



Tháng 6 năm 2022

# Hướng dẫn Sử dụng *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Phiên bản 1

**IVD**

Dùng cho Mục đích Sử dụng Chẩn đoán In Vitro  
Để sử dụng với các dụng cụ Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

**CE**

**REF**

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ĐỨC

R6 **MAT**

1127512VI



# Mục lục

Mục đích sử dụng.....	5
Tóm tắt và Giải thích .....	6
Nguyên lý của Quy trình.....	7
Định dạng bộ dụng cụ .....	7
Xét nghiệm .....	8
Mẫu chứng.....	9
Vật tư được cung cấp.....	10
Thành phần bộ dụng cụ .....	10
Các vật tư yêu cầu nhưng không được cung cấp .....	11
Cảnh báo và Phòng ngừa .....	12
Thông tin an toàn .....	12
Phòng ngừa chung.....	12
Bảo quản và Xử lý Thuốc thử.....	14
Bảo quản và Xử lý Bệnh phẩm.....	16
Quy trình.....	17
Giao thức: Phát hiện Đột biến EGFR .....	18
Giao thức: Thiết lập Rotor-Gene Q EGFR.....	22
Phân tích dữ liệu đánh giá đột biến.....	29
Hướng dẫn Khắc phục sự cố .....	36
Kiểm soát Chất lượng .....	38
Hạn chế .....	38
Đặc tính hiệu năng .....	40

Độ nhạy phân tích — giới hạn trống (limit of blank, LOB) .....	40
Giới hạn phát hiện (Limit of detection, LOD) .....	40
Độ nhạy phân tích — Dngưỡng $C_T$ và phạm vi ngưỡng $\Delta C_T$ .....	42
Tính lặp lại và tính tái lập .....	42
Ảnh hưởng của đầu vào DNA đến giá trị $C_T$ .....	42
Các chất gây nhiễu .....	43
Hiệu năng Lâm sàng .....	47
Tài liệu tham khảo .....	48
Thông tin liên hệ .....	49
Biểu tượng .....	50
Phụ lục A: Chi tiết về Đột biến .....	52
Thông tin Đặt hàng .....	53
Lịch sử Sửa đổi Tài liệu .....	55

## Mục đích sử dụng

*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit là một xét nghiệm chẩn đoán trong ống nghiệm để phát hiện mất đoạn exon 19, thay thế exon 20 và 21 (tương ứng là T790M và L858R) trong gen thụ thể yếu tố tăng trưởng thượng bì (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) và sẽ cung cấp đánh giá định tính về trạng thái đột biến. Kết quả nhằm hỗ trợ bác sĩ lâm sàng xác định những bệnh nhân bị NSCLC có thể có lợi từ việc điều trị bằng IRESSA® (gefitinib) khi không thể đánh giá được mẫu mô.

*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sẽ được sử dụng bởi nhân viên được đào tạo trong môi trường phòng thí nghiệm chuyên nghiệp với các mẫu DNA tách chiết từ huyết tương lấy từ máu bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

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

# Tóm tắt và Giải thích

*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit là bộ dụng cụ sẵn sàng sử dụng để phát hiện các đột biến trong gen liên quan đến ung thư EGFR bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) trên các dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Sử dụng các công nghệ Scorpions® và ARMS, *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit cho phép phát hiện các đột biến gen EGFR sau trên nền DNA bộ gen kiểu tự nhiên.

- Mất đoạn exon 19
- T790M
- L858R

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

# Nguyên lý của Quy trình

*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sử dụng hai công nghệ – ARMS và Scorpions – để phát hiện các đột biến trong real-time PCR.

## ARMS

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

## Scorpions

Việc phát hiện khuếch đại được thực hiện bằng cách sử dụng Scorpions. Scorpions là các phân tử hai chức năng có chứa mỗi PCR được liên kết cộng hóa trị với một đoạn dò. Fluorophore trong đoạn dò này tương tác với chất thu nhận tín hiệu, cũng được đưa vào đoạn dò, làm giảm huỳnh quang. Trong quá trình PCR, khi đoạn dò liên kết với sản phẩm khuếch đại, fluorophore và chất thu nhận tín hiệu sẽ tách ra. Điều này dẫn đến tăng huỳnh quang từ ống phản ứng.

## Định dạng bộ dụng cụ

Bốn xét nghiệm được cung cấp trong *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit:

- Một xét nghiệm đối chứng (Ctrl)
- Ba xét nghiệm đột biến

Tất cả các hỗn hợp phản ứng đều chứa thuốc thử để phát hiện các đích được dán nhãn FAM™ và xét nghiệm đối chứng nội bộ được dán nhãn HEX™. Xét nghiệm đối chứng nội bộ có thể phát hiện sự hiện diện của các chất ức chế có thể dẫn đến kết quả âm tính giả. Khuếch đại FAM có thể trội hơn khuếch đại mẫu chứng nội bộ và mục đích của mẫu chứng nội bộ chỉ đơn giản là để cho thấy rằng khi không có khuếch đại FAM đây là kết quả âm tính thật và không phải là phản ứng PCR thất bại.

## Xét nghiệm

### Xét nghiệm đối chứng

Xét nghiệm đối chứng, được dán nhãn FAM, được sử dụng để đánh giá tổng số DNA trong một mẫu. Xét nghiệm này khuếch đại vùng exon 2 của gen EGFR. Mồi và đoạn dò đã được thiết kế để tránh mọi hiện tượng đa hình EGFR đã biết.

### Xét nghiệm đột biến

Mỗi xét nghiệm đột biến chứa một đoạn dò Scorpion được dán nhãn FAM và một mồi ARMS để phân biệt giữa DNA kiểu tự nhiên và DNA đột biến đặc hiệu.



## Mẫu chứng

Tất cả các lần chạy thử nghiệm phải chứa các mẫu chứng sau:

### Mẫu chứng dương

Mỗi lần chạy phải chứa một mẫu chứng dương trong các ống 1-4. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit chứa Mẫu chứng dương (PC) EGFR được sử dụng làm mẫu trong phản ứng mẫu chứng dương. Các kết quả mẫu chứng dương sẽ được đánh giá để đảm bảo rằng bộ dụng cụ hoạt động trong các tiêu chí chấp nhận đã nêu.

### Mẫu chứng âm

Mỗi lần chạy phải chứa một mẫu chứng âm (đối chứng không mẫu; No Template Control, NTC) trong các ống 9-12. NTC bao gồm Nước Không chứa Nuclease (H<sub>2</sub>O) được sử dụng làm 'mẫu' cho đối chứng không mẫu. Đối chứng không mẫu được sử dụng để đánh giá khả năng lây nhiễm trong quá trình thiết lập lần chạy và để đánh giá hiệu năng của phản ứng mẫu chứng nội bộ.

### Đánh giá phản ứng mẫu chứng nội bộ

Mỗi hỗn hợp phản ứng có chứa một mẫu chứng nội bộ ngoài phản ứng đích. Lỗi chỉ ra rằng có thể có chất ức chế dẫn đến kết quả âm tính giả hoặc đã xảy ra lỗi thiết lập của người vận hành đối với ống đó.

Nếu lỗi mẫu chứng nội bộ là do ức chế PCR, việc pha loãng mẫu có thể làm giảm tác dụng của chất ức chế, nhưng cần lưu ý rằng điều này cũng sẽ làm loãng DNA đích. Khuếch đại FAM có thể trội hơn khuếch đại mẫu chứng nội để giá trị CT IC (HEX) được tạo ra có thể nằm ngoài phạm vi xác định. Kết quả FAM vẫn có giá trị đối với các mẫu này.

# Vật tư được cung cấp

## Thành phần bộ dụng cụ

### ***therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit**

**(24)**

**Số danh mục**

**870311**

**Số lượng phản ứng**

**24**

Màu đỏ	Control Reaction Mix (Hỗn hợp Phản ứng Mẫu chứng)	Ctrl	2 x 600 µl
Màu tím	T790M Reaction Mix (Hỗn hợp Phản ứng T790M)	T790M	600 µl
Màu cam	Deletions Reaction Mix (Hỗn hợp Phản ứng Mất đoạn)	Del	600 µl
Màu hồng	L858R Reaction Mix (Hỗn hợp Phản ứng L858R)	L858R	600 µl
Màu be	EGFR Positive Control (Mẫu chứng dương EGFR)	PC	300 µl
Màu bạc hà	<i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Màu trắng	Nuclease-Free Water for No Template Control (Nước Không có Nuclease cho Đối chứng Không mẫu)	NTC	1 x 1,9 ml
Màu trắng	Nuclease-Free Water for Dilution (Nước Không có Nuclease để Pha loãng)	Dil	1 x 1,9 ml
Hướng dẫn Sử dụng (Số tay) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			1

# Các vật tư yêu cầu nhưng không được cung cấp

Khi làm việc với hóa chất, luôn mang áo choàng phòng thí nghiệm, găng tay dùng một lần và kính bảo hộ phù hợp. Để biết thêm thông tin, hãy tham khảo bảng chỉ dẫn an toàn (Safety Data Sheet, SDS) thích hợp, có sẵn từ nhà cung cấp sản phẩm.

- Bộ dụng cụ tách chiết DNA (xem “Quy trình”, trang 17)
- Pipet chuyên dụng\* (có thể điều chỉnh) để chuẩn bị mẫu
- Pipet chuyên dụng\* (có thể điều chỉnh) để chuẩn bị hỗn hợp chính PCR
- Pipet chuyên dụng\* (có thể điều chỉnh) để phân phối DNA mẫu
- Đầu pipet không có DNase, RNase và DNA có bộ lọc (để tránh lây nhiễm chéo, chúng tôi khuyên bạn nên sử dụng đầu pipet có tấm chắn sol khí)
- Bồn nước hoặc thiết bị tương tự có thể giữ ống ly tâm 50 ml ở 60°C.
- Khối gia nhiệt hoặc thiết bị tương tự có khả năng ủ ở 56°C†
- Đá bào
- Máy ly tâm trên bàn máy\* có rôto cho ống phản ứng 2 ml
- Máy xoáy
- Dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\*† với các kênh huỳnh quang cho Cycling Green và Cycling Yellow (phát hiện FAM và HEX tương ứng)
- Phần mềm Rotor-Gene Q phiên bản 2.3.5 trở lên
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, để sử dụng với 72-well rotor (số hạng mục 981103 hoặc 981106)
- Ống ly tâm nhỏ không có DNase, RNase và DNA để chuẩn bị các hỗn hợp chính
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, khối nhôm để thiết lập phản ứng thủ công với pipet một kênh (QIAGEN, số hạng mục 9018901)

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

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

# Cảnh báo và Phòng ngừa

Dùng cho Mục đích Sử dụng Chẩn đoán In Vitro

Dành cho sử dụng chuyên nghiệp

## Thông tin an toàn

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

## Phòng ngừa chung

Người dùng phải luôn chú ý đến những điều sau:

- Sử dụng đầu pipet không có DNase, RNase và DNA có bộ lọc và đảm bảo rằng các pipet đã được hiệu chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Bảo quản và tách chiết các vật liệu dương tính (bệnh phẩm và mẫu chứng dương) tách biệt với tất cả các thuốc thử khác và thêm chúng vào hỗn hợp phản ứng tại một cơ sở tách biệt về không gian.
- Rã đông hoàn toàn tất cả các thành phần ở nhiệt độ phòng (15-25°C) trước khi bắt đầu xét nghiệm.
- Khi rã đông, trộn các thành phần bằng cách đảo ngược mỗi ống 10 lần và ly tâm trong thời gian ngắn.

**Lưu ý:** Hết sức thận trọng để ngăn ngừa PCR lây nhiễm vật liệu đối chứng tổng hợp. Chúng tôi khuyên bạn nên sử dụng các pipet chuyên dụng, riêng biệt để thiết lập hỗn hợp phản ứng và thêm mẫu DNA. Việc chuẩn bị và phân phối hỗn hợp phản ứng phải được thực hiện trong khu vực tách biệt với khu vực được sử dụng để thêm mẫu. Không được mở các ống Rotor-Gene Q sau khi lần chạy PCR kết thúc. Điều này nhằm ngăn ngừa lây nhiễm các sản phẩm sau PCR trong phòng thí nghiệm.

**Lưu ý:** Thuốc thử được xác nhận cho thiết lập thủ công. Nếu sử dụng phương pháp tự động, điều này có thể làm giảm số lượng phản ứng có thể xảy ra do cần có thuốc thử để lấp đầy 'thể tích chết' trên các dụng cụ này.

**Lưu ý:** Tất cả các thuốc thử trong *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit được pha chế đặc biệt để sử dụng cho các xét nghiệm đã nêu. Tất cả các thuốc thử được cung cấp trong *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit chỉ được sử dụng với các thuốc thử khác trong cùng *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Không được thay thế thuốc thử trong bộ dụng cụ nếu muốn duy trì hiệu năng tối ưu.

**Lưu ý:** Chỉ sử dụng *Taq* DNA polymerase (*Taq*) được cung cấp trong bộ dụng cụ. Không thay thế bằng *Taq* DNA polymerase từ các bộ dụng cụ khác cùng loại hoặc bất kỳ loại nào khác hoặc bằng *Taq* DNA polymerase từ nhà cung cấp khác.

**Lưu ý:** Thuốc thử cho *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit đã được pha loãng một cách tối ưu. Chúng tôi không khuyến nghị pha loãng thêm thuốc thử, vì điều này có thể dẫn đến mất hiệu năng. Chúng tôi không khuyến nghị sử dụng thể tích phản ứng nhỏ hơn 25 µl, vì điều này sẽ làm tăng nguy cơ âm tính giả.

# Bảo quản và Xử lý Thuốc thử

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

*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit phải được bảo quản ngay lập tức sau khi nhận ở  $-30$  đến  $-15^{\circ}\text{C}$  trong buồng đông lạnh nhiệt độ ổn định và tránh ánh sáng. Khi được bảo quản trong các điều kiện bảo quản được chỉ định, *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ổn định cho đến ngày hết hạn đã nêu.

Sau khi mở, thuốc thử có thể được bảo quản trong bao bì gốc ở  $-30$  đến  $-15^{\circ}\text{C}$  trong 12 tháng hoặc cho đến ngày hết hạn đã nêu, tùy điều kiện nào đến trước. Tránh rã đông và đông lạnh nhiều lần. Không vượt quá tối đa tám chu kỳ đông lạnh–rã đông.

Thuốc thử phải được rã đông ở nhiệt độ môi trường trong tối thiểu 1 giờ và tối đa 4,5 giờ. Khi thuốc thử đã sẵn sàng để sử dụng, phản ứng PCR có thể được thiết lập và các ống Rotor-Gene Q chứa hỗn hợp chính và mẫu DNA phải được nạp vào Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ngay lập tức. Tổng thời gian từ khi bắt đầu thiết lập PCR đến khi bắt đầu chạy không được quá:

- 6 giờ nếu bảo quản ở nhiệt độ môi trường  
**Lưu ý:** Thời gian này bao gồm cả thiết lập và bảo quản PCR.
- 18 giờ nếu được bảo quản trong tủ lạnh ( $2-8^{\circ}\text{C}$ )  
**Lưu ý:** Thời gian này bao gồm cả thiết lập và bảo quản PCR.

**Lưu ý:** Scorpions (như với tất cả các phân tử được dán nhãn huỳnh quang) trong thuốc thử của hỗn hợp phản ứng nhạy sáng. Bảo vệ thuốc thử của mẫu chứng và hỗn hợp phản ứng khỏi ánh sáng để tránh tẩy trắng ảnh.

Thuốc thử trong *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit được pha loãng một cách tối ưu và không cần tinh sạch hoặc xử lý thêm trước khi sử dụng trong phân tích theo chỉ dẫn của Hướng dẫn Sử dụng (Sổ tay) *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

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

# Bảo quản và Xử lý Bệnh phẩm

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

Vật liệu mẫu phải là DNA bộ gen người được tách chiết từ huyết tương. Bệnh phẩm phải được vận chuyển theo phương pháp bệnh học tiêu chuẩn để đảm bảo chất lượng bệnh phẩm.



# Quy trình

## Tách chiết DNA

Các đặc tính hiệu năng cho bộ dụng cụ này đã được tạo ra bằng cách sử dụng DNA được tách chiết bằng QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (số hạng mục 55114). Khi sử dụng QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, hãy thực hiện tách chiết DNA theo hướng dẫn trong sổ tay lưu ý những điều sau:

- Thể tích huyết tương ban đầu là 2 ml.
- Trước khi tách chiết DNA, 2 ml huyết tương phải được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 2 phút và phần nổi phía trên được chuyển vào một ống sạch.
- Thể tích proteinase K phải là 250 µl.
- Quá trình phân hủy proteinase K nên được thực hiện trong 1 giờ ở 60°C.
- DNA bộ gen đã lọc phải được rửa giải trong 55 µl Buffer AVE (được cung cấp trong QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Bảo quản DNA bộ gen đã lọc ở -30 đến -15°C.

**Lưu ý:** Tất cả các xét nghiệm trong *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit đều tạo ra các sản phẩm PCR ngắn. Tuy nhiên, *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sẽ không hoạt động với DNA bị phân mảnh nhiều.

# Giao thức: Phát hiện Đột biến EGFR

## Những điểm quan trọng trước khi bắt đầu

- Để có được kết quả chính xác, hãy đảm bảo rằng quy trình trộn như mô tả được thực hiện ở mỗi bước trộn của quy trình thiết lập xét nghiệm.
- Có thể đánh giá tối đa 16 mẫu trên mỗi lần chạy.
- Trước khi bắt đầu quy trình, hãy đọc “Phòng ngừa chung”, trang 12.
- Dành thời gian để làm quen với Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM trước khi bắt đầu giao thức. Xem hướng dẫn sử dụng dụng cụ.
- Không xoáy *Taq* DNA Polymerase (*Taq*) hoặc bất kỳ hỗn hợp nào có chứa *Taq* DNA polymerase, vì điều này có thể làm bất hoạt enzym.
- Hút pipet *Taq* bằng cách đặt đầu pipet ngay dưới bề mặt chất lỏng để tránh đầu tip bị dư thừa enzym.
- Đối với mỗi mẫu DNA, xét nghiệm đối chứng và xét nghiệm đột biến phải được phân tích trong cùng một lần chạy PCR để tránh các biến thiên giữa các lần chạy.
- Để sử dụng hiệu quả các thuốc thử trong *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, hãy xử lý hàng loạt các mẫu DNA càng nhiều càng tốt để tạo đủ các lần chạy. Xét nghiệm các mẫu riêng lẻ hoặc với số lượng nhỏ hơn sử dụng nhiều thuốc thử hơn và giảm tổng số lượng mẫu có thể được xét nghiệm bằng một *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit duy nhất.

## Những việc cần làm trước khi bắt đầu

- Trước mỗi lần sử dụng, tất cả thuốc thử cần được rã đông hoàn toàn trong tối thiểu 1 giờ và tối đa 4,5 giờ ở nhiệt độ phòng (15-25°C), trộn bằng cách đảo ngược 10 lần và ly tâm nhanh để thu các thành phần dưới đáy ống.
- Đảm bảo rằng *Taq* ở nhiệt độ phòng (15-25°C) trước mỗi lần sử dụng. Ly tâm ống nhanh để thu enzym ở đáy ống.
- **Trộn tất cả các mẫu bằng cách đảo ngược 10 lần** và ly tâm nhanh để thu các thành phần dưới đáy ống.

## Quy trình

1. Rã đông hoàn toàn tất cả hỗn hợp phản ứng, Nước Không có Nuclease cho Đối chứng Không mẫu (NTC) và Mẫu chứng dương (PC) EGFR ở nhiệt độ phòng (15-25°C) trong tối thiểu 1 giờ (Bảng 1). Khi thuốc thử đã được rã đông, trộn chúng bằng cách đảo ngược mỗi ống 10 lần để tránh nồng độ muối tập trung tại một vùng, sau đó ly tâm nhanh để thu các thành phần dưới đáy ống.

**Bảng 1. Thời gian rã đông, thời gian thiết lập PCR và nhiệt độ bảo quản**

Thời gian rã đông tối thiểu	Thời gian rã đông tối đa	Nhiệt độ bảo quản sau khi thiết lập PCR	Thời gian thiết lập PCR và bảo quản tối đa
1 giờ	4,5 giờ	Nhiệt độ môi trường (15-25°C)	6 giờ
1 giờ	4,5 giờ	2-8°C	18 giờ

**Lưu ý:** Việc thiết lập PCR phải được thực hiện ở nhiệt độ môi trường. Bảo quản chỉ thời gian từ khi hoàn thành thiết lập PCR đến khi bắt đầu chạy PCR trên Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

**Lưu ý:** Đưa *Taq* DNA polymerase (*Taq* ống) về nhiệt độ môi trường (15–25 °C) cùng lúc với các thuốc thử khác (xem “Bảo quản và Xử lý Thuốc thử”, trang 14). Ly tâm ống nhanh để thu enzym ở đáy ống.

2. Thực hiện các bước sau:

- 2a. Dán nhãn bốn ống ly tâm nhỏ (không được cung cấp) theo từng hỗn hợp phản ứng tương ứng như trình bày trong Bảng 2.
- 2b. Chuẩn bị đủ hỗn hợp chính (hỗn hợp phản ứng mẫu chứng hoặc đột biến [ống CTRL, T790M, Mất đoạn, L858R] cộng với *Taq* DNA polymerase [*Taq*] cho các mẫu DNA, một phản ứng của mẫu chứng dương EGFR (ống PC) và một phản ứng của Nước Không có Nuclease cho Đối chứng Không mẫu (ống NTC) theo các thể tích trong Bảng 2.

**Lưu ý:** Bao gồm thuốc thử cho một mẫu bổ sung để có đủ lượng dư cho quá trình thiết lập PCR.

Các hỗn hợp chính chứa tất cả các thành phần cần thiết cho PCR ngoại trừ mẫu.

**Bảng 2. Chuẩn bị hỗn hợp chính\***

Xét nghiệm	Ống hỗn hợp phản ứng	Thể tích hỗn hợp phản ứng	Thể tích <i>Taq</i> DNA polymerase ( <i>Taq</i> ống)
Mẫu chứng	CTRL	19,50 $\mu$ l x (n+1)	0,50 $\mu$ l x (n+1)
T790M	T790M	19,50 $\mu$ l x (n+1)	0,50 $\mu$ l x (n+1)
Mất đoạn	Del	19,50 $\mu$ l x (n+1)	0,50 $\mu$ l x (n+1)
L858R	L858R	19,50 $\mu$ l x (n+1)	0,50 $\mu$ l x (n+1)

\* Khi chuẩn bị hỗn hợp chính, hãy chuẩn bị đủ cho một mẫu bổ sung để có đủ lượng dư cho thiết lập PCR.

**Lưu ý:** Khi chuẩn bị hỗn hợp chính, thể tích cần thiết của hỗn hợp phản ứng mẫu chứng hoặc phản ứng đột biến được thêm vào ống liên quan trước và *Taq* DNA polymerase được thêm vào sau cùng.

- Đặt số lượng ống 4 dài PCR thích hợp (mỗi dài có 4 ống) vào khối nắp theo bố cục trong Bảng 3. Không đậy nắp ống.

**Lưu ý:** Để nắp trong hộp đựng bằng nhựa cho đến khi cần.

- Đậy nắp ống cho hỗn hợp chính và đảo ngược 10 lần để trộn hỗn hợp chính, sau đó ly tâm nhanh để đảm bảo hỗn hợp nằm ở đáy ống. Thêm ngay 20  $\mu$ l hỗn hợp chính vào mỗi ống dạng dài PCR thích hợp.
- Thêm ngay 5  $\mu$ l Nước Không có Nuclease ( $H_2O$ ) vào các ống dạng dài PCR đối chứng không mẫu (ống PCR số 9-12) và đậy nắp ống.
- Thêm 5  $\mu$ l mỗi mẫu vào các ống mẫu (ống PCR 5-8, 13-16 và 17-72) và đậy nắp ống.
- Thêm 5  $\mu$ l Mẫu chứng dương (PC) EGFR vào các ống mẫu chứng dương (ống PCR số 1-4). Mỗi mẫu DNA phải được xét nghiệm với xét nghiệm đối chứng và tất cả các xét nghiệm đột biến. Bố cục được trình bày trong Bảng 3.

**Bảng 3. Bộ cục xét nghiệm đối chứng và xét nghiệm đột biến**

Xét nghiệm	Mẫu chứng		Số mẫu						
	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
Mất đoạn	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
<b>Số mẫu</b>									
<b>Xét nghiệm</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
Ctrl	5	13	21	29	37	45	53	61	69
T790M	6	14	22	30	38	46	54	62	70
Mất đoạn	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. Sử dụng bút đánh dấu không phai, đánh dấu các nắp của các ống đầu tiên ở vị trí số thấp nhất trong mỗi ống 4 dải PCR (ví dụ như vị trí 1, 5, 9, v.v.) để hiển thị hướng nạp các ống vào 72-well rotor của Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Đảo ngược các ống có nắp 4 lần để trộn mẫu và hỗn hợp phản ứng.
10. Đặt tất cả các ống 4 dải PCR vào các vị trí thích hợp trong 72-well rotor và kiểm tra bằng mắt để đảm bảo rằng tất cả các ống đều có thể tích bằng nhau.  
**Lưu ý:** Đảm bảo rằng các dải ống không bị đảo ngược khi chuyển chúng sang rôto.
11. Nếu rôto chưa đầy, hãy lấp đầy các khoảng trống còn lại bằng các ống rỗng có nắp.
12. Đặt ngay rôto vào Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Đảm bảo rằng vòng khóa (phụ kiện Rotor-Gene Q MDx) được đặt trên đầu rôto để giữ chặt các ống trong quá trình chạy.
13. Tham khảo phần thiết lập Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (xem “Giao thức: Thiết lập Rotor-Gene Q EGFR”, trang 22) để tạo biên dạng nhiệt độ và bắt đầu chạy.

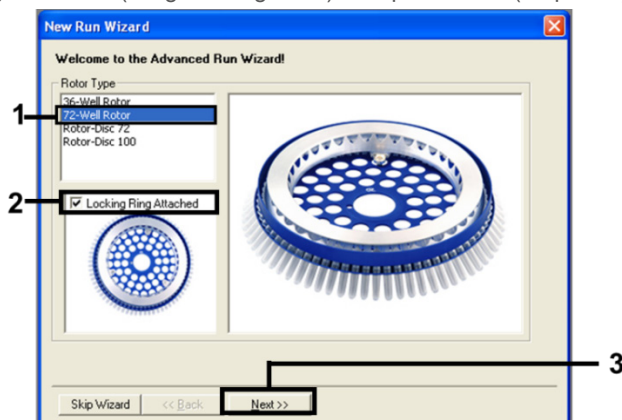
# Giao thức: Thiết lập Rotor-Gene Q EGFR

Các thông số chu kỳ được trình bày trong Bảng 4.

**Bảng 4. Thông số chu kỳ**

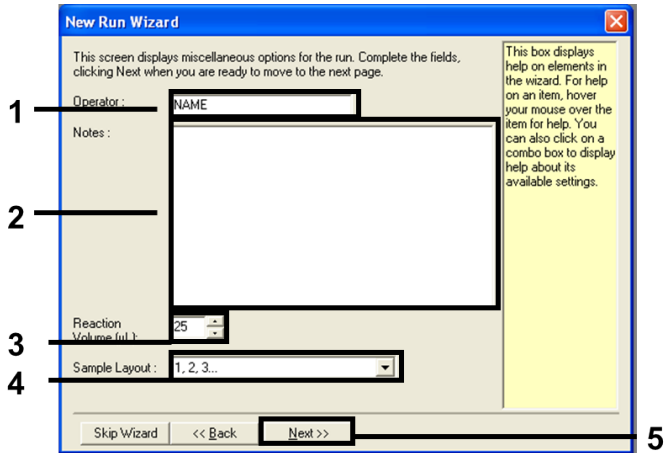
Chu kỳ	Nhiệt độ	Thời gian	Thu nhận dữ liệu
1	95°C	15 phút	Không có
40	95°C	30 giây	Không có
	60°C	60 giây	Green và Yellow

1. Nhấp đúp vào biểu tượng Phần mềm Rotor-Gene Q Series 2.3 trên màn hình máy tính xách tay được kết nối với Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Chọn thẻ “Advanced” (Nâng cao) trong hộp thoại “New Run” (lần chạy mới).
2. Để tạo một mẫu mới, chọn **Empty Run** (Lần chạy rỗng), sau đó nhấp vào **New** (Mới). Cửa sổ “New Run Wizard” (Trình hướng dẫn lần chạy mới) xuất hiện.
3. Chọn **72-Well Rotor** làm loại rôto. Đảm bảo rằng vòng khóa đã được gắn và chọn hộp **Locking Ring Attached** (Đã gắn Vòng khóa). Nhấp vào Next (Tiếp theo) (Hình 1).



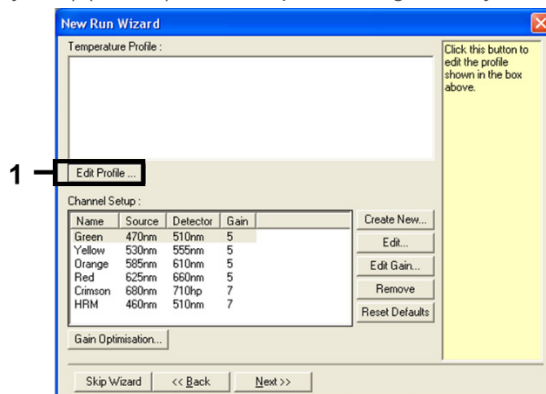
**Hình 1. Hộp thoại “New Run Wizard” (Trình hướng dẫn lần chạy mới).**

4. Nhập tên của người vận hành vào trường **Operator** (Người vận hành). Thêm bất kỳ lưu ý nào và đặt giá trị trong trường **Reaction Volume** (Thể tích phản ứng) là **25**. Đảm bảo rằng các giá trị trong trường **Sample Layout** (Bố cục mẫu) được đặt là **1, 2, 3...** Nhấp vào Next (Tiếp theo) (Hình 2).



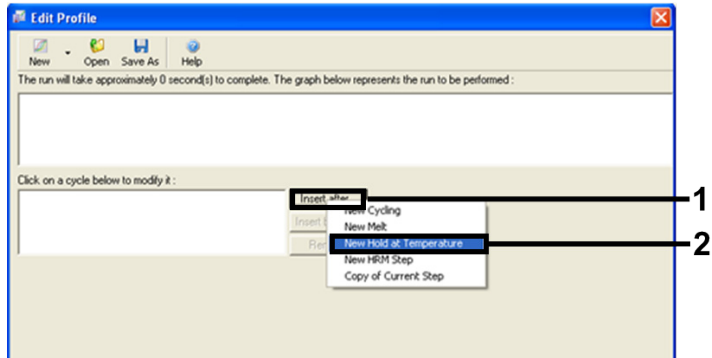
Hình 2. Nhập tên của người vận hành và thể tích phản ứng.

5. Nhấp vào **Edit Profile** (Chỉnh sửa hồ sơ) trong hộp thoại “New Run Wizard” (Trình hướng dẫn lần chạy mới) (Hình 3) và thiết lập các thông số chạy theo các bước sau.



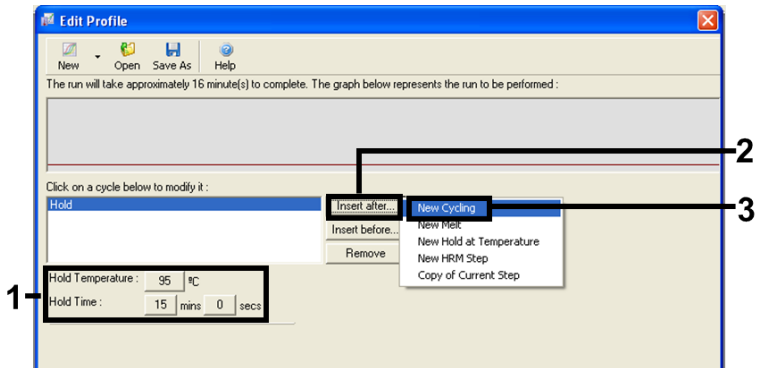
Hình 3. Chỉnh sửa hồ sơ.

6. Nhấp vào **Insert after** (Chèn sau) và chọn **New Hold at Temperature** (Nhiệt độ giữ mới) (Hình 4).



Hình 4. Chèn bước ủ ban đầu.

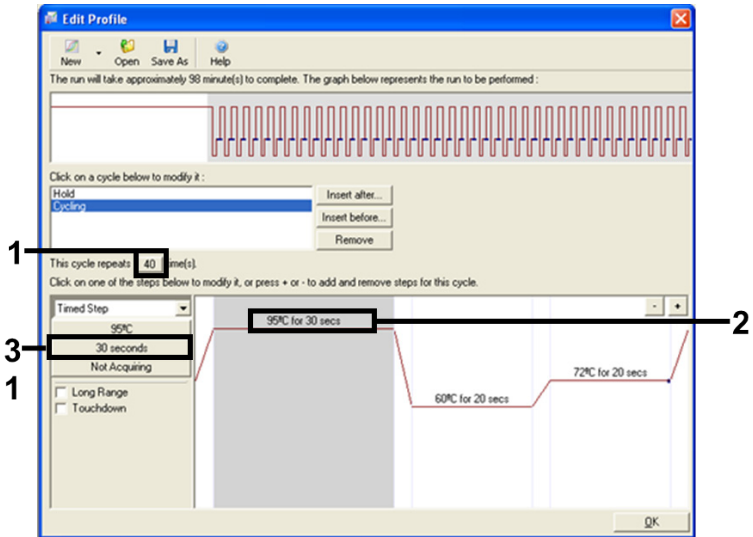
7. Đặt giá trị trong trường **Hold Temperature** (Nhiệt độ giữ) thành **95°C** và giá trị trong **Hold Time** (Thời gian giữ) thành **15 mins 0 secs** (15 phút 0 giây). Nhấp vào **Insert After** (Chèn sau), sau đó chọn **New Cycling** (Chu kỳ mới) (Hình 5).



Hình 5. Bước ủ ban đầu ở 95°C.

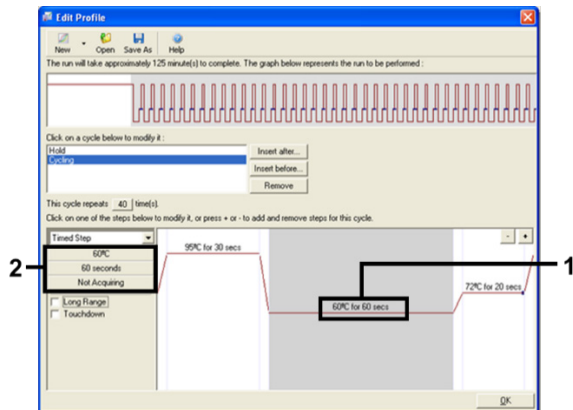


8. Đặt số lần lặp lại chu kỳ thành **40**. Chọn bước đầu tiên và đặt thành **95°C for 30 secs** (95 °C trong 30 giây) (Hình 6).



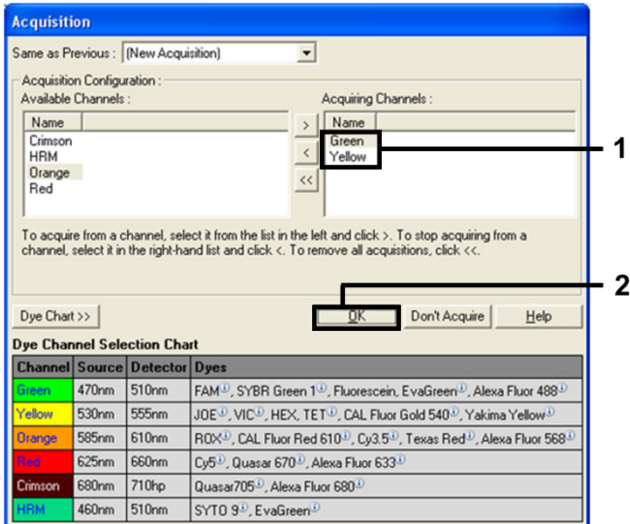
Hình 6. Bước chu kỳ ở 95°C.

9. Đánh dấu bước thứ hai và đặt thành 60°C for 60 secs (60 °C trong 60 giây). Nhấp vào **Not Acquiring** (Không thu nhận) để cho phép thu thập dữ liệu trong bước này. (Hình 7).



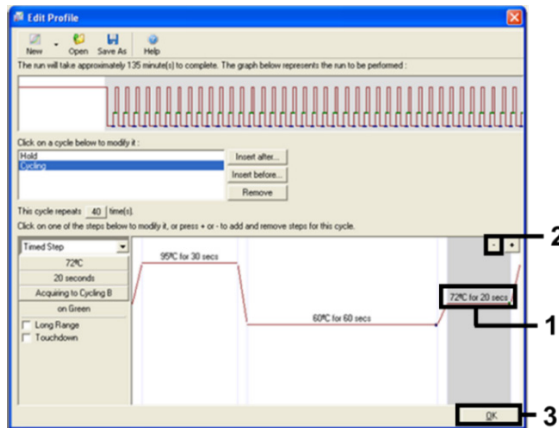
Hình 7. Bước chu kỳ ở 60°C.

10. Chọn **Green** và **Yellow** từ danh sách **Available Channels** (Kênh khả dụng), sau đó nhấp vào > để chuyển chúng sang danh sách **Acquiring Channels** (Kênh thu nhận). Nhấp vào **OK** (Hình 8).



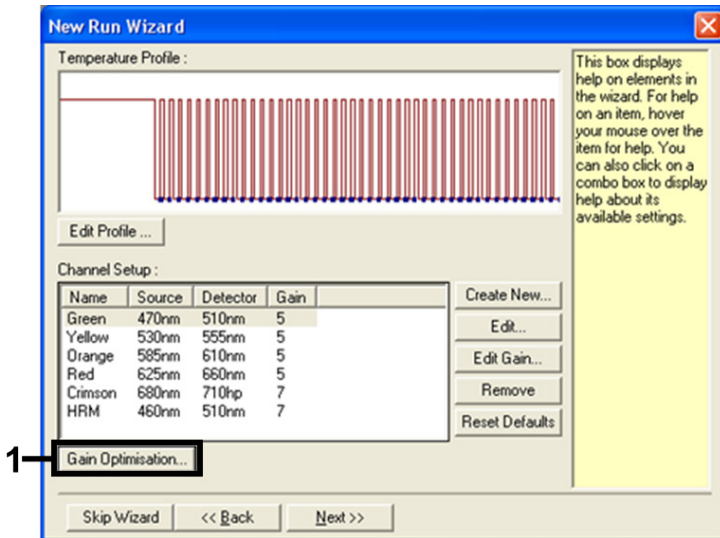
Hình 8. Thu nhận ở bước chu kỳ 60°C.

11. Đánh dấu bước thứ ba và nhấp vào nút - để xóa. Nhấp vào **OK** (Hình 9).



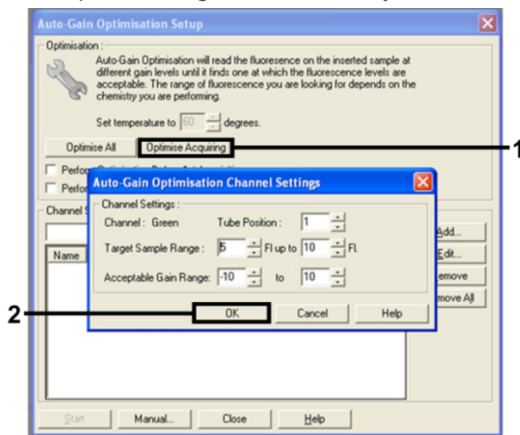
Hình 9. Loại bỏ bước mở rộng.

12. Trong hộp thoại tiếp theo, nhấp vào **Gain Optimisation** (Tối ưu hóa khuếch đại) (Hình 10).



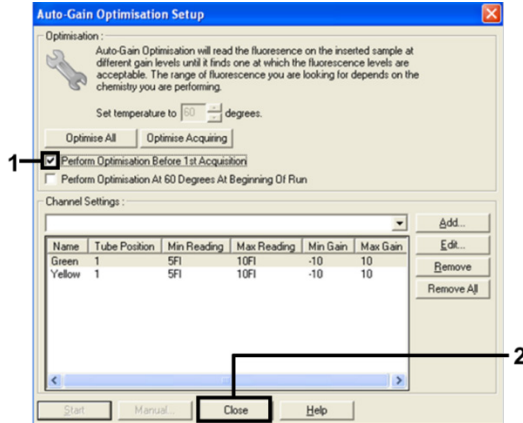
Hình 10. Gain Optimisation (Tối ưu hóa khuếch đại).

13. Nhấp vào **Optimise Acquiring** (Tối ưu hóa thu nhận). Cài đặt kênh được hiển thị cho mỗi kênh. Nhấp vào **OK** để chấp nhận các giá trị mặc định này cho cả hai kênh. (Hình 11).



Hình 11. Tối ưu hóa khuếch đại tự động cho kênh Green.

14. Đánh dấu vào ô **Perform Optimisation before 1st Acquisition** (Thực hiện tối ưu hóa trước khi thu nhận lần 1), sau đó nhấp vào **Close** (Đóng) để quay lại trình hướng dẫn (Hình 12).



Hình 12. Lựa chọn các kênh Green và Yellow.

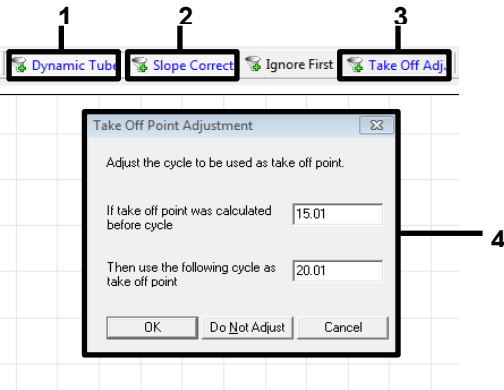
15. Nhấp vào **Next** (Tiếp theo) để lưu mẫu vào vị trí thích hợp bằng cách chọn “**Save Template**” (Lưu mẫu).

## Phân tích dữ liệu đánh giá đột biến

Sau khi lần chạy hoàn tất, phân tích dữ liệu theo quy trình sau.

### Thiết lập phân tích phần mềm

1. Mở tệp thích hợp bằng Phần mềm Rotor-Gene Q Series 2.3.5 trở lên.
2. Nếu mẫu không được đặt tên trước khi thực hiện lần chạy, nhấp vào **Edit Samples** (Chỉnh sửa mẫu).
3. Nhập tên mẫu vào cột **Name** (Tên).  
**Lưu ý:** Để trống tên của bất kỳ lọ rỗng nào.
4. Nhấp vào **Analysis** (Phân tích). Trên trang phân tích, nhấp vào **Cycling A Yellow** để kiểm tra kênh HEX.
5. Kiểm tra xem tùy chọn **Dynamic Tube** (Ống động) có được đánh dấu không. Nhấp vào **Slope Correct** (Độ dốc chính xác) và Linear scale (Tỷ lệ tuyến tính).
6. Nhấp vào **Take Off Adj** (Điều chỉnh điểm xuất phát) và nhập **15.01** (15,01) và **20.01** (20,01) như trình bày trong Hình 13.



**Hình 13. Cài đặt chuẩn hóa phân tích EGFR.** 1 = “Dynamic Tube” (Ống động), 2 = “Slope Correct” (Độ dốc chính xác), 3 = “Take Off Adj” (Điều chỉnh điểm xuất phát), 4 = Cửa sổ hộp thoại “Take Off Adj” (Điều chỉnh điểm xuất phát) với các giá trị thông số.

7. Đặt ngưỡng ở **0.02** (0,02) và kiểm tra các giá trị HEX C<sub>T</sub>.

8. Trên trang phân tích, nhấp vào **Cycling A, Green** để xem kênh FAM. Thiết lập các thông số như trong Hình 13 ở trên.  
Ổng động nên được đánh dấu.
9. Nhấp vào **Slope Correct** (Độ dốc chính xác) và **Linear scale** (Tỷ lệ tuyến tính).
10. Đặt ngưỡng ở **0.075** (0,075) và kiểm tra các giá trị FAM C<sub>T</sub>.

## Chạy phân tích mẫu chứng

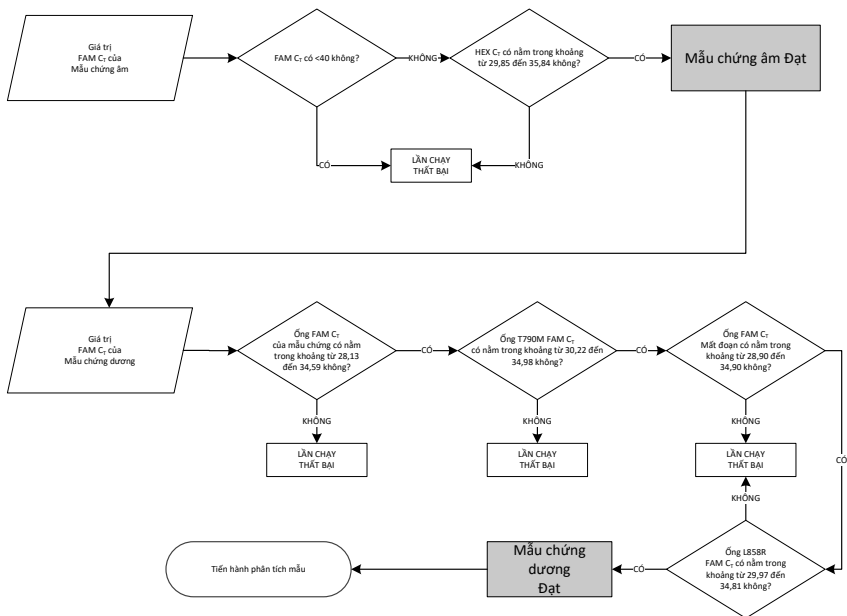
Sau khi lần chạy hoàn tất, phân tích dữ liệu như sau.

- **Mẫu chứng âm:** Để đảm bảo rằng không có hiện tượng nhiễm bẩn mẫu, NTC không được tạo giá trị C<sub>T</sub> trong kênh màu xanh lá (FAM) dưới 40. Để đảm bảo rằng lần chạy được thiết lập chính xác, NTC phải hiển thị mức khuếch đại từ 29,85 đến 35,84 trong kênh màu vàng (HEX) (Mẫu chứng Nội bộ).  
Nếu có khuếch đại dương tính trong kênh màu xanh lá và/hoặc khuếch đại nằm ngoài phạm vi từ 29,85 đến 35,84 trong kênh màu vàng, lần chạy không hợp lệ.
- **Mẫu chứng dương:** Mẫu chứng dương (PC) EGFR phải đưa ra C<sub>T</sub> cho mỗi hỗn hợp phản ứng nằm trong và bao gồm phạm vi đã nêu trong Bảng 5. Một lần chạy có giá trị mẫu chứng dương nằm ngoài phạm vi này cho thấy sự cố thiết lập xét nghiệm và lần chạy phải được chỉ định là thất bại. Nếu mẫu chứng dương đưa ra C<sub>T</sub> nằm trong phạm vi (FAM) nhưng C<sub>T</sub> mẫu chứng nội bộ (HEX) nằm ngoài phạm vi từ 29,85 đến 35,84, hãy tiếp tục phân tích.

**Lưu ý:** Dữ liệu mẫu không được sử dụng nếu mẫu chứng dương hoặc âm không thành công.

**Bảng 5. Phạm vi C<sub>T</sub> chấp nhận được cho các mẫu chứng lần chạy**

Mẫu chứng phản ứng	Xét nghiệm	Kênh	Phạm vi C <sub>T</sub>
Mẫu chứng dương	Mẫu chứng	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Mất đoạn	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Đối chứng không mẫu	Tất cả bốn hỗn hợp phản ứng	Green (FAM)	≥40,00
	Tất cả bốn hỗn hợp phản ứng	Yellow (HEX)	29,85-35,84



**Hình 14. Chạy quy trình phân tích mẫu chứng.**

Với điều kiện cả hai mẫu chứng lần chạy đều hợp lệ, mỗi giá trị CT của xét nghiệm đối chứng mẫu phải nằm trong phạm vi từ 23,70 đến 31,10 trong kênh màu xanh lá (FAM) (Bảng 6).

**Bảng 6. Phạm vi FAM C<sub>T</sub> chấp nhận được cho phản ứng mẫu chứng mẫu**

Hỗn hợp phản ứng	Kênh	Phạm vi C <sub>T</sub> chấp nhận được
Mẫu chứng	Green (FAM)	23,70-31,10

Nếu mẫu nằm ngoài phạm vi này, hướng dẫn sau sẽ được cung cấp.

- **C<sub>T</sub> của xét nghiệm đối chứng mẫu <23,70:** Các mẫu có giá trị C<sub>T</sub> của mẫu chứng <23,70 sẽ làm quá tải các xét nghiệm đột biến và phải được pha loãng. Để phát hiện từng đột biến ở mức thấp, các mẫu quá đậm đặc phải được pha loãng để nằm trong phạm vi trên trên cơ sở pha loãng một nửa sẽ làm tăng C<sub>T</sub> thêm 1.
- **C<sub>T</sub> của xét nghiệm đối chứng mẫu >31,10:** Mẫu không chứa đủ DNA để cho phép phân tích.

Với điều kiện cả hai mẫu chứng lần chạy đều hợp lệ và xét nghiệm đối chứng nằm trong phạm vi được nêu trong Bảng 6, mỗi giá trị  $C_T$  đột biến của mẫu phải nằm trong phạm vi được nêu chi tiết trong Bảng 7 trong kênh màu xanh lá (FAM). Nếu mẫu nằm ngoài phạm vi này, hướng dẫn sau sẽ được cung cấp.

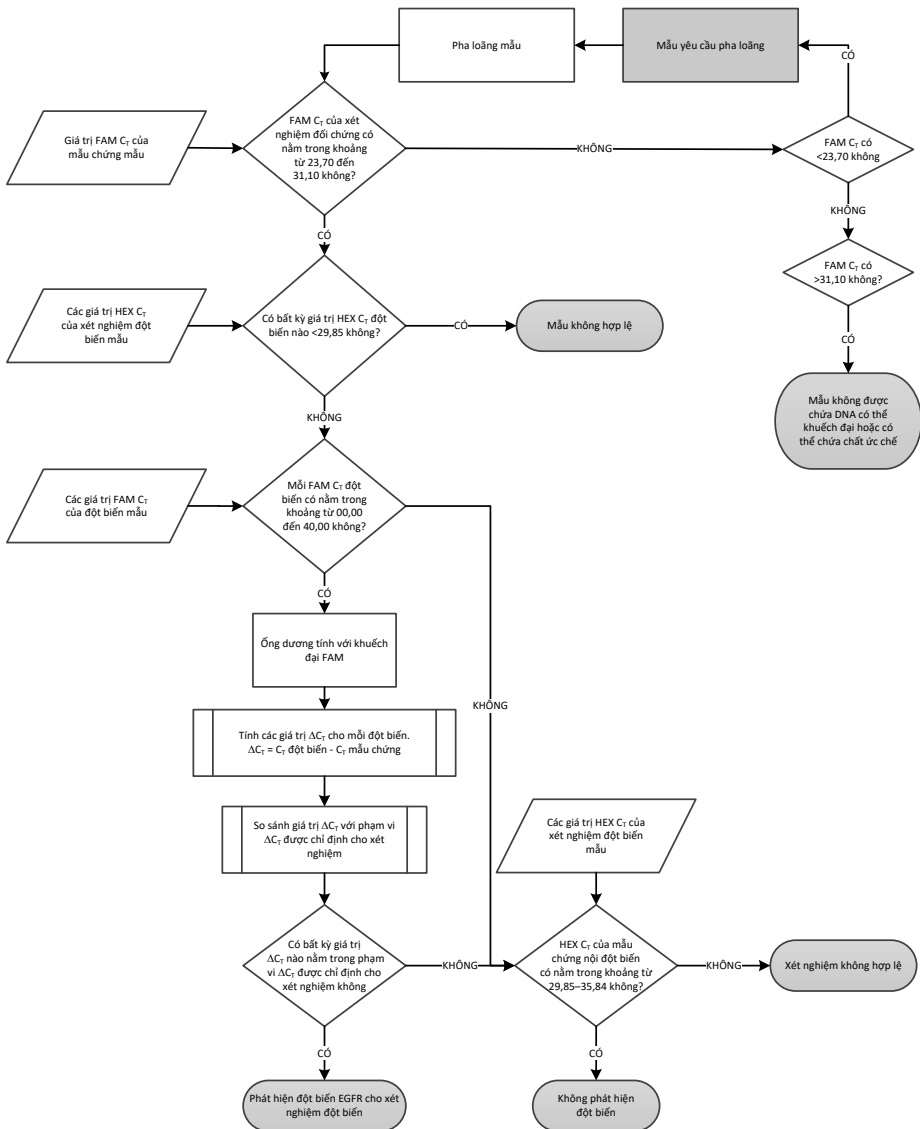
**Bảng 7. Giá trị phản ứng đột biến mẫu chấp nhận được**

Phản ứng	Hỗn hợp phản ứng	Kênh	Phạm vi $C_T$
Phản ứng đột biến	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Mất đoạn	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Cả ba đột biến	Yellow (HEX)	29,85-35,84

**Lưu ý:** Nếu một mẫu không tạo ra  $C_T$  (tức là,  $C_T > 40$ ), thì có thể do sự hiện diện của chất ức chế, lỗi thiết lập xét nghiệm hoặc không có DNA EGFR có thể khuếch đại.

- Giá trị  $C_T$  mẫu đối chứng nội nằm trong phạm vi 29,85–35,84: Không có DNA EGFR có thể khuếch đại.
- Giá trị  $C_T$  mẫu chứng nội không nằm trong phạm vi 29,85–35,84: Điều này có thể cho thấy lỗi thiết lập xét nghiệm hoặc sự hiện diện của chất ức chế. Có thể làm giảm tác dụng của chất ức chế bằng cách pha loãng mẫu, mặc dù điều này cũng sẽ pha loãng DNA.





Hình 15. Sơ đồ phân tích đột biến.

## Giá trị FAM C<sub>T</sub> của xét nghiệm đột biến mẫu

Các giá trị FAM cho cả ba hỗn hợp phản ứng đột biến phải được kiểm tra so với các giá trị được liệt kê trong Bảng 8.

Tính giá trị ngưỡng  $\Delta C_T$  cho mỗi mẫu đột biến cho biết khuếch đại dương tính như sau, đảm bảo rằng C<sub>T</sub> đột biến và đối chứng là từ cùng một mẫu.

$$\Delta C_T = C_T \text{ đột biến} - C_T \text{ mẫu chứng}$$

So sánh giá trị  $\Delta C_T$  của mẫu với phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  cho xét nghiệm được đề cập (Bảng 8), đảm bảo rằng điểm ngưỡng chính xác được áp dụng cho mỗi xét nghiệm.

**Bảng 8. Phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  của xét nghiệm đột biến**

Xét nghiệm đột biến	Phạm vi ngưỡng $\Delta C_T$
T790M	-10,00 ≥ đến ≤7,40
Mất đoạn	-10,00 ≥ đến ≤8,00
L858R	-10,00 ≥ đến ≤8,90

Giới hạn trên của phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  là điểm trên đó tín hiệu dương tính có thể do tín hiệu nền của môi ARMS trên DNA kiểu tự nhiên gây ra. Nếu giá trị  $\Delta C_T$  mẫu cao hơn điểm trên của phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$ , nó được phân loại là “Mutation not detected” (Không phát hiện đột biến) hoặc vượt quá giới hạn phát hiện của bộ dụng cụ. Nếu giá trị mẫu nằm trong các điểm ngưỡng  $\Delta C_T$ , mẫu được coi là dương tính với đột biến được phát hiện bởi xét nghiệm đó. Nếu giá trị mẫu nằm dưới biên dưới của phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$ , điều này có thể là do nhiễu ảnh hưởng quang.

**Lưu ý:** Đối với các mẫu không có C<sub>T</sub> đột biến FAM, cần phải đánh giá C<sub>T</sub> mẫu chứng nội bộ (HEX) để xác định đột biến không được phát hiện hoặc xét nghiệm không hợp lệ hay không. Nếu giá trị C<sub>T</sub> HEX nằm trong khoảng từ 29,85 đến 35.84, thì đột biến không được phát hiện. Nếu giá trị ngưỡng  $\Delta C_T$  HEX nằm ngoài khoảng này, thì mẫu không hợp lệ.

Tóm lại, đối với mỗi mẫu, mỗi phản ứng đột biến sẽ được cấp trạng thái đột biến được phát hiện, không phát hiện đột biến hoặc không hợp lệ bằng cách sử dụng các tiêu chí sau.

- **Phát hiện đột biến:** Dương tính với khuếch đại FAM và  $\Delta C_T$  trong phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$ . Nếu nhiều đột biến được phát hiện, tất cả đều có thể được báo cáo.
- **Không phát hiện đột biến:**
  - Dương tính với khuếch đại FAM và giá trị ngưỡng  $\Delta C_T$  cao hơn phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  và HEX (mẫu chứng nội) nằm trong khoảng 29,85–35,84.
  - Khuếch đại FAM âm tính và HEX (mẫu chứng nội bộ) nằm trong khoảng 29,85–35,84.
- **Không hợp lệ:** Khuếch đại FAM âm tính và khuếch đại HEX nằm ngoài các thông số kỹ thuật.
  - $\Delta C_T$  được tính nằm dưới phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  và HEX (mẫu chứng nội) nằm trong phạm vi dự kiến. Giá trị  $\Delta C_T$  thấp hơn  $-10,00$  chỉ ra rằng có thể đã xảy ra nhiễu ảnh hưởng quang.

## Hướng dẫn Khắc phục sự cố

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

### Nhận xét và gợi ý

#### **Không có tín hiệu với Mẫu chứng dương (PC) EGFR trong kênh huỳnh quang Cycling Green**

- |  |   |
|--|---|
| a) Kênh huỳnh quang được chọn để phân tích dữ liệu PCR không tuân thủ giao thức.   | Để phân tích dữ liệu, chọn kênh huỳnh quang Cycling Green cho EGFR PCR phân tích và kênh huỳnh quang Cycling Yellow cho PCR mẫu chứng nội bộ. |
| b) Lập trình sai biên dạng nhiệt độ của dụng cụ Rotor Gene Q MDx 5plex HRM   | So sánh biên dạng nhiệt độ với giao thức và nếu không chính xác, thì hãy chạy lại.  |
| c) Cấu hình PCR sai  | Kiểm tra các bước công việc của bạn bằng sơ đồ hút pipet và lặp lại PCR, nếu cần.   |
| d) Các điều kiện bảo quản cho một hoặc nhiều thành phần của bộ dụng cụ không tuân thủ các hướng dẫn được đưa ra trong “Bảo quản và Xử lý Thuốc thử” (trang 14) | Kiểm tra các điều kiện bảo quản và ngày hết hạn (xem nhãn bộ dụng cụ) của thuốc thử và sử dụng bộ dụng cụ mới, nếu cần.                       |
| e) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit đã hết hạn   | Kiểm tra các điều kiện bảo quản và ngày hết hạn (xem nhãn bộ dụng cụ) của thuốc thử và sử dụng bộ dụng cụ mới, nếu cần.                       |

## Nhận xét và gợi ý

---

### Tín hiệu với các mẫu chứng âm trong kênh huỳnh quang và Cycling Green của PCR phân tích

- a) Nhiễm bẩn xảy ra trong quá trình chuẩn bị PCR
- Lặp lại PCR với thuốc thử mới trong các lần lặp lại.  
Nếu có thể, đóng các ống PCR ngay sau khi thêm mẫu sẽ được xét nghiệm.  
Đảm bảo rằng không gian làm việc và dụng cụ được khử nhiễm đều đặn.

---

### Nhiều ngưỡng giao nhau hoặc giá trị $\Delta C_T$ nằm dưới phạm vi ngưỡng

- a) Trộn không chính xác trong quá trình thiết lập xét nghiệm
- Lặp lại PCR nếu điều này ảnh hưởng đến mẫu chứng hoặc xét nghiệm lại mẫu không đạt.  
Làm theo Hướng dẫn Sử dụng, chú ý chặt chẽ đến các bước trộn.

# Kiểm soát Chất lượng

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

## Hạn chế

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

Sản phẩm này chỉ được sử dụng bởi nhân viên được hướng dẫn và đào tạo đặc biệt về quy trình chẩn đoán in vitro và dụng cụ Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Các nghiên cứu xác nhận phân tích bao gồm DNA người được tách chiết từ các mẫu huyết tương.

Sản phẩm chỉ được thiết kế để sử dụng trên máy luân nhiệt real-time PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Cần tuân thủ nghiêm ngặt *Sổ tay theascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* để có kết quả tối ưu. Việc pha loãng thuốc thử khác với những gì khác với mô tả trong sổ tay này không được khuyến khích và sẽ làm giảm hiệu năng.

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

Mỗi trong hỗn hợp Phản ứng Mất đoạn EGFR đã được thiết kế để nhắm đến nhiều mất đoạn Exon 19, kéo dài từ các nucleotide 55174772 đến 55174795 (GRCh38 chr7), phạm vi 23 cặp base.

Mặc dù xét nghiệm mất đoạn Exon 19 đã được xác nhận về mặt phân tích và được chứng minh để phát hiện các lần mất đoạn cụ thể trong Exon 19 (xem Bảng 13 của sổ tay này), tuy nhiên, vẫn có thể xảy ra các đột biến bổ sung (bao gồm nhưng không giới hạn ở các lần mất đoạn Exon 19 bổ sung, các lần thêm đoạn Exon 19 và đột biến L747P) được khuếch đại bởi Hỗn hợp Phản ứng Mất đoạn.

Nếu có, các đột biến bổ sung như vậy sẽ dẫn đến kết quả “Deletions Detected” (Phát hiện mất đoạn) cho mẫu của một bệnh nhân nhất định.

Ngoài ra, đột biến L858Q có thể được phát hiện bởi Hỗn hợp Phản ứng L858R. Do đó, nếu có trong mẫu của bệnh nhân, đột biến L858Q có thể dẫn đến kết quả “L858R Mutation Detected” (Phát hiện đột biến L858R).

# Đặc tính hiệu năng

## Độ nhạy phân tích — giới hạn trống (limit of blank, LOB)

Để đánh giá hiệu năng của *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit trong trường hợp không có mẫu và để đảm bảo rằng mẫu trống hoặc mẫu có DNA kiểu tự nhiên không tạo ra tín hiệu phân tích có thể chỉ ra nồng độ đột biến thấp, DNA kiểu tự nhiên của EGFR huyết tương NSCLC được đánh giá từ 59 mẫu khác nhau. Các tiêu chí chấp nhận của nghiên cứu (ít nhất 95% mẫu kiểu tự nhiên phải có giá trị ngưỡng  $\Delta C_T$  trên ngưỡng tương ứng) đã được đáp ứng.

## Giới hạn phát hiện (Limit of detection, LOD)

LOD là tỷ lệ phần trăm tối thiểu của DNA đột biến có thể được phát hiện trong nền DNA kiểu tự nhiên khi tổng số DNA có thể khuếch đại (trong phạm vi đầu vào), tạo ra tỷ lệ lệnh gọi đột biến chính xác ở 95% cho mỗi mẫu dương tính đột biến (C95). Phạm vi hoạt động đầu vào DNA cho xét nghiệm được xác định bởi  $C_T$  mẫu chứng ở phạm vi được chỉ định trước từ 23,70 đến 31,10.

LOD được xác định ở mức đầu vào DNA thấp ( $C_T$  mẫu chứng khoảng 30,10) bằng cách sử dụng DNA lấy từ mô FFPE cho *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD được xác định bằng cách sử dụng cả bệnh phẩm lâm sàng FFPE và dòng tế bào FFPE ở mức đầu vào DNA thấp cho các đột biến EGFR này.

Các giá trị LOD được thiết lập bằng cách sử dụng mô FFPE đã được xác minh cho *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit với DNA lấy từ các mẫu huyết tương dương tính đột biến giả.

Các tuyên bố LOD cuối cùng được liệt kê trong Bảng 9, trang tiếp theo, cho biết tỷ lệ phần trăm đột biến đưa ra xác suất dự đoán về lệnh gọi chính xác, là 95% cho mỗi đột biến.



**Bảng 9. LOD cho mỗi xét nghiệm đột biến EGFR**

Exon	Đột biến	ID COSMIC*	% tuyên bố 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	Mất đoạn	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*

\* Các tuyên bố LOD đã được xác minh trong huyết tương như một phần của nghiên cứu xác nhận LOD *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

† Những đột biến này không được xác nhận trong huyết tương.

## Độ nhạy phân tích — Dngưỡng $C_T$ và phạm vi ngưỡng $\Delta C_T$

Một cách tiếp cận dựa trên rủi ro đã được thực hiện đối với tỷ lệ dương tính giả khi thiết lập ngưỡng của xét nghiệm và các giá trị LOB ước tính được sử dụng như một thành phần trong quá trình phát triển các giá trị ngưỡng.

Các phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  tương ứng được thiết lập cho mỗi xét nghiệm đột biến trong *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit được cung cấp trong Bảng 10.

**Bảng 10. Các phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  của *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit**

Xét nghiệm đột biến	Phạm vi ngưỡng $\Delta C_T$
T790M	-10,00 ≥ đến ≤7,40
Mất đoạn	-10,00 ≥ đến ≤8,00
L858R	-10,00 ≥ đến ≤8,90

## Tính lặp lại và tính tái lập

Tính lặp lại và tính tái lập được đánh giá bằng cách xét nghiệm mức đột biến ở 3 lần LOD trên nền DNA bộ gen kiểu tự nhiên tại 3 địa điểm xét nghiệm sử dụng nhiều lô bộ dụng cụ, người vận hành và lần chạy trong những ngày khác nhau, với 2 lần lặp lại cho mỗi mẫu. Đối với cả 3 xét nghiệm đột biến, 100% mẫu DNA đột biến cho kết quả dương tính với đột biến. Các mẫu kiểu tự nhiên được xét nghiệm âm tính với đột biến trong tất cả các xét nghiệm tại tất cả các địa điểm.

## Ảnh hưởng của đầu vào DNA đến giá trị $C_T$

Mức đầu vào DNA được định nghĩa là tổng số lượng DNA EGFR có thể khuếch đại trong một mẫu được xác định bởi các giá trị  $C_T$  từ phản ứng mẫu chứng. Để chứng minh rằng hiệu năng của *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit nhất quán trong phạm vi  $C_T$  phản ứng mẫu chứng (23,70-31,10), tất cả 3 xét nghiệm đột biến EGFR đều được thực hiện dựa trên chuỗi pha loãng sáu điểm, 1 trong 3 (DNA tách chiết từ các dòng tế bào FFPE).  $C_T$  đích cho pha loãng một cho mỗi đột biến là khoảng 24,70. Pha loãng cuối cùng, cho  $C_T$  khoảng 32-33, nằm ngoài phạm vi  $C_T$  phản ứng mẫu chứng. Nhìn chung, các giá trị ngưỡng  $\Delta C_T$  đo được ở tổng mức đầu vào DNA khác nhau đều nhất quán trong phạm vi hoạt động của *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

## Các chất gây nhiễu

### Các chất gây nhiễu nội sinh

Các chất có khả năng gây nhiễu được pha vào các mẫu huyết tương dương tính với đột biến giả ở 3 lần LOD. Sau đó, các mẫu được xét nghiệm bằng *therascreen* EGFR Plasma RQ PCR Kit. Các mẫu có chứa các chất có khả năng gây nhiễu được so sánh với các mẫu huyết tương dương tính đột biến giả ở 3 lần LOD không chứa các chất gây nhiễu được pha. Mỗi chất gây nhiễu được xét nghiệm với 4 lần lặp lại.

Chênh lệch >2 lần độ lệch chuẩn (Standard Deviation, SD) (lấy từ nghiên cứu độ chụm) giữa  $\Delta C_T$  “xét nghiệm” và “mẫu chứng” (tức là không có chất gây nhiễu) được coi là cho thấy có khả năng gây nhiễu. Trong những trường hợp này, chênh lệch quan sát được trong  $\Delta C_T$  được cung cấp.

Các nồng độ xét nghiệm cung cấp trong Bảng 11 được lựa chọn dựa trên chỉ dẫn trong hướng dẫn EP07-A2 của CLSI và đại diện cho nồng độ tối đa dự kiến sẽ quan sát được trong một mẫu lâm sàng.

**Lưu ý:** Các hợp chất nội sinh này đã được pha vào các mẫu huyết tương dương tính với đột biến giả, bao gồm huyết tương từ những người hiến khỏe mạnh. Do đó, các hợp chất nội sinh này sẽ có mặt tự nhiên trong các mẫu ở nồng độ không xác định trước khi pha. Nồng độ cuối cùng của mỗi chất gây nhiễu nội sinh tiềm ẩn được xét nghiệm có thể sẽ lớn hơn nồng độ xét nghiệm.

**Bảng 11. Các chất nội sinh có khả năng gây nhiễu**

<b>Các chất có khả năng gây nhiễu (Interfering Substance, IS)</b>	<b>Nồng độ xét nghiệm</b>
Bilirubin không tiếp hợp	15 mg/dl
Hemoglobin (người)	0,2 g/dl
Triglyceride	3 g/dl

### **Xét nghiệm T790M**

Các hợp chất nội sinh sau đây ở nồng độ nêu trong Bảng 11 được chứng minh là có ảnh hưởng >2 lần SD (0,40  $\Delta C_T$ ) đến hiệu năng của xét nghiệm T790M:

- Triglyceride, chênh lệch 1,37  $\Delta C_T$

### **Xét nghiệm mất đoạn**

Các hợp chất nội sinh sau đây ở nồng độ nêu trong Bảng 11 được chứng minh là có ảnh hưởng >2 lần SD (0,71  $\Delta C_T$ ) đến hiệu năng của xét nghiệm mất đoạn:

- Hemoglobin, chênh lệch 0,80  $\Delta C_T$

### **Xét nghiệm L858R**

Các hợp chất nội sinh sau đây ở nồng độ nêu trong Bảng 11 được chứng minh là có ảnh hưởng >2 lần SD (0,56  $\Delta C_T$ ) đến hiệu năng của xét nghiệm L858R:

- Bilirubin, chênh lệch 1,13  $\Delta C_T$
- Triglyceride, chênh lệch 1,53  $\Delta C_T$

## Các chất gây nhiễu ngoại sinh

Các chất có khả năng gây nhiễu được pha vào các mẫu huyết tương dương tính với đột biến giả ở 3 lần LOD. Sau đó, các mẫu được xét nghiệm bằng *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Các mẫu có chứa các chất có khả năng gây nhiễu được so sánh với các mẫu huyết tương dương tính đột biến giả ở 3 lần LOD không chứa các chất gây nhiễu được pha. Mỗi chất gây nhiễu được xét nghiệm với 4 lần lặp lại.

Chênh lệch >2 lần độ lệch chuẩn (lấy từ nghiên cứu độ chụm) giữa  $\Delta C_T$  “xét nghiệm” và  $\Delta C_T$  “mẫu chứng” (tức là không có chất gây nhiễu) được coi là cho thấy có khả năng gây nhiễu. Trong những trường hợp này, chênh lệch quan sát được trong  $\Delta C_T$  được cung cấp.

Các nồng độ xét nghiệm cung cấp trong Bảng 12 được lựa chọn dựa trên chỉ dẫn trong hướng dẫn EP07-A2 của CLSI và vượt quá nồng độ điều trị trong mọi trường hợp.

**Bảng 12. Các chất nội sinh có khả năng gây nhiễu**

<b>Chất có khả năng gây nhiễu (Interfering Substance, IS)</b>	<b>Nồng độ xét nghiệm (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
Citalopram hydrobromide	0,75
Paroxetine hydrochloride hemihydrate	1,14
Sertraline hydrochloride	0,67
Fluoxetine hydrochloride	3,87
Acetaminophen	200,7
K <sub>2</sub> EDTA	3600

### Xét nghiệm T790M

Các hợp chất ngoại sinh sau đây ở nồng độ nêu trong Bảng 12 được chứng minh là có ảnh hưởng >2 lần SD (0,40  $\Delta C_T$ ) đến hiệu năng của xét nghiệm T790M:

- Citalopram hydrobromide, chênh lệch 0,52  $\Delta C_T$
- Sertraline hydrochloride, chênh lệch 0,47  $\Delta C_T$
- Fluoxetine hydrochloride, chênh lệch 0,48  $\Delta C_T$

### Xét nghiệm mất đoạn

Các hợp chất ngoại sinh sau đây ở nồng độ nêu trong Bảng 12 được chứng minh là có ảnh hưởng >2 lần SD (0,71  $\Delta C_T$ ) đến hiệu năng của xét nghiệm mất đoạn:

- Fluoxetine, chênh lệch 0,73  $\Delta C_T$

### Xét nghiệm L858R

Các hợp chất ngoại sinh sau đây ở nồng độ nêu trong Bảng 12 được chứng minh là có ảnh hưởng >2 lần SD (0,56  $\Delta C_T$ ) đến hiệu năng của xét nghiệm L858R:

- Citalopram hydrobromide, chênh lệch 0,72  $\Delta C_T$
- Paroxetine hydrochloride hemihydrate, chênh lệch 0,92  $\Delta C_T$
- Sertraline hydrochloride, chênh lệch 0,82  $\Delta C_T$
- Fluoxetine hydrochloride, chênh lệch 0,98  $\Delta C_T$
- Acetaminophen, chênh lệch 0,81  $\Delta C_T$
- K<sub>2</sub> EDTA, chênh lệch 0,57  $\Delta C_T$

## Hiệu năng Lâm sàng

Thử nghiệm lâm sàng NCT01203917 là một nghiên cứu một nhánh, nhãn mở, giai đoạn IV để đánh giá hiệu quả và độ an toàn/khả năng dung nạp của gefitinib tuyến đầu ở bệnh nhân Da trắng mắc NSCLC dương tính với đột biến EGFR, giai đoạn IIIA/B/IV.

Tính đủ điều kiện của bệnh nhân để tham gia vào thử nghiệm lâm sàng NCT01203917 được xác định bởi sự hiện diện của các đột biến nhạy cảm EGFR. Trạng thái đột biến EGFR của bệnh nhân NSCLC được đánh giá bằng cách sử dụng Xét nghiệm Thử nghiệm Lâm sàng (Clinical Trial Assay, CTA), với DNA từ các mẫu mô và huyết tương phù hợp. Nghiên cứu bao gồm một mục tiêu khám phá dấu ấn sinh học được lên kế hoạch trước để xác định các mẫu huyết tương có thể được xem xét cho phân tích đột biến nếu không có mẫu mô không. Kết quả cho thấy tỷ lệ phù hợp cao giữa các mẫu mô và huyết tương phù hợp là 94,3%, với độ đặc hiệu của xét nghiệm là 99,8% và độ nhạy là 65,7%.

Xét nghiệm hồi cứu các bệnh phẩm huyết tương từ những bệnh nhân được sàng lọc cho thử nghiệm lâm sàng NCT01203917 được thực hiện bằng cách sử dụng *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Một nghiên cứu bắc cầu đã được thực hiện để đánh giá sự phù hợp của *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit với CTA được sử dụng để chọn bệnh nhân cho thử nghiệm lâm sàng NCT01203917. Tính tương đương giữa CTA và *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit đã được chứng minh.

## Tài liệu tham khảo

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 gefitinib and osimertinib (AZD9291): A case report. *Thorac. Cancer.* 9, 745















## Thông tin liên hệ

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

# Biểu tượng

Các biểu tượng sau đây có thể xuất trong các hướng dẫn sử dụng trên bao bì và nhãn dán:

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

## Biểu tượng

## Định nghĩa biểu tượng

---



Tham khảo hướng dẫn sử dụng



Cảnh báo/thận trọng

## Phụ lục A: Chi tiết về Đột biến

Bảng 13 cho thấy các ID COSMIC được lấy từ Danh mục các Đột biến Sinh dưỡng trong Ung thư ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

**Bảng 13. Danh sách các đột biến và ID COSMIC**

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

# Thông tin Đặt hàng

Sản phẩm	Thành phần	Số catalog
<b><i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – để phát hiện các đột biến trong gen EGFR</b>		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Cho 24 phản ứng: 1 Xét nghiệm đối chứng, 7 Xét nghiệm đột biến, Mẫu chứng dương, <i>Taq</i> DNA Polymerase	870311
<b>Rotor-Gene Q MDx và các phụ kiện</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Máy luân nhiệt real-time PCR và bộ phân tích High Resolution Melt với 5 kênh (xanh lá, vàng, cam, đỏ, đỏ thẫm) cộng với kênh HRM, máy tính xách tay, phần mềm, phụ kiện, bảo hành 1-năm đối với các bộ phận và nhân công, không bao gồm cài đặt và đào tạo	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Máy luân nhiệt real-time PCR và bộ phân tích High Resolution Melt với 5 kênh (xanh lá, vàng, cam, đỏ, đỏ thẫm) cộng với kênh HRM, máy tính xách tay, phần mềm, phụ kiện, bảo hành 1 năm đối với các bộ phận và nhân công, cài đặt và đào tạo	9002032
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Khối nhôm cho thiết lập phản ứng thủ công với pipet một kênh 72 x ống 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 que của 4 ống và nắp cho 1000 phản ứng	981103

Sản phẩm	Thành phần	Số catalog
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 que của 4 ống và nắp cho 10.000 phản ứng	981106
<b>Các sản phẩm liên quan</b>		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Cho 50 lần chuẩn bị: QIAamp Mini Columns, Ống nối dài (20 ml), QIAGEN Proteinase K, RNA chất mang, Chất đệm, VacConnectors và Collection Tubes (1,5 ml và 2 ml)	55114

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

# Lịch sử Sửa đổi Tài liệu

## Lần sửa đổi

## Mô tả

Bản sửa đổi 4, tháng 10 năm 2019

Thay đổi nhà sản xuất hợp pháp (**trang bìa**)  
Điều chỉnh tên dụng cụ từ Rotor-Gene Q MDx thành Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM để phù hợp với tên trên nhãn dụng cụ  
Đã chỉnh sửa hướng dẫn bảo quản thuốc thử từ 90 ngày thành 12 tháng hoặc cho đến ngày hết hạn  
Đã cập nhật phần Hạn chế với thông tin liên quan đến xét nghiệm mất đoạn exon 19 và xét nghiệm L858R  
Sửa đổi **Bảng 9** để thay thế exon 21 L858R bị trùng lặp bằng Mất đoạn exon 19  
Đã xóa biểu tượng EC + REP khỏi trang bìa và phần Biểu tượng

Bản sửa đổi 5, tháng 6 năm 2020

Đã cập nhật các tham chiếu đến phần mềm RGQ phiên bản từ 2.3 lên 2.3.5 trở lên  
Đã cập nhật Bảng 8 và 10 để triển khai phạm vi ngưỡng  $\Delta C_T$  mới và điều chỉnh tất cả các mô tả liên quan cho phù hợp trong toàn bộ sổ tay  
Đã cập nhật tất cả các chương Giao thức để đưa thông tin về tầm quan trọng của việc trộn vào Các điểm quan trọng trước khi bắt đầu các phần; đã đánh dấu các chi tiết về việc trộn ở tất cả các bước trộn  
Đã thêm một bước trộn vào phần “Giao thức: Phát hiện Đột biến EGFR”  
Đã cập nhật phần Khắc phục sự cố để thêm giải pháp cho nhiều ngưỡng giao nhau

Bản sửa đổi 6, tháng 6 năm 2022

Đã cập nhật bảng trong phần Các chất có khả năng gây nhiễu để sửa đổi nồng độ xét nghiệm đối với Bilirubin không liên hợp từ 150 thành 15 mg/dbl

**Trang này được để trống có chủ ý**



**Trang này được để trống có chủ ý**

**Trang này được để trống có chủ ý**

### Thỏa thuận Cấp phép Giới hạn cho *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plasma RGQ PCR Kit

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

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

Để biết các điều khoản cấp phép được cập nhật, hãy truy cập [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Nhãn hiệu: QIAGEN<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, *therascreen*<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, Scorpions<sup>®</sup> (Tập đoàn QIAGEN); FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA<sup>®</sup> (Tập đoàn AstraZeneca). Các tên, nhãn hiệu, v.v. đã đăng ký được sử dụng trong tài liệu này, kể cả khi không được đánh dấu cụ thể như vậy được coi là được bảo vệ về pháp lý.

Tháng 6-2022 HB-1898-007 1127512VI © 2022 QIAGEN, tất cả quyền được bảo lưu.

