

2019 m. spalio mėn.

# „*therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio vadovas



1 versija

**IVD**

Skirta *in vitro* diagnostikai

Skirta naudoti su „Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM“ instrumentais

**CE**

**REF**

870311



„QIAGEN GmbH“, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden VOKIETIJA

R4 **MAT**

1119189LT

# Turinys

Numatytoji paskirtis .....	4
Santrauka ir paaiškinimas .....	5
Procedūros principas .....	6
<b>Rinkinio formatas</b> .....	6
<b>Tyrimai</b> .....	7
<b>Kontrolinės medžiagos</b> .....	8
Pateikiamos medžiagos .....	9
<b>Rinkinio turinys</b> .....	9
Būtinios, bet nepateikiamos priemonės .....	10
Įspėjimai ir atsargumo priemonės .....	11
<b>Saugos informacija</b> .....	11
<b>Bendrosios atsargumo priemonės</b> .....	11
Reagentų laikymas ir naudojimas .....	13
Bandinių laikymas ir naudojimas .....	15
Procedūra .....	16
Protokolas. EGFR mutacijų aptikimas .....	17
Protokolas. „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas .....	21
<b>Mutacijų įvertinimo duomenų analizė</b> .....	29
Trikčių šalinimo vadovas .....	37
Kokybės kontrolė .....	38
Apribojimai .....	38
Eksploatacinių savybių charakteristikos .....	40

---

Analitinis jautrumas – tuštumo riba (Limit of Blank, LOB) .....	40
Aptikimo riba (Limit of Detection, LOD) .....	40
Analitinis jautrumas – $\Delta C_T$ ribinės reikšmės .....	42
Pasikartojamumas ir atkartojamumas .....	42
DNR įvesties poveikis $C_T$ reikšmėms .....	42
Trukdančios medžiagos.....	43
Klinikinis efektyvumas .....	47
Literatūra .....	48
Kontaktinė informacija .....	48
Simboliai .....	49
A priedas. Informacija apie mutacijas .....	50
Užsakymo informacija .....	51
Dokumento peržiūrų istorija.....	53

---

# Numatytoji paskirtis

„*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinys yra „in vitro“ diagnostikos tyrimas, skirtas 19 egzono delecijoms, 20 ir 21 egzono pakaitalams (atitinkamai T790M ir L858R) epidermio augimo faktoriaus receptoriaus (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) gene aptikti, ir pateikiantis mutacijos būsenos kiekybinį vertinimą. Rezultatai skirti padėti gydytojams identifikuoti pacientus, sergančius NSCLC, kuriems gali būti naudingas gydymas IRESSA® (gefitinibu), kai negalima įvertinti audinio mėginio.

„*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį turi naudoti išmokytas personalas specialioje laboratorinėje aplinkoje, tirdamas DNR mėginius, išskirtus iš plazmos, gautos iš nesmulkiaštelinio plaučių vėžio (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) pacientų kraujo.

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

---

# Santrauka ir paaiškinimas

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

Naudojant „Scorpions®“ ir ARMS technologijas, „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkiniu laukinio tipo genominės DNR fone galima nustatyti toliau nurodytas EGFR geno mutacijas.

- 19 egzono delecijas
- T790M
- L858R

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

# Procedūros principas

„*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinyje naudojami dvi technologijos – ARMS ir „Scorpions“ – skirtos mutacijoms aptikti atliekant „real-time PCR“ tyrimus.

## ARMS

Aleliams arba mutacijoms būdingos amplifikacijos gaunamos naudojant amplifikacijos refrakcinę mutacijų sistemą (Amplification Refractory Mutation System, ARMS). *Taq* DNR polimerazė (*Taq*) efektyvi atskiriant sutapimą arba nesutapimą PGR pradmenis 3' gale. Konkretios mutavusios sekos gali būti selektyviai amplifikuotos net mėginiuose, kuriuose dauguma sekų nemutuoja. Kai pradmuo visiškai sutampa, amplifikacija vyksta visu greičiu. Kai nesutampa 3' galo bazė, amplifikacija vyksta fone nedideliu greičiu.

## Scorpions

Amplifikacija aptinkama taikant „Scorpions“ technologiją. „Scorpions“ yra dvigubos funkcijos molekulės, turinčios PGR pradmenį, kovalentiškai sujungtą su zonda. Zonde esančiam fluoroforui reaguojant su slopinamąja medžiaga, taip pat esančia zonde, sumažinama fluorescencija. Kai PGR tyrimo metu zondas prisijungia prie stiprinamosios medžiagos, fluoroforas ir slopinamoji medžiaga atsiskiria. Dėl to reakcijos mėgintuvėlyje padidėja fluorescencija.

## Rinkinio formatas

„*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinyje yra keturi tyrimai:

- vienas kontrolinis tyrimas (Ctrl),
- trys mutacijų tyrimai.

---

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

## Tyrimai

### Kontrolinis tyrimas

Kontrolinis tyrimas, pažymėtas FAM, naudojamas visai DNR mėginyje įvertinti. Šio tyrimo metu amplifikuojama EGFR geno 2 egzono sritis. Pradmenys ir zondai sukurti taip, kad būtų išvengta bet kokių žinomų EGFR polimorfizmų.

### Mutacijų tyrimai

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

---

## Kontrolinės medžiagos

Visų eksperimentinių tyrimų serijose turi būti toliau išvardytos kontrolinės medžiagos.

### Teigiama kontrolinė medžiaga

Kiekviename tyrime 1–4 mėgintuvėliuose turi būti teigiama kontrolinė medžiaga. „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinyje yra EGFR teigiama kontrolinė medžiaga (Positive Control, PC), kuri naudojama kaip teigiamos kontrolinės medžiagos reakcijos matrica. Teigiamos kontrolinės medžiagos rezultatai įvertinami siekiant įsitikinti, kad rinkinys veikia pagal nurodytus priimtumo kriterijus.

### Neigiamos kontrolinės medžiagos

Kiekvienoje tyrimų serijoje 9–12 mėgintuvėliuose turi būti neigiama kontrolinė medžiaga (kontrolinė medžiaga be matricos, NTC). NTC sudaro vanduo be nukleazės (H<sub>2</sub>O), skirtas naudoti kaip kontrolinės medžiagos be matricos „matrica“. Kontrolinė medžiaga be matricos naudojama siekiant įvertinti bet kokią galimą taršą tyrimo nustatymo metu ir vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos veiksmingumą.

### Vidinės kontrolinės medžiagos reakcijos įvertinimas

Kiekviename reakcijos mišinyje kartu su tikslinės reakcijos medžiaga yra vidinė kontrolinė medžiaga. Nepavykusi reakcija rodo, kad gali būti inhibitorių, dėl kurių gaunami klaidingai neigiami rezultatai, arba kad nustatydamas šį mėgintuvėlį operatorius padarė klaidą.

Jei vidinės kontrolinės medžiagos reakcija nepavyksta dėl PGR inhibicijos, inhibitorių poveikį galima sumažinti praskiedus mėginį, tačiau reikia atminti, kad praskiedžiama ir tikslinė DNR. FAM amplifikacija gali nukonkuruoti vidinės kontrolės amplifikaciją tiek, kad sugeneruota IC C<sub>T</sub> (HEX) reikšmė nepateks į nurodytą diapazoną. Šių mėginių FAM rezultatai vis tiek galioja.



# Pateikiamos medžiagos

## Rinkinio turinys

<b><i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>Katalogo nr.</b>			<b>870311</b>
<b>Reakcijų skaičius</b>			<b>24</b>
Raudona	Control Reaction Mix (Kontrolinės reakcijos mišinys)	Ctrl	2 x 600 µl
Violetinė	T790M Reaction Mix (T790M reakcijos mišinys)	T790M	600 µl
Oranžinė	Deletions Reaction Mix (Delecijų reakcijos mišinys)	Del	600 µl
Rožinė	L858R Reaction Mix (T790M reakcijos mišinys)	L858R	600 µl
Rusvai gelsva	EGFR Positive Control (EGFR teigiama kontrolinė medžiaga)	PC	300 µl
Žalsva	<i>Taq</i> DNA Polymerase ( <i>Taq</i> DNR polimerazė)	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Balta	Nuclease-Free Water for No Template Control (Vanduo be nukleazės, skirtas kontrolinei medžiagai be matricos)	NTC	1 x 1,9 ml
Balta	Nuclease-Free Water for Dilution (Vanduo be nukleazės, skirtas skiesti)	Dil	1 x 1,9 ml

# Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

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

- DNR išskyrimo rinkinys (žr. „Procedūra“, 16 psl.)
- Specialios pipetės\* (reguliuojamos), skirtos mėginiams ruošti
- Specialios pipetės\* (reguliuojamos), skirtos PGR pagrindiniams mišiniams ruošti
- Specialios pipetės\* (reguliuojamos), skirtos DNR matricai paskirstyti
- Pipečių antgaliai su filtrais be DNR-azės, RNR-azės ir DNR (siekiant išvengti kryžminės taršos, rekomenduojame naudoti pipečių antgalius su aerozoliniais barjeriais)
- Vandens vonelė arba panašus įrenginys, kuriame galima laikyti 50 ml centrifugos mėgintuvėlius 60 °C temperatūroje
- Kaitinimo blokas arba panašus įrenginys, kuriame galima inkubuoti 56 °C temperatūroje<sup>‡</sup>
- Skaldytas ledas
- Stalinė centrifuga\* su rotoriumi 2 ml reakcijos mėgintuvėliams
- Sūkurinė maišyklė („vortex“)
- „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentas\*<sup>†</sup> su fluorescenciniais kanalais, skirtais „Cycling Green“ ir „Cycling Yellow“ (atitinkamai FAM ir HEX aptikimui)
- „Rotor-Gene Q“ programinės įrangos 2.3 versija
- „Strip Tubes and Caps, 0.1 ml“, skirti naudoti su „72-Well Rotor“ (kat. nr. 981103 arba 981106)
- Mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai be DNR-azės, RNR-azės ir DNR, skirti pagrindiniams mišiniams ruošti
- „Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes“, aliuminio blokas neautomatiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete (kat. nr. 9018901)

\* Užtikrinkite, kad instrumentai būtų patikrinti ir sukalibruoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

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

# Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta in vitro diagnostikai

Skirta tik profesionaliam naudojimui

## Saugos informacija

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

## Bendrosios atsargumo priemonės

Visada laikykitės toliau pateikiamų nurodymų.

- Naudokite pipečių antgalius be DNR-azės, RNR-azės ir DNR su filtrais ir užtikrinkite, kad pipetės būtų sukalibruotos pagal gamintojo nurodymus.
- Teigiamas medžiagas (bandinius ir teigiamas kontrolines medžiagas) laikykite ir ekstrahuokite atskirai nuo visų kitų reagentų, dėkite juos į reakcijos mišinį erdviškai atskirtoje patalpoje.
- Prieš pradėdami tyrimą visus komponentus gerai atšildykite kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Atšildę sumaišykite komponentus (vartydami kiekvieną mėgintuvėlį 10 kartų) ir trumpai centrifuguokite.

---

**Pastaba.** Būkite ypač atsargūs, kad neužterštumėte PGR reakcijų sintetine kontroline medžiaga. Reakcijos mišiniams paruošti ir DNR matricai pridėti rekomenduojama naudoti atskiras specialias pipetes. Reakcijos mišiniai turi būti ruošiami ir paskirstomi kitoje vietoje nei ta, kurioje pridedama matrica. Pabaigus PGR tyrimą, „Rotor-Gene Q“ mėgintuvėlių atidaryti negalima. Taip išvengsite laboratorijos užteršimo galutiniais PGR produktais.

**Pastaba.** Reagentai patvirtinti neautomatiniam nustatymui. Jei naudojamas automatizuotas metodas, galimų reakcijų skaičius gali sumažėti dėl instrumentų „neveikos tūrį“ reikalingų užpildyti reagentų.

**Pastaba.** Visi reagentai, esantys „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinyje, yra pritaikyti naudoti aprašytiems tyrimams. Visi „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio sudėtyje esantys reagentai numatyti naudoti tik su kitais reagentais iš to paties „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio.

Norint išlaikyti optimalų rinkinio veikimą, negalima naudoti reagentų pakaitalų.

**Pastaba.** Naudokite tik rinkinyje pateikiamą *Taq* DNR polimerazę (*Taq*). Nepakeiskite jos kita *Taq* DNR polimeraze iš to paties ar kito tipo rinkinio, taip pat nekeiskite *Taq* DNR polimeraze, gauta iš kito tiekėjo.

**Pastaba.** „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio reagentai yra optimaliai atskiesti. Daugiau reagentų skiesti nerekomenduojama, nes gali sumažėti jų veiksmingumas. Nerekomenduojama naudoti mažesnių negu 25 µl reakcijos tūrių, nes tai didina klaidingai neigiamų rezultatų riziką.

# Reagentų laikymas ir naudojimas

„*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinys pateikiamas ant sausojo ledo. Jei pristačius „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį kuris nors jo komponentas nėra užšaldytas, pervežant buvo atidaryta išorinė pakuotė, nėra važtaraščio, naudojimo instrukcijų arba reagentų, susisiekite su vienu iš QIAGEN techninės priežiūros skyrių arba vietinių platintojų (apsilankykite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Gavus „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį, jį iš karto reikia padėti laikyti temperatūroje nuo  $-30$  iki  $-15$  °C pastovią temperatūrą palaikančiame ir apsaugotame nuo šviesos šaldiklyje. Laikant nurodytomis laikymo sąlygomis, „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinys išlieka stabilus iki nurodytos galiojimo datos.

Atidarytus reagentus galima laikyti jų originalioje pakuotėje nuo  $-30$  iki  $-15$  °C temperatūroje 12 mėnesių arba iki nurodytos galiojimo pabaigos datos, atsižvelgiant į tai, kas bus pirmiau. Venkite pakartotinai atšildyti ir užšaldyti. Atlikite ne daugiau kaip aštuonis užšaldymo ir atšildymo ciklus.

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

- 6 valandų, jei laikoma kambario temperatūroje  
**Pastaba.** Šis laikas apima PGR nustatymą ir laikymą.
- 18 valandų, jei laikoma šaldytuve ( $2-8$  °C)  
**Pastaba.** Šis laikas apima PGR nustatymą ir laikymą.

---

**Pastaba.** Reakcijų mišinyje esantys „Scorpions“ (kaip ir visos fluorescenciškai pažymėtos molekulės) yra jautrūs šviesai. Apsaugokite kontrolinius ir reakcijų mišinius nuo šviesos, kad neišblukytų.

„*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio reagentai yra optimaliai atskiesti, todėl jų nereikia daugiau gryninti ar apdoroti prieš naudojant tyrime, kaip nurodyta „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio naudojimo instrukcijose (vadove).

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

---

## Bandinių laikymas ir naudojimas

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

Mėginių medžiaga turi būti žmogaus genominė DNR, išskirta iš plazmos. Bandinius būtina transportuoti pagal standartinį pataloginį metodą, kad būtų užtikrinta bandinių kokybė.

# Procedūra

## DNR išskyrimas

Šio rinkinio efektyvumo charakteristikos sugeneruotos naudojant DNR, išskirtą pasitelkus „QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit“ rinkinį (kat. Nr. 55114). Kai naudojate „QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit“ rinkinį, DNR išskyrimą atlikite pagal vadove pateiktas instrukcijas ir atkreipkite dėmesį į toliau nurodytus dalykus.

- Pradinis plazmos tūris yra 2 ml.
- Prieš išskiriant DNR, 2 ml plazmos reikia centrifuguoti 3 000 aps./min. 2 minutes, tada supernatantą perkelti į švarų mėgintuvėlį.
- Proteinazės K tūris turi būti 250 µl.
- Proteinazės K skaidymas turi būti vykdomas 1 valandą 60 °C temperatūroje.
- Išgryninta genomine DNR turi būti išplauta 55 µl „Buffer AVE“ buferiniu tirpalu (pateikiamu „QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit“ rinkinyje).
- Išgrynintą genomine DNR laikykite temperatūroje nuo –30 iki –15° C.

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



# Protokolas. EGFR mutacijų aptikimas

## Svarbi informacija prieš pradėdant

- Prieš pradėdami procedūrą perskaitykite skyrių „Bendrosios atsargumo priemonės“, 11 psl.
- Prieš pradėdami protokolą skirkite laiko, kad susipažintumėte su „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu. Žr. instrumento naudotojo vadovą.
- Nevartykite *Taq* DNR polimerazės (*Taq*) arba bet kokio mišinio, kuriame yra *Taq* DNR polimerazės, nes tai gali deaktyvinti fermentą.
- Vienoje plokštelėje galima tirti ne daugiau kaip 16 mėginių.
- Pipete įlašinkite *Taq*: pipetės antgalį įkiškite skysčio paviršiuje, kad antgalis nepasidengtų fermentų pertekliumi.
- Kiekvieno DNR mėginio kontrolinius ir mutacijų tyrimus būtina išanalizuoti tos pačios PGR tyrimų serijos metu, kad būtų išvengta skirtumų, atsirandančių dėl skirtingų tyrimų serijų.

## Ką reikia atlikti prieš pradėdant

- Prieš kiekvieną naudojimą visus reagentus reikia visiškai atšildyti kambario temperatūroje (15–25 °C) bent 1 valandą, bet ne ilgiau kaip 4,5 valandos, sumaišyti (vartant 10 kartų) ir trumpai centrifuguoti, kad turinys susirinktų mėgintuvėlio apačioje.
- Kiekvieną kartą prieš naudodami įsitikinkite, kad *Taq* yra kambario temperatūros (15–25 °C). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

## Procedūra

1. Visiškai atšildykite visus reakcijų mišinius, vandenį be nukleazės, skirtą kontrolinei medžiagai be matricos (No Template Control, NTC), ir EGFR teigiamą kontrolinę medžiagą (Positive Control, PC) kambario temperatūroje (15–25 °C) bent 1 val. (1 lentelė). Reagentams atšilus, sumaišykite juos (vartydami 10 kartų), kad nesusikauptų druskos, ir trumpai centrifuguokite, kad turinys susirinktų mėgintuvėlio apačioje.

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

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

**Pastaba.** PGR nustatymą reikia atlikti kambario temperatūroje. „Laikymas“ reiškia laiką nuo PGR nustatymo pabaigos iki tyrimo „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentu pradžios.

**Pastaba.** Perkelkite *Taq* DNR polimerazę (mėgintuvėlį *Taq*) į kambario temperatūrą (15–25 °C) tuo pačiu metu, kaip ir kitus reagentus (žr. „Reagentų laikymas ir naudojimas“, 13 psl). Mėgintuvėlį trumpai centrifuguokite, kad jo apačioje susirinktų fermentas.

2. Atlikite toliau nurodytus veiksmus.

- 2a. Pagal atitinkamus reakcijų mišinius, parodytus 2 lentelėje, pažymėkite keturis mikrocentrifugos mėgintuvėlius (nepateikiami).
- 2b. Pagal 2 lentelėje pateiktus tūrius paruoškite pakankamai DNR mėginių pagrindinių mišinių (kontrolinės arba mutacijų reakcijos mišinys [mėgintuvėlis CTRL, T790M, delecijos, L858R] ir *Taq* DNR polimerazė [*Taq*]), skirtų vienai EGFR teigiamos kontrolinės medžiagos (mėgintuvėlis PC) reakcijai, ir vandenį be nukleazės, skirtą kontrolinės medžiagos be matricos (mėgintuvėlis NTC) reakcijai.

**Pastaba.** Įtraukite reagentus vienam papildomam mėginiui, kad jų pakaktų PGR nustatyti.

Pagrindiniuose mišiniuose yra visi PGR reikalingi komponentai, išskyrus mėginį.

**2 lentelė. Pagrindinių mišinių ruošimas\***

Tyrimas	Reakcijos mišinio mėgintuvėlis	Reakcijos mišinio tūris	Taq DNR polimerazės tūris (mėgintuvėlis Taq)
Kontrolinė medžiaga	CTRL	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
T790M	T790M	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
Delecijos	Del	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
L858R	L858R	19,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n + 1)$

\* Paruoškite pakankamai pagrindinio mišinio, kad užtektų papildomam mėginiui ir būtų pakankamas perteklius nustatant PGR.

**Pastaba.** Ruošiant pagrindinį mišinį, pirmiausia į atitinkamą mėgintuvėlį pridedama reikiamo tūrio kontrolinės medžiagos arba mutacijų reakcijos mišinio, o Taq DNR polimerazė pridedama paskutinė.

3. Pagal 3 lentelėje pateiktą išdėstymą į įkėlimo bloką įdėkite reikiamą skaičių PGR 4 mėgintuvėlių juostelių (kiekvienoje juostelėje yra po 4 mėgintuvėlius). Mėgintuvėlių neuždenkite.

**Pastaba.** Laikykite dangtelius plastikiniame indelyje, kol jų prireiks.

4. Uždenkite pagrindinio mišinio mėgintuvėlį ir pavartykite 10 kartų, kad sumaišytumėte pagrindinį mišinį, tada trumpai centrifuguokite, kad pagrindinis mišinys būtų mėgintuvėlio apačioje. Nedelsdami įpilkite 20  $\mu\text{l}$  pagrindinio mišinio į kiekvieną atitinkamą PGR mėgintuvėlių juostelę.
5. Nedelsdami įpilkite 5  $\mu\text{l}$  vandens be nukleazės ( $\text{H}_2\text{O}$ ) į kontrolinės medžiagos be matricos PGR mėgintuvėlių juosteles (PGR mėgintuvėliai Nr. 9–12) ir uždenkite mėgintuvėlius dangteliais.
6. Įpilkite po 5  $\mu\text{l}$  kiekvieno mėginio į mėginių mėgintuvėlius (PGR mėgintuvėliai Nr. 5–8, 13–16 ir 17–72) ir uždenkite mėgintuvėlius dangteliais.
7. Įpilkite 5  $\mu\text{l}$  EGFR teigiamos kontrolinės medžiagos (Positive Control, PC) į teigiamos kontrolinės medžiagos mėgintuvėlius (PCR mėgintuvėliai Nr. 1–4). Turi būti atliktas kiekvieno DNR mėginio kontrolinis ir visų mutacijų tyrimai. Išdėstymas pateiktas 3 lentelėje.

**3 lentelė. Kontrolinio ir mutacijų tyrimų išsidėstymas**

Kontrolinės medžiagos			Mėginio numeris						
Tyrimas	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
Delecijos	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
			Mėginio numeris						
Tyrimas	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
Delecijos	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Ilgalaikiu žymikliu pažymėkite PGR 4 mėgintuvėlių juostelių pirmų mėgintuvėlių, esančių mažiausių skaičių vietoje, dangtelius (pvz., esančių 1, 5, 9 vietoje ir t. t.), kad nurodytumėte kryptį, kaip įdėti mėgintuvėlius į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento 72 šulinėlių rotorių.
- Įstatykite visas PGR 4 mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas 72 šulinėlių rotoriaus vietas ir apžiūrėkite, ar visuose mėgintuvėliuose tūriai vienodi.
 

**Pastaba.** Įsitikinkite, kad perkeliant mėgintuvėlių juosteles į rotorių jos nepersisuko.
- Jei rotorius užpildytas ne visas, į likusias vietas įstatykite uždengtus tuščius mėgintuvėlius.
- Iš karto įdėkite rotorių į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“. Įsitikinkite, ar fiksuojamasis žiedas („Rotor-Gene Q MDx“ instrumento priedas) yra uždėtas ant rotoriaus, kad tyrimų serijos metu mėgintuvėliai būtų pritvirtinti.
- Kaip sukurti temperatūros profilį ir pradėti tyrimų seriją, žr. „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento nustatymą (žr. „Protokolas. „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas“, 21 psl.).

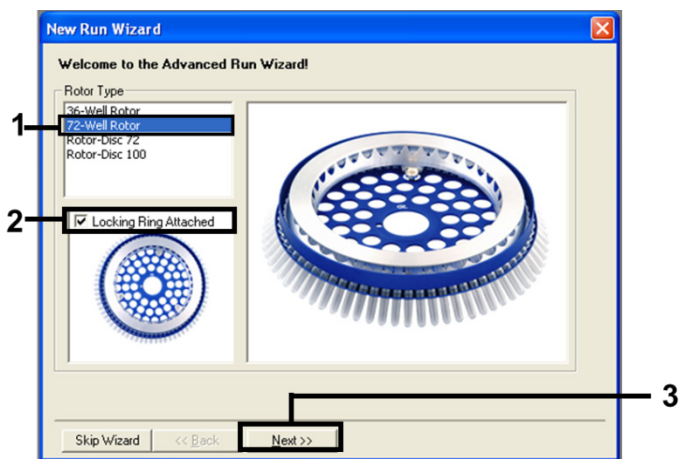
# Protokolas. „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas

Ciklo parametrai pateikti 4 lentelėje 0..

4 lentelė. Ciklo parametrai

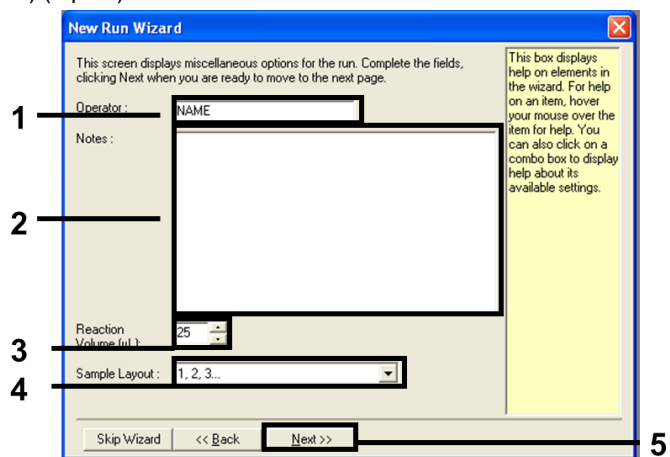
Ciklai	Temperatūra	Laikas	Duomenų gavimas
1	95 °C	15 min.	Nėra
40	95 °C	30 sek.	Nėra
	60 °C	60 sek.	Green and Yellow

1. Prie „Rotor-Gene Q MDx 5plex“ instrumento prijungto nešiojamojo kompiuterio darbalaukyje dukart spustelėkite „Rotor-Gene Q“ serijos programinės įrangos versijos 2.3 piktogramą. Pasirodžiusiame dialogo lange „New Run“ (Nauja tyrimų serija) pasirinkite skirtuką „Advanced“ (Išplėstinis).
2. Norėdami sukurti naują šabloną, pasirinkite „**Empty Run**“ (Tuščias tyrimas) ir spustelėkite „**New**“ (Naujas).  
Atidaromas dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos procedūros vedlys).
3. Pasirinkite rotoriaus tipą „72-Well Rotor“ (72 šulinėlių rotorius). Įsitinkinkite, kad fiksuojamasis žiedas uždėtas, ir pažymėkite langelį „**Locking Ring Attached**“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Spustelėkite „**Next**“ (Kitas) (1 pav.).



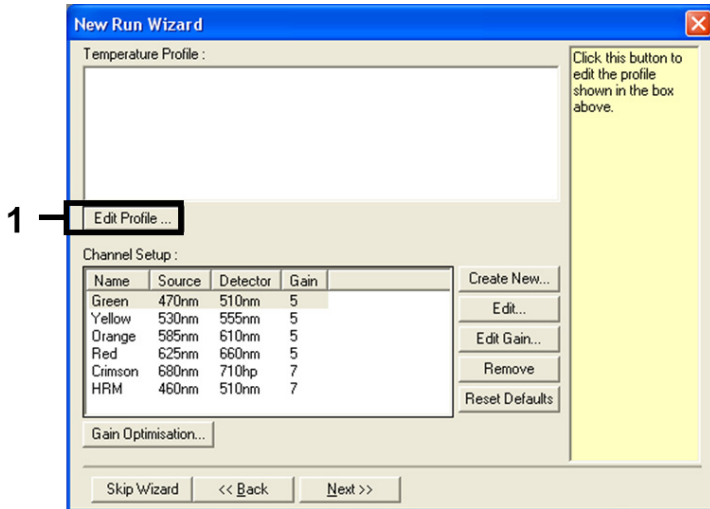
1 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos procedūros vedlys).

4. Įveskite operatoriaus vardą. Įtraukite pastabas ir įveskite reakcijos tūrį **25**. Įsitikinkite, kad lauke „Sample Layout“ (Mėginių išdėstymas) įvestos reikšmės yra **1, 2, 3...** Spustelėkite „Next“ (Kitas) (2 pav.).



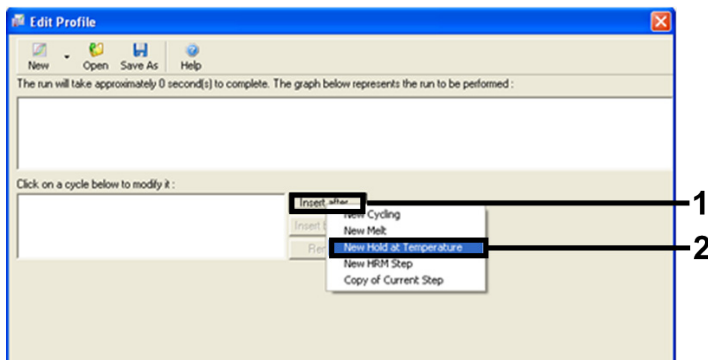
2 pav. Operatoriaus vardo ir reakcijų tūrių įvedimas.

5. Dialogo lange „New Run Wizard“ (Naujos procedūros vedlys) spustelėkite **„Edit Profile“** (Redaguoti profilį) (3 pav.) ir nustatykite tyrimo parametrus, atlikdami toliau nurodytus veiksmus.



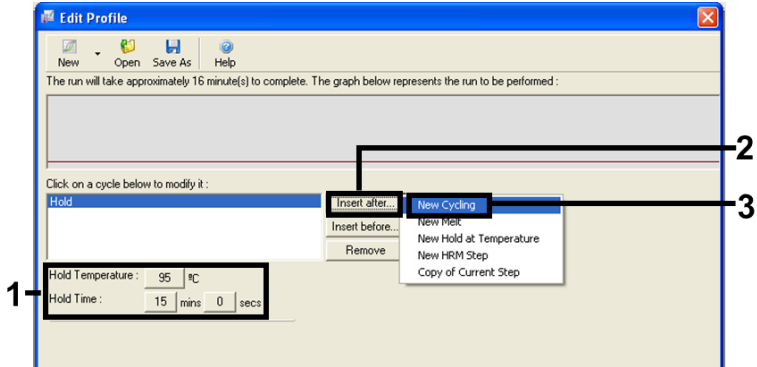
3 pav. Profilio redagavimas.

6. Spustelėkite **„Insert after“** (Įterpti po) ir pasirinkite **„New Hold at Temperature“** (Naujas išlaikymas esant temperatūrai) (4 pav.).



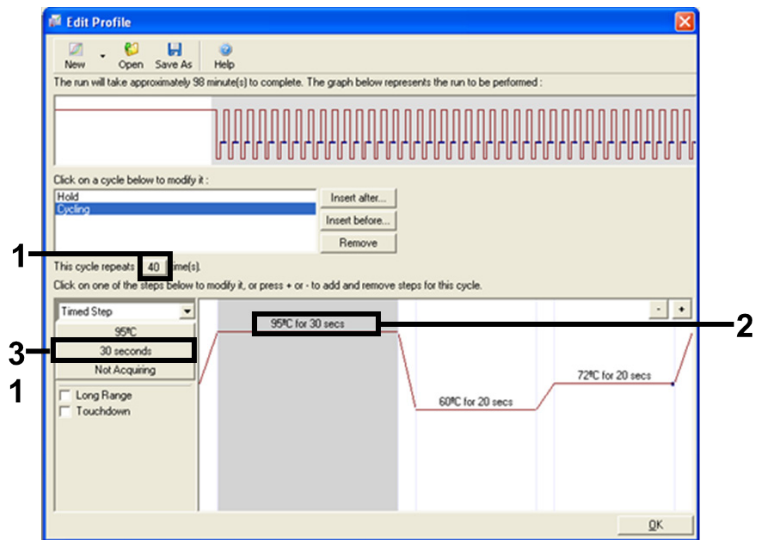
4 pav. Pradinio inkubavimo veiksmo įterpimas.

7. Pakeiskite „Hold Temperature“ (Išlaikymo temperatūra) į 95 °C, o „Hold Time“ (Išlaikymo laikas) – į „15 mins 0 secs“ (15 min. 0 sek.). Spustelėkite „Insert After“ (Įterpti po), tada pasirinkite „New Cycling“ (Naujas ciklas) (5 pav).



5 pav. Pradinis inkubacijos žingsnis esant 95 °C temperatūrai.

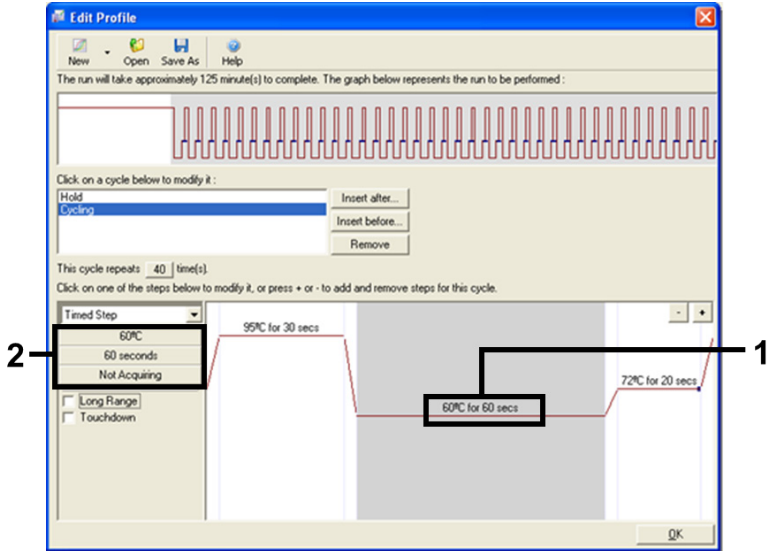
8. Nustatykite, kad ciklas būtų kartojamas 40 kartų. Pasirinkite pirmą žingsnį ir nustatykite „95 °C – 30 sek.“.



6 pav. Ciklo žingsnis esant 95 °C temperatūrai.

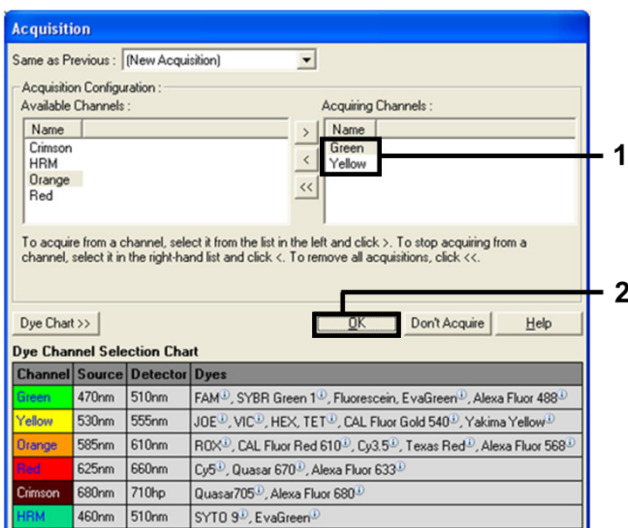


9. Pasirinkite antrą žingsnį ir nustatykite „60 °C – 60 sek.“. Spustelėkite „Not Acquiring“ (Negaunama), kad šiame žingsnyje įgalintumėte duomenų gavimą. (7 pav).



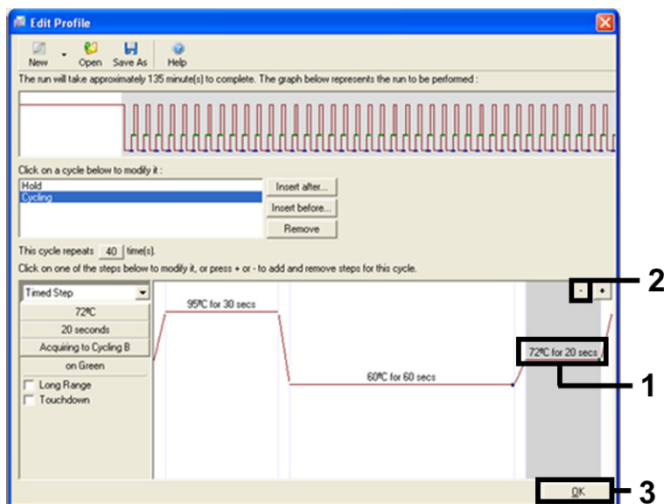
7 pav. Ciklo žingsnis esant 60 °C temperatūrai.

10. Nustatykite „Green“ ir „Yellow“ gavimo kanalus pasirinkdami „>“, kad perkeltumėte juos iš sąrašo „Available Channels“ (Pasiekiami kanalai). Spustelėkite „OK“ (Gerai) (8 pav.).



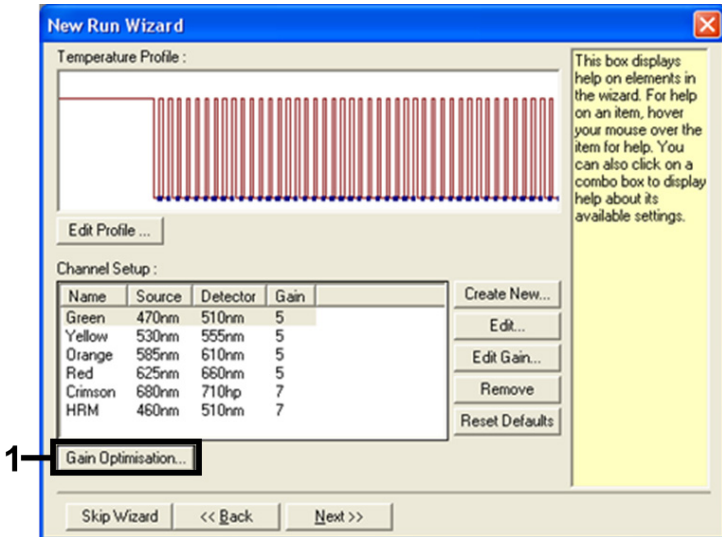
8 pav. Gavimas atliekant ciklo žingsnį esant 60 °C temperatūrai.

11. Pažymėkite trečią žingsnį ir panaikinkite spustelėdami „-“. Spustelėkite „OK“ (Gerai) (9 pav.).



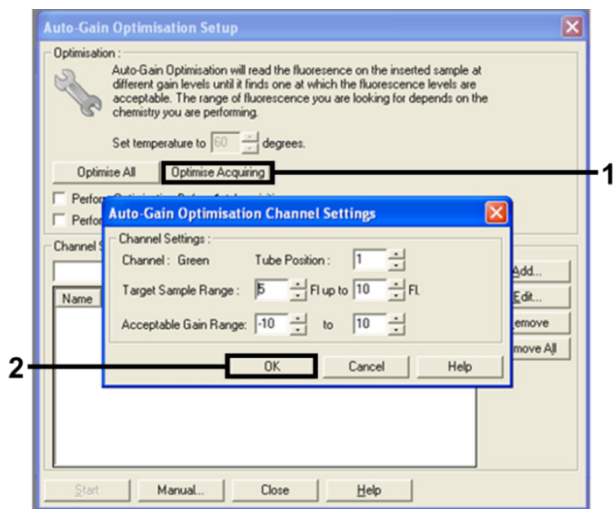
9 pav. Išplėtimo žingsnio pašalinimas.

12. Kitame dialogo lange spustelėkite „**Gain Optimisation**“ (Gavimo optimizavimas) (10 pav.).



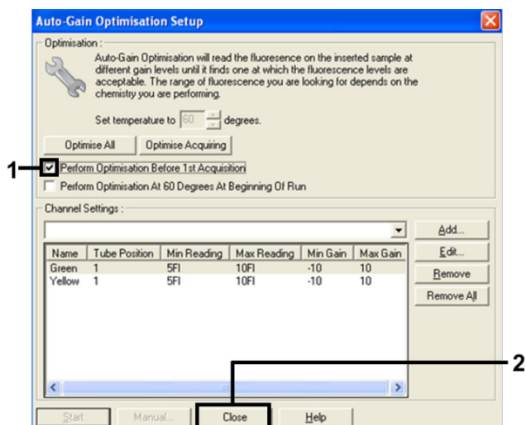
10 pav. Gavimo optimizavimas.

13. Spustelėkite „**Optimise Acquiring**“ (Optimizuoti gavimą). Rodomi kiekvieno kanalo nustatymai. Priimkite šias numatytąsias abiejų kanalų reikšmes spustelėdami „**OK**“ (Gerai). (11 pav).



11 pav. Automatinis žaliao kanalo gavimo optimizavimas.

14. Pažymėkite langelį „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Atlikti optimizavimą prieš pirmą gavimą), tada spustelėkite „Close“ (Uždaryti) ir grįžkite į vedlį (12 pav.).



12 pav. Green ir Yellow kanalų pasirinkimas s.

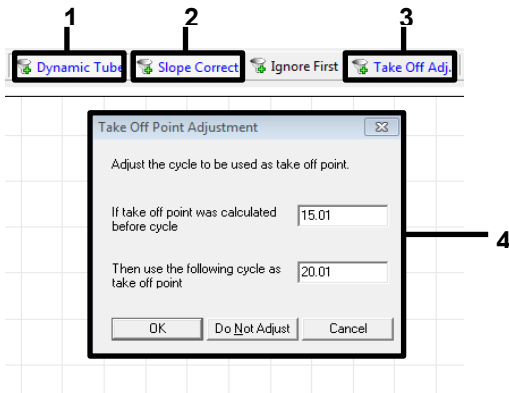
15. Spustelėkite „Next (Kitas)“, kad įrašytumėte matricą atitinkamoje vietoje, pasirinkdami „Save Template“ (Įrašyti matricą).

## Mutacijų įvertinimo duomenų analizė0.

Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis naudodami toliau pateiktą procedūrą.

### Programinės įrangos analizės nustatymas

1. Atidarykite atitinkamą failą naudodami „Rotor-Gene Q“ serijos programinės įrangos versiją 2.3.
2. Jei prieš atliekant tyrimą mėginiams nebuvo suteiktas pavadinimas, spustelėkite „**Edit Samples**“ (Redaguoti mėginius).
3. Stulpelyje „**Name**“ (Pavadinimas) įterpkite mėginių pavadinimus.  
**Pastaba.** Tuščių šulinėlių pavadinimų nerašykite.
4. Spustelėkite „**Analysis**“ (Analizė). Analizės puslapyje spustelėkite „**Cycling A. Yellow**“ ir patikrinkite HEX kanalą.
5. Patikrinkite, ar pažymėta parinktis „**Dynamic Tube**“ (Dinaminis mėgintuvėlis). Spustelėkite „**Slope Correct**“ (Teisingas nuolydis) ir „**Linear Scale**“ (Linijinė skalė).
6. Spustelėkite „**Take Off Adj.**“ (Kilimo koregavimas), tada įveskite „**15.01**“ (15,01) ir „**20.01**“ (20,01), kaip parodyta 13 pav.



13 pav. EGFR analizės normalizavimo nustatymai. 1 = „Dynamic Tube“ (Dinaminis mėgintuvėlis), 2 = „Slope Correct“ (Teisingas nuolydis), 3 = „Take Off Adj.“ (Kilimo koregavimas), 4 = „Take Off Point Adjustment“ (Kilimo taško koregavimas) dialogo langas su parametru reikšmėmis.

7. Nustatykite slenksčio reikšmę „**0.02**“ (0,02) ir patikrinkite HEX C<sub>T</sub> reikšmes.
8. Analizės puslapyje spustelėkite „**Cycling A, Green**“, kad peržiūrėtumėte FAM kanalą. Nustatykite parametrus, kaip anksčiau pateikta 13 pav.  
Turi būti pažymėtas dinaminis mėgintuvėlis.
9. Spustelėkite „**Slope Correct**“ (Teisingas nuolydis) ir „Linear Scale“ (Linijinė skalė).
10. Nustatykite slenksčio reikšmę „**0.075**“ (0,075) ir patikrinkite FAM C<sub>T</sub> reikšmes.

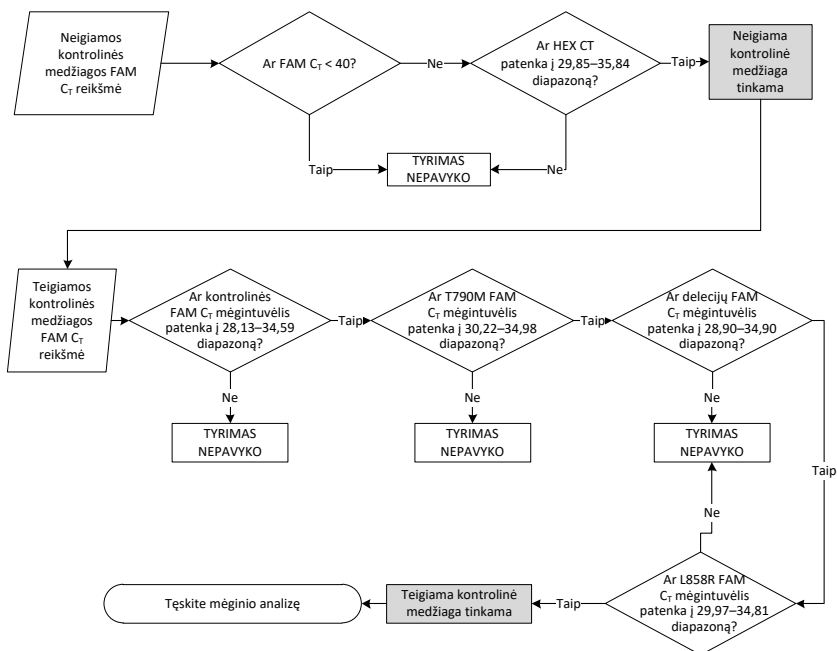
## Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė

Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis, kaip aprašyta toliau.

- **Neigiamos kontrolinės medžiagos:** norint užtikrinti, kad nėra užteršimo matrica, NTC neturi generuoti C<sub>T</sub> reikšmės žaliame (FAM) kanale žemiau 40. Norint užtikrinti tinkamą tyrimų serijos nustatymą, NTC turi rodyti amplifikaciją 29,85–35,84 geltoname (HEX) kanale (vidinės kontrolinės medžiagos).  
Jei amplifikacija žaliame kanale yra teigiama ir (arba) signalo amplifikacija geltoname kanale yra už 29,85–35,84 diapazono ribų, tyrimų serija yra netinkama.
- **Teigiama kontrolinė medžiaga:** EGFR teigiama kontrolinė medžiaga (Positive Control, PC) pagal kiekvieną reakcijų mišinį turi pateikti C<sub>T</sub> reikšmę, esančią nustatytame diapazone, pateiktame 5 lentelėje. Tyrimų serija, kurios teigiamos kontrolinės medžiagos reikšmė nepatenka į šį diapazoną, rodo tyrimo nustatymo problemą, o tyrimų seriją reikia laikyti nepavykusia. Jei teigiamos kontrolinės medžiagos pateikta C<sub>T</sub> reikšmė patenka į diapazoną (FAM), bet vidinės kontrolinės medžiagos C<sub>T</sub> reikšmė (HEX) yra už diapazono 29,85–35,84 ribų, tęskite analizę.  
Pastaba. Mėginio duomenų naudoti negalima, jei neigiamos arba teigiamos kontrolinės medžiagos tyrimas nepavyksta.

**5 lentelė. Priimtinas tyrimų serijos kontrolinių medžiagų C<sub>T</sub> diapazonas**

<b>Reakcijos kontrolinė medžiaga</b>	<b>Tyrimas</b>	<b>Kanalas</b>	<b>C<sub>T</sub> diapazonas</b>
Teigiama kontrolinė medžiaga	Kontrolinė medžiaga	Green (FAM)	28,13–34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22–34,98
	Delecijos	Green (FAM)	28,90–34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97–34,81
Kontrolinė medžiaga be matricos	Visi keturi reakcijų mišiniai	Green (FAM)	≥ 40,00
	Visi keturi reakcijų mišiniai	Yellow (HEX)	29,85–35,84



14 pav. Tyrimo kontrolinės medžiagos analizės darbų eiga.

Jei abi tyrimų kontrolinės medžiagos tinkamos, kiekviena mėginio kontrolinio tyrimo  $C_T$  reikšmė turi patekti į 23,70–31,10 diapazoną žaliame (FAM) kanale (6 pav.).

6 lentelė. Priimtinas mėginio kontrolinės reakcijos  $FAM C_T$  diapazonas

Reakcijos mišinys	Kanalas	Priimtinas $C_T$ diapazonas
Kontrolinė medžiaga	Žalias (FAM)	23,70– 31,10

Toliau pateikiamos rekomendacijos, jei mėginio reikšmė nepatenka į šį diapazoną.



- **< 23,70 mėginio kontrolinio tyrimo C<sub>T</sub>:** mėginiai, kurių kontrolinės medžiagos C<sub>T</sub> reikšmė yra < 23,70, perkraus mutacijos tyrimus, todėl juos reikia atskiesti. Norėdami peržiūrėti kiekvieną nedidelio lygio mutaciją, per daug koncentruotus mėginius atskieskite taip, kad jų reikšmės patektų į anksčiau nurodytą diapazoną ir praskiedus per pusę C<sub>T</sub> padidėtų 1.
- **> 31,10 mėginio kontrolinio tyrimo C<sub>T</sub>:** mėginyje nepakankamas kiekis DNR analizei atlikti.

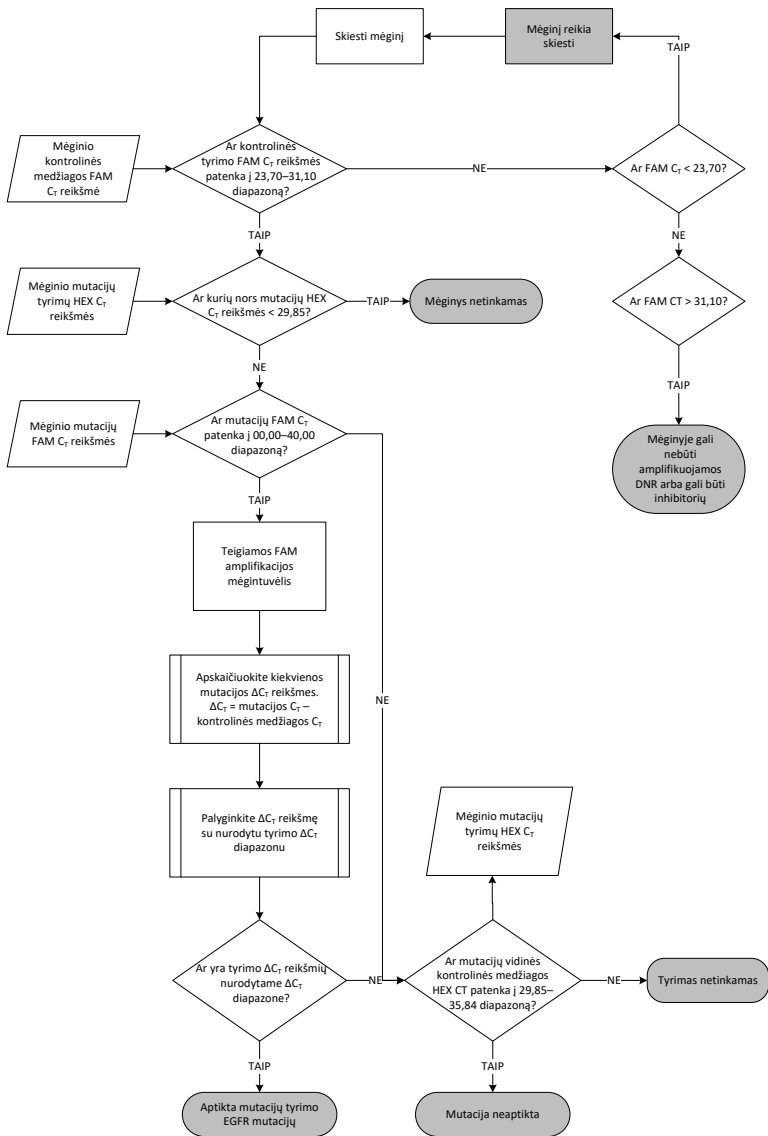
Jei abi tyrimo kontrolinės medžiagos yra tinkamos, o kontrolinio tyrimo reikšmės patenka į diapazoną, nurodytą 6 lentelėje, žaliame (FAM) kanale kiekviena mėginio mutacijos C<sub>T</sub> reikšmė turi patekti į diapazoną, nurodytą 7 lentelėje. Toliau pateikiamos rekomendacijos, jei mėginio reikšmė nepatenka į šį diapazoną.

**7 lentelė. Priimtinos mėginio mutacijų reakcijos reikšmės**

Reakcija	Reakcijos mišinys	Kanalas	C <sub>T</sub> diapazonas
Mutacijos reakcija	T790M	Green (FAM)	0,00–40,00
	Delecijos	Green (FAM)	0,00–40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00–40,00
	Visos trys mutacijos	Yellow (HEX)	29,85–35,84

**Pastaba.** Jei mėginys negeneruoja C<sub>T</sub> (t. y. C<sub>T</sub> > 40), tai gali būti dėl inhibitoriaus poveikio, tyrimo nustatymo klaidos arba nėra amplifikuojamos EGFR DNR.

- **Vidinės kontrolinės medžiagos C<sub>T</sub> reikšmė patenka į 29,85–35,84 diapazoną:** nėra amplifikuojamos EGFR DNR.
- **Vidinės kontrolinės medžiagos C<sub>T</sub> reikšmė nepatenka į 29,85–35,84 diapazoną:** tai gali rodyti tyrimo nustatymo klaidą arba inhibitoriaus buvimą. Įmanoma sumažinti inhibitoriaus efektą mėginį skiedžiant, tačiau tuomet praskiedžiama ir DNR.



15 pav. Mutacijų analizės schema.

## Mėginio mutacijų tyrimo FAM C<sub>T</sub> reikšmė

Vsų trijų mutacijų reakcijų mišinių FAM reikšmes reikia patikrinti pagal 8 lentelėje pateiktas reikšmes.

Toliau nurodytu būdu apskaičiuokite kiekvieno mutacijų mėginio, rodančio teigiamą amplifikaciją,  $\Delta C_T$  reikšmę ir įsitikinkite, kad mutacijos ir kontrolinės medžiagos C<sub>T</sub> reikšmės yra iš to paties mėginio.

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

Palyginkite mėginio  $\Delta C_T$  reikšmę su analizuojamo tyrimo kritinės ribos tašku (8 lentelė) ir įsitikinkite, kad kiekvienam tyrimui taikomas tinkamas kritinės ribos taškas.

**8 lentelė. Mutacijų tyrimo ribinės reikšmės**

Mutacijų tyrimas	$\Delta C_T$ ribinės reikšmės
T790M	≤ 7,40
Delecijos	≤ 8,00
L858R	≤ 8,90

Ribinės reikšmės taškas yra taškas, kurio signalas gali būti teigiamas dėl laukinio tipo DNR ARMS pradmens foninio signalo. Jei mėginio  $\Delta C_T$  reikšmė yra didesnė nei ribinės reikšmės taško reikšmė, jis klasifikuojamas kaip „mutation not detected“ (mutacija neaptikta) arba neaptinkamas naudojant šį rinkinį. Jei mėginio reikšmė yra ties ribinės reikšmės taško reikšme arba mažesnė už ją, mėginys klasifikuojamas kaip teigiamas ir turintis tokiu tyrimu aptinkamų mutacijų.

**Pastaba.** Mėginius, kuriuose nerodomas FAM mutacijos C<sub>T</sub>, reikia įvertinti atsižvelgiant į vidinės kontrolinės medžiagos (HEX) C<sub>T</sub> reikšmes, kad būtų galima nustatyti, ar mutacija neaptikta, ar tyrimas negalioja. Jei HEX C<sub>T</sub> reikšmė yra nuo 29,85 iki 35,84, vadinasi, mutacija neaptikta. Jei HEX C<sub>T</sub> reikšmė nepatenka į šį diapazoną, mėginys yra netinkamas.

---

Apibendrinant pagal toliau nurodytus kriterijus bus nustatyta visų mėginių kiekvienos reakcijos būseną: mutacija aptikta, mutacija neaptikta arba netinkama.

- **Mutacija aptikta:** FAM amplifikacija teigiama, o  $\Delta C_T$  reikšmė yra ties ribine reikšme arba mažesnė. Jei aptinkamos kelios mutacijos, visas galima įtraukti į ataskaitą.
- **Mutacija neaptikta:**
  - FAM amplifikacija teigiama,  $\Delta C_T$  reikšmė didesnė už ribinę reikšmę, o HEX (vidinės kontrolinės medžiagos) patenka į 29,85–35,84 diapazoną.
  - FAM amplifikacija neigiama, o HEX (vidinės kontrolinės medžiagos) patenka į 29,85–35,84 diapazoną.
- **Netinkama:** FAM amplifikacija neigiama, o HEX amplifikacija neatitinka specifikacijų.

# Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali būti naudingas šalinant atsiradusias triktis. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Dažniausiai užduodami klausimai“ (Frequently Asked Questions, FAQ) adresu [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGEN techninės priežiūros skyriuose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius klausimus, susijusius su šiame vadove ir protokoluose pateikta informacija, mėginiais ir tyrimų technologijomis (kontaktinę informaciją žr. galiniame viršelyje arba apsilankykite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Pastabos ir pasiūlymai

### Jokio signalo naudojant EGFR teigiamas kontrolines medžiagas (Positive Control, PC) fluorescenciniame kanale „Cycling Green“

- |   |  |
|---|--|
| a) PGR duomenų analizei pasirinktas fluorescencinis kanalas neatitinka protokolo.   | Atlikdami duomenų analizę pasirinkite fluorescencinį kanalą „Cycling Green“ analitinei EGFR PGR ir fluorescencinį kanalą „Cycling Yellow“ – vidinės kontrolinės medžiagos PGR. |
| b) Neteisingas „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento temperatūros profilio programavimas   | Palyginkite temperatūros profilį su protokolu ir, jei jis yra neteisingas, pakartokite tyrimų seriją.  |
| c) Neteisinga PGR konfigūracija   | Patikrinkite savo darbo veiksmus naudodami lašinimo pipete schemą ir, jei reikia, pakartokite PGR.   |
| d) Vieno ar kelių rinkinio komponentų laikymo sąlygos neatitiko nurodymų, pateiktų skyriuje „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (13 psl.) | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį.   |
| e) Baigėsi „ <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio tinkamumo laikas  | Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir tinkamumo laiką (žr. rinkinio etiketę) ir, jei reikia, naudokite naują rinkinį.   |

### Signalai naudojant neigiamas kontrolines medžiagas analitinės PGR fluorescenciniame kanale „Cycling Green“

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| PGR ruošimo metu atsirado tarša | Pakartokite PGR, naudodami naujus reagentus kartotiniaus tyrimais.<br>Jei galima, įdėję reikiamą bandyti mėginį, iš karto uždarykite PGR mėgintuvėlius.<br>Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami. |
|---------------------------------|---|

# Kokybės kontrolė

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

## Apribojimai

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

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

Analitinio patvirtinimo tyrimai naudojant žmogaus DNR mėginius, išskirtus iš plazmos mėginių.

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

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

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

---

Pradmenys EGFR delecijų reakcijos mišinyje sukurti taip, kad būtų gauta daugybė 19 egzono delecijų, apimančių nukleotidus nuo 55174772 iki 55174795 (GRCh38 chr7), kurių diapazonas yra 23 bp.

Nors 19 egzono delecijų tyrimas analitiškai patvirtintas ir įrodyta, kad juo nustatomos nurodytos 19 egzono delecijos (žr. šio vadovo 13 lentelę), papildomas mutacijas (įskaitant, bet tuo neapsiribojant, papildomas 19 egzono delecijas, 19 egzono įterpimus ir L747P mutacijas) galima amplifikuoti delecijų reakcijos mišiniu.

Jei tokios papildomos mutacijos bus aptiktos, paciento mėginio rezultatas bus „Deletions Detected“ (Aptiktos delecijos).

Be to, L858Q mutaciją galima aptikti naudojant L858R reakcijos mišinį. Todėl, jei paciento mėginyje bus aptikta L858Q mutacija, gali būti nustatytas rezultatas „L858R Mutation Detected“ (L858R mutacija aptikta).

# Eksploatacinių savybių charakteristikos

## Analitinis jautrumas – tuštumo riba (Limit of Blank, LOB)

Norint nustatyti „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio efektyvumą nesant matricos ir užtikrinti, kad tuščias mėginys arba mėginys su laukinio tipo DNR nesukuria analitinio signalo, kuris gali rodyti mažą mutacijos koncentraciją, buvo įvertinta NSCLC plazmos EGFR laukinio tipo DNR iš 59 skirtingų mėginių. Tyrimo priimtumo kriterijus (bent 95 % laukinio tipo mėginių  $\Delta C_T$  reikšmė turi būti didesnė už atitinkamą kritinę reikšmę) atitiko reikalavimą.

## Aptikimo riba (Limit of Detection, LOD)

LOD – tai mažiausia procentinė dalis mutacinės DNR, kurią galima aptikti laukinio tipo DNR fone, kai bendrame amplifikuotinos DNR kiekyje (patenkančiame į nustatytą įvesties diapazoną) mutacija buvo tinkamai aptinkama 95 % atvejų pagal kiekvieną mutacijų turintį mėginį (C95). Tyrimo DNR įvesties darbinis diapazonas apibrėžiamas iš anksto apibrėžtu kontrolinių  $C_T$  reikšmių 23,70–31,10 diapazonu.

„*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rinkinio LOD buvo nustatyta esant žemam DNR įvesties (kontrolinė  $C_T$  reikšmė – maždaug 30,10) lygiui naudojant DNR, išskirtą iš FFPE audinio. Šių EGFR mutacijų LOD buvo nustatyta naudojant tiek FFPE klinikinius bandinius, tiek FFPE ląstelių linijas esant žemam DNR įvesties lygiui.

LOD reikšmės, nustatytos naudojant FFPE audinį, buvo patikrintos naudojant „*therascreen* EGFR plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį ir DNR, išskirtą iš dirbtinių mutacijų turinčių plazmos mėginių.

Galutinės LOD reikšmės, išvardytos pateiktoje 9 lentelėje, rodo, kokia mutacijų procentinė dalis pateikė numatomą 95 % aptikimo tikimybę pagal kiekvieną mutaciją.



9 lentelė. Kiekvieno iš trijų EGFR mutacijų tyrimų LOD

Egzonas	Mutacija	COSMIC ID*	% LOD reikšmė
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	Delecijos	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 reikšmė, patikrinta plazmoje kaip „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio LOD patvirtinimo tyrimo dalis.

† Šios mutacijos nebuvo patvirtintos plazmoje.

## Analitinis jautrumas – $\Delta C_T$ ribinės reikšmės

Nustatant ribines tyrimo reikšmes klaidingai teigiamų rodiklių atžvilgiu buvo taikomas rizika pagrįstas požiūris ir formuojant ribines reikšmes kaip vienas komponentų buvo naudojamos apskaičiuotos LOB reikšmės. Atitinkamos kiekvienos mutacijos tyrimo, naudojant „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį,  $\Delta C_T$  ribinės reikšmės pateiktos 10 lentelėje.

10 lentelė. „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio  $\Delta C_T$  ribinės reikšmės

Mutacijų tyrimas	$\Delta C_T$ ribinės reikšmės
T790M	$\leq 7,40$
Delecija	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$

## Pasikartojamumas ir atkartojamumas

Pasikartojamumas ir atkartojamumas buvo įvertintas tiriant  $3 \times \text{LOD}$  mutacijų lygio mėginius laukinio tipo genominės DNR fone 3 laboratorijose naudojant kelių partijų rinkinius. Tyrimą atliko keli operatoriai, tyrimų serijos buvo atliekamos kelias dienas, tiriant po 2 kiekvieno mėginio pakartojimus. Visų 3 mutacijų tyrimų 100 % mutacinės DNR mėginių nustatyti kaip turintys mutacijų. Laukinio tipo mėginiai visuose tyrimuose, atliktuose visose laboratorijose, buvo neigiamos mutacijos.

## DNR įvesties poveikis $C_T$ reikšmėms

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

---

Bendrai  $\Delta C_T$  reikšmės, išmatuotos esant skirtingiems visos DNR įvesties lygiams, darbiname „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio diapazone buvo nuoseklios.

## Trukdančios medžiagos

### Endogeninės trukdančios medžiagos

Galimai trukdančių medžiagų buvo pridėta į  $3 \times \text{LOD}$  dirbtinius mutacijų turinčius plazmos mėginius. Tada mėginiai buvo iširti naudojant „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį. Mėginiai, kuriuose buvo galimai trukdančių medžiagų, buvo palyginti su  $3 \times \text{LOD}$  dirbtiniais mutacijų turinčiais plazmos mėginiais, kuriuose trukdančių medžiagų nebuvo. Kiekviena trukdanti medžiaga iširta naudojant 4 pakartojimus.

Galimu trukdymu laikytas  $> 2 \times$  standartinių nuokrypių (Standard Deviation, SD) (paimtų iš tikslumo tyrimų) skirtumas tarp „tyrimo“ ir „kontrolinės“ medžiagos (t. y. medžiagos be trukdančių medžiagų)  $\Delta C_T$ . Šiais atvejais pateikiamas pastebėtas  $\Delta C_T$  skirtumas.

11 lentelėje nurodytos tyrimo koncentracijos buvo pasirinktos remiantis CLSI dokumente EP07-A2 pateikiamomis rekomendacijomis. Šios koncentracijos atspindi maksimalią klinikiniame mėginyje aptinkamą koncentraciją.

**Pastaba.** Šių endogeninių junginių buvo pridėta į dirbtinius mutacijų turinčius mėginius, kuriuose buvo sveikų donorų plazmos. Todėl šių nežinomos koncentracijos endogeninių junginių galėjo natūraliai būti mėginiuose, prieš papildomai jų pridedant. Kiekvienos iširtos galimai trukdančios endogeninės medžiagos galutinė koncentracija galėjo būti didesnė nei tyrimo koncentracija.

### 11 lentelė. Galimai trukdančios endogeninės medžiagos

Galimai trukdančios medžiagos (Interfering Substance, IS)	Tyrimo koncentracija
Nekonjuguotas bilirubinas	150 mg/dl
Hemoglobinas (žmogaus)	0,2 g/dl
Trigliceridai	3 g/dl

### T790M tyrimas

Toliau pateikti endogeniniai junginiai, esant 11 lentelėje nurodytoms koncentracijoms, turėjo  $> 2 \times SD$  poveikį ( $0,40 \Delta C_T$ ) T790M tyrimo efektyvumui.

- Trigliceridai,  $1,37 \Delta C_T$  skirtumas

### Delecijų tyrimas

Toliau pateikti endogeniniai junginiai, esant 11 lentelėje nurodytoms koncentracijoms, turėjo  $> 2 \times SD$  poveikį ( $0,71 \Delta C_T$ ) delecijų tyrimo efektyvumui.

- Hemoglobinas,  $0,80 \Delta C_T$  skirtumas

### L858R tyrimas

Toliau pateikti endogeniniai junginiai, esant 11 lentelėje nurodytoms koncentracijoms, turėjo  $> 2 \times SD$  poveikį ( $0,56 \Delta C_T$ ) L858R tyrimo efektyvumui.

- Bilirubinas,  $1,13 \Delta C_T$  skirtumas
- Trigliceridai,  $1,53 \Delta C_T$  skirtumas

## Egzogeninės trukdančios medžiagos

Galimai trukdančių medžiagų buvo pridėta į  $3 \times \text{LOD}$  dirbtinius mutacijų turinčius plazmos mėginius. Tada mėginiai buvo iširti naudojant „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį. Mėginiai, kuriuose buvo galimai trukdančių medžiagų, buvo palyginti su  $3 \times \text{LOD}$  dirbtiniais mutacijų turinčiais plazmos mėginiais, kuriuose trukdančių medžiagų nebuvo. Kiekviena trukdanti medžiaga iširta naudojant 4 pakartojimus.

Galimu trukdymu laikytas  $> 2 \times$  standartinių nuokrypių (paimtų iš tikslumo tyrimų) skirtumas tarp „tyrimo“  $\Delta C_T$  ir „kontrolinės medžiagos“ (t. y. medžiagos be trukdančių medžiagų)  $\Delta C_T$ . Šiais atvejais pateikiamas pastebėtas  $\Delta C_T$  skirtumas.

12 lentelėje nurodytos tyrimo koncentracijos buvo pasirinktos remiantis CLSI dokumente EP07-A2 pateiktomis rekomendacijomis. Visais atvejais jos viršija terapinę koncentraciją.

**12 lentelė. Galimai trukdančios endogeninės medžiagos**

Galimai trukdančios medžiagos (Interfering Substance, IS)	Tyrimo koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )
Citalopramo hidrobromidas	0,75
Paroksetino hidrochlorido hemihidratas	1,14
Sertralino hidrochloridas	0,67
Fluoksetino hidrochloridas	3,87
Acetaminofenas	200,7
$\text{K}_2$ EDTA	3600

## T790M tyrimas

Toliau pateikti egzogeniniai junginiai, esant 12 lentelėje nurodytoms koncentracijoms, turėjo  $> 2 \times \text{SD}$  poveikį ( $0,40 \Delta C_T$ ) T790M tyrimo efektyvumui.

- Citalopramo hidrobromidas, 0,52  $\Delta C_T$  skirtumas
- Sertralino hidrochloridas, 0,47  $\Delta C_T$  skirtumas
- Fluoksetino hidrochloridas, 0,48  $\Delta C_T$  skirtumas

### **Delecijų tyrimas**

Toliau pateikti egzogeniniai junginiai, esant 12 lentelėje nurodytoms koncentracijoms, turėjo  $> 2 \times SD$  poveikį (0,71  $\Delta C_T$ ) delecijų tyrimo efektyvumui.

- Fluoksetinas, 0,73  $\Delta C_T$  skirtumas

### **L858R tyrimas**

Toliau pateikti egzogeniniai junginiai, esant 12 lentelėje nurodytoms koncentracijoms, turėjo  $> 2 \times SD$  poveikį (0,56  $\Delta C_T$ ) L858R tyrimo efektyvumui.

- Citalopramo hidrobromidas, 0,72  $\Delta C_T$  skirtumas
- Paroksetino hidrochlorido hemihidratas, 0,92  $\Delta C_T$  skirtumas
- Sertralino hidrochloridas, 0,82  $\Delta C_T$  skirtumas
- Fluoksetino hidrochloridas, 0,98  $\Delta C_T$  skirtumas
- Acetaminofenas, 0,81  $\Delta C_T$  skirtumas
- K<sub>2</sub> EDTA, 0,57  $\Delta C_T$  skirtumas

---

## Klinikinis efektyvumas

NCT01203917 klinikinis tyrimas buvo IV etapo atviras vienos grupės tyrimas, atliekamas norint ištirti pirminei terapijai skirto gefitinibo efektyvumą ir saugumą / toleravimą taikant baltaodžiams pacientams, sergantiems IIIA/B/IV stadijos EGFR mutacijų turinčiu NSCLC.

Pacientų tinkamumas įtraukti į NCT01203917 klinikinį tyrimą buvo nustatomas remiantis EGFR jautrių mutacijų buvimu. NSCLC pacientų EGFR mutacijų būseną buvo įvertinta atliekant klinikinį tyrimą (Clinical Trial Assay, CTA) ir naudojant DNR iš tinkamų audinių ir plazmos mėginių. Tyrimo tikslas buvo iš anksto suplanuotas biomarkerių ištyrimas norint nustatyti, ar galima naudoti plazmos mėginius tiriant mutacijas, jei nėra audinių mėginių. Palyginus tinkamų audinių ir plazmos mėginius, gautas didelis atitikimo rodiklis – 94,3 %, esant tyrimo 99,8 % specifiškumui ir 65,7 % jautrumui.

Plazmos bandinių, gautų iš NCT01203917 klinikiniame tyrime tirtų pacientų, retrospektyvus tyrimas buvo atliktas naudojant „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinį. Buvo atliktas papildomas tyrimas norint įvertinti „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio ir CTA, naudoto atrenkant pacientus NCT01203917 klinikiniam tyrimui, atitikimą. Buvo įrodytas CTA ir „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio lygiavertiškumas.

---

## Literatūra

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















## Kontaktinė informacija

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



# Simboliai

Ant pakuotės ir etikečių gali būti pateikti šie simboliai:

Simolis	Simolio apibrėžimas
 $\Sigma$ <N>	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti
	Tinka naudoti iki
	„In vitro“ diagnostikos medicinos prietaisas
	Katalogo numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris
	Komponentai
	Sudėtyje yra
	Numeris
	Visuotinis prekės numeris
	Temperatūros apribojimai
	Gamintojas
	Žr. naudojimo instrukcijas
	Dėmesio

## A priedas. Informacija apie mutacijas

13 lentelėje rodomi COSMIC ID, paimti iš „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“ (Somatinių vėžio mutacijų katalogo) ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

**13 lentelė. Mutacijų ir COSMIC ID sąrašas**

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

# Užsakymo informacija

Gaminys	Turinys	Kat. nr.
<b>„therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ – skirtas EGFR geno mutacijoms nustatyti</b>		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	24 reakcijoms: 1 kontrolinis tyrimas, 3 mutacijų tyrimai, teigiama kontrolinė medžiaga, Taq DNR polimerazė	870311
<b>„Rotor-Gene Q MDx“ ir priedai</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	„Real-time PCR“ ciklą valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu) ir HRM kanalu, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai (1-metų garantija dalims, darbui, neįskaitant įrengimo ir mokymo)	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	„Real-time PCR“ ciklą valdiklis ir didelės skiriamosios gebos lydumo analizatorius su 5 kanalais (žaliu, geltonu, oranžiniu, raudonu, tamsiai raudonu), taip pat HRM kanalas, nešiojamasis kompiuteris, programinė įranga, priedai, 1 metų garantija dalims ir darbui, diegimas ir mokymas	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aliuminio blokas neautomatiniam reakcijos nustatymui su vieno kanalo pipete 72 x 0,1 ml mėgintuvėliuose	9018901

<b>Gaminys</b>	<b>Turinys</b>	<b>Kat. nr.</b>
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelių, skirtų 1000 reakcijų	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangteliai 10 000 reakcijų	981106
<b>Susiję produktai</b>		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	50 paruošimų: „QIAampMini“ kolonėlės, mėgintuvėlių plėtikliai (20 ml), „QIAGEN Proteinase K“, Carrier RNA, buferiniai tirpalai, „VacConnectors“ jungtys ir Collection Tubes (1.5 ir 2 ml)	55114

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų gaminių garantinių įsipareigojimų ribojimą pateikta atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinių vadovai arba naudotojo vadovai pasiekiami svetainėje [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) arba galite jų paprašyti QIAGEN techninės priežiūros skyriaus ar vietinio platintojo.

# Dokumento peržiūrų istorija

Dokumentas	Keitimai
R2, 2018 m. balandžio mėn.	<p>Atnaujintas „Sample to Insight“ šūkis</p> <p>Skyriuje „Reagentų laikymas ir naudojimas“ ir 1 lentelėje pateiktas nustatymo ir laikymo temperatūros paaiškinimas</p> <p>15 pav. Laukelis „Ar FAM C<sub>T</sub> &lt; 31,10?“ pakeistas į „Ar FAM C<sub>T</sub> &gt; 31,10?“ ir atlikti nedideli teksto pataisymai.</p> <p>Skyrius „Ivesties DNR koncentracijos poveikis“ pašalintas ir pakeistas nauju skyriumi „DNR įvesties poveikis <math>\Delta C_T</math> reikšmėms“.</p> <p>11 lentelė. Ištirto hemoglobino (žmogaus) koncentracijos korekcija nuo 2 g/dl iki 0,2 g/dl.</p> <p>Visame tekste atlikti nedideli pataisymai.</p>
R3, 2019 m. sausio mėn.	<p>Pridėtas įgaliotasis atstovas (priekinis viršelis). Atnaujintas skyrius „Simboliai“.</p>
R4, 2019 spalio mėn.	<p>Pakeistas teisėtas gamintojas (viršelis)</p> <p>Instrumento pavadinimas pakeistas iš „Rotor-Gene Q MDx“ į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“, kad jis atitiktų ant instrumento etiketės nurodytą pavadinimą</p> <p>Pataisytos reagentų laikymo instrukcijos nurodant, kad juos galima laikyti ne 90 dienų, o 12 mėnesių arba iki tinkamumo naudoti datos</p> <p>Skyrius „Apribojimai“ papildytas informacija apie 19 egzono delecijų tyrimą ir L858R tyrimą.</p> <p>Peržiūrėta 9 lentelė ir kartotinio tyrimo 21 L858R egzonas pakeistas 19 egzono delecijomis</p> <p>EC + REP simbolis pašalintas iš viršelio ir skyriaus „Simboliai“</p>

#### „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio ribotosios licencijos sutartis

1. Naudodamas šį gaminį pirkęjas ar naudotojas sutinka su šiomis sąlygomis.
2. Gaminį galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo gaminį, šiuo vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, kuriuos galima rasti **www.qiagen.com**. QIAGEN naudotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
3. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
4. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
5. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
6. Rinkinio pirkęjas ir naudotojas sutinka nesiminti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti čia nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencijos sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencijos sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Atnaujintas licencijos sąlygas rasite **www.qiagen.com**.

Prekių ženklai: QIAGEN<sup>®</sup>, „Sample to Insight<sup>®</sup>“, „QIAamp<sup>®</sup>“, „*therascreen*<sup>®</sup>“, „Rotor-Gene<sup>®</sup>“, „Scorpions<sup>®</sup>“ (QIAGEN Group); FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup> („Thermo Fisher Scientific Inc.“); IRESSA<sup>®</sup> („AstraZeneca Group“). Šiame dokumente vartojami registruotieji pavadinimai, prekių ženklai ir kt., net jei jie specialiai nepažymėti, negali būti laikomi nesaugomais įstatymų.

1119189 10-2019 HB-1898-005 © 2019 QIAGEN, visos teisės saugomos.

