



Юни 2022 г.

# Инструкции за употреба на *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plasma RGQ PCR Kit



24

Версия 1

**IVD**

За *in vitro* диагностика

За употреба с апаратите Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

**CE**

**REF**

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

R6 **MAT**

1127512BG



# Съдържание

Предвидена употреба .....	5
Кратко изложение и обяснение .....	6
Принципи на процедурата .....	7
Формат на набора .....	7
Анализи .....	8
Контроли.....	9
Предоставени материали .....	10
Съдържание на набора .....	10
Необходими, но непредоставени материали .....	11
Предупреждения и предпазни мерки .....	12
Информация за безопасността.....	12
Общи предпазни мерки.....	12
Съхранение и боравене с реактиви .....	14
Съхранение и работа с проби .....	16
Процедура .....	17
Протокол: Откриване на EGFR мутации.....	18
Протокол: Настройка на Rotor-Gene Q EGFR.....	23
Анализ на данните от оценка на мутация .....	29
Ръководство за отстраняване на проблеми .....	37
Контрол на качеството .....	39
Ограничения .....	39
Работни характеристики .....	41

Аналитична чувствителност – граница на празна проба (Limit of Blank, LOB) ....	41
Граница на откриване (Limit of Detection, LoD).....	41
Аналитична чувствителност – гранични стойности на $\Delta C_T$ и граничен диапазон на $\Delta C_T$ .....	43
Повторяемост и възпроизводимост .....	43
Ефект на входящата ДНК върху стойностите на $C_T$ .....	43
Интерфериращи вещества .....	44
Клинични работни характеристики .....	49
Литературни източници .....	50
Информация за контакт .....	51
Символи .....	52
Приложение А: Детайли за мутация .....	54
Информация за поръчки .....	55
Хронология на редакциите на документа .....	57

## Предвидена употреба

Наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit представлява *in vitro* диагностичен тест за откриване на делеции на екзон 19, замествания на екзон 20 и 21 (съответно T790M и L858R) в гена за рецептора на епидермалния растежен фактор (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), и предоставя качествена оценка на състоянието на мутация. Резултатите имат за цел да са в помощ на клинициста при идентифициране на пациенти с NSCLC, които могат да имат полза от лечението с IRESSA® (гефитиниб), когато не може да бъде направена оценка на клетъчна аликвотна част.

Наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit трябва да се използва от обучен персонал в професионална лабораторна среда с ДНК аликвотни части, извлечени от кръвта на пациенти с недребноклетъчен рак на белия дроб (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit е предназначен за *in vitro* диагностика.

## Кратко изложение и обяснение

Наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit е готов за употреба набор за откриване на мутации в свързания с рак ген EGFR чрез използване на полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR) в апарати Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Чрез използване на технологиите Scorpions® и ARMS наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit дава възможност за откриване на следните мутации на EGFR гена на фон от див тип геномна ДНК.

- Делеции в екзон 19
- T790M
- L858R

Използваните методи са високо селективни и в зависимост от наличната ДНК дават възможност за откриване на нисък процент на мутации във фон от див тип геномна ДНК. Границите на селективността и откриването надвишават тези при технологии като секвениране чрез цветови терминатор.

# Принципи на процедурата

Наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit използва две технологии – ARMS и Scorpions – за откриване на мутации по време на real-time PCR.

## ARMS

Специфична за алел или за мутация амплификация се постига чрез използване на ARMS (Amplification Refractory Mutation System). Taq ДНК полимеразата (Taq) е ефективна за разграничаване на съвпадение и несъвпадение в 3' края на PCR праймер. Специфични мутирани последователности се амплифицират селективно, дори и в алиquotни части, в които по-голямата част от последователностите не носят мутацията. Когато праймерът е с пълно съвпадение, амплификацията продължава с пълна ефективност. Когато 3' базата е с несъвпадение, се осъществява само амплификация с ниско ниво на фона.

## Scorpions

Откриването на амплификация се извършва чрез използване на Scorpions. Scorpions са бифункционални молекули, които съдържат PCR праймер, свързан ковалентно към образец. Флуорофорът в този образец взаимодейства с гасител, който също е включен в образца, което намалява флуоресценцията. По време на PCR, когато образецът се свърже към ампликона, флуорофорът и гасителят се разделят. Това води до увеличение на флуоресценцията от реакционната епруветка.

## Формат на набора

В набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit са предоставени четири анализа:

- Един контролен анализ (Ctrl)
- Три анализа за мутации

Всички реакционни смеси съдържат реактиви за откриване на цели, които са с етикет FAM™, и анализ за вътрешна контрола, с етикет HEX™. Анализът за вътрешна контрола може да открива наличието на инхибитори, което може да доведе до фалшиво отрицателни резултати. FAM амплификацията може да конкурира амплификацията за вътрешна контрола и целта на вътрешната контрола е просто да покаже, че там, където няма FAM амплификация, резултатът е действително отрицателен, а не неуспешна PCR реакция.

## Анализи

### Контролен анализ

Контролният анализ, означен с FAM, се използва за оценка на общата ДНК в аликвотна част. Този анализ амплифицира участък от екзон 2 от гена EGFR. Праймерът и образецът са проектирани да избягват всички познати EGFR полиморфизми.

### Анализи за мутации

Всеки анализ за мутации съдържа означен с FAM Scorpion образец и праймер ARMS за разграничаване между див тип ДНК и специфична мутантна ДНК.



## Контроли

Всички експериментални цикли трябва да съдържат следните контроли:

### Положителна контрола

Всеки цикъл трябва да съдържа положителна контрола в епруветки 1 – 4. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit съдържа EGFR положителна контрола (Positive Control, PC), която трябва да се използва като еталон в реакцията за положителен контрол. Резултатите от положителния контрол се оценяват, за да се гарантира, че наборът действа в рамките на посочените критерии за допустимост.

### Отрицателна контрола

Всеки цикъл трябва да съдържа отрицателна контрола (контрола без еталон (No-Template Control, NTC)) в епруветки 9 – 12. NTC се състои от вода без нуклеаза (H<sub>2</sub>O), която трябва да бъде използвана като „еталон“ за контрола без еталон. Контролът без еталон се използва за оценяване на всяко потенциално замърсяване по време на настройката на цикъла и за оценка на работните показатели на реакцията за вътрешна контрола.

### Оценка на реакцията за вътрешна контрола

Всяка реакционна смес съдържа вътрешна контрола в допълнение към целевата реакция. Неизпълнението указва, че или са налице инхибитори, което може да доведе до фалшиво отрицателни резултати, или че за тази епруветка е възникнала грешка на оператора при настройката.

Ако неизпълнението на вътрешната контрола се дължи на инхибиране на PCR, разреждането на алиquotната част може да намали ефекта на инхибиторите, но следва да бъде отбелязано, че това също ще разрежи и прицелената ДНК. FAM амплификацията може да конкурира амплификацията за вътрешна контрола, така че генерираната IC CT (HEX) стойност може да попадне извън посочения диапазон. Резултатите от FAM продължават да са валидни за тези алиquotна част.

# Предоставени материали

## Съдържание на набора

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Каталожен №			870311
Брой реакции			24
Червен	Control Reaction Mix (Контролна реакционна смес)	Ctrl	2 × 600 µl
Лилав	T790M Reaction Mix (Реакционна смес T790M)	T790M	600 µl
Оранжев	Deletions Reaction Mix (Реакционна смес за делеции)	Del	600 µl
Розов	L858R Reaction Mix (Реакционна смес L858R)	L858R	600 µl
Бежов	EGFR Positive Control (Положителна контрола EGFR)	PC	300 µl
Ментов	<i>Taq</i> DNA Polymerase ( <i>Taq</i> ДНК полимераза)	<i>Taq</i>	2 × 80 µl
Бял	Nuclease-Free Water for No Template Control (Вода без нуклеаза за контрол без еталон)	NTC (Контрола без шаблон)	1 x 1,9 ml
Бял	Nuclease-Free Water for Dilution (Вода без нуклеаза за разреждане)	Dil	1 x 1,9 ml
Инструкции (ръководство) за употреба на <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			1

## Необходими, но непредоставени материали

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS), предлагани от доставчика на продукта.

- Набор за екстракция на ДНК (вижте „Процедура“ на страница 17)
- Специализирани пипети\* (регулируеми) за приготвяне на аликвотна част
- Специализирани пипети\* (регулируеми) за приготвяне на главна PCR смес
- Специализирани пипети\* (регулируеми) за накапване на матрична ДНК
- Накрайници за пипети без съдържание на DNase, RNase и ДНК с филтри (за предотвратяване на кръстосано замърсяване препоръчваме накрайници за пипети с аерозолни бариери)
- Водна баня или подобно устройство, което може да задържи епруветки за центрофугиране от 50 ml при 60 °C.
- Нагревателен блок или подобно устройство, което може да инкубира при 56 °C†
- Натрошен лед
- Настолна центрофуга\* с ротор за реакционни епруветки от 2 ml
- Вихров смесител
- Апарат Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\*† с флуоресцентни канали за Cycling Green и Cycling Yellow (откриване съответно на FAM и HEX)
- Софтуер на Rotor-Gene Q, версия 2.3.5 или по-нова
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, за използване със 72-well rotor (каталожен № 981103 или 981106)
- Епруветки за микроцентрофуга без съдържание на DNase, RNase и ДНК за приготвяне на главни смеси
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, алуминиев блок за ръчна настройка на реакцията с едноканална пипета (QIAGEN, кат. № 9018901)

\* Апаратите задължително трябва да се проверяват и калибрират по препоръките на производителя.

† В някои държави, ако е приложимо, може да се използва апаратът Rotor-Gene Q 5plex HRM с дата на производство от май 2011 г. нататък. Датата на производство може да се разбере от серийния номер на гърба на апарата. Серийният номер е във формат „mmуnnn“, където „mm“ указва месеца на производство с цифри, „уу“ указва последните две цифри от годината на производство, а „nnn“ указва уникалния идентификатор на апарата.

# Предупреждения и предпазни мерки

За in vitro диагностика

За професионална употреба

## Информация за безопасността

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Тези листове можете да намерите онлайн в удобен и компактен PDF формат на [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.

## Общи предпазни мерки

Потребителят трябва винаги да обръща особено внимание на следното:

- Използвайте накрайници за пипети без съдържание на DNase, RNase и ДНК с филтри и се уверете, че пипетите са калибрирани в съответствие с инструкциите на производителя.
- Съхранявайте и извличайте положителни материали (проби и положителни контроли) отделно от всички други реактиви ги прибавяйте към реакционната смес в пространствено обособено съоръжение.
- Размразете добре всички компоненти при стайна температура (15 – 25 °C), преди да започнете анализа.
- При размразяване смесете компонентите чрез обръщане на всяка епруветка 10 пъти и центрофугирайте за кратко.

**Забележка:** Прилагайте повишено внимание, за да предотвратите замърсяване на PCR със синтетичен контролен материал. Препоръчваме използването на отделни специализирани пипети за съставяне на реакционните смеси и добавяне на ДНК еталон. Приготвянето и накапването на реакционни смеси трябва да се извършва в зона, отделена от зоната, която се използва за добавянето на еталон. Епруветките Rotor-Gene Q не трябва да се отварят след приключването на цикъла PCR. Това е с цел предотвратяване на лабораторно замърсяване с продукти след PCR.

**Забележка:** Реактивите са валидирани за ръчно съставяне. Ако се използва автоматизиран метод, той може да намали броя на вероятните реакции вследствие на реактивите, необходими за запълване на „мъртвите обеми“ на тези апарати.

**Забележка:** Всички реактиви в набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit са формулирани специално за използване с посочените тестове. Всички реактиви, доставени с набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, са предназначени да бъдат използвани единствено с останалите реактиви в същия набор *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Не трябва да се правят замествания на реактивите в набора, ако трябва да се поддържат оптималните работни показатели.

**Забележка:** Използвайте само предоставената в набора *Taq* ДНК полимераза (*Taq*). Не замествайте с *Taq* ДНК полимераза от други набори от същия или друг вид, нито с *Taq* ДНК полимераза от друг доставчик.

**Забележка:** Реактивите за набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit са оптимално разреждени. Не препоръчваме допълнително разреждане на реактивите, тъй като това може да доведе до загуба на производителност. Не препоръчваме използването на по-ниски от 25 µl реакционни обеми, тъй като това ще увеличи риска от фалшиво отрицателни резултати.

## Съхранение и боравене с реактиви

*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit се транспортира в сух лед. Ако някой от компонентите на набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit не е замразен при пристигане, ако външната опаковка е била отворена по време на транспортиране или ако пратката не съдържа опаковъчен лист, инструкции за употреба или реактивите, моля, свържете се с някой от отделите за техническо обслужване на QIAGEN или с местните дистрибутори (посетете [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit трябва да се съхрани веднага след получаване при  $-30$  до  $-15$  °C във фризер с постоянна температура и защитен от светлина. Когато се съхранява при посочените условия на съхранение, наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit е стабилен до посочената дата на изтичане срока на годност.

След отваряне реактивите могат да се съхраняват в оригиналната им опаковка при  $-30$  до  $-15$  °C в продължение на 12 месеца или до изтичане срока на годност, в зависимост от това кое настъпва първо. Многократното размразяване и замразяване трябва да се избягва. Не превишавайте максималния брой от осем цикъла на замразяване и размразяване.

Реактивите трябва да се размразяват при околна температура в продължение на минимум 1 час и максимум 4,5 часа. След като реактивите са готови за употреба, могат да бъдат настроени PCR реакциите и епруветките Rotor-Gene Q, които съдържат главните смеси и ДНК аликвотната част, трябва да се заредят веднага в Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Общото време от началото на настройката на PCR до началото на цикъла не трябва да надвишава:

- 6 часа, ако се съхранява при температура на околната среда  
**Забележка:** Това време включва както настройката на PCR, така и съхранението.
- 18 часа, ако се съхранява в хладилник ( $2 - 8$  °C)  
**Забележка:** Това време включва както настройката на PCR, така и съхранението.

**Забележка:** Scorpions (както при всички флуоресцентно маркирани молекули) в реактивите на реакционната смес са светлочувствителни. Предпазвайте контролните реактиви и реактивите на реакционната смес от светлина, за да избегнете фотоизбелване.

Реактивите в набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit са оптимално разредени и не е необходимо допълнително пречистване или обработка преди използването им в анализ, както е указано в *Инструкциите за употреба (Ръководството) на therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit*.

Трябва да се проверяват датите на изтичане на сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани на опаковката и етикетите на всички компоненти. Не използвайте компоненти, които не са били съхранявани правилно или са с изтекъл срок на годност.

## Съхранение и работа с проби

**Забележка:** С всички алиquotни части трябва да се работи като с потенциално инфекциозен материал.

Материалът в алиquotната част трябва да е човешка геномна ДНК, извлечена от плазма. Пробите трябва да се транспортират в съответствие със стандартната методология на патологията, за да се гарантира качество на пробите.



# Процедура

## Извличане на ДНК

Работните характеристики за този набор са генерирани чрез използване на ДНК, извлечена с набора QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (кат. № 55114). При използване на набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit изпълнете извличането на ДНК съгласно инструкциите в ръководството, като имате предвид следното:

- Началният обем плазма е 2 ml.
- Преди извличане на ДНК, 2 ml плазма трябва да се центрофугират с 3000 об./мин в продължение на 2 минути и супернатантът да се прехвърли в чиста епруветка.
- Обемът на протеиназа К трябва да е 250 µl.
- Разтварянето на протеиназа К трябва да се извършва в продължение на 1 час при 60 °C.
- Пречистената геномна ДНК трябва да се елуира в 55 µl Buffer AVE (предоставен в набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Съхранявайте пречистената геномна ДНК при -30 до -15 °C.

**Забележка:** Всички анализи в набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit генерират къси PCR продукти. Наборът *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit обаче няма да работи със силно фрагментирана ДНК.

# Протокол: Откриване на EGFR мутации

## Важни моменти преди започване

- За да се получат точни резултати, се уверете, че описаната процедура на смесване се извършва при всяка стъпка на смесване в процеса на настройване на анализа.
- На всеки цикъл могат да се анализират до 16 аликвотни части.
- Преди започване на процедурата прочетете „Общи предпазни мерки“ на страница 12.
- Отделете време да се запознаете с Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, преди да започнете протокола. Прочетете ръководството за потребителя на апарата.
- Не разбърквайте *Taq* ДНК полимеразата (*Taq*) или смеси, които съдържат *Taq* ДНК полимераза, тъй като това може да деактивира ензима.
- Пипетирайте *Taq*, като поставите накрайника на пипетата под повърхността на течността, за да предотвратите покриване на върха с излишно количество ензим.
- За всяка ДНК аликвотна част контролните анализи и анализите за мутации трябва да се анализират в един и същи PCR цикъл, за да се избегнат отклонения между отделните цикли.
- За ефективно използване на реактивите в *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit обработвайте на партиди ДНК аликвотните части, доколкото е възможно, за да се създадат пълни цикли. При тестването на аликвотни части поотделно или в по-малък брой се използват повече реактиви и се намалява общият брой аликвотни части, които могат да бъдат тествани с един *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Какво трябва да се направи преди да започнете

- Преди всяка употреба всички реактиви трябва да се размразят изцяло в продължение на минимум 1 час и максимум 4,5 часа при стайна температура (15 – 25 °C), да се смесят чрез обръщане 10 пъти и да се центрофугират за кратко за събиране на съдържанието в дъното на епруветката.

- Уверете се, че *Taq* е при стайна температура (15 – 25 °C) преди всяка употреба. Центрофугирайте епруветката за кратко, за да съберете ензима на дъното на епруветката.
- Смесете всички аликвотни части, като ги обърнете 10 пъти и центрофугирайте за кратко, за да се събере съдържанието на дъното на епруветката.

## Процедура

1. Размразете напълно всички реакционни смеси, водата без съдържание на нуклеаза за контролата без еталон (No Template Control, NTC) и EGFR положителната контрола (Positive Control, PC) при стайна температура (15 – 25 °C) в продължение на минимум 1 час (таблица 1). Когато реактивите се размразят, смесете ги чрез 10-кратно обръщане на всяка епруветка, за да избегнете локализираните концентрации на соли, след което центрофугирайте за кратко, за да съберете съдържанието на дъното на епруветката.

**Таблица 1. Времена за размразяване, времена за настройка на PCR и температури на съхранение**

Минимално време за размразяване	Максимално време за размразяване	Температура на съхранение след настройка на PCR	Максимално време на настройка на PCR и съхранение
1 час	4,5 часа	Температура на околната среда (15 – 25°C)	6 часа
1 час	4,5 часа	2 – 8 °C	18 часа

**Забележка:** Настройката на PCR трябва да се извърши при температура на околната среда. Терминът „съхранение“ се отнася до времето между завършването на настройката на PCR и началото на PCR цикъла в Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

**Забележка:** Темпераируйте *Taq* ДНК полимеразата (епруветка *Taq*) до околната температура (15 – 25 °C) едновременно с другите реактиви (вижте „Съхранение и боравене с реактиви“ на страница 14). Центрофугирайте епруветката за кратко, за да съберете ензима на дъното на епруветката.

2. Изпълнете следните стъпки:

- 2a. Етикетирайте четири микроцентрифужни епруветки (не са предоставени) в съответствие с всяка съответна реакционна смес, показана в таблица 2.
- 2b. Подгответе достатъчно главни смеси (контролна смес или реакционна смес за мутация [епруветка CTRL, T790M, делеции, L858R], заедно с *Taq* ДНК полимеразата [*Taq*]) за ДНК алиquotните части, една реакция за EGFR положителен контрол (епруветка PC) и една вода без съдържание на нуклеаза за реакция за контрол без еталон (епруветка NTC) съгласно обемите в таблица 2.

**Забележка:** Включете реактиви за една допълнителна алиquotна част, за да осигурите достатъчно излишък за настройката на PCR.

Главните смеси съдържат всички компоненти, необходими за PCR, освен алиquotната част.

**Таблица 2. Получаване на главни смеси\***

Анализ	Епруветка с реакционна смес	Обем на реакционната смес	Обем на <i>Taq</i> ДНК полимеразата (епруветка <i>Taq</i> )
Контрола	CTRL	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)
T790M	T790M	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)
Делеции	Del	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)
L858R	L858R	19,50 µl x (n+1)	0,50 µl x (n+1)

\* Когато пригответе главната смес, пригответе достатъчно за една допълнителна алиquotна част, за да осигурите достатъчно излишък за настройката на PCR.

**Забележка:** Когато пригответе главната смес, необходимият обем от контролната реакционна смес или реакционната смес за мутация най-напред се добавя към съответната епруветка, а *Taq* ДНК полимеразата се добавя последна.

3. Поставете подходящ брой PCR 4-лентови епруветки (всяка лента има 4 епруветки) в зареждащия блок според конфигурацията в таблица 3. Не затваряйте епруветките с капачка.

**Забележка:** Оставете капачките в пластмасовия контейнер до момента, в който са необходими.

4. Затворете с капачка епруветката за главната смес и обърнете 10 пъти, за да смесите главната смес, последвано от кратко центрофугиране, за да гарантирате, че сместа е на дъното на епруветката. Веднага добавете 20 µl главна смес към всяка подходяща PCR епруветка за лента.
5. Веднага добавете 5 µl вода без съдържание на нуклеаза (H<sub>2</sub>O) към PCR епруветките за лента за контрола без образец (PCR епруветки с номера 9 – 12) и затворете с капачка епруветките.
6. Добавете 5 µl от всяка аликвотна част към епруветките за аликвотна част (PCR епруветки 5 – 8, 13 – 16 и 17 – 72) и затворете с капачка епруветките.
7. Добавете 5 µl EGFR положителна контрола (Positive Control, PC) към епруветките за положителна контрола (PCR епруветки с номера 1 – 4). Всяка ДНК аликвотна част трябва да бъде тествана с контролните анализи и всички анализи за мутации. Конфигурацията е показана в таблица 3.

**Таблица 3. Конфигурация на контролните анализи и анализите за мутации**

Анализ	Контроли		Номер на аликвотната част						
	PC	NTC (Контрола без шаблон)	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
Делеции	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
Номер на аликвотната част									
Анализ	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
Делеции	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. Като използвате перманентен маркер, надпишете капаците на първите епруветки в най-ниското числово положение във всяка PCR 4-лентова епруветка (напр. позиции 1, 5, 9 и т.н.), за да покажете ориентацията за зареждане на епруветките в 72-ямковия ротор на Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Обърнете затворените с капачка епруветки 4 пъти, за да се смесят аликвотната част и реакционната смес.
10. Поставете всички PCR 4-лентови епруветки в подходящите позиции в 72-ямковия ротор и направете визуална проверка дали всички епруветки съдържат еднакъв обем.

**Забележка:** Уверете се, че лентите на епруветките не са обърнати при прехвърлянето им в ротора.

11. Ако роторът не е пълен, запълнете останалите места с празни епруветки, затворени с капачка.
12. Веднага поставете ротора в Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Уверете се, че фиксиращият пръстен (принадлежност на Rotor-Gene Q MDx) е поставен върху ротора, за да обезопаси епруветките по време на цикъла.
13. Вижте настройката на Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (вижте „Протокол: Настройка на Rotor-Gene Q EGFR“ на страница 23) за създаване на температурния профил и стартиране на цикъла.

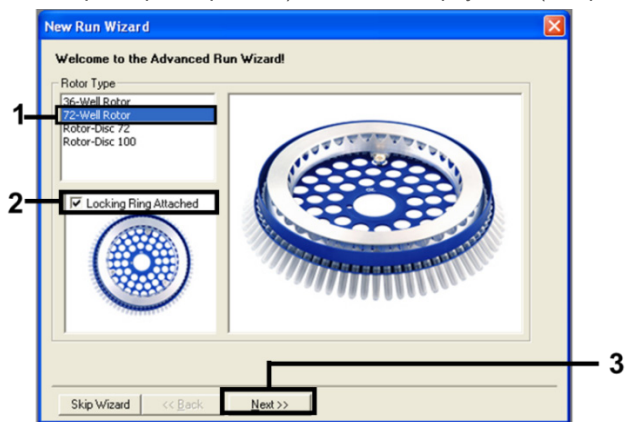
# Протокол: Настройка на Rotor-Gene Q EGFR

Параметрите за циклизиране са показани в таблица 4.

Таблица 4. Параметри за циклизиране

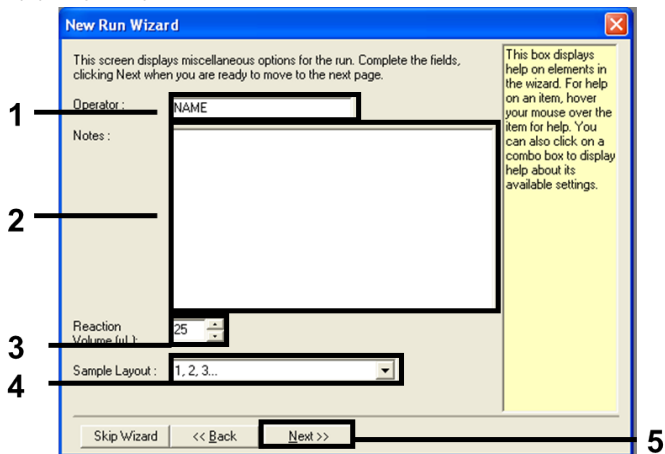
Цикли	Температура	Време	Събиране на данни
1	95 °C	15 минути	Няма
40	95 °C	30 секунди	Няма
	60 °C	60 секунди	Green и Yellow

1. Кликнете два пъти върху иконката на софтуера Rotor-Gene Q Series Software 2.3 на работния плот на лаптопа, свързан към Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Изберете раздела „Advanced“ (Разширени) в диалоговия прозорец „New Run“ (Нов цикъл), който се показва.
2. За да създадете нов еталон, изберете **Empty Run** (Празен цикъл), след което кликнете върху **New** (Създаване).  
Показва се прозорецът „New Run Wizard“ (Съветник за нов цикъл).
3. За вида на ротора изберете **72-Well Rotor** (72-ямков ротор). Потвърдете, че фиксиращият пръстен е поставен и поставете отметка в прозореца **Locking Ring Attached** (Поставен фиксиращ пръстен). Кликнете върху Next (Напред) (фигура 1).



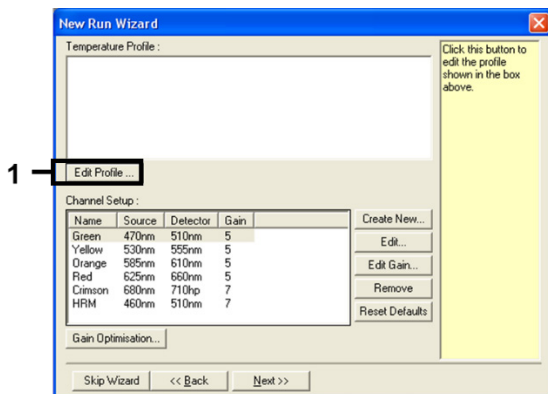
Фигура 1. Диалоговият прозорец „New Run Wizard“ (Съветник за ново изпълнение).

4. Въведете името на оператора в полето **Operator** (Оператор). Добавете евентуални бележки и настройте стойността в полето **Reaction Volume** (Реакционен обем) на **25**. Уверете се, че стойностите в полето **Sample Layout** (Конфигурация на аликвотната част) са настроени като **1, 2, 3...** Кликнете върху **Next** (Напред) (фигура 2).



Фигура 2. Въвеждане на име на оператор и реакционни обеми.

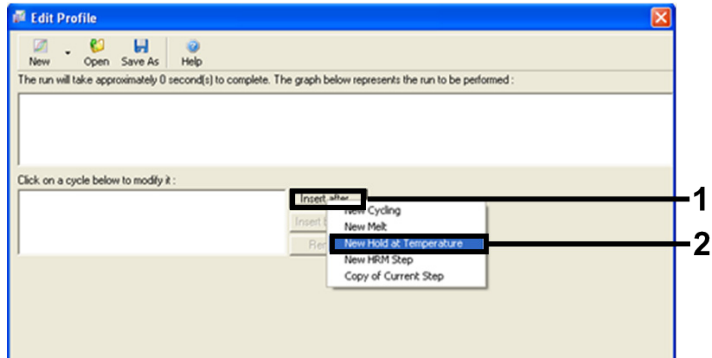
5. Кликнете върху **Edit Profile** (Редактиране на профила) в диалоговия прозорец „New Run Wizard“ (Съветник за нов цикъл) (фигура 3) и задайте параметрите на цикъла съгласно следващите стъпки.



Фигура 3. Промяна на профила.

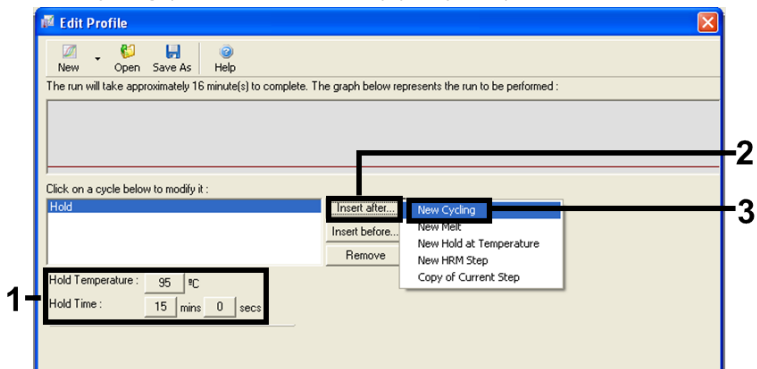


6. Кликнете върху **Insert after** (Вмъкване след) и изберете **New Hold at Temperature** (Ново задържане при температура) (фигура 4).



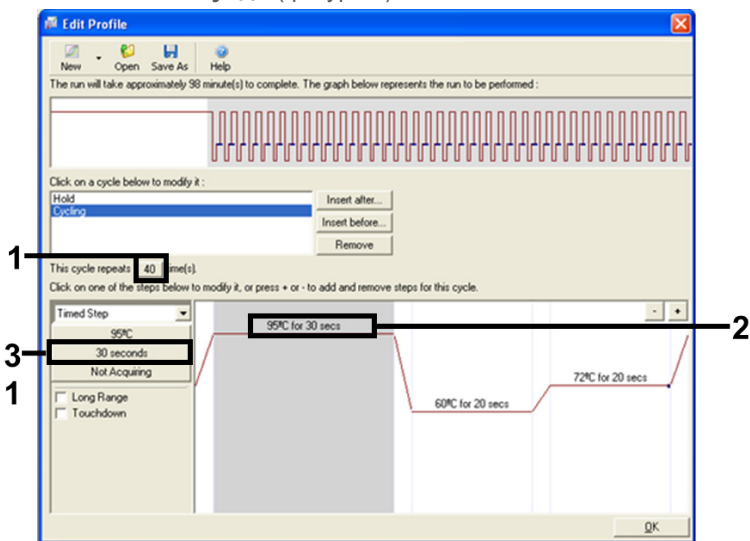
Фигура 4. Вмъкване на първоначална стъпка на инкубиране.

7. Задайте стойността в полето **Hold Temperature** (Температура на задържане) на **95 °C** и стойността в **Hold Time** (Време на задържане) на **15 mins 0 secs** (15 минути 0 секунди). Кликнете върху **Insert After** (Вмъкване след), след което изберете **New Cycling** (Ново циклизиране) (фигура 5).



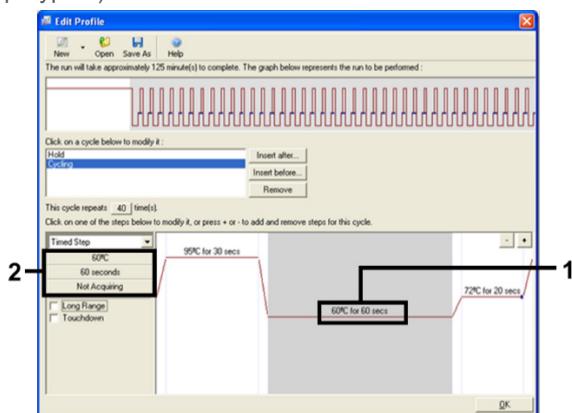
Фигура 5. Първоначална стъпка на инкубиране при 95 °C.

8. Променете броя на повторенията на цикъла на **40**. Изберете първата стъпка и задайте на **95 °C за 30 секунди** (фигура 6).



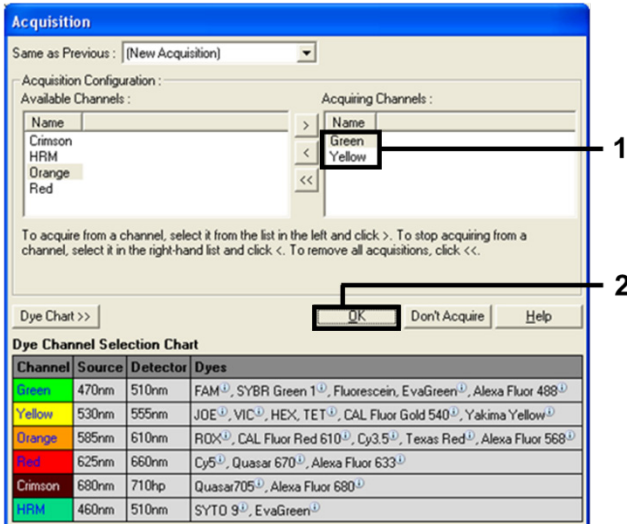
Фигура 6. Стъпка на циклизиране при 95 °C.

9. Маркирайте втората стъпка и настройте на 60 °C за 60 секунди. Кликнете върху **Not Acquiring** (Без събиране), за да активирате събирането на данни по времена тази стъпка. (фигура 7)



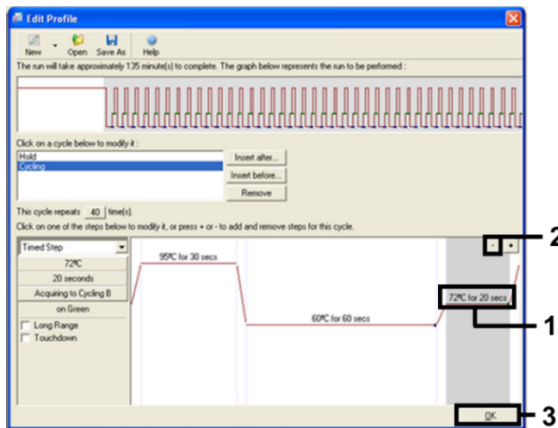
Фигура 7. Стъпка на циклизиране при 60 °C.

10. Изберете **Green** and **Yellow** от списъка **Available Channels** (Налични канали), след това кликнете **>**, за да ги прехвърлите в списъка с **Acquiring Channels** (Канали за събиране). Кликнете върху **OK** (фигура 8).



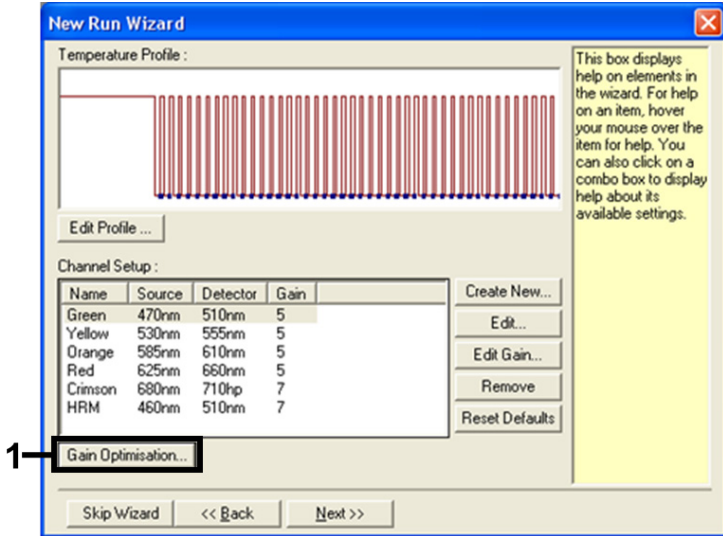
Фигура 8. Събиране в стъпка на циклизиране при 60 °C.

11. Маркирайте третата стъпка и кликнете върху бутона -, за да я изтриете. Кликнете върху **OK** (фигура 9).



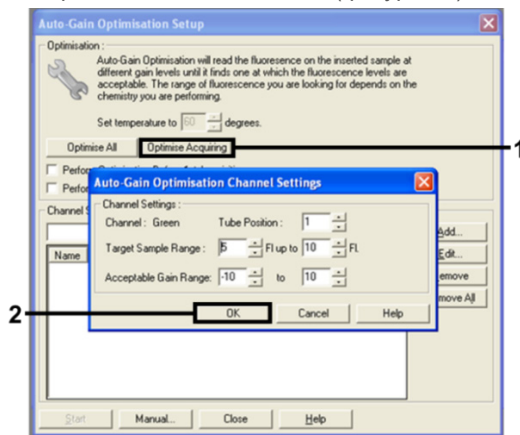
Фигура 9. Премахване на разширяващата стъпка.

12. В следващия диалогов прозорец кликнете върху **Gain Optimisation** (Оптимизиране на усилването) (фигура 10).



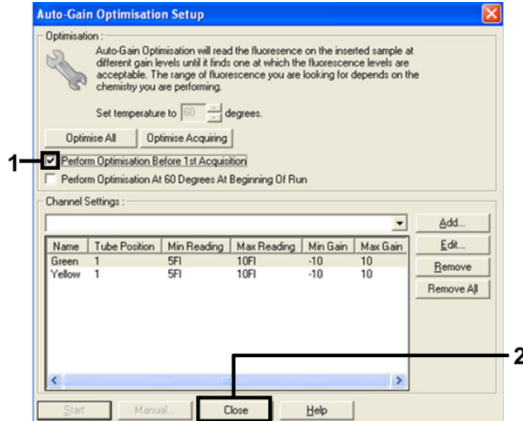
Фигура 10. Оптимизиране на усилването.

13. Кликнете върху **Optimise Acquiring** (Оптимизиране на събирането). Настройките на каналите се показват за всеки канал. Кликнете върху **OK**, за да изберете тези стойности по подразбиране и за двата канала. (фигура 11).



Фигура 11. Оптимизиране на автоматичното усилване за канала Green (Зелен).

14. Поставете отметка в прозореца **Perform Optimisation before 1st Acquisition** (Извършване на оптимизация преди 1-вото събиране), след което кликнете върху **Close** (Затваряне), за да се върнете в съветника (фигура 12).



Фигура 12. Избор на каналите Green и Yellow.

15. Кликнете върху **Next** (Напред), за да запазите еталона на подходящо място, като изберете „**Save Template**“ (Запазване на еталона).

## Анализ на данните от оценка на мутация

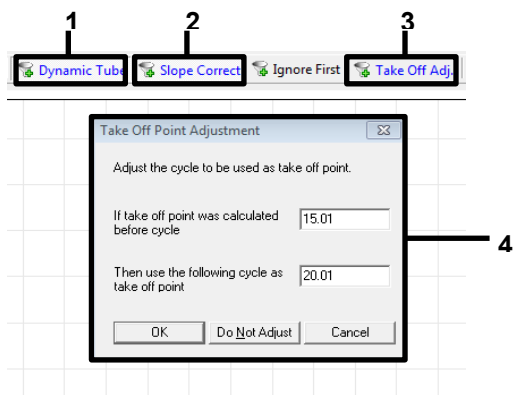
След завършване на цикъла анализирайте данните, като използвате следната процедура.

### Настройване на софтуерния анализ

1. Отворете подходящия файл с помощта на софтуера Rotor-Gene Q Series версия 2.3.5 или по-нова.
2. Ако алиquotните части не са наименувани преди извършването на цикъла, кликнете върху **Edit Samples** (Редактиране на алиquotни части).
3. Въведете имената на алиquotните части в колоната **Name** (Име).

**Забележка:** Не попълвайте имената на празните ямки, ако има такива.

4. Кликнете върху **Analysis** (Анализ). На страницата за анализ кликнете върху **Cycling A Yellow** за проверка на канала HEX.
5. Проверете дали е маркирана опцията **Dynamic Tube** (Динамична епруветка). Кликнете върху **Slope Correct** (Коригиране на наклона) и **Linear scale** (Линеен мащаб).
6. Кликнете върху **Take Off Adj** (Настройка на стартирането) и въведете **15.01** (15,01) и **20.01** (20,01), както е показано на фигура 13.



**Фигура 13. Настройки за нормализиране на EGFR анализ.** 1 = „Dynamic Tube“ (динамична епруветка), 2 = „Slope Correct“ (корекция на наклона), 3 = „Take Off Adj“ (настройка на стартиране), 4 = диалогов прозорец „Take Off Adj“ (настройка на стартиране) със стойности на параметрите.

7. Задайте гранична стойност **0.02** (0,02) и проверете стойностите на HEX Ст.
8. На страницата за анализ кликнете върху **Cycling A, Green**, за да видите канала FAM. Задайте параметрите, както във фигура 13 по-горе.  
Динамичната епруветка трябва да е маркирана.
9. Кликнете върху **Slope Correct** (Коригиране на наклона) и **Linear scale** (Линеен мащаб).
10. Задайте граничната стойност на **0.075** (0,075) и проверете стойностите на FAM Ст.

## Извършване на контролен анализ

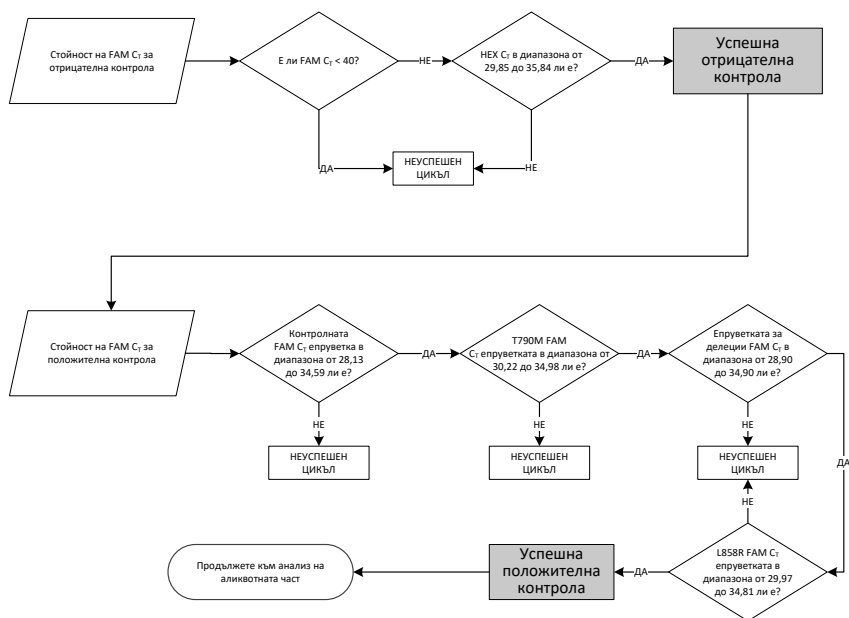
След като цикълът е завършен, анализирайте данните, както следва.

- **Отрицателна контрола:** За да гарантирате, че не е налице замърсяване на еталона, NTC не трябва да генерира  $C_T$  стойност в зеления (FAM) канал под 40. За да гарантирате, че цикълът е правилно настроен, NTC трябва да проявява амплификация от 29,85 до 35,84 в жълтия (HEX) канал (вътрешна контрола). Ако има положителна амплификация в зеления канал и/или амплификацията е извън диапазона от 29,85 до 35,84 в жълтия канал, цикълът е невалиден.
- **Положителна контрола:** Положителната контрола EGFR (Positive Control, PC) трябва да даде  $C_T$  за всяка реакционна смес в рамките на и включително посочения диапазон в таблица 5. Цикъл със стойност на положителната контрола извън този диапазон указва проблем с настройката на анализа и цикълът трябва да се означава като неуспешен. Ако положителната контрола даде  $C_T$  в рамките на диапазона (FAM), но вътрешна контрола  $C_T$  (HEX) извън диапазона от 29,85 до 35,84, продължете с анализа.

**Забележка:** Данните от аликвотната част не трябва да се използват, ако положителната или отрицателната контрола са неуспешни.

Таблица 5. Допустим  $C_T$  диапазон за контролите на цикъла

Реакционна контрола	Анализ	Канал	Диапазон на $C_T$
Положителна контрола	Контрола	Green (FAM)	28,13 – 34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22 – 34,98
	Делеции	Green (FAM)	28,90 – 34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97 – 34,81
Контрола без еталон	Всички четири реакционни смеси	Green (FAM)	$\geq 40,00$
	Всички четири реакционни смеси	Yellow (HEX)	29,85 – 35,84



**Фигура 14. Работен процес за анализ на контролата на цикъла.**

Ако и двете контроли на цикъла са валидни, всяка СТ стойност от контролен анализ на аликвотната част трябва да е в рамките на диапазон от 23,70 до 31,10 в зеления (FAM) канал (таблица 6).

**Таблица 6. Допустим FAM Ct диапазон за контролна реакция на аликвотната част**

Реакционна смес	Канал	Допустим диапазон на Ct
Контрола	Green (FAM)	23,70 – 31,10

Ако аликвотната част е извън този диапазон, се предоставят следните указания.



- Контролен анализ на аликвотната част **C<sub>T</sub> < 23,70**: Проби с контролна C<sub>T</sub> < 23,70 ще претоварят анализите за мутация и трябва да бъдат разреждени. За откриване на всяка мутация с ниско ниво свърхконцентрираните аликвотни части трябва да се разреждат, за да попаднат в рамките на горепосочения диапазон, въз основа на това, че разреждането наполовина ще увеличи C<sub>T</sub> с 1.
- Контролен анализ на аликвотна част **C<sub>T</sub> > 31,10**: Аликвотната част не съдържа достатъчно ДНК, за да позволи анализ.

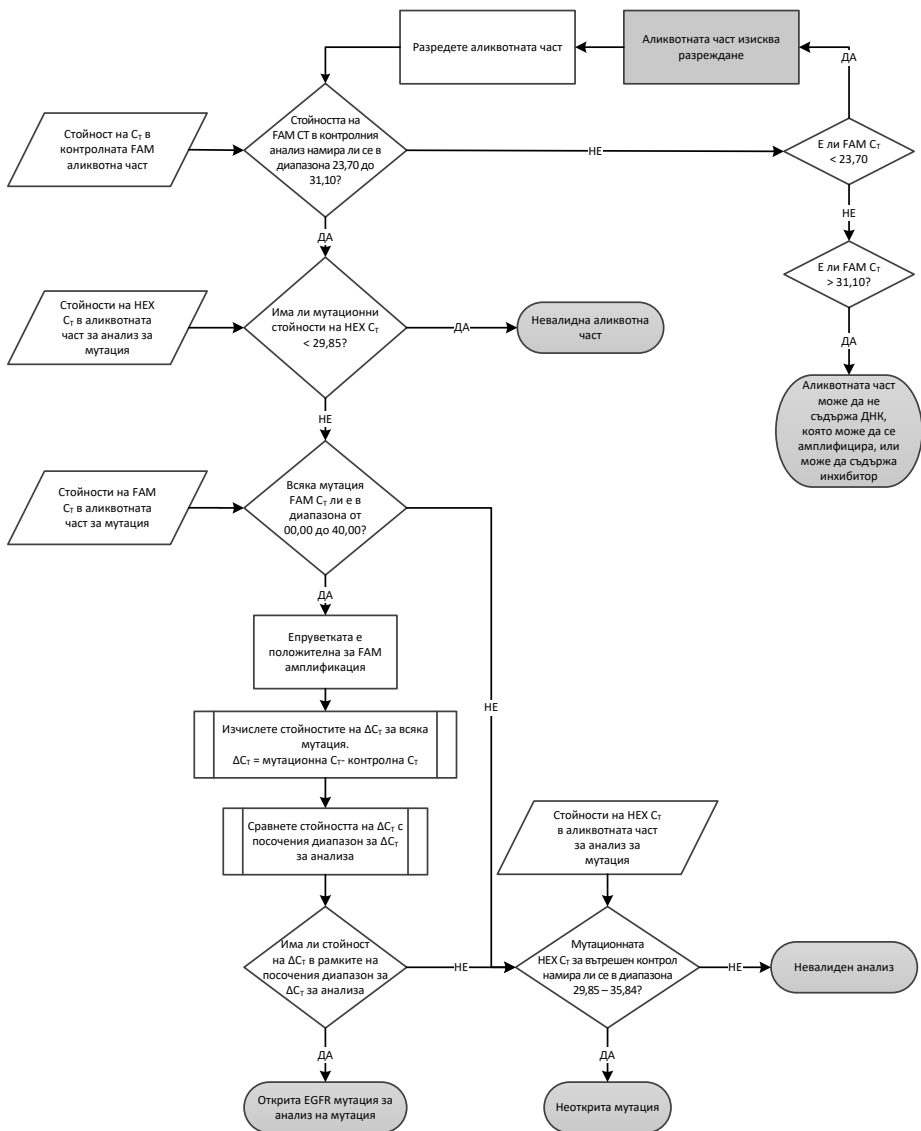
Ако и двете контроли на цикъл са валидни и контролният анализ е в диапазона, посочен в таблица 6, всяка стойност C<sub>T</sub> за мутация на аликвотната част трябва да е в диапазона, който е даден подробно в таблица 7 в зеления (FAM) канал. Ако аликвотната част е извън този диапазон, се предоставят следните указания.

**Таблица 7. Допустими стойности за реакция за мутация на аликвотната част**

Реакция	Реакционна смес	Канал	Диапазон на C <sub>T</sub>
Реакция за мутация	T790M	Green (FAM)	0,00 – 40,00
	Делеции	Green (FAM)	0,00 – 40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00 – 40,00
	Всички три мутации	Yellow (HEX)	29,85 – 35,84

**Забележка:** Ако аликвотната част не генерира C<sub>T</sub> (т.е. C<sub>T</sub> > 40), това може да се дължи на наличието на инхибитор, на грешка в настройката на анализа или на липсата на EGFR ДНК, която може да се амплифицира.

- Стойността C<sub>T</sub> на вътрешната контрола е в диапазона 29,85 – 35,84: Няма EGFR ДНК, която може да се амплифицира.
- Стойността C<sub>T</sub> на вътрешната контрола не е в рамките на диапазона 29,85 – 35,84: Това би могло да указва грешка в настройката на анализа или наличието на инхибитор. Ефектът на инхибитора може да се намали чрез разреждане на аликвотната част, макар че това ще разрежи също и ДНК.



Фигура 15. Диаграма на анализа за мутация.

## Стойност на FAM C<sub>T</sub> в аликвотната част за анализ за мутация

FAM стойностите за трите реакционни смеси за мутация трябва да се проверят спрямо стойностите, посочени в таблица 8.

Изчислете граничната стойност  $\Delta C_T$  за всяка аликвотна част за мутация, която проявява положителна амплификация, както следва, като се уверите, че мутационната и контролната C<sub>T</sub> са от една и съща аликвотна част.

$$\Delta C_T = \text{мутационна } C_T - \text{контролна } C_T$$

Сравнете стойността  $\Delta C_T$  за аликвотната част с граничния диапазон на  $\Delta C_T$  за въпросния анализ (таблица 8), като се уверите, че за всеки анализ се прилага правилната гранична точка.

**Таблица 8. Граничен диапазон на  $\Delta C_T$  за анализ на мутация**

Анализ за мутация	Граничен диапазон на $\Delta C_T$
T790M	-10,00 $\geq$ до $\leq$ 7,40
Делеции	-10,00 $\geq$ до $\leq$ 8,00
L858R	-10,00 $\geq$ до $\leq$ 8,90

Горната граница на граничния диапазон на  $\Delta C_T$  е точката, над която положителният сигнал потенциално би могъл да се дължи на фоновия сигнал на ARMS праймера върху див тип ДНК. Ако стойността  $\Delta C_T$  на аликвотната част е по-висока от горната граница на граничния диапазон на  $\Delta C_T$ , тя се класифицира като „Mutation not detected“ („Неоткрита мутация“) или извън границите на откриване на набора. Ако стойността на аликвотната част е в рамките на граничните точки за  $\Delta C_T$ , аликвотната част се счита положителна за мутация, открита чрез този анализ. Ако стойността на аликвотната част е под долната граница на граничния диапазон за  $\Delta C_T$ , това евентуално може да е вследствие на артефакт във флуоресцентното изображение.

**Забележка:** За аликвотни части, които нямат FAM мутационна  $C_t$ , е необходима оценка на стойността на  $C_t$  за вътрешната контрола (HEX), за да се определи дали мутацията не е открита или дали анализът е невалиден. Ако стойността HEX  $C_t$  е между 29,85 и 35,84, то мутацията не е открита. Ако граничната стойност HEX  $\Delta C_t$  е извън този диапазон, то аликвотната част е невалидна.

Обобщено, за всяка аликвотна част, на всяка реакция за мутация ще бъде дадено състояние на открита мутация, неоткрита мутация или невалидна чрез използване на следните критерии.

- **Открита мутация:** Положителна FAM амплификация и  $\Delta C_t$  са в рамките на граничния диапазон на  $\Delta C_t$ . Ако са открити няколко мутации, всичките могат да бъдат докладвани.
- **Неоткрита мутация:**
  - Положителна FAM амплификация и граничната стойност  $\Delta C_t$  е над граничния диапазон за  $\Delta C_t$ , а HEX (вътрешна контрола) е в рамките на 29,85 – 35,84.
  - Отрицателна FAM амплификация и HEX (вътрешна контрола) е в рамките на 29,85 – 35,84.
- **Невалиден:** Отрицателна FAM амплификация и HEX амплификация извън спецификациите.
  - Изчислената  $\Delta C_t$  е под граничния диапазон за  $\Delta C_t$  и HEX (вътрешна контрола) е в рамките на очаквания диапазон. Стойност на  $\Delta C_t$  под  $-10,00$  показва, че може да е възникнал артефакт във флуоресцентното изображение.

# Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте и страницата „Често задавани въпроси“ (Frequently Asked Questions, FAQ) в нашия Център за техническа поддръжка: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Учените в „Техническо обслужване“ на QIAGEN с готовност ще отговорят на всички Ваши въпроси – както за информацията и протоколите в този наръчник, така и за технологиите за аликвотни части и анализи (за информация за контакт вижте задната корица или посетете [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Коментари и предложения

### **Няма сигнал с EGFR положителна контрола (Positive Control, PC) във флуоресцентния канал Cycling Green**

- |   |   |
|---|---|
| a) Избраният флуоресцентен канал за анализ на данните от PCR не е в съответствие с протокола.   | За анализ на данните изберете флуоресцентния канал Cycling Green за аналитичната PCR за EGFR и флуоресцентния канал Cycling Yellow за PCR за вътрешната контрола.   |
| b) Неправилно програмиране на температурния профил на апарата Rotor Gene Q MDx 5plex HRM  | Сравнете температурния профил с протокола и ако е неправилен – повторете цикъла.  |
| c) Неправилно конфигуриране на PCR  | Проверете своите работни стъпки по схемата за пипетиране и повторете PCR, ако е необходимо.   |
| d) Условиата на съхранение за един или повече от компонентите на комплекта не съответстват на инструкциите в „Съхранение и боравене с реактиви“ (страница 14) | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на комплекта) на реактивите и използвайте нов комплект, ако е необходимо. |

## Коментари и предложения

---

- |  |   |
|--|---|
| е) Срокът на годност на <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit е изтекъл | Проверете условията на съхранение и датата на изтичане на срока на годност (вижте етикета на комплекта) на реактивите и използвайте нов комплект, ако е необходимо. |
|--|---|
- 

### Сигнали с отрицателните контроли във флуоресцентен и канал *Cycling Green* на аналитичната PCR

- |  |  |
|--|--|
| а) Настъпило замърсяване по време на приготвяне на PCR | Повторете PCR с нови реактиви на повторения. Ако е възможно, затваряйте епруветките за PCR незабавно след прибавянето на аликвотната част за тестване.<br><br>Задължително деконтаминирайте редовно работното място и апаратите. |
|--|--|
- 

### Пресичане на няколко граници или стойността на $\Delta Ct$ е под граничния диапазон

- |   |   |
|---|---|
| а) Неправилно смесване по време на настройката на анализа | Повторете PCR, ако това засяга контрола или повторете теста на неуспешната аликвотна част.<br><br>Спазвайте Инструкциите за употреба като обърнете специално внимание н стъпките на смесване. |
|---|---|

## Контрол на качеството

В съответствие със сертифицираната по ISO система за управление на качеството на QIAGEN всяка партида на набора *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* е тествана за предварително определени спецификации, за да се гарантира постоянно качество на продукта.

## Ограничения

Резултатите от продукта трябва да се интерпретират в контекста на всички съответстващи клинични и лабораторни открития и не трябва да се използват за диагностика самостоятелно.

Продуктът може да се използва само от персонал, който е специално инструктиран и обучен по процедурите за *in vitro* диагностика и за апарата Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Проучванията за аналитично валидиране включват човешка ДНК, извлечена от аликвотни части плазма.

Продуктът е предназначен само за използване в апарата за цикли *real-time* PCR на Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

За оптимални резултати е необходимо стриктно спазване на Ръководството за *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit*. Разреждането на реактиви, различно от описаното в това ръководство, не е препоръчително и ще доведе до загуба на производителност.

Трябва да се проверяват датите на изтичане на сроковете на годност и условията на съхранение, отпечатани на опаковката и етикетите на всички компоненти. Не използвайте компоненти, които не са били съхранявани правилно или са с изтекъл срок на годност.

Праймерите в реакционната смес за делеции EGFR са предназначени да се насочват към множество делеции на екзон 19, обхващащи нуклеотидите от 55174772 до 55174795 (GRCh38 chr7) – диапазон от 23 bp.

Анализът за делеции на екзон 19 е аналитично валидиран и е установено, че открива специфични делеции в екзон 19 (вижте таблица 13 в настоящото ръководство), но въпреки това е възможно реакционната смес за делеции да амплифицира допълнителни мутации (включително, но не само, допълнителни делеции на екзон 19, вмъквания на екзон 19 и мутация на L747P).

Ако има такива допълнителни мутации, те ще повишат резултата „Deletions Detected“ (Открити делеции) за дадена алиquotна част на пациента.

Освен това е възможно мутацията на L858Q да бъде открита от реакционната смес за L858R. Следователно, ако е налична в алиquotна част на пациента, мутацията на L858Q може да повиши резултата „L858R Mutation Detected“ (Открита мутация на L858R).



# Работни характеристики

## Аналитична чувствителност – граница на празна проба (Limit of Blank, LOB)

За оценка на производителността на набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit в отсъствието на еталон и за гарантиране, че празна алиquotна част или алиquotна част с див тип ДНК не генерира аналитичен сигнал, който може да указва ниска концентрация на мутация, EGFR див тип ДНК от NSCLC плазма е оценена от 59 различни алиquotни части. Критериите за допустимост на проучването (най-малко 95% от алиquotните части див тип трябва да имат стойност на  $\Delta C_t$  над съответната гранична стойност) са изпълнени.

## Граница на откриване (Limit of Detection, LoD)

LOD е минималният процент мутантна ДНК, който може да бъде открит във фон от див тип ДНК, когато общата ДНК, която може да бъде амплифицирана (в рамките на входящия обхват), води до получаване на правилни мутационни сигнали от 95% за всяка положителна за мутация алиquotна част (C95). Входящият ДНК работен диапазон за анализа е дефиниран чрез контролната  $C_t$  при предварително уточнения диапазон от 23,70 до 31,10.

LOD е определена при ниски входящи нива на ДНК (контролна  $C_t$  приблизително 30,10) чрез използване на ДНК, извлечена от FFPE тъкан за набора *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD е определена чрез използване и на двете FFPE клинични проби и FFPE клетъчни линии при ниски входящи нива на ДНК за тези EGFR мутации.

Установените чрез използване на FFPE тъкан стойности на LOD са потвърдени за набора *therascreen* EGFR Plasma RQG PCR Kit с ДНК, извлечена от изкуствени мутантни положителни алиquotни части от плазма.

Крайните твърдения за LOD, изброени в таблица 9 на следващата страница, указват процента мутация, който дава прогнозна вероятност за правилни сигнали от 95% за всяка от мутациите.

**Таблица 9. LOD за всеки от анализите за EGFR мутация**

Екзон	Мутация	ИН в COSMIC*	% LOD твърдение
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43 <sup>†</sup>
		12419	16,87 <sup>†</sup>
		12422	3,24 <sup>†</sup>
		6218	9,83 <sup>†</sup>
		6210	7,44 <sup>†</sup>
		6254	10,2*
		12370	8,1*
19	Делеции	12678	10,40 <sup>†</sup>
		12367	4,39 <sup>†</sup>
		12384	7,54 <sup>†</sup>
		6225	6,5*
		6220	2,7*
		6255	0,81*
		12382	1,45*
		12383	4,58*
		12387	4,91 <sup>†</sup>
21	L858R	6224	5,94*

\* Твърденията за LOD са проверени в плазма като част от проучването за потвърждаване на LOD за набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

<sup>†</sup> Тези мутации не са потвърдени в плазма.

## Аналитична чувствителност – гранични стойности на $\Delta C_T$ и граничен диапазон на $\Delta C_T$

При настройка на граничните стойности на анализа спрямо фалшиво положителните стойности е предприет подход, базиран на риска, а оценените LOB стойности са използвани като един компонент при разработката на граничните стойности.

Съответните гранични диапазони на  $\Delta C_T$  за всеки мутационен анализ в набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit са дадени в таблица 10.

Таблица 10. Гранични диапазони на  $\Delta C_T$  за набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Анализ за мутация	Граничен диапазон на $\Delta C_T$
T790M	$-10,00 \geq \text{до} \leq 7,40$
Делеция	$-10,00 \geq \text{до} \leq 8,00$
L858R	$-10,00 \geq \text{до} \leq 8,90$

## Повторяемост и възпроизводимост

Повторяемостта и възпроизводимостта са оценени чрез тестване на мутационното ниво при  $3xLOD$  във фон от див тип геномна ДНК на 3 места на тестване чрез използване на няколко партиди от набора, оператори и цикли в различни дни, с по 2 репликата за всяка аликвотна част. За всички 3 мутационни анализи 100% от мутантните ДНК аликвотни части са положителни за мутации. Дивият тип аликвотни части са отрицателни за мутации във всички анализи на всички места.

## Ефект на входящата ДНК върху стойностите на $C_T$

Входящото ниво на ДНК е дефинирано като общото количество EGFR ДНК, която може да се амплифицира, в аликвотната част, както е определено чрез стойностите на  $C_T$  от контролната реакция. За да се демонстрира, че производителността на набора

*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit е постоянна в диапазона на  $C_t$  за контролната реакция (23,70 – 31,10), всички 3 EGFR анализи за мутации са тествани спрямо серии на разреждане 1 към 3 с шест точки (ДНК, извлечена от клетъчни линии FFPE). Целевата  $C_t$  за първото разреждане за всяка мутация е приблизително 24,70. Крайното разреждане, което дава  $C_t$  от приблизително 32 – 33, е извън диапазона на  $C_t$  за контролната реакция. Като цяло граничните стойности на  $\Delta C_t$ , измерени за различни входящи нива на обща ДНК, са постоянни за работния диапазон на *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

## Интерфериращи вещества

### Ендогенни интерфериращи вещества

Потенциално интерфериращите вещества се поставят в 3xLOD изкуствени мутантни положителни аликвотни части от плазма. След това аликвотните части се тестват с набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Пробите, съдържащи потенциално интерфериращите вещества, се сравняват с 3xLOD изкуствени мутантни положителни аликвотни части от плазма, които не съдържат поставено интерфериращо вещество. Всяко интерфериращо вещество се тества с 4 репликата.

Разлика > 2x стандартни отклонения (Standard Deviation, SD) (взета от проучване на прецизността) между „тестовата“ и „контролната“  $\Delta C_t$  (т.е. без интерфериращо вещество) се счита за показателна за потенциална интерференция. В тези случаи е дадена наблюдаваната разлика в  $\Delta C_t$ .

Тестовите концентрации, дадени в таблица 11, са избрани на базата на насоките, предоставени в ръководството EP07-A2 на CLSI, и са представителни за максималните концентрации, които се очаква да бъдат наблюдавани в клинична аликвотна част.

**Забележка:** Тези ендогенни съединения се въвеждат в изкуствени мутантни положителни аликвотни части от плазма, които съдържат плазма от здрави донори. Следователно ендогенните съединения биха били естествено налични в аликвотните части с неизвестни концентрации преди въвеждането. Крайната концентрация на всяко тествано потенциално интерфериращо вещество вероятно би била по-висока от тестовата концентрация.

**Таблица 11. Потенциално интерфериращи ендогенни вещества**

<b>Потенциално интерфериращи вещества (Interfering Substance, IS)</b>	<b>Тестова концентрация</b>
Неконюгиран билирубин	15 mg/dl
Хемоглобин (човешки)	0,2 g/dl
Триглицериди	3 g/dl

## **Анализ T790M**

За следните ендогенни съединения при концентрациите, посочени в таблица 11, е доказано, че имат ефект  $> 2 \times \text{SD}$  ( $0,40 \Delta C_T$ ) върху производителността на анализа T790M:

- Триглицериди, разлика от  $1,37 \Delta C_T$

## **Анализ за делеции**

За следните ендогенни съединения при концентрациите, посочени в таблица 11, е доказано, че имат ефект  $> 2 \times \text{SD}$  ( $0,71 \Delta C_T$ ) върху производителността на анализа за делеции:

- Хемоглобин, разлика от  $0,80 \Delta C_T$

## Анализ L858R

За следните ендогенни съединения при концентрациите, посочени в таблица 11, е доказано, че имат ефект  $> 2 \times \text{SD}$  ( $0,56 \Delta \text{Ct}$ ) върху производителността на анализа L858R:

- Билирубин, разлика от  $1,13 \Delta \text{Ct}$
- Триглицериди, разлика от  $1,53 \Delta \text{Ct}$

## Екзогенни интерфериращи вещества

Потенциално интерфериращите вещества се поставят в  $3 \times \text{LOD}$  изкуствени мутантни положителни аликвотни части от плазма. След това аликвотните части се тестват с набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Пробите, съдържащи потенциално интерфериращите вещества, се сравняват с  $3 \times \text{LOD}$  изкуствени мутантни положителни аликвотни части от плазма, които не съдържат поставено интерфериращо вещество. Всяко интерфериращо вещество се тества с 4 репликата.

Разлика  $> 2 \times$  стандартни отклонения (взета от проучване на прецизността) между „тестовата“  $\Delta \text{Ct}$  и „контролната“  $\Delta \text{Ct}$  (т.е. без интерфериращо вещество) се счита за показателна за потенциална интерференция. В тези случаи е дадена наблюдаваната разлика в  $\Delta \text{Ct}$ .

Тестовите концентрации, дадени в таблица 12, са избрани на базата на насоките, предоставени в ръководството EP07-A2 на CLSI, и във всички случаи надвишават терапевтичната концентрация.

**Таблица 12. Потенциално интерфериращи ендогенни вещества**

<b>Потенциално интерфериращо вещество (Interfering Substance, IS)</b>	<b>Тестова концентрация (µg/ml)</b>
Циталопрам хидробромид	0,75
Пароксетин хидрохлорид хемихидрат	1,14
Сертралин хидрохлорид	0,67
Флуоксетин хидрохлорид	3,87
Ацетаминофен	200,7
K <sub>2</sub> EDTA	3600

### **Анализ T790M**

За следните екзогенни съединения при концентрациите, посочени в таблица 12, е доказано, че имат ефект  $> 2 \times \text{SD}$  (0,40  $\Delta C_T$ ) върху производителността на анализа T790M:

- Циталопрам хидробромид, разлика от 0,52  $\Delta C_T$
- Сертралин хидрохлорид, разлика от 0,47  $\Delta C_T$
- Флуоксетин хидрохлорид, разлика от 0,48  $\Delta C_T$

### **Анализ за делеции**

За следните екзогенни съединения при концентрациите, посочени в таблица 12, е доказано, че имат ефект  $> 2 \times \text{SD}$  (0,71  $\Delta C_T$ ) върху производителността на анализа за делеции:

- Флуоксетин, разлика от 0,73  $\Delta C_T$

## Анализ L858R

За следните екзогенни съединения при концентрациите, посочени в таблица 12, е доказано, че имат ефект  $> 2 \times \text{SD}$  ( $0,56 \Delta \text{Ct}$ ) върху производителността на анализа L858R:

- Циталопрам хидробромид, разлика от  $0,72 \Delta \text{Ct}$
- Пароксетин хидрохлорид хемихидрат, разлика от  $0,92 \Delta \text{Ct}$
- Сертралин хидрохлорид, разлика от  $0,82 \Delta \text{Ct}$
- Флуоксетин хидрохлорид, разлика от  $0,98 \Delta \text{Ct}$
- Ацетаминофен, разлика от  $0,81 \Delta \text{Ct}$
- $\text{K}_2$  EDTA, разлика от  $0,57 \Delta \text{Ct}$



## Клинични работни характеристики

Клиничното проучване NCT01203917 е отворено проучване с едно рамо във фаза IV за оценка на ефикасността и безопасността/поносимостта към гефитиниб първа линия при пациенти от европеидната раса с NSCLC в стадий IIIA/B/IV, положителен за EGFR мутация.

Допустимостта на пациентите за включване в клиничното проучване NCT01203917 е определена чрез наличието на сенсibiliзираци EGFR мутации. Състоянието на EGFR мутация при пациенти с NSCLC се оценява чрез използване на Анализ на клиничното проучване (Clinical Trial Assay, CTA) с ДНК от съответстваща тъкан и аликвотни части от плазма. Проучването включва предварително планирана проучвателна цел с биомаркер за установяване дали аликвотните части от плазма биха могли да се използват за анализ за мутации, ако няма налични тъканни аликвотни части. Резултатите показват висок процент на съответствие между съответстващата тъкан и аликвотните части от плазма 94,3% със специфичност на анализа 99,8% и чувствителност 65,7%.

Ретроспективното тестване на плазмени проби от пациенти, преминали скрининг за клиничното проучване NCT01203917, се извършва чрез използване на набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Провежда се свързващо проучване за оценка на съответствието на набора *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit със CTA, използвано за избор на пациенти за клиничното проучване NCT01203917. Демонстрирана е еквивалентност между CTA и *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

## Литературни източници













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

## Информация за контакт

За техническа помощ и повече информация вижте нашия Център за техническа поддръжка на [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), позвънете на телефон 00800-22-44-6000 или се свържете с един от отделите за техническа поддръжка на QIAGEN или с местен дистрибутор (вижте задната корица или посетете [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Символи

Следните символи може да фигурират в инструкциите за употреба или на опаковката и етикетите:

Символ	Описание на символа
 $\Sigma$ <N>	Съдържа реактиви, достатъчни за <N> реакции
	Използвайте до
	Медицинско изделие за in vitro диагностика
	Каталожен номер
	Партиден номер
	Номер на материал (т.е. етикета на компонента)
	Компоненти
	Съдържа
	Номер
	Глобален номер на търговска единица
Rn	„R“ означава редакция на инструкциите за употреба, а „n“ е номерът на редакцията
	Ограничение на температурата
	Производител

**Символ**

**Описание на символа**

---



Направете справка с инструкциите за употреба



Предупреждение/внимание

## Приложение А: Детайли за мутация

Таблица 13 показва идентификационните номера (ИН) в COSMIC, взети от каталога на соматичните мутации при рака (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

Таблица 13. Списък на мутациите и ИН в COSMIC

Мутация	Екзон	Промяна на базата	ИН в COSMIC
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
		2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (комплекс)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (комплекс)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (комплекс)	12422
Делеции	19	2238_2252>GCA (комплекс)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (комплекс)	12382
		2239_2258>CA (комплекс)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (комплекс)	12383

# Информация за поръчки

Продукт	Съдържание	Каталожен №
<b>Набор <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – за откриване на мутации в гена EGFR</b>		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	За 24 реакции: 1 контролен анализ, 7 анализа за мутации, положителна контрола, <i>Taq</i> ДНК полимераза	870311
<b>Rotor-Gene Q MDx и принадлежности</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Апарат за цикли <i>real-time</i> PCR и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности, 1-годишна гаранция на части и труд, не включва инсталиране и обучение	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Апарат за цикли <i>real-time</i> PCR в реално време и анализатор на стопилки с висока разделителна способност с 5 канала (зелен, жълт, оранжев, червен, пурпурен) плюс канал HRM, лаптоп, софтуер, принадлежности, 1-годишна гаранция на части и труд, инсталиране и обучение	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Алуминиев блок за ръчна подготовка на реакция с едноканална пипета в 72 епруветки × 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 ленти от 4 епруветки и капачки за 1000 реакции	981103

Продукт	Съдържание	Каталожен №
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 ленти от 4 епруветки и капачки за 10 000 реакции	981106
<b>Свързани продукти</b>		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	За 50 подготовки: Колони QIAamp Mini, удължители за епруветки (20 ml), QIAGEN Proteinase K, носеща РНК, буфери, VacConnectors и Collection Tubes (1,5 ml и 2 ml)	55114

За актуална информация относно лицензирането и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на набора QIAGEN. Наръчниците и ръководствата за потребителя на набори QIAGEN са достъпни на адрес [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) или могат да бъдат заявени от отдела за техническо обслужване на QIAGEN или местния Ви дистрибутор.



# Хронология на редакциите на документа

## Редакция

## Описание

R4, октомври 2019 г.

Промяна на законния производител (заглавна страница)

Адаптиране на името на апарата от Rotor-Gene Q MDx на Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM за уеднаквяване с името върху етикета на апарата

Коригиране на инструкциите за съхранение на реактиви от 90 дни на 12 месеца или до датата на изтичане на срока на годност

Актуализиране на раздела „Ограничения“ с информацията относно анализа за делеции на екзон 19 и анализа за L858R

Редактиране на таблица 9 за замяна на дублиран екзон 21 L858R с делеции на екзон 19

Премахване на символа EC + REP от заглавната страница и раздела „Символи“

R5, юни 2020 г.

Актуализиране на препратките към версията на софтуера RGQ от 2.3 на 2.3.5 или по-нова

Актуализиране на таблици 8 и 10, за да се отрази новия граничен диапазон на  $\Delta Ct$  и съответстваща корекция на всички свързани описания в цялото ръководство

Актуализиране на всички глави на протокола, за да включват информация, свързана с важноста на смесването, в частта „Важни точки“ преди началото на раздели; маркиране на подробности за смесването във всички стъпки на смесване

Добавена е стъпка на смесване в раздел „Протокол: Откриване на EGFR мутации“

Актуализиран е раздел „Отстраняване на проблеми“, за да се добави решение за пресичане на няколко граници

R6, юни 2022 г.

Актуализирана е таблица в раздел „Интерфериращи вещества“ за редактиране на тестовата концентрация за неконюгиран билирубин от 150 на 15 mg/dbl

Тази страница умишлено е оставена празна

Тази страница умишлено е оставена празна

Тази страница умишлено е оставена празна

### Ограничено лицензно споразумение за *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Употребата на този продукт означава, че всеки купувач или потребител на продукта приема следните условия:

1. Продуктът може да се използва само по протоколите, предоставени с продукта и този наръчник, и само с компонентите, съдържащи се в набора. QIAGEN не предоставя лиценз по никакви права върху своята интелектуална собственост за употребата или включването на приложените компоненти на този набор с компоненти, които не са включени в този набор, освен както е описано в протоколите, предоставени с продукта, този наръчник и допълнителните протоколи, които могат да се изтеглят от адрес [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са тествани щателно или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти се лицензират за еднократна употреба и не може да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от всички други лицензи, изрични или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора се съгласяват да не предприемат и да не позволяват на други лица да предприемат стъпки, които може да улеснят или да доведат до някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разноски, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Търговски марки: 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). Регистрираните имена, търговските марки и пр., използвани в настоящия документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона.

Юни 2022 г. HB-1898-007 1127512BG © 2022 QIAGEN, всички права запазени.

