nukleázy pro kontrolu bez templátu	NTC	1 × 1,9 ml
Bílá	Voda bez nukleázy k ředění	Dil	1 × 1,9 ml
Návod k použití soupravy <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (příručka)			1

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL) které obdržíte od dodavatele výrobku.

- Souprava na extrakci DNA (viz „Postup“, strana 17)
- Pipety* (nastavitelné), určené výhradně k přípravě alikvoty
- Pipety* (nastavitelné) určené výhradně pro přípravu PCR master mixů
- Pipety* (nastavitelné) určené výhradně k dávkování templátu DNA
- Sterilní špičky pipet DNÁzy, RNÁzy a bez DNA s filtry (aby se předešlo křížové kontaminaci, doporučujeme pipety s aerosolovými bariérami)
- Vodní lázeň nebo podobné zařízení schopné uchovat 50ml odstředivkové zkumavky při teplotě 60 °C.
- Topný blok nebo podobné zařízení schopné zajistit inkubaci při teplotě 56 °C†
- Drcený led
- Stolní odstředivka* s rotorem na zkumavky po 2 ml
- Vortex
- Přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*† s fluorescenčními kanály Cycling Green a Cycling Yellow (detekce FAM a HEX v uvedeném pořadí)
- Software přístroje Rotor-Gene Q, verze 2.3.5 nebo novější
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, pro použití s 72-Well Rotor (kat. čís. 981103 nebo 981106)
- Mikrocentrifugační zkumavky s DNázou, RNázou a bez DNA k přípravě master mixů
- Nakládací blok zkumavek Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes, hliníkový blok k ruční přípravě reakce pomocí jednonábové pipety (QIAGEN, kat. č. 9018901)

* Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

† V některých zemích může být dle potřeby použit přístroj Rotor-Gene Q 5plex HRM s datem výroby květen 2011 nebo novější. Datum výroby lze zjistit ze sériového čísla uvedeného na zadní straně přístroje. Sériové číslo je ve formátu „mmrrnnn“, kde „mm“ označuje měsíc výroby v číslicích, „r“ označuje poslední dvě číslice roku výroby a „nnn“ označuje jedinečný identifikátor přístroje.

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in-vitro

Pro použití odbornými pracovníky

Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Ty jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech sad a součástí sad QIAGEN.

Všeobecná bezpečnostní opatření

Uživatel by měl vždy dbát na následující:

- Používejte pipetovací špičky s DNázou, RNázou a bez DNA s filtry a zajistěte, aby pipety byly kalibrovány v souladu s návodem výrobce.
- Pozitivní materiály (vzorky a pozitivní kontroly) skladujte a extrahujte odděleně od všech ostatních činidel. Do reakční směsi je přidávejte v odděleném prostoru.
- Všechny komponenty před počátkem analýzy úplně rozmrazte při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Po rozmrazení všechny složky promíchejte **převrácením každé zkumavky 10krát** a krátce odstředěte.

Poznámka: Při provádění PCR dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke kontaminaci reakcí PCR syntetickým kontrolním materiálem. Pro přípravu reakčních směsí a přidávání templátu DNA se doporučuje používat zvláště vyhrazené pipety. Příprava a dávkování reakčních směsí musejí být prováděny v prostoru odděleném od místa, kde se provádí

dávkování templátu. Zkumavky přístroje Rotor-Gene Q po dokončení PCR cyklu nikdy neotevírejte. Předejete tak laboratorní kontaminaci produkty vzniklými po PCR.

Poznámka: Činidla jsou ověřena pro manuální nastavení. Pokud se používá automatická metoda, může to snížit počet možných reakcí v důsledku množství činidel požadovaného pro zaplnění „mrtvých objemů“ v těchto přístrojích.

Poznámka: Všechna činidla v soupravě *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit mají složení připravené specificky pro dané testy. Všechna činidla dodávaná v soupravě *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jsou určena k použití výhradně s ostatními činidly ve stejné soupravě *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Má-li být zachován optimální výkon testu, nelze se soupravou používat žádná náhradní činidla.

Poznámka: Používejte výhradně *Taq* DNA polymerázu (*Taq*), která se dodává v soupravě. Nenahrazujte ji *Taq* DNA polymerázou dodávanou jako součást jiné soupravy stejného nebo jiného typu ani ji nezaměňujte za *Taq* DNA polymerázu od jiného dodavatele.

Poznámka: Činidla v soupravě *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jsou optimálně naředěna. Další ředění činidel se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu. Použití menších reakčních objemů než 25 µl se nedoporučuje, neboť tím narůstá riziko výskytu falešně negativních výsledků.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit je dodávána na suchém ledu. Pokud není jakákoliv součást soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit při dodání zmrzlá, během přepravy došlo k otevření vnějšího obalu nebo zásilka neobsahuje balící list, návod k použití nebo činidla, obraťte se na oddělení technických služeb společnosti QIAGEN nebo na místní prodejce (navštivte internetové stránky www.qiagen.com).

Soupravu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit uložte ihned po dodání do mrazničky a skladujte v temnu při konstantní teplotě -30 až -15 °C. Při uložení dle stanovených podmínek je souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit stabilní do uvedeného data expirace.

Po otevření lze činidla uložit v původních obalech při teplotě -30 až -15 °C po dobu 12 měsíců nebo až do data expirace uvedeného na obalu podle toho, co nastane dříve. Soupravu opakovaně nerozmrazujte a nezmrazujte. Nepřekračujte maximální počet osmi cyklů zmrazení/rozmrazení.

Činidla musejí být rozmrazována při pokojové teplotě minimálně 1 hodinu a maximálně 4,5 hodiny. Jakmile jsou činidla připravena k použití, lze připravit reakce PCR; zkumavky Rotor-Gene Q obsahující master mixy a alikvoty DNA by se měly okamžitě vložit do přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Celkový čas od začátku přípravy PCR do začátku cyklu by neměl překročit:

- 6 hodin v případě uložení při pokojové teplotě
Poznámka: Tato doba zahrnuje přípravu PCR i dobu skladování.
- 18 hodin v případě uložení v chladničce (2–8 °C)
Poznámka: Tato doba zahrnuje přípravu PCR i dobu skladování.

Poznámka: Sondy Scorpions (stejně jako u všech fluorescenčně značených molekul) v činidlech reakčních směsí jsou citlivé na světlo. Kontroly a reakční směsi reagencie chraňte před světlem, aby nedošlo k jejich optickému vyblednutí.

Činidla v soupravě *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* jsou optimálně zředěna a žádná další purifikace nebo jiné úpravy před jejich použitím při analýze dle pokynů v návodu k použití soupravy *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit (příručka)* nejsou nutné.

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.

Uchovávání alikvotu a manipulace s ním

Poznámka: Se všemi alikvoty se musí zacházet jako s potenciálně infekčními.

Materiál alikvotů musí být lidská genomová DNA extrahovaná z plazmy. Vzorky musejí být dopravovány v souladu se standardní patologickou metodologií, aby byla zajištěna kvalita vzorku.

Postup

Extrakce DNA

Charakteristika funkčních vlastností této soupravy byla vytvořena pomocí DNA extrahované pomocí soupravy QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (kat. č. 55114). Používáte-li soupravu QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, proveďte extrakci DNA podle pokynů v příručce, přičemž vezměte na vědomí:

- Počáteční objem plazmy je 2 ml.
- Před extrakcí DNA je nutné odstředit 2 ml plazmy při otáčkách 3 000 ot./min. po dobu 2 minut a supernatant přenést do čisté zkumavky.
- Objem proteinázy K by měl být 250 µl.
- Rozklad vzorku pomocí proteinázy K by měl probíhat 1 hodinu při teplotě 60 °C.
- Purifikovaná genomová DNA musí být eluována v 55 µl pufru Buffer AVE (je součástí soupravy QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Purifikovanou genomovou DNA skladujte při teplotě -30 až -15°C.

Poznámka: Při všech analýzách pomocí soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit se vytvářejí krátké produkty PCR. Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit však nebude fungovat se vzorky silně fragmentované DNA.

Protokol: Detekce mutací EGFR

Důležité body před zahájením používání

- K získání správných výsledků je třeba zajistit, aby byl v každém kroku míchání procesu nastavení analýzy proveden popsáný postup míchání.
- Při každém cyklu je možné zpracovat až 16 alikvotů.
- Před zahájením postupu si přečtěte část „Všeobecná bezpečnostní opatření“, stránka 12.
- Před zahájením protokolu věnujte dostatek času seznámení se s přístrojem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Viz uživatelská příručka k přístroji.
- Neprotřepávejte *Taq* DNA polymerázu (*Taq*) ani žádnou směs obsahující *Taq* DNA polymerázu, neboť by mohlo dojít k inaktivaci enzymu.
- *Taq* pipetujte tak, že špičku pipety ponoříte těsně pod hladinu tekutiny, aby na vnějším povrchu špičky neulpěl nadbytečný enzym.
- Pro každý alikvot DNA je třeba provést kontrolní test a analýzu přítomnosti mutace ve stejném cyklu PCR reakce, aby byly vyloučeny rozdíly mezi analýzami jdoucími za sebou.
- Pro efektivní použití činidel v soupravě *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit použijte co možná nejvíce alikvotů DNA, abyste vytvořili kompletně naplněné testovací cykly. Při testování jednotlivých alikvotů nebo v menších množstvích se spotřebuje více činidel a sníží se tak celkový počet alikvotů, který je možné testovat pomocí jedné soupravy *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Co je třeba udělat, než začnete

- Před každým použitím musejí být všechna činidla zcela rozmrazená a po dobu nejméně 1 hodiny a maximálně po dobu 4,5 hodiny temperovaná na pokojovou teplotu (15–25 °C), promíchána **převrácením každé zkumavky 10 krát** a krátce odstředěná, aby se obsah usadil na dně zkumavky.

- Zajistěte, aby *Taq* byla před každým použitím temperována na pokojovou teplotu (15–25 °C). Zkumavku krátce odstředte, aby se veškerý enzym shromáždil na dně zkumavky.
- **Promíchejte všechny alikvoty tak, že je 10× převrátíte**, a krátce je odstředte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.

Postup

1. Úplně rozmrazte všechny reakční směsi, vodu bez obsahu nukleázy pro beztemplátovou kontrolu (No Template Control, NTC) a pozitivní kontrolu EGFR (Positive Control, PC) na laboratorní teplotu (15–25 °C) po dobu nejméně 1 hodiny (Tabulka 1). Po rozmrazení reakční směsi tyto přípravy promíchejte převrácením každé zkumavky (opakovaným 10krát), aby nedošlo k lokální koncentraci solí, a poté je krátce odstředte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.

Tabulka 1. Doby pro rozmrazení, přípravu PCR a teploty skladování

Minimální doba pro rozmrazení	Maximální doba pro rozmrazení	Skladovací teplota po přípravě PCR	Maximální doba přípravy PCR a doba skladování
1 hodina	4,5 hodiny	Pokojevá teplota (15–25 °C)	6 hodin
1 hodina	4,5 hodiny	2–8 °C	18 hodin

Poznámka: Příprava PCR musí být prováděna při pokojové teplotě. Pojem „skladovací“ se týká doby od dokončení přípravy PCR do zahájení cyklu PCR na přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Poznámka: Nechte *Taq* DNA polymerázu (zkumavka *Taq*) ohřát na pokojovou teplotu (15–25 °C) ve stejnou chvíli jako ostatní činidla (viz „Skladování činidel a manipulace s nimi“, strana 14). Zkumavku krátce odstředte, aby se veškerý enzym shromáždil na dně zkumavky.

2. Provedte následující kroky:
 - 2a. Označte čtyři mikrocentrifugační zkumavky (nejsou součástí dodávky) dle odpovídající reakční směsi, jak je znázorněno v tabulce 2.
 - 2b. Připravte dostatek master mixů (kontrolní nebo mutační reakční směs [zkumavka CTRL, T790M, delece, L858R] plus *Taq* DNA polymeráza [*Taq*]) pro alikvoty DNA, jednu pozitivní kontrolní (zkumavka PC) reakci EGFR a jednu vodu bez nukleázy pro beztemplátovou kontrolu (zkumavka NTC) podle objemů uvedených v tabulce 2.

Poznámka: Zahrňte činidla pro 1 alikvot navíc, představující dostatečný přebytek pro nastavení PCR.

Master mixy obsahují všechny složky nutné k provedení PCR kromě alikvotu.

Tabulka 2. Příprava směsi master mixu*

Analýza	Zkumavka s reakční směsí	Objem reakční směsi	Objem <i>Taq</i> DNA polymerázy (zkumavka <i>Taq</i>)
Kontrola	CTRL	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
T790M	T790M	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
Delece	Del	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
L858R	L858R	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)

* Při přípravě master mixu připravte množství dostatečné pro 1 alikvot navíc, představující dostatečný přídavek pro přípravu PCR.

Poznámka: Během přípravy master mixu je do příslušné zkumavky nejprve přidán požadovaný objem kontrolní nebo mutační reakční směsi (CTRL) a *Taq* DNA polymeráza je přidána naposledy.

- Umístěte příslušný počet stripů se 4 zkumavkami PCR (každý strip obsahuje 4 zkumavky) do plnicího bloku podle rozvržení v tabulce 3. Zkumavky neuzavírejte.

Poznámka: Ponechte víčka v plastové nádobě až do okamžiku, kdy budou třeba.

- Uzavřete zkumavku činidla master mix a **10krát převratte, aby se činidlo master mix promíchalo**. Následně krátce odstředte, abyste zajistili promíchání směsi na dně zkumavky. Ihned přidejte 20 µl master mixu do každé příslušné stripové zkumavky PCR.
- Ihned přidejte 5 µl vody bez obsahu nukleázy (H₂O) do stripových zkumavek PCR k bezteplátové kontrole (zkumavky PCR 9–12) a zkumavky uzavřete víčky.
- Do zkumavek pro vzorky s alikvoty (zkumavky PCR 5–8, 13–16 a 17–72) přidejte 5 µl každého alikvotu a zkumavky uzavřete víčky.
- Přidejte 5 µl pozitivní kontroly (Positive Control, PC) EGFR do zkumavky na pozitivní kontrolu (zkumavka PCR 1–4). Každý alikvot DNA se musí testovat pomocí kontroly i všech analýz mutací. Uvedené rozvržení je zobrazeno v tabulce 3.

Tabulka 3. Rozvržení kontroly a analýzy mutací

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

8. Pomocí permanentního popisovače označte víčka prvních zkumavek v nejnižší číselné pozici v každém stripu se 4 zkumavkami PCR (např. pozice 1, 5 a 9 atd.), aby byla naznačena orientace k naplnění zkumavek do rotoru se 72 jamkami přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- 9. Víčkem uzavřené zkumavky 4krát otočte, abyste promíchali alikvoty a reakční směsi.**
10. Všechny stripy se 4 zkumavkami PCR umístěte do příslušných pozic v rotoru 72-Well Rotor a vizuálně zkontrolujte, zda všechny zkumavky obsahují stejný objem.
- Poznámka:** Ověřte, že nedojde k převrácení stripů zkumavek při jejich přenosu do rotoru.
11. Pokud není rotor plný, zaplňte zbývající prostor prázdnými zavíčkovanými zkumavkami.
12. Rotor ihned umístěte do přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ujistěte se, že pojistný kroužek (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q MDx) je umístěn v horní části rotoru, aby zajistil zkumavky během cyklu.
13. Vytvoření teplotního profilu a spuštění cyklu je popsáno v nastavení přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (viz „Protokol: Nastavení přístroje Rotor-Gene Q EGFR“, strana 22).

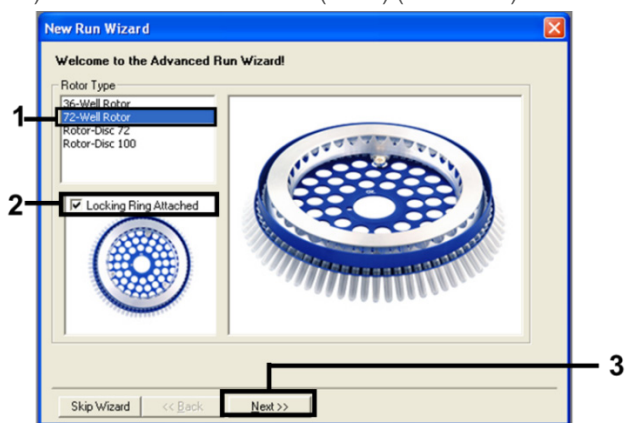
Protokol: Nastavení přístroje Rotor-Gene Q EGFR

Parametry cyklování jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Parametry cyklování

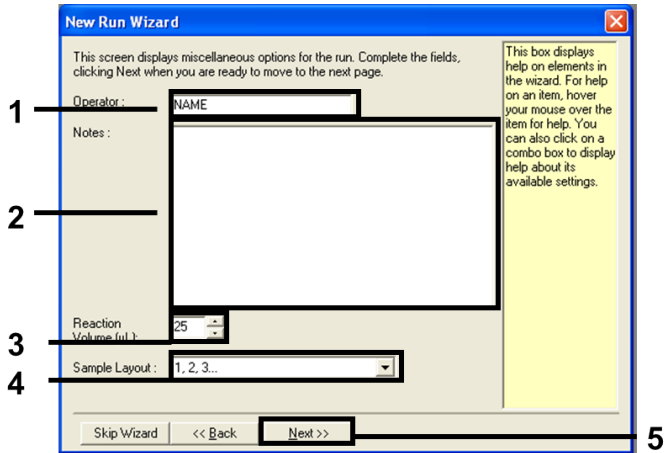
Cyklování	Teplota	Čas	Požíování dat
1	95 °C	15 minut	Žádné
40	95 °C	30 sekund	Žádné
	60 °C	60 sekund	Zelená a žlutá

1. Dvakrát klikněte na ikonu softwaru Rotor-Gene Q Series Software 2.3 na pracovní ploše laptopu připojeného k přístroji Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. V dialogu „New Run“ (Nový cyklus), který se zobrazí, vyberte kartu „Advanced“ (Pokročilý).
2. Chcete-li vytvořit nový templát, vyberte **Empty Run** (Prázdný cyklus) a potom klikněte na **New** (Nový).
Otevře se okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem).
3. Jako typ rotoru vyberte **72-Well Rotor** (rotor se 72 jamkami). Ujistěte se, že je správně nasazen pojistný kroužek, a zaškrtněte políčko **Locking Ring Attached** (Pojistný kroužek nasazen). Klikněte na tlačítko Next (Další) (obrázek 1).



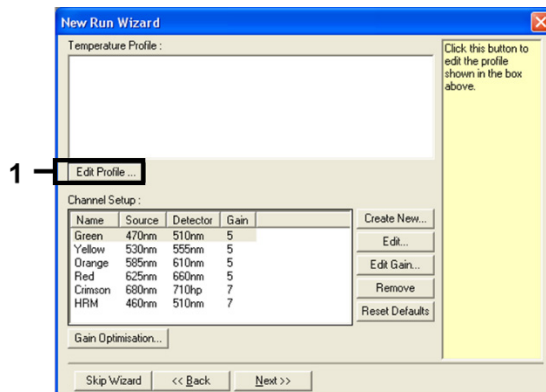
Obrázek 1. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým během).

4. Do pole **Operator** (Obsluha) zadejte jméno obsluhy. Přidejte veškeré poznámky a nastavte hodnotu v poli **Reaction Volume** (Reakční objem) na **25**. Ujistěte se, že hodnoty v poli **Sample Layout** (Rozložení alikvoty) jsou **1, 2, 3...** Klikněte na tlačítko Next (Další) (obrázek 2).



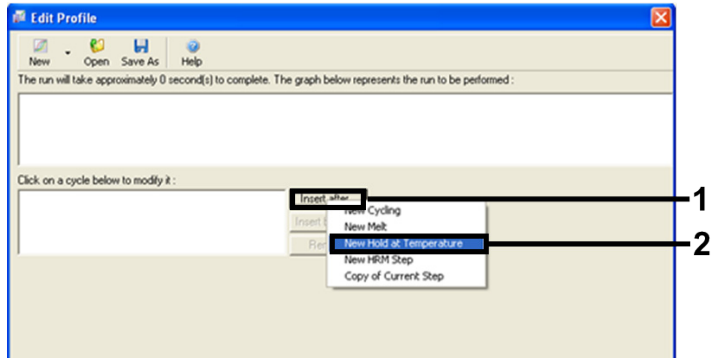
Obrázek 2. Zadání jména obsluhy a objemů reakční směsi.

5. V dialogovém okně „New Run Wizard“ (Průvodce novým cyklem) (obrázek 3) klikněte na tlačítko **Edit Profile** (Upravit profil) a naprogramujte parametry cyklu podle informací v následujících krocích.



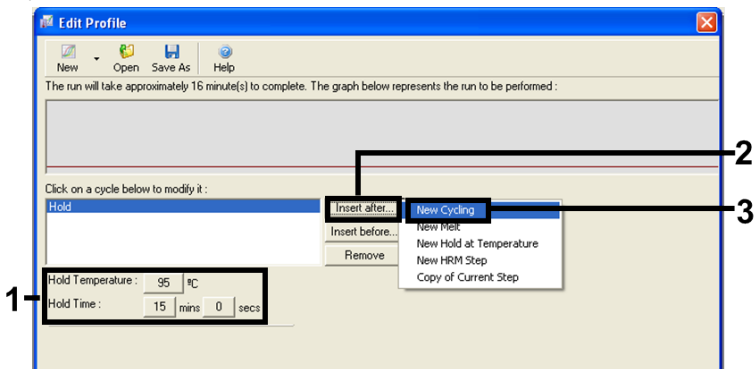
Obrázek 3. Úprava profilu.

6. Klikněte na tlačítko **Insert after** (Vložit za) a vyberte **New Hold at Temperature** (Nové pozastavení při teplotě) (obrázek 4).



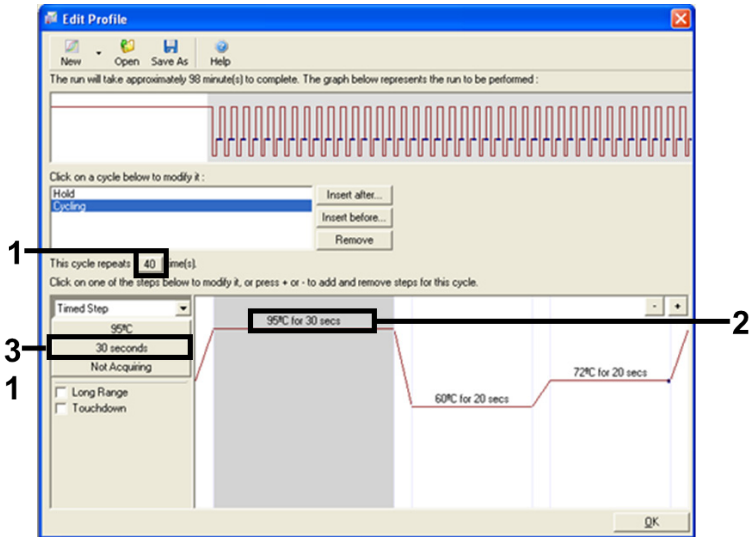
Obrázek 4. Vložení kroku počáteční inkubace.

7. Nastavte hodnotu v poli **Hold Temperature** (Teplota výdrže) na **95 °C** a hodnotu v poli **Hold Time** (Doba výdrže) na **15 mins 0 secs (15 minut 0 sekund)**. Klikněte na tlačítko **Insert after** (Vložit za) a poté vyberte položku **New Cycling** (Nové cyklování) (obrázek 5).



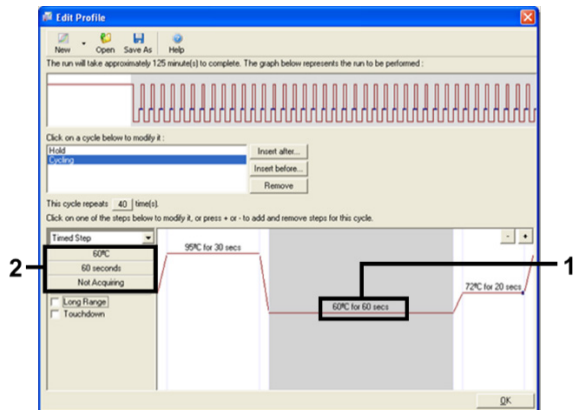
Obrázek 5. Krok počáteční inkubace při 95 °C.

8. Nastavte počet opakování cyklování na **40**. Vyberte první krok a nastavte **95 °C** na 30 sekund (obrázek 6).



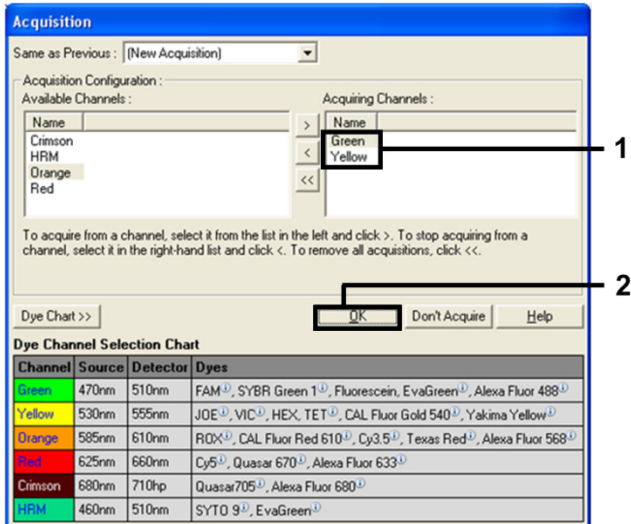
Obrázek 6. Krok cyklování při 95 °C.

9. Zvýrazněte druhý krok a nastavte na 60 °C na 60 sekund. Kliknutím na tlačítko **Not Acquiring** (Nepoživují se) aktivujte pořizování dat během tohoto kroku. (Obrázek 7)



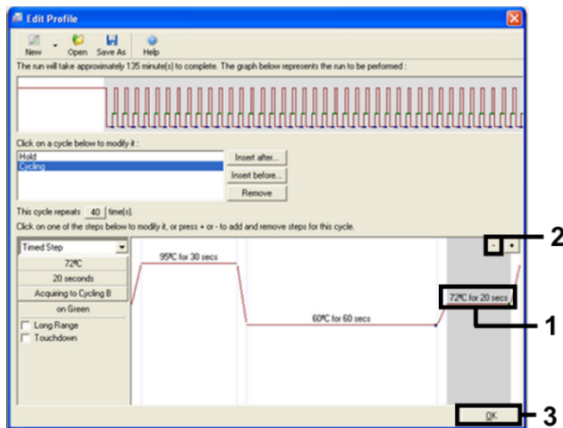
Obrázek 7. Krok cyklování při 60 °C.

10. V seznamu **Available Channels** (Dostupné kanály) vyberte možnost **Green** (Zelený) a **Yellow** (Žlutý), poté klikněte na tlačítko > a přeneste je do seznamu **Acquiring Channels** (Kanály pořizování). Klikněte na tlačítko **OK** (obrázek 8).



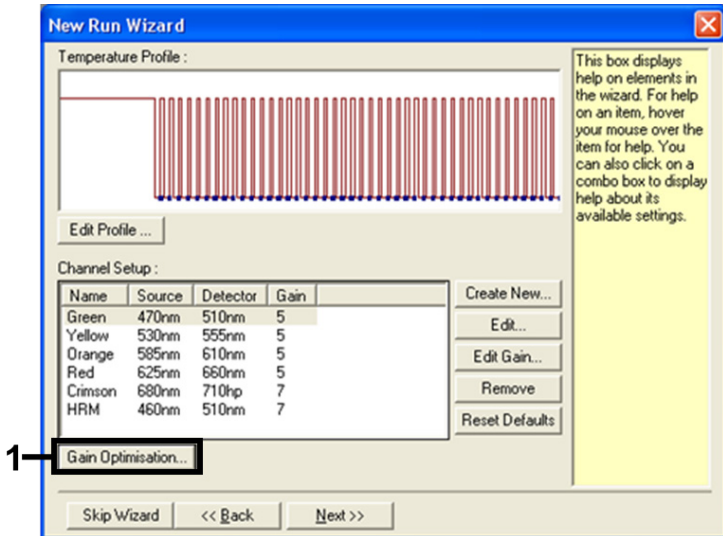
Obrázek 8. Pořizování při kroku cyklování 60 °C.

11. Zvýrazněte třetí krok a proveďte smazání kliknutím na tlačítko -. Klikněte na tlačítko **OK** (obrázek 9).



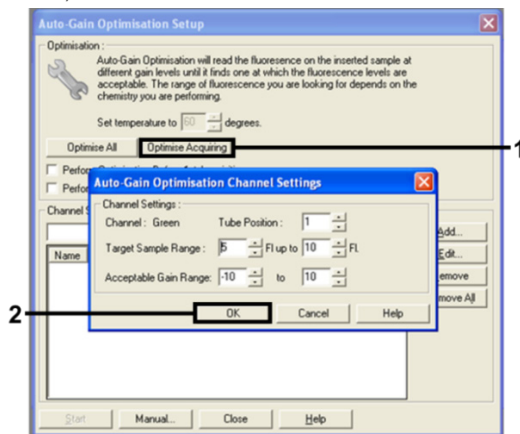
Obrázek 9. Odstranění rozšiřujícího kroku.

12. V dalším dialogovém okně klikněte na tlačítko **Gain Optimisation** (Optimalizace zisku) (obrázek 10).



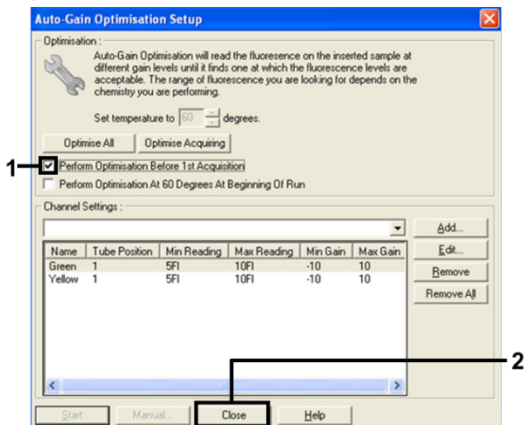
Obrázek 10. Optimalizace zisku.

13. Klikněte na tlačítko **Optimise Acquiring** (Optimalizovat pořizování). Pro každý kanál se zobrazí jeho nastavení. Kliknutím na tlačítko **OK** přijmete tyto výchozí hodnoty pro oba kanály. (Obrázek 11)



Obrázek 11. Optimalizace automatického zvyšování citlivosti pro kanál Green.

14. Zaškrtněte políčko **Perform Optimisation before 1st Acquisition** (Provést optimalizaci před 1. pořízením) a poté se kliknutím na tlačítko **Close** (Zavřít) vraťte do průvodce (obrázek 12).



Obrázek 12. Výběr kanálů Green a Yellow.

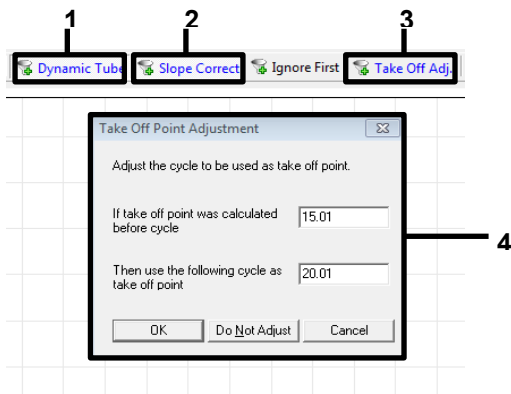
15. Kliknutím na tlačítko **Next** (Další) uložte templát do příslušného místa výběrem možnosti „**Save Template**“ (Uložit templát).

Analýza dat hodnocení mutace vzorku

Po dokončení cyklu analyzujte data následujícím postupem.

Nastavení softwarové analýzy

1. Otevřete odpovídající soubor pomocí softwaru přístroje Rotor-Gene Q verze 2.3.5 nebo vyšší.
2. Jestliže alikvoty nejsou před provedením cyklu pojmenovány, klikněte na možnost **Edit Samples** (Upravit alikvoty).
3. Zadejte názvy alikvotů do sloupce **Name** (Název).
Poznámka: Ponechte názvy případných prázdných jamek nevyplněné.
4. Klikněte na tlačítko **Analysis** (Analýza). Na straně analýzy klikněte na možnost **Cycling A Yellow** a zkontrolujte kanál HEX.
5. Ujistěte se, že je zvýrazněna položka **Dynamic Tube** (Dynamická zkumavka). Klikněte na tlačítko **Slope Correct** (Křivka správně) a **Linear Scale** (Lineární stupnice).
6. Klikněte na tlačítko **Take Off Adj.** (Nastavení bodu vyjmutí) a zadejte **15,01** a **20,01**, jak je znázorněno na obrázku 13.



Obrázek 13. Nastavení normalizace analýzy EGFR. 1 = „Dynamic Tube“ (Dynamická zkumavka), 2 = tlačítko „Slope Correct“ (Křivka správně), 3 = „Take Off Adj.“ (Nastavení bodu vyjmutí), 4 = dialogové okno s hodnotami parametru „Take Off Adj.“ (Nastavení bodu vyjmutí).

7. Nastavte prahovou hodnotu na **0,02** a zkontrolujte hodnoty HEX C_T .
8. Na straně analýzy klikněte na položku **Cycling A, Green**, aby se zobrazil kanál FAM. Nastavte parametry dle obrázku 13 výše.
Dynamická zkumavka musí být zvýrazněna.
9. Klikněte na tlačítko **Slope Correct** (Křivka správně) a **Linear Scale** (Lineární stupnice).
10. Nastavte prahovou hodnotu na **0,075** a zkontrolujte hodnoty FAM C_T .

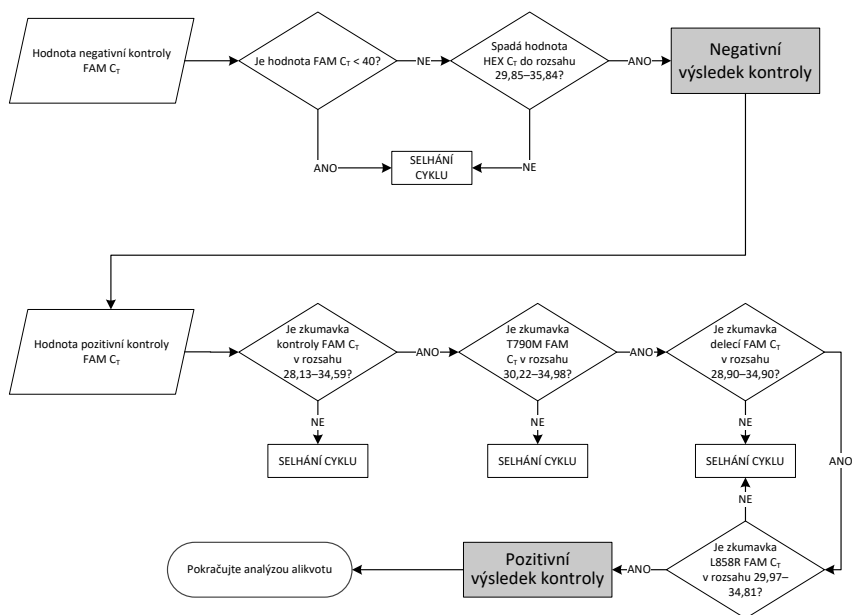
Analýza kontrol cyklu

Po dokončení cyklu analyzujte data následovně.

- **Negativní kontrola:** Aby nedošlo ke kontaminaci templátu, žádná z NTC nesmí generovat hodnotu C_T v zeleném kanálu (FAM) nižší než 40. Aby bylo zajištěno správné nastavení analýzy, nesmí kontrola bez templátu (No Template Control, NTC) zobrazovat amplifikaci v rozsahu 29,85–35,84 ve žlutém (HEX) kanálu (interní kontrola). Jestliže je v zeleném kanálu pozitivní amplifikace a/nebo je zesílení mimo rozsah 29,85–35,84 ve žlutém kanálu, je cyklus neplatný.
- **Pozitivní kontrola:** Pozitivní kontrola EGFR (Positive Control, PC) musí poskytnout hodnotu C_T pro každou zpracovanou reakční směs, daný rozsah je uveden v tabulce 5. Hodnota pozitivní kontroly mimo tento rozsah indikuje problém s nastavením analýzy a znamená tedy selhání cyklu. Jestliže pozitivní kontrola poskytuje C_T v rámci rozsahu (FAM), avšak C_T (HEX) interní kontroly je mimo rozsah 29,85 až 35,84, pokračujte v analýze.
Poznámka: Data alikvotu nelze použít, jestliže negativní nebo pozitivní kontrola selhala.

Tabulka 5. Přijatelný rozsah C_T pro kontroly cyklu

Reakční kontrola	Analýza	Kanál	Rozsah C_T
Pozitivní kontrola	Kontrola	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Delece	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Beztemplátová kontrola	Všechny čtyři reakční směsi	Green (FAM)	≥ 40,00
	Všechny čtyři reakční směsi	Yellow (HEX)	29,85-35,84



Obrázek 14. Pracovní postup analýzy kontrol cyklu.

Za předpokladu, že oba výsledky kontrolních cyklů jsou platné, všechny hodnoty CT alikvot kontrolní analýzy musejí být v rozsahu 23,70–31,10 v zeleném kanálu (FAM) (tabulka 6).

Tabulka 6. Přijatelný rozsah FAM C_T pro kontrolní reakci alikvot

Reakční směs	Kanál	Přijatelný rozsah C _T
Kontrola	Green (FAM)	23,70–31,10

Je-li alikvot mimo tento rozsah, platí následující pokyn.

- **Kontrolní analýza alikvot C_T je < 23,70:** Alikvoty vykazující u kontroly hodnotu C_T < 23,70 nadměrně zatěžují analýzy mutace a musí se proto zředit. Aby bylo možné zachytit každou mutaci při nízké úrovni, nadměrně koncentrované alikvoty musejí být ředěny tak, aby spadaly do výše uvedeného rozsahu za předpokladu, že rozředění vzorku o polovinu zvýší hodnotu C_T o 1.

- **Kontrolní analýza alikvotu C_T je > 31,10:** Alikvot neobsahuje dostatečné množství DNA pro provedení analýzy.

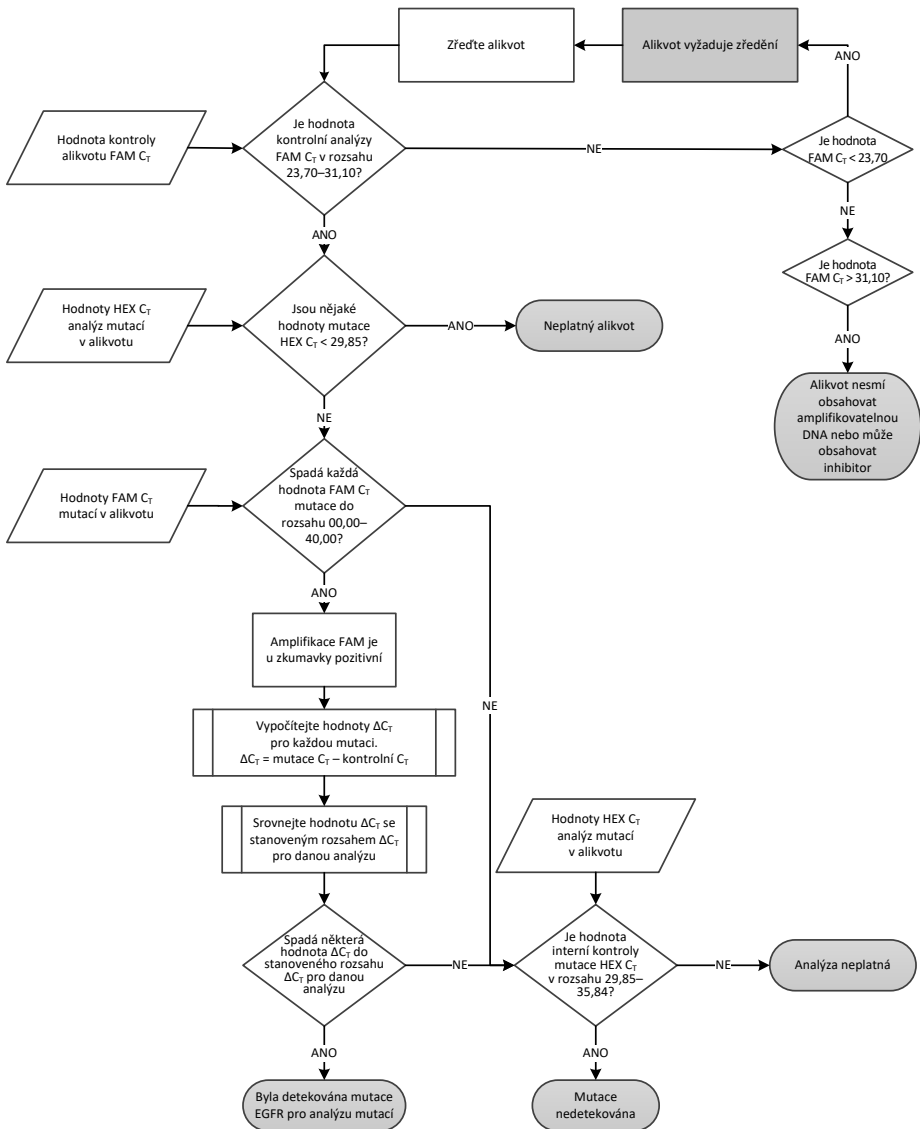
Za předpokladu, že oba výsledky kontrol cyklu jsou platné a kontrolní analýza je v rozsahu uvedeném v tabulce 6, každá hodnota C_T mutace alikvotu musí být v rozsahu uvedeném v tabulce 7 v zeleném (FAM) kanálu. Je-li alikvot mimo tento rozsah, platí následující pokyn.

Tabulka 7. Přijatelné hodnoty reakce mutací alikvot

Reakce	Reakční směs	Kanál	Rozsah C_T
Mutační reakce	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Delece	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Všechny tři mutace	Yellow (HEX)	29,85-35,84

Poznámka: Pokud alikvot negeneruje C_T (tj., $C_T > 40$), může to být v důsledku přítomnosti inhibitoru, chyby v nastavení analýzy nebo nepřítomnosti amplifikovatelné EGFR DNA.

- Hodnota C_T interní kontroly je v rozsahu 29,85–35,84: Neexistuje zde žádná amplifikovatelná EGFR DNA.
- Hodnota interní kontroly C_T je mimo rozsah 29,85–35,84: Může to indikovat chybu při nastavení analýzy nebo přítomnost inhibitoru. Zředění alikvotu může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění DNA.



Obrázek 15. Vývojový diagram analýzy dat mutací.

Hodnota FAM C_T analýz mutace alikvotů

Hodnoty FAM všech tří reakčních směsí mutací je třeba zkontrolovat s využitím hodnot uvedených v tabulce 8.

Následujícím postupem vypočítejte hraniční hodnotu ΔC_T jednotlivých alikvotů s mutacemi, které indikují kladnou hodnotu amplifikace, přičemž zajistěte, aby hodnoty mutace a kontrolní hodnoty C_T pocházely ze stejného alikvotu.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutace} - C_T \text{ kontroly}$$

Porovnejte hodnotu ΔC_T alikvotu s hraničním rozsahem ΔC_T pro zkoumanou analýzu (Tabulka 8) a zkontrolujte, že se pro každou analýzu používá správná hraniční hodnota.

Tabulka 8. Analýza mutací, hraniční rozsah ΔC_T

Analýza mutací	Hraniční rozsah ΔC_T
T790M	-10,00 ≥ až ≤ 7,40
Delece	-10,00 ≥ až ≤ 8,00
L858R	-10,00 ≥ až ≤ 8,90

Horní mez hraničního rozsahu ΔC_T je bod, nad kterým může docházet k pozitivnímu signálu v důsledku signálu pozadí primeru ARMS na DNA divokého typu. Je-li hodnota ΔC_T alikvotu vyšší než horní bod hraničního rozsahu ΔC_T , vyhodnotí se jako „Mutation not detected“ (Mutace nedetekována) nebo ležící pod limity detekce soupravy. Pokud je hodnota alikvotu v mezích hraničních hodnot ΔC_T , je alikvot považován za pozitivní z hlediska mutace detekované touto analýzou. Pokud je hodnota alikvotu pod spodní hranicí hraničního rozsahu ΔC_T , pak by to mohlo být potenciálně způsobeno fluorescenčním artefaktem.

Poznámka: Pro alikvoty nevykazující žádnou FAM mutaci C_T je vyžadováno posouzení interní kontroly (HEX) C_T pro určení, zda nejsou mutace zjištěny nebo je analýza neplatná.

Pokud je hodnota HEX C_T mezi 29,85 a 35,84, žádná mutace není detekována. Pokud je hraniční hodnota HEX ΔC_T mimo tento rozsah, je alikvot neplatný.

Souhrnně, pro všechny alikvoty musí být na základě následujících kritérií každá reakce mutace vyhodnocena jako „mutace detekována“, „mutace nedetekována“ nebo „neplatné“.

- **Mutace detekována:** Pozitivní amplifikace FAM a hodnota ΔC_T odpovídají meznímu rozsahu ΔC_T nebo jsou nižší. Pokud je zjištěno více mutací, mohou být vykázány všechny.
- **Mutace nedetekována:**
 - Pozitivní amplifikace FAM a hraniční hodnota ΔC_T je nad hraničním rozsahem ΔC_T a HEX (interní kontrola) je v rozsahu 29,85–35,84.
 - Amplifikace FAM je negativní a HEX (interní kontrola) je v rozsahu 29,85–35,84.
- **Neplatné:** Amplifikace FAM je negativní a amplifikace HEX je mimo specifikace.
 - Vypočtená hodnota ΔC_T je pod hraničním rozsahem ΔC_T a HEX (interní kontrola) je v očekávaném rozsahu. Hodnota ΔC_T nižší než $-10,00$ naznačuje, že mohlo dojít k fluorescenčnímu artefaktu.

Návod pro řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a protokolů v této příručce i obecně k technologiím pro přípravu alikvotů a jejich analýzy (možnosti navázání kontaktu viz zadní strana nebo navštivte webové stránky www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Žádný signál s EGFR pozitivní kontrolou (Positive Control, PC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) Fluorescenční kanál zvolený pro analýzu dat PCR neodpovídá protokolu. | Pro analýzu dat vyberte fluorescenční kanál Cycling Green pro analytické EGFR PCR a fluorescenční kanál Cycling Yellow pro interní kontroly PCR. |
| b) Nesprávné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor Gene Q MDx 5plex HRM | Porovnejte teplotní profil s protokolem; je-li nesprávný, potom daný cyklus zopakujte. |
| c) Chybná konfigurace PCR | Zkontrolujte své pracovní kroky podle schématu pipetování, případně PCR zopakujte. |
| d) Skladovací podmínky jedné nebo několika součástí soupravy neodpovídaly instrukcím v části „Skladování činidel a manipulace s nimi“ (na straně 14) | Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (viz štítek soupravy) reagensí a případně použijte novou soupravu. |
| e) Souprava <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit překročila datum expirace | Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace (viz štítek soupravy) reagensí a případně použijte novou soupravu. |

Komentáře a návrhy

Signály s negativními kontrolami ve fluorescenčním kanálu a Cycling Green analytického PCR

- a) Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci
- Zopakujte PCR s novými činidly.
- Uzavřete jednotlivé PCR zkumavky pokud možno ihned po vložení zkoumaného alikvotu.
- Zkontrolujte, zda jsou přístroje a pracoviště pravidelně dekontaminovány.
-

Několikanásobné překročení prahové hodnoty nebo hodnota ΔC_T pod hraničním rozsahem

- a) Nesprávné promíchání během nastavení analýzy
- Opakujte PCR, pokud to ovlivní kontrolu, nebo znovu otestujte nezdařený alikvot.
- Postupujte podle návodu k použití, přičemž věnujte zvláštní pozornost krokům míchání.

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN, certifikovaným podle ISO, je každá výrobní šarže souprav *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

Omezení

Výsledky získané pomocí produktu musí být interpretovány v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů a nejsou určeny k použití samostatně jen pro diagnostiku.

Produkt je určen k použití personálem speciálně instruovaným a vyškoleným v postupech diagnostiky in-vitro pomocí přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Analytické validační studie zahrnovaly lidskou DNA extrahovanou ze vzorků plazmy.

Produkt je určen k použití pouze s cyklem pro real-time PCR přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Pro získávání optimálních výsledků je nutné přísně dodržovat pokyny uvedené v příručce k soupravě *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Jiné ředění činidel než to, které je popsáno v této příručce, se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu.

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.

Primery v reakční směsi pro delece EGFR byly navrženy tak, aby cílily na více delecí exonu 19, pokrývající nukleotidy 55174772 až 55174795 (GRCh38 chr7), rozsah 23 bp.

Přestože byla analýza delecí exonu 19 analyticky validována a bylo prokázáno, že detekuje specifické delece v rámci exonu 19 (viz tabulka 13 této příručky), může však reakční směs pro delece amplifikovat další mutace (včetně, mimo jiné, dalších delecí exonu 19, inzercí exonu 19 a mutace L747P).

Pokud jsou takové dodatečné mutace přítomny, povedou u daného patientského alikvotu k výsledku „Deletions Detected“ (Detekovány delece).

Kromě toho je možné pomocí reakční směsi L858R detekovat mutaci L858Q. Pokud je tedy v patientském alikvotu přítomna, může mutace L858Q vést k výsledku „L858R Mutation Detected“ (Detekována mutace L858R).

Charakteristika funkčních vlastností

Analytická citlivost – mez slepého vzorku (Limit of Blank, LOB)

K vyhodnocení účinnosti soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit bez přítomnosti templátu a aby se zajistilo, že slepý alikvot nebo alikvot s DNA divokého typu nevytváří analytický signál, který může ukazovat na nízkou koncentraci mutace, bylo vyhodnoceno 59 různých alikvotů plazmy NSCLC EGFR s DNA divokého typu. Kritéria přijatelnosti studie (nejméně 95 % alikvotů divokého typu musí mít hraniční hodnotu ΔC_T vyšší než příslušnou hraniční hodnotu) byla splněna.

Limit detekce (Limit of Detection, LOD)

LOD je minimální procentní podíl mutantní DNA, který lze detekovat na pozadí DNA divokého typu, kdy se při celkové amplifikovatelné DNA (v rámci vstupního rozsahu) dosáhlo správného stanovení mutace u 95 % všech alikvotů pozitivních na mutaci (C95). Uvedený vstupní pracovní rozsah DNA pro analýzu je definován předem stanoveným rozsahem hodnot C_T kontroly 23,70 až 31,10.

LOD byl stanoven při nízkých vstupních hladinách DNA (C_T kontroly přibližně 30,10) s použitím DNA odvozené z tkáně FFPE pro soupravu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD byl stanoven s použitím klinických vzorků FFPE i buněčné linie FFPE při nízkých vstupních hladinách DNA pro tyto mutace EGFR.

Hodnoty LOD stanovené pomocí tkáně FFPE byly ověřeny pro soupravu *therascreen* EGFR plasma RQG PCR Kit s DNA odvozenou ze vzorků plazmy záměrně pozitivních na mutaci.

Konečné limity LOD, uvedené v tabulce 9 na další stránce, označují procento mutace, které poskytlo 95% predikovanou pravděpodobnost správné detekce pro každou mutaci.

Tabulka 9. LOD pro každé stanovení analýzy mutací EGFR

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

* LOD stanovení ověřené v plazmě jako součásti potvrzovací studie LOD soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

† Tyto mutace nebyly potvrzeny v plazmě.

Analytická citlivost – Δ hraniční hodnoty C_T a hraniční rozsah ΔC_T

Přístup na bázi rizika byl přijat s ohledem na míru falešně pozitivních výsledků při stanovení hraničních hodnot analýzy a odhadované hodnoty LOB byly použity jako jedna součást při tvorbě hraničních hodnot.

Příslušné hraniční rozsahy ΔC_T stanovené pro každou analýzu mutace v soupravě *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10. Souprava *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit – hraniční rozsahy ΔC_T

Analýza mutací	Hraniční rozsah ΔC_T
T790M	-10,00 \geq až \leq 7,40
Delece	-10,00 \geq až \leq 8,00
L858R	-10,00 \geq až \leq 8,90

Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Opakovatelnost a reprodukovatelnost byly posouzeny testováním hladiny mutace při $3 \times$ LOD na pozadí genomové DNA divokého typu na třech pracovištích pomocí více šarží souprav, obsluh a během několika dní se dvěma replikacemi každého alikvotu. U všech 3 analýz mutace bylo 100 % alikvot s mutantní DNA testováno jako pozitivní na mutaci. Testované alikvoty divokého typu byly s negativní reakcí na mutace ve všech analýzách na všech pracovištích.

Vliv vstupní hladiny DNA na hodnoty C_T

Vstupní hladina DNA je definována jako celkové množství amplifikovatelné DNA EGFR v alikvotu dle stanovení z hodnot C_T z kontrolní reakce. K prokázání, že je účinnost soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit konzistentní v celém rozsahu C_T kontrolní reakce (23,70–31,10), byly u všech 3 analýz mutací EGFR provedeny testy oproti sérii šesti ředění v poměru 1 : 3 (DNA extrahovaná z buněčných linií FFPE). Cílová hodnota C_T pro ředění jedna byla pro každou mutaci přibližně 24,70. Poslední ředění, které poskytlo hodnotu C_T přibližně 32–33, bylo mimo rozsah C_T kontrolní reakce. Celkově byly hraniční hodnoty ΔC_T změřené při různých celkových vstupních hladinách DNA konzistentní v celém pracovním rozsahu soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Interferující látky

Endogenní interferující látky

Potenciálně interferující látky byly přidány do vzorků plazmy záměrně pozitivních na mutaci při $3 \times \text{LOD}$. Alikvoty poté byly testovány pomocí soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Alikvoty obsahující potenciálně interferující látky byly porovnány se vzorky plazmy záměrně pozitivní na mutaci při $3 \times \text{LOD}$ bez obsahu interferujících látek. Každá interferující látka byla otestována ve 4 replikátech.

Rozdíl $> 2 \times$ směrodatné odchylky (Standard Deviation, SD) (převzato ze studie přesnosti) mezi „testem“ a „kontrolou“ ΔC_T (tj. bez interferující látky) byl považován za indikaci možné interference. U těchto látek je uveden pozorovaný rozdíl v ΔC_T .

Koncentrace testu uvedené v tabulce 11 byly zvoleny na základě pokynů uvedených v pokynech CLSI EP07-A2 a představují maximální očekávané koncentrace v klinickém alikvotu.

Poznámka: Tyto endogenní složky byly přidány do vzorků plazmy záměrně pozitivních na mutaci, které zahrnovaly plazmu od zdravých dárců. Tyto endogenní složky by proto byly přirozenou součástí alikvot při neznámé koncentraci před přidáním. Konečná koncentrace každé testované potenciální endogenní interferující látky by byla pravděpodobně vyšší než koncentrace testu.

Tabulka 11. Potenciálně interferující endogenní látky

Potenciální interferující látky (Interfering Substance, IS)	Koncentrace testu
Nekonjugovaný bilirubin	15 mg/dl
Hemoglobin (lidský)	0,2 g/dl
Triglyceridy	3 g/dl

Analýza T790M

Ukázalo se, že následující endogenní složky v koncentracích uvedených v tabulce 11 mají vliv $> 2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) na účinnost analýzy T790M:

- Triglyceridy, rozdíl $1,37 \Delta C_T$

Analýza delecí

Ukázalo se, že následující endogenní složky v koncentracích uvedených v tabulce 11 mají vliv $> 2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) na účinnost analýzy delecí:

- Hemoglobin, rozdíl $0,80 \Delta C_T$

Analýza L858R

Ukázalo se, že následující endogenní složky v koncentracích uvedených v tabulce 11 mají vliv $> 2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) na účinnost analýzy L858R:

- Bilirubin, rozdíl $1,13 \Delta C_T$
- Triglyceridy, rozdíl $1,53 \Delta C_T$

Exogenní interferující látky

Potenciálně interferující látky byly přidány do vzorků plazmy záměrně pozitivních na mutaci při $3 \times \text{LOD}$. Alikvoty poté byly testovány pomocí soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Alikvoty obsahující potenciálně interferující látky byly porovnány se vzorky plazmy záměrně pozitivní na mutaci při $3 \times \text{LOD}$ bez obsahu interferujících látek. Každá interferující látka byla otestována ve 4 replikátech.

Rozdíl $> 2 \times$ směrodatné odchylky (převzato ze studie přesnosti) mezi ΔC_T „testu“ a ΔC_T „kontroly“ (tj. bez interferující látky) byl považován za indikaci možné interference. U těchto látek je uveden pozorovaný rozdíl v ΔC_T .

Koncentrace testu uvedené v tabulce 12 byly zvoleny na základě pokynů uvedených ve směrnici CLSI EP07-A2 a ve všech případech překračují léčebné koncentrace.

Tabulka 12. Potenciálně interferující endogenní látky

Potenciální interferující látka (Interfering Substance, IS)	Koncentrace testu ($\mu\text{g/ml}$)
Citalopram hydrobromid	0,75
Paroxetin hydrochlorid hemihydrát	1,14
Sertralin hydrochlorid	0,67
Fluoxetin hydrochlorid	3,87
Acetaminofen	200,7
K_2 EDTA	3600

Analýza T790M

Ukázalo se, že následující exogenní složky v koncentracích uvedených v tabulce 12 mají vliv $> 2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) na výkon analýzy T790M:

- Citalopram hydrobromid, rozdíl $0,52 \Delta C_T$
- Sertralin hydrochlorid, rozdíl $0,47 \Delta C_T$
- Fluoxetin hydrochlorid, rozdíl $0,48 \Delta C_T$

Analýza delecí

Ukázalo se, že následující exogenní složky v koncentracích uvedených v tabulce 12 mají vliv $> 2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) na účinnost analýzy delecí:

- Fluoxetin, rozdíl $0,73 \Delta C_T$

Analýza L858R

Ukázalo se, že následující exogenní složky v koncentracích uvedených v tabulce 12 mají vliv $> 2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) na výkon analýzy L858R:

- Citalopram hydrobromid, rozdíl $0,72 \Delta C_T$
- Paroxetin hydrochlorid hemihydrát, rozdíl $0,92 \Delta C_T$
- Sertralin hydrochlorid, rozdíl $0,82 \Delta C_T$
- Fluoxetin hydrochlorid, rozdíl $0,98 \Delta C_T$
- Acetaminofen, rozdíl $0,81 \Delta C_T$
- K_2 EDTA, rozdíl $0,57 \Delta C_T$

Klinická účinnost

Klinické hodnocení NCT01203917 byla otevřená, jednoramenná studie fáze IV k posouzení účinnosti a bezpečnosti/snášenlivosti přípravku gefitinibu první linie léčby u bělošské populace pacientů s NSCLC stádia IIIA/B/IV pozitivním na mutaci EGFR.

Způsobilost pacientů pro zařazení do klinického hodnocení NCT01203917 byla stanovena přítomností senzitivizujících mutací EGFR. Stav mutace EGFR u pacientů s NSCLC byl vyhodnocen s použitím testu klinického hodnocení (Clinical Trial Assay, CTA), s DNA z odpovídajících vzorků tkáně a plazmy. Tato studie zahrnovala předem plánovaný výzkumný cíl pro biomarkery za účelem stanovení, zda by vzorky plazmy mohly být vzaty v úvahu pro analýzu mutace, pokud nejsou k dispozici alikvoty tkáně. Výsledky ukázaly vysokou míru shody mezi odpovídajícími vzorky tkáně a plazmy při koncentraci 94,3 %, se specificitou analýzy 99,8 % a citlivostí 65,7 %.

Zpětné testování vzorků plazmy od pacientů, kteří prošli screeningem klinického hodnocení NCT01203917, bylo provedeno pomocí soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Paralelní studie byla provedena za účelem vyhodnocení shody soupravy *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit s CTA použité k výběru pacientů pro klinické hodnocení NCT01203917. Byla prokázána rovnocennost mezi CTA a soupravou *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Literatura













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

Kontaktní údaje

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na internetové adrese www.qiagen.com/Support, volejte na telefonní číslo 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN anebo naše místní distributory (viz zadní strana obalu nebo navštivte webové stránky www.qiagen.com).

Symbols

V návodu k použití anebo na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
 Σ <N>	Obsahuje dostatek reagensů pro <N> reakcí
	Použijte do
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (tj. označení dílu)
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Globální číslo obchodní položky
Rn	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Teplotní rozmezí
	Výrobce

Symbol

Definice symbolu



Viz návod k použití



Varování/upozornění

Příloha A: Podrobné informace o mutacích

Tabulka 13 uvádí kódy mutací (COSMIC ID) převzaté z katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabulka 13. Přehled mutací a katalogu COSMIC ID

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

Informace pro objednání

Produkt	Obsah	Kat. č.
Souprava <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – pro detekci mutací v genu EGFR		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Pro 24 reakcí: 1 kontrolní analýza, 7 analýz mutací, pozitivní kontrola, <i>Taq</i> DNA polymeráza	870311
Přístroj Rotor-Gene Q MDx a příslušenství		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cykler pro real-time PCR a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler pro real-time PCR a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Hliníkový blok k ruční přípravě reakce pomocí jednobanňové pipety ve zkumavkách 72 × 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách s uzávěry, pro 1 000 reakcí	981103

Produkt	Obsah	Kat. č.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 stripů po 4 zkumavkách s víčky na 10 000 reakcí	981106
Související výrobky		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Pro přípravu 50 alikvotů: Kolonky QIAamp Mini, prodlužovače zkumavek (20 ml), QIAGEN Proteinase K, nosič RNA, pufry, VacConnectors a odběrové zkumavky Collection Tubes (1,5 ml a 2 ml)	55114

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro soupravu QIAGEN nebo uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technické podpory společnosti QIAGEN či místního distributora.

Historie revizí dokumentu

Revize

Popis

R4, říjen 2019	<p>Změna u zákonného výrobce (titulní strana)</p> <p>Přizpůsobení názvu přístroje z Rotor-Gene Q MDx na Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM tak, aby odpovídal názvu uvedenému na štítku přístroje</p> <p>Opravené pokyny pro skladování činidel od 90 dnů do 12 měsíců nebo do data expirace.</p> <p>Část Omezení aktualizována a doplněna informacemi o analýze delecí exonu 19 a analýze L858R.</p> <p>Revidovaná tabulka 9, aby se nahradil duplikovaný exon 21 L858R za delece exonu 19</p> <p>Z titulní stránky a části Symboly odstraněn symbol EC + REP.</p>
R5, červen 2020	<p>Aktualizovány odkazy na verzi softwaru RGQ z 2.3 na 2.3.5 nebo vyšší</p> <p>Aktualizovány tabulky 8 a 10 se zavedením nového hraničního rozsahu ΔC_T a odpovídajícím způsobem byly upraveny všechny příslušné popisy v celé příručce.</p> <p>Aktualizovány všechny kapitoly protokolu tak, aby zahrnovaly informace o důležitosti míchání v důležitých bodech před zahájením sekce; zvýraznění podrobností míchání ve všech krocích míchání.</p> <p>Doplněn krok míchání do části „Protokol: Detekce mutací EGFR“.</p> <p>Aktualizována část Řešení potíží a doplněna řešení pro vícenásobné překročení prahové hodnoty.</p>
R6, červen 2022	<p>Aktualizovaná tabulka v oddíle Interferující látky s cílem změnit testovací koncentraci pro nekonjugovaný bilirubin ze 150 na 15 mg/dbl</p>

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Omezená licenční smlouva pro soupravu *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje každý kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v panelu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v tomto panelu, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v tomto panelu obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tento panel a/nebo jeho použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tento panel a jeho komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přeprocessovat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoli další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat základy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem a/nebo jeho součástmi.

Pro aktualizovanou licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

Ochranné známky: QIAGEN[®], Sample to Insight[™], QIAamp[®], *therascreen*[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA[®] (AstraZeneca Group). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když takto nejsou konkrétně označeny, nesmějí být považovány za nechráněné zákonem.

Červen 2022 HB-1898-007 1127512CS © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

