



2022 m. birželis

„*therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ naudojimo instrukcijos



1 versija

IVD

Skirta in vitro diagnostikai

Skirta naudoti su „Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM“ instrumentais

CE

REF

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA

R6 **MAT**

1127512LT

Turinys

Numatytoji paskirtis	5
Santrauka ir paaiškinimas	6
Procedūros principas	7
Rinkinio formatas	7
Tyrimai	8
Kontrolinės medžiagos	9
Pateikiamos medžiagos.....	10
Rinkinio turinys	10
Būtinios, bet nepateikiamos priemonės.....	11
Įspėjimai ir atsargumo priemonės.....	12
Saugos informacija	12
Bendrosios atsargumo priemonės	12
Reagentų laikymas ir naudojimas.....	14
Bandinių laikymas ir naudojimas	16
Procedūra	17
Protokolas. EGFR mutacijų aptikimas	18
Protokolas. „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas	22
Mutacijų įvertinimo duomenų analizė	30
Trikčių šalinimo vadovas	38
Kokybės kontrolė	40
Apribojimai.....	40
Eksplotacinių ypatybių charakteristikos	42

Analitinis jautrumas – tuštumo riba (angl. „Limit of Blank“, LOB)	42
Aptikimo riba (angl. „Limit of Detection“, LOD).....	42
Analitinis jautrumas – ΔC_T ribinės reikšmės ir ΔC_T ribinių reikšmių intervalas	44
Pasikartojamumas ir atkartojamumas	44
DNR įvesties poveikis C_T reikšmėms	44
Trukdančios medžiagos	45
Klinikinis efektyvumas	49
Literatūra	50
Kontaktinė informacija	51
Simboliai	52
A priedas. Informacija apie mutacijas	54
Užsakymo informacija	55
Dokumento peržiūrų istorija.....	57

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 kokybinį 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 nesmulkiaūstelinio 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 naudojamos 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 pradmens 3' gale. Konkrečios 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 zonde. 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 tyrimas, pažymėtas 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 (H₂O), 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 kontrolinės medžiagos amplifikaciją tiek, kad sugeneruota IC CT (HEX) reikšmė nepateks į nurodytą diapazoną. Šių mėginių FAM rezultatai vis tiek galioja.

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit
Katalogo Nr.
Reakcijų skaičius

(24)
870311
24

Raudonas	„Control Reaction Mix“ (kontrolinės reakcijos mišinys)	CTRL	2 x 600 µl
Violetinis	„T790M Reaction Mix“ (T790M reakcijos mišinys)	T790M	600 µl
Oranžinis	„Deletions Reaction Mix“ (delecijų reakcijos mišinys)	DEL	600 µl
Rožinis	„L858R Reaction Mix“ (L858R reakcijos mišinys)	L858R	600 µl
Rusvai gelsvas	„EGFR Positive Control“ (EGFR teigiama kontrolinė medžiaga)	PC	300 µl
Žalsvas	„Taq DNA Polymerase“ (Taq DNR polimerazė)	Taq	2 x 80 µl
Baltas	„Nuclease-Free Water for No Template Control“ (Vanduo be nukleazės, skirtas kontrolinei medžiagai be matricos)	NTC	1 x 1,9 ml
Baltas	„Nuclease-Free Water for Dilution“ (Vanduo be nukleazės, skirtas skiesti)	Dil	1 x 1,9 ml
„therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ naudojimo instrukcijos (vadovas)			1

Būtinios, bet nepateikiamos priemonės

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (safety data sheets, SDS), kuriuos gali pateikti produkto tiekėjas.

- DNR ekstrahavimo rinkinys (žr. „Procedūra“, 17 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†
- Skaldytas ledas
- Stalinė centrifuga* su rotoriumi 2 ml reakcijos mėgintuvėliams
- Sūkurinė maišyklė („vortex“)
- „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumentas*† su fluorescenciniais kanalais, skirtais „Cycling Green“ ir „Cycling Yellow“ (atitinkamai FAM ir HEX aptikti)
- „Rotor-Gene Q“ programinė įranga, 2.3.5 arba naujesnė 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 sukalinuoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

† 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 (Safety Data Sheets, SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete svetainėje www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jų komponentų SDS.

Bendrosios atsargumo priemonės

Visada laikykitės toliau pateiktų 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 atlikti. 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.

Kad rinkinys optimaliai veiktų, 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).

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“ mėgintuvėlius su pagrindiniais mišiniais ir DNR mėginį 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 genominė DNR turi būti išplauta 55 µl „Buffer AVE“ buferiniu tirpalu (pateikiamu „QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit“ rinkinyje).
- Išgrynintą genominę 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

- Norėdami gauti tinkamus rezultatus, aprašytą maišymo procedūrą atlikite kiekviename tyrimo sąrankos proceso maišymo žingsnyje.
- Vieno tyrimo metu galima tirti ne daugiau kaip 16 mėginių.
- Prieš pradėdami procedūrą perskaitykite skyrių „Bendrosios atsargumo priemonės“ 12 psl.
- Prieš pradėdami protokolą skirkite laiko susipažinti 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.
- Pipete įlašinkite *Taq*: pipetės antgalį įkiškite į skysčio paviršių, 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.
- Norėdami efektyviai naudoti „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rinkinio reagentus, sudarykite kuo didesnes DNR mėginių partijas, kad galėtumėte atlikti visos apimties tyrimus. Jei mėginiai tiriami atskirai ar mažesnėmis partijomis, sunaudojama daugiau reagentų ir sumažinamas mėginių, kuriuos galima ištirti naudojant vieną „*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit“ rinkinį, skaičius.

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 (variant 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.
- **Sumaišykite visus mėginius apversdami 10 kartų** ir trumpai centrifuguokite, kad turinys susirinktų mėgintuvėlio apačioje.

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“ 14 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 μl × (n + 1)	0,50 μl × (n + 1)
T790M	T790M	19,50 μl × (n + 1)	0,50 μl × (n + 1)
Delecijos	Del	19,50 μl × (n + 1)	0,50 μl × (n + 1)
L858R	L858R	19,50 μl × (n + 1)	0,50 μl × (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.

- 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.

- Uždenkite pagrindinio mišinio mėgintuvėlį ir **parvartykite 10 kartų, kad sumaišytumėte pagrindinį mišinį**, tada trumpai centrifuguokite, kad pagrindinis mišinys būtų mėgintuvėlio apačioje. Nedelsdami įpilkite 20 μl pagrindinio mišinio į kiekvieną atitinkamą PGR mėgintuvėlių juostelę.
- Nedelsdami įpilkite 5 μl vandens be nukleazės (H₂O) į kontrolinės medžiagos be matricos PGR mėgintuvėlių juosteles (PGR mėgintuvėliai Nr. 9–12) ir uždenkite mėgintuvėlius dangteliais.
- Įpilkite po 5 μl kiekvieno mėginio į mėginių mėgintuvėlius (PGR mėgintuvėliai Nr. 5–8, 13–16 ir 17–72) ir uždenkite mėgintuvėlius dangteliais.

7. Įpilkite 5 µl 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

Tyrimas	Kontrolinės medžiagos		Mėginio numeris						
	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

8. Ilgalaikiu žymikliu pažymėkite PGR 4 mėgintuvėlių juostelių pirmų mėgintuvėlių, esančių mažiausių skaičių vietose, 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-well rotor“.

9. Pavartykite uždengtus mėgintuvėlius 4 kartus, kad susimaišytų mėginys ir reakcijos mišinys.

10. Įstatykite visas PGR 4 mėgintuvėlių juosteles į atitinkamas „72-well rotor“ vietas ir apžiūrėkite, ar visuose mėgintuvėliuose tūriai vienodi.

Pastaba. Įsitinkinkite, kad perkeliant mėgintuvėlių juosteles į rotorius jos nepersisuko.

11. Jei rotorius užpildytas ne visas, į likusias vietas įstatykite uždengtus tuščius mėgintuvėlius.

12. Iš karto įdėkite rotorį į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“. Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas („Rotor-Gene Q MDx“ instrumento priedas) yra uždėtas ant rotoriaus, kad tyrimų serijos metu mėgintuvėliai būtų pritvirtinti.
13. Kaip sukurti temperatūros profilį ir pradėti tyrimų seriją, žr. „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento nustatymą (žr. „Protokolas. „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas“ 22 psl.).

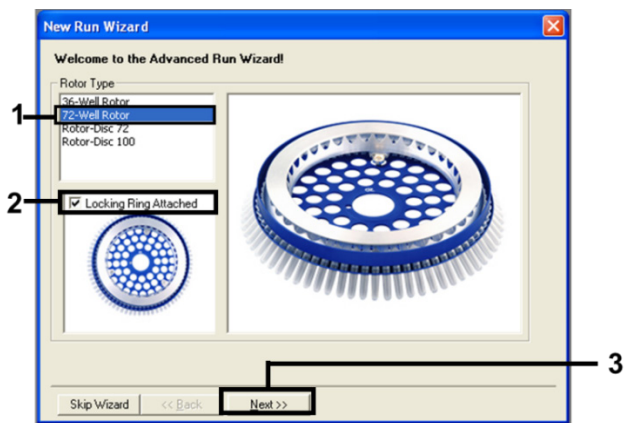
Protokolas. „Rotor-Gene Q EGFR“ nustatymas

Ciklo parametrai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Ciklo parametrai

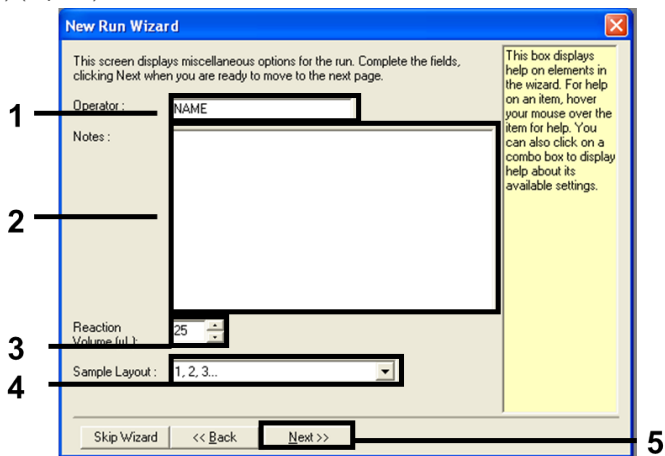
Ciklai	Temperatūra	Laikas	Duomenų gavimas
1	95 °C	15 min.	Nėra
40	95 °C	30 sek.	Nėra
	60 °C	60 sek.	Žalias ir geltonas

1. Prie „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“ instrumento prijungto nešiojamojo kompiuterio darbalaukyje dukart spustelėkite „Rotor-Gene Q“ serijos 2.3 programinės įrangos versijos 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). Įsitikinkite, kad fiksuojamasis žiedas uždėtas, ir pažymėkite langelį „Locking Ring Attached“ (Fiksuojamasis žiedas uždėtas). Spustelėkite „Next“ (Kitas) (1 pav.).



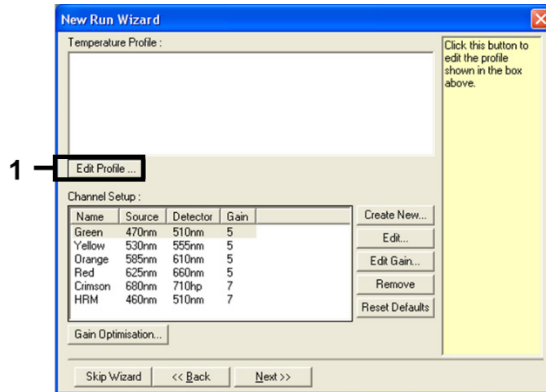
1 pav. Dialogo langas „New Run Wizard“ (Naujos procedūros vedlys).

4. Įveskite operatoriaus vardą lauke **Operator** (Operatorius). Pridėkite pastabas ir lauke **Reaction Volume** (Reakcijos tūris) nustatykite reikšmę **25**. Įsitikinkite, kad lauke **Sample Layout** (Mėginių išdėstymas) įvestos reikšmės yra **1, 2, 3...** Spustelėkite „Next“ (Kitas) (2 pav.).



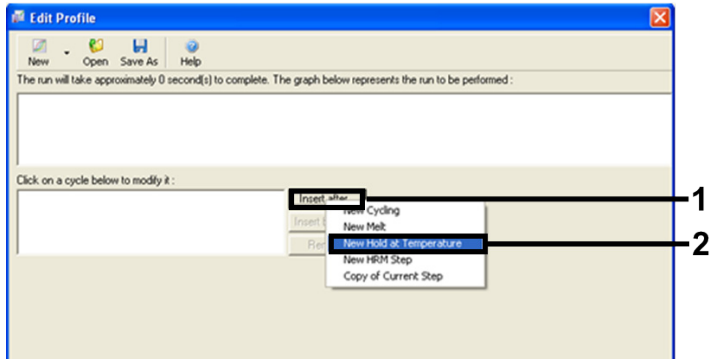
2 pav. Operatoriaus vardo ir reakcijų tūrių įvedimas.

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



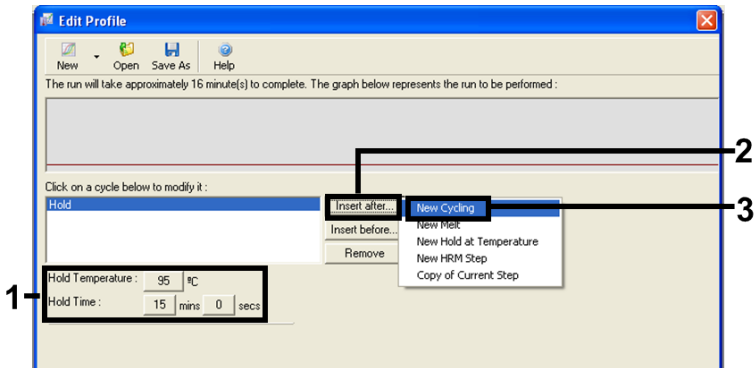
3 pav. Profilio redagavimas.

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



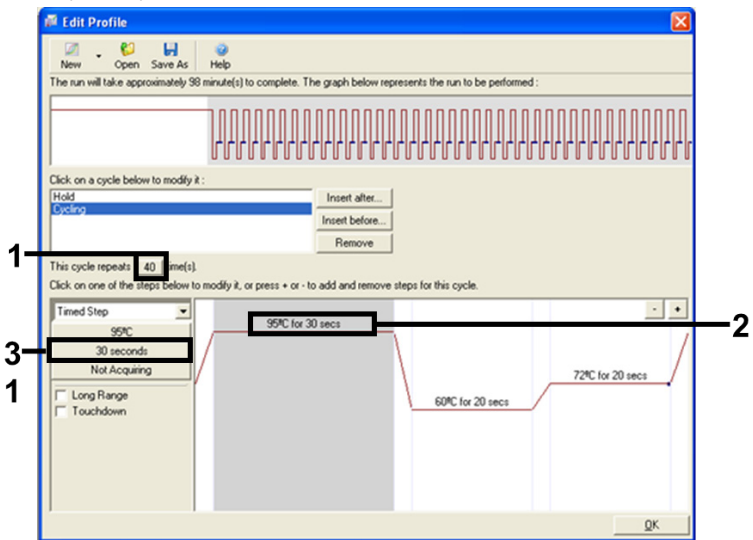
4 pav. Pradinio inkubavimo žingsnio įterpimas.

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.).



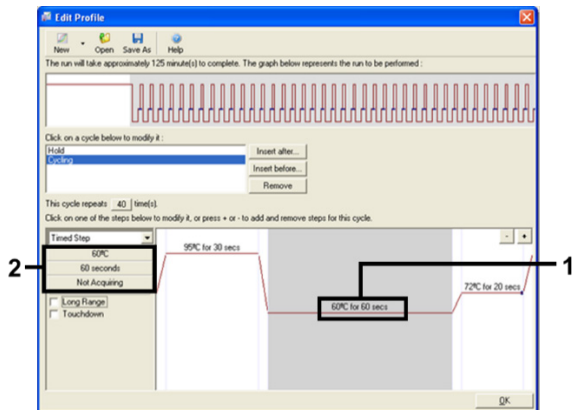
5 pav. Pradinis inkubavimo žingsnis esant 95 °C temperatūrai.

8. Nustatykite, kad ciklas būtų kartojamas **40** kartų. Pasirinkite pirmą žingsnį ir nustatykite **95 °C 30 sek.** (6 pav.).



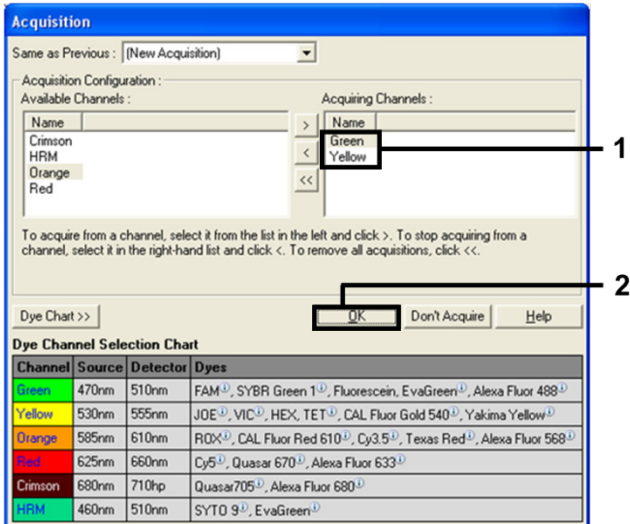
6 pav. Ciklo žingsnis esant 95 °C temperatūrai.

9. Pasirinkite antrą žingsnį ir nustatykite 60 °C 60 sek. Spustelėkite **Not Acquiring** (Negaunama), kad šio žingsnio metu būtų gaunami duomenys (7 pav).



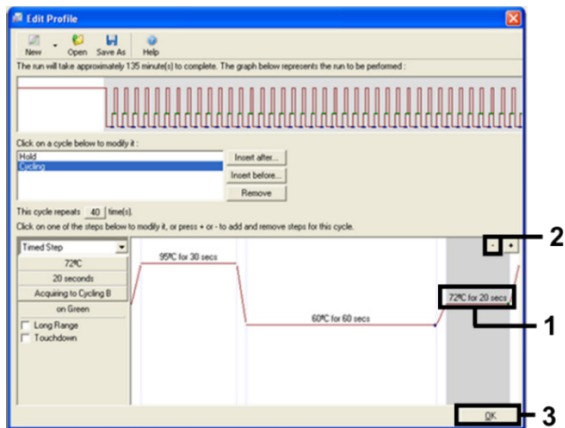
7 pav. Ciklo žingsnis esant 60 °C temperatūrai.

10. Pasirinkite **Green** (Žalias) ir **Yellow** (Geltonas) sąrašė **Available Channels** (Pasiekiami kanalai), tada spustelėkite **>**, kad perkeltumėte juos į sąrašą **Acquiring Channels** (Gavimo kanalai). Spustelėkite **OK** (Gerai) (8 pav.).



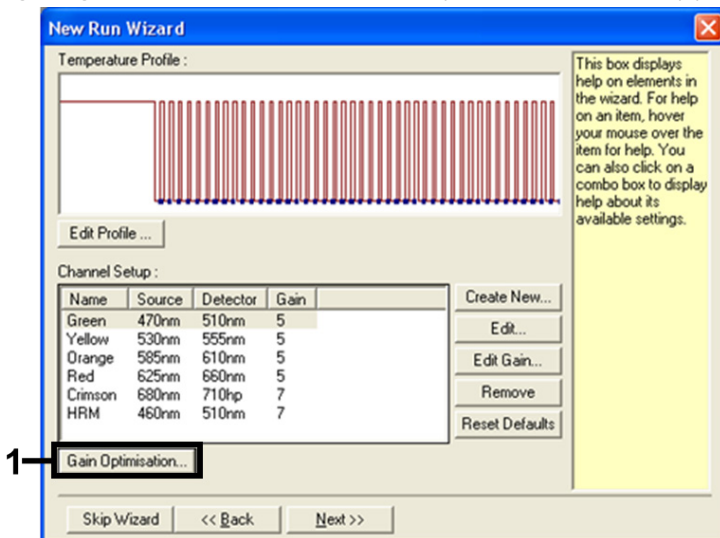
8 pav. Gavimas atliekant ciklo žingsnį esant 60 °C temperatūrai.

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



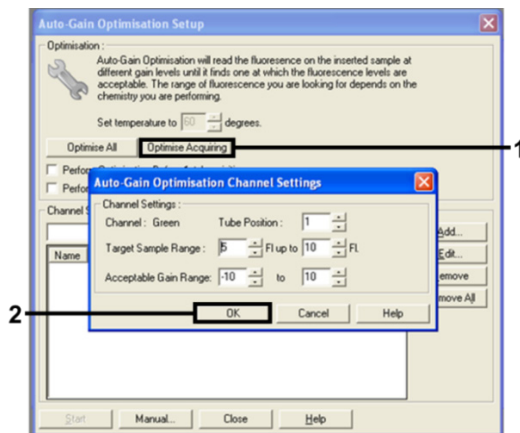
9 pav. Išplėtimo žingsnio pašalinimas.

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



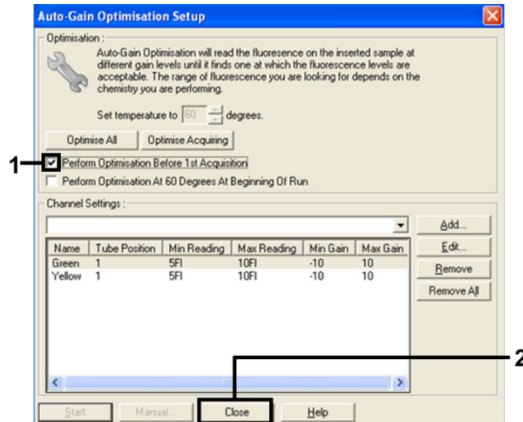
10 pav. Gavimo optimizavimas.

13. Spustelėkite „Optimise Acquiring“ (Optimizuoti gavimą). Rodomi kiekvieno kanalo nustatymai. Priimkite šias numatytąsias abiejų kanalų reikšmes spustelėdami „OK“ (Geri). (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. Žalio ir geltono kanalų pasirinkimas.

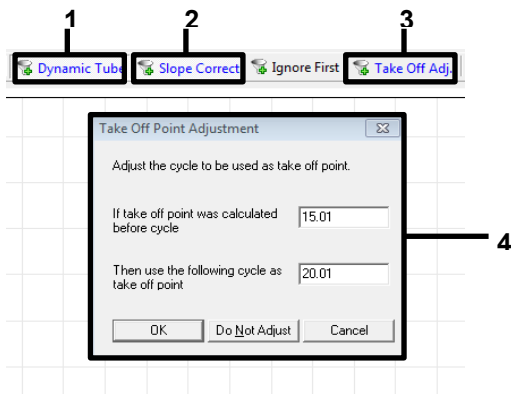
15. Spustelėkite **Next** (Kitas), kad įrašytumėte matricą atitinkamoje vietoje, pasirinkdami **Save Template** (Įrašyti matricą).

Mutacijų įvertinimo duomenų analizė

Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis naudodami toliau pateiktą procedūrą.

Programinės įrangos analizės nustatymas

1. Atidarykite atitinkamą failą naudodami „Rotor-Gene Q“ serijos programinės įrangos 2.3.5 arba naujesnę versiją.
2. Jei prieš atliekant tyrimą mėginiams nebuvo suteiktas pavadinimas, spustelėkite **Edit Samples** (Redaguoti mėginius).
3. Stulpelyje **Name** (Pavadinimas) įveskite 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** ir **20.01**, kaip parodyta 13 pav.



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

7. Nustatykite slenksčio reikšmę **0.02** ir patikrinkite HEX C_T reikšmes.
8. Analizės puslapyje spustelėkite **Cycling A, Green** (A ciklas, žalias), 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** ir patikrinkite FAM C_T reikšmes.

Tyrimo kontrolinės medžiagos analizė

Pabaigę tyrimų seriją, analizuokite duomenis, kaip aprašyta toliau.

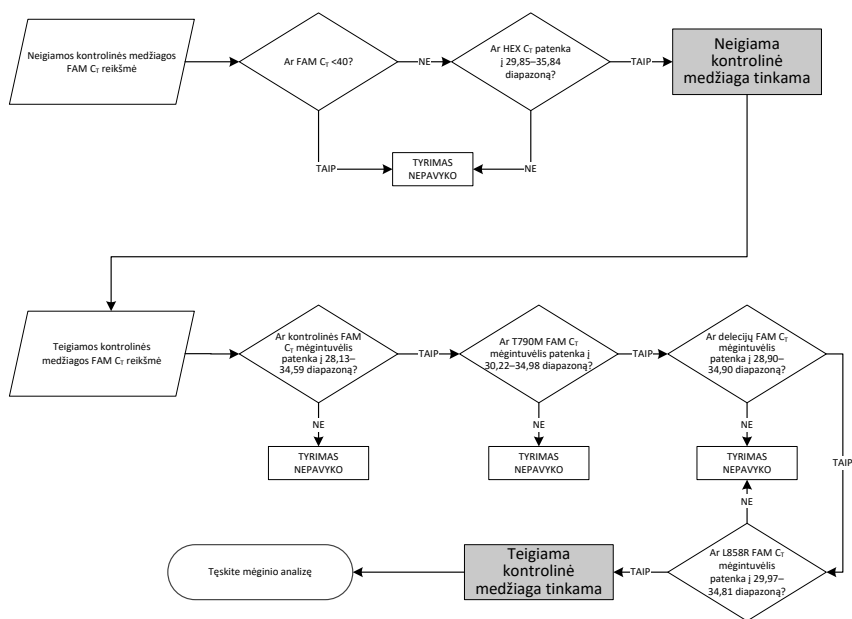
- **Neigiamos kontrolinės medžiagos:** norint užtikrinti, kad nėra užteršimo matrica, NTC neturi generuoti C_T reikšmės žaliame (FAM) kanale žemiau 40. Norint užtikrinti tinkamą tyrimų serijos nustatymą, NTC turi rodyti amplifikaciją 29,85–35,84 geltoname (HEX) kanale (vidinės kontrolinės medžiagos).

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_T 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_T reikšmė patenka į diapazoną (FAM), bet vidinės kontrolinės medžiagos C_T 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_T diapazonas

Reakcijos kontrolinė medžiaga	Tyrimas	Kanalas	C _T diapazonas
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 CT reikšmė turi patekti į 23,70–31,10 diapazoną žaliame (FAM) kanale (6 lentelė).

6 lentelė. Priimtinas mėginio kontrolinės reakcijos FAM C_T diapazonas

Reakcijos mišinys	Kanalas	Priimtinas C _T diapazonas
Kontrolinė medžiaga	Green (FAM)	23,70–31,10

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

- **< 23,70 mėginio kontrolinio tyrimo C_T:** mėginiai, kurių kontrolinės medžiagos C_T 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_T padidėtų 1.
- **> 31,10 mėginio kontrolinio tyrimo C_T:** 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_T reikšmė turi patekti į diapazoną, nurodytą 7 lentelėje. Toliau pateikiamos rekomendacijos, jei mėginio reikšmė nepatenka į šį diapazoną.

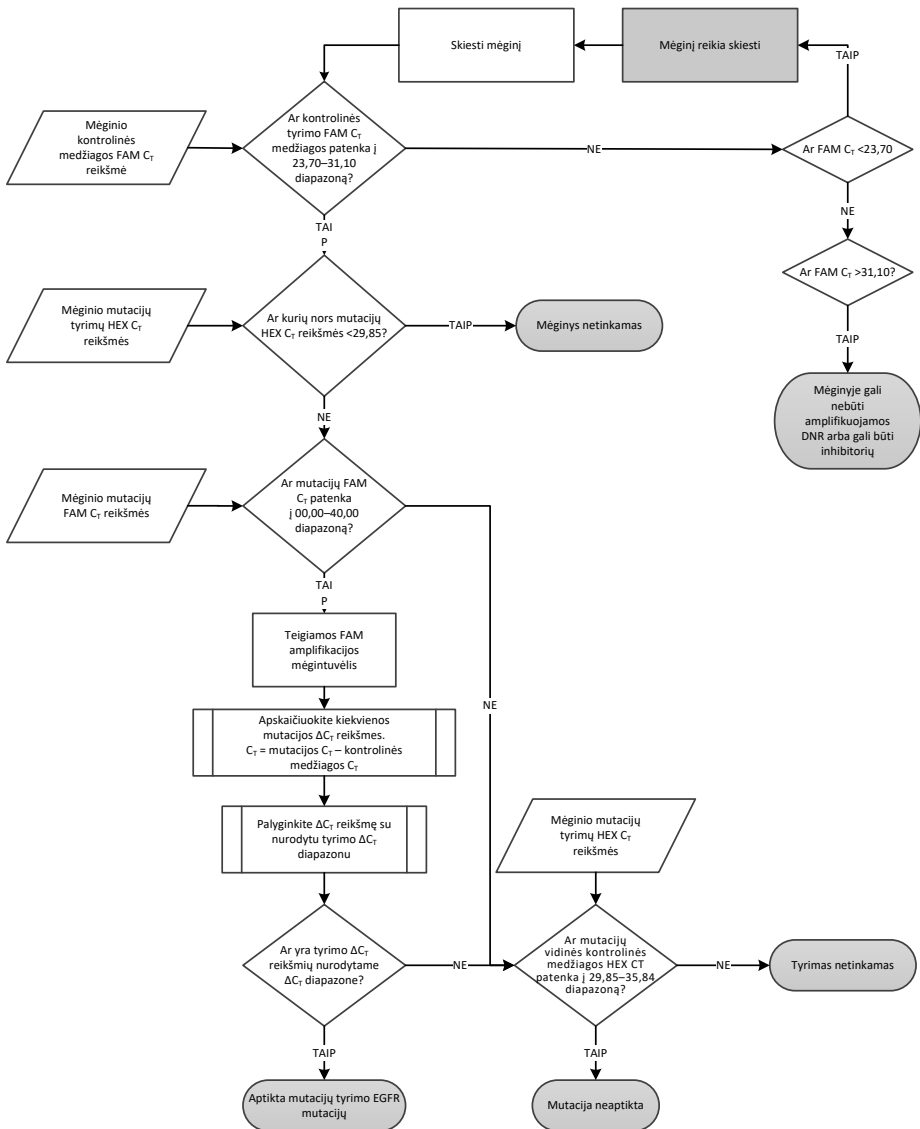
7 lentelė. Priimtinos mėginio mutacijų reakcijos reikšmės

Reakcija	Reakcijos mišinys	Kanalas	C _T 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_T (t. y. C_T > 40), tai gali būti dėl inhibitoriaus poveikio, tyrimo nustatymo klaidos arba nėra amplifikuojamos EGFR DNR.

- Vidinės kontrolinės medžiagos C_T reikšmė patenka į 29,85–35,84 diapazoną: nėra amplifikuojamos EGFR DNR.

- Vidinės kontrolinės medžiagos C_T 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_T reikšmė

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

Toliau nurodytu būdu apskaičiuokite kiekvieno mutacijų mėginio, rodančio teigiamą amplifikaciją, ΔC_T ribinę reikšmę ir įsitikinkite, kad mutacijos ir kontrolinės medžiagos C_T reikšmės yra iš to paties mėginio.

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

Palyginkite mėginio ΔC_T reikšmę su analizuojamo tyrimo ΔC_T ribinių reikšmių intervalu (8 lentelė) ir įsitikinkite, kad kiekvienam tyrimui taikomas tinkamas ribinės reikšmės taškas.

8 lentelė. Mutacijų tyrimo ΔC_T ribinių reikšmių intervalas

Mutacijų tyrimas	ΔC_T ribinių reikšmių intervalas
T790M	Nuo $-10,00 \geq$ iki $\leq 7,40$
Delecijos	nuo $-10,00 \geq$ iki $\leq 8,00$
L858R	nuo $-10,00 \geq$ iki $\leq 8,90$

ΔC_T ribinių reikšmių intervalo viršutinė riba yra taškas, kurį viršijantis signalas gali būti teigiamas dėl laukinio tipo DNR ARMS pradmens foninio signalo. Jei mėginio ΔC_T reikšmė yra didesnė nei ΔC_T ribinių reikšmių intervalo viršutinio taško reikšmė, jis klasifikuojamas kaip „Mutation not detected“ (Mutacija neaptikta) arba neaptinkamas naudojant šį rinkinį. Jei mėginio reikšmė yra tarp ΔC_T ribinių reikšmių taškų, mėginys klasifikuojamas kaip teigiamas ir turintis tokiu tyrimu aptinkamų mutacijų. Jeigu mėginio reikšmė yra mažesnė nei ΔC_T ribinių reikšmių intervalo apatinė riba, tai gali būti dėl fluorescencijos artefaktų.

Pastaba. Mėginius, kuriuose nerodomas FAM mutacijos C_T, reikia įvertinti atsižvelgiant į vidinės kontrolinės medžiagos (HEX) C_T reikšmes, kad būtų galima nustatyti, ar mutacija neaptikta, ar tyrimas negalioja. Jei HEX C_T reikšmė yra nuo 29,85 iki 35,84, vadinasi, mutacija neaptikta. Jei HEX ΔC_T ribinė reikšmė nepatenka į šį intervalą, 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 ΔC_T reikšmė patenka į ΔC_T ribinių reikšmių intervalą. Jei aptinkamos kelios mutacijos, visas galima įtraukti į ataskaitą.
- **Mutacija neaptikta:**
 - FAM amplifikacija teigiama, ΔC_T ribinė reikšmė didesnė už ΔC_T ribinių reikšmių intervalą, o HEX (vidinė kontrolinė medžiaga) patenka į 29,85–35,84 intervalą.
 - FAM amplifikacija neigiama, o HEX (vidinė kontrolinė medžiaga) patenka į 29,85–35,84 intervalą.
- **Netinkama:** FAM amplifikacija neigiama, o HEX amplifikacija neatitinka specifikacijų.
 - Apskaičiuota ΔC_T yra mažesnė nei ΔC_T ribinių reikšmių intervalas, HEX (vidinė kontrolinė medžiaga) patenka į tikėtiną intervalą. Mažesnė nei –10,00 ΔC_T reikšmė rodo, kad galėjo būti fluorescencijos artefaktų.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali būti naudingas šalinant atsiradusias problemas. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Dažniausiai užduodami klausimai“ („Frequently Asked Questions“, FAQ) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninės priežiūros skyriuose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius klausimus, susijusius su šiuo vadovu ir protokoluose pateikta informacija, mėginiais ir tyrimų technologijomis (kontaktingą informaciją žr. galiniame viršelyje arba apsilankykite 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 lašinio pipete schemą ir, jei reikia, pakartokite PGR. |
| d) Vieno ar kelių rinkinio komponentų laikymo sąlygos neatitiko nurodymų, pateiktų „Reagentų laikymas ir naudojimas“ (14 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. |

Pastabos ir pasiūlymai

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

- a) PGR ruošimo metu atsirado tarša
- Pakartokite PGR, naudodami naujus reagentus kartotiniams tyrimams.
- Jei galima, įdėję reikiamą tirti mėginį, iš karto uždarykite PGR mėgintuvėlius.
- Užtikrinkite, kad darbo vieta ir instrumentai būtų reguliariai dezinfekuojami.

Slenksčio reikšmės perėjimas kelis kartus arba ΔC_T reikšmė žemiau ribinių reikšmių intervalo

- a) Netinkamas maišymas pasirengimo tyrimui metu
- Pakartokite PGR, jeigu tai turi įtakos kontrolinei medžiagai, arba iš naujo ištirkite nepavykusį mėginį.
- Vykdykite naudojimo instrukcijas, atidžiai atlikdami maišymo žingsnius.

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 klinikinų 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 ypatybių charakteristikos

Analitinis jautrumas – tuštumo riba (angl. „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 ΔC_T ribinė reikšmė turi būti didesnė už atitinkamą ribinę reikšmę) buvo įvykdytas.

Aptikimo riba (angl. „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 RQG PCR Kit“ rinkinį ir DNR, išskirtą iš dirbtinių mutacijų turinčių plazmos mėginių.

Galutinės LOD reikšmės, išvardytos kitame puslapyje 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 – ΔC_T ribinės reikšmės ir ΔC_T ribinių reikšmių intervalas

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.

Atitinkami kiekvieno mutacijos tyrimo, esančio „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinyje, ΔC_T ribinių reikšmių intervalai pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė. „*therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ rinkinio ΔC_T ribinių reikšmių intervalas

Mutacijų tyrimas	ΔC_T ribinių reikšmių intervalas
T790M	Nuo $-10,00 \geq$ iki $\leq 7,40$
Delecija	nuo $-10,00 \geq$ iki $\leq 8,00$
L858R	nuo $-10,00 \geq$ iki $\leq 8,90$

Pasikartojamumas ir atkartojamumas

Pasikartojamumas ir atkartojamumas buvo įvertintas tiriant $3 \times$ 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 ΔC_T ribinės reikšmės, išmatuotos esant skirtingiems visos DNR įvesties lygiams, dariniame „*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 ištirti 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 ištirta 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) ΔC_T . Šiais atvejais pateikiamas pastebėtas ΔC_T skirtumas.

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

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

11 lentelė. Galimai trukdančios endogeninės medžiagos

Galimai trukdančios medžiagos (angl. „Interfering Substance“, IS)	Tyrimo koncentracija
Nekonjuguotas bilirubinas	15 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“ ΔC_T ir „kontrolinės medžiagos“ (t. y. medžiagos be trukdančių medžiagų) ΔC_T . Šiais atvejais pateikiamas pastebėtas ΔC_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
K ₂ EDTA	3 600

T790M tyrimas

Toliau pateikti egzogeniniai junginiai, esant 12 lentelėje nurodytoms koncentracijoms, turėjo $> 2 \times SD$ 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_2 EDTA, $0,57 \Delta C_T$ skirtumas

Klinikinis efektyvumas

NCT01203917 klinikinis tyrimas buvo IV etapo atviras vienos grupės tyrimas, atliekamas norint iširti 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 klinikiniam tyrimui 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, 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).

Simboliai

Naudojimo instrukcijose arba ant pakuočių ir etiketėse gali būti pateikti šie simboliai:

Simbolis	Simbolio apibrėžimas
 Σ <N>	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti
	Tinka naudoti iki
	In vitro diagnostikos medicinos prietaisas
	Katalogo numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris (t. y. komponento ženklimas etikete)
	Komponentai
	Sudėtyje yra
	Numeris
	Visuotinis prekės numeris
R _n	„R“ yra naudojimo instrukcijų peržiūrėtas leidimas, „n“ – peržiūrėto leidimo numeris
	Temperatūros ribos
	Gamintojas

Simbolis

Simbolio apibrėžimas



Žr. naudojimo instrukcijas



Įspėjimas / 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).

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

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
„therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit“ – skirtas EGFR geno mutacijoms nustatyti		
therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	24 reakcijoms: 1 kontrolinis tyrimas, 7 mutacijų tyrimai, teigiama kontrolinė medžiaga, Taq DNR polimerazė	870311
„Rotor-Gene Q MDx“ ir priedai		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	„Real-time PCR“ ciklų 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“ ciklų 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
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangtelius, skirtų 1000 reakcijų	981103

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 juostelių po 4 mėgintuvėlius ir dangteliai 10 000 reakcijų	981106
Susiję produktai		
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 ir naudotojo vadovai pateikiami svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninės priežiūros skyriaus ar vietinio platintojo.

Dokumento peržiūrų istorija

Peržiūrėtas leidimas

Aprašas

R4, 2019 spalio mėn.

Pakeistas teisėtas gamintojas (**viršelis**)

Instrumento pavadinimas pakeistas iš „Rotor-Gene Q MDx“ į „Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM“, kad atitiktų instrumento etiketėje nurodytą pavadinimą

Pataisytos reagentų laikymo instrukcijos nurodant, kad juos galima laikyti ne 90 dienų, o 12 mėnesių arba iki tinkamumo naudoti datos

Skyrius „Apribojimai“ papildytas informacija apie 19 egzono delecijų tyrimą ir L858R tyrimą.

Peržiūrėta 9 lentelė ir kartotinio tyrimo 21 L858R egzonas pakeistas 19 egzono delecijomis

EC + REP simbolis pašalintas iš viršelio ir skyriaus „Simboliai“

R5, 2020 m. birželis

Atnaujintos nuorodos į RGQ programinę įrangą iš 2.3 į 2.3.5 arba naujesnę versiją

Atnaujintos 8 ir 10 lentelės įtraukus naują ΔC_T ribinių reikšmių diapazoną ir atitinkamai pakoreguoti visi susiję aprašai visame vadove

Atnaujinti visi protokolo skyriai, svarbiose vietose prieš skyriaus pradžią įtraukiant informaciją apie maišymo svarbą; išryškinta išsami maišymo informacija visuose maišymo žingsniuose

Įtrauktas maišymo žingsnis į skyrių „Protokolas: EGFR mutacijų aptikimas“

Atnaujintas skyrius „Trikčių šalinimas“ įtraukiant kelių slenksčio reikšmių perėjimo sprendimą

R6, 2022 m. birželis

Atnaujinta lentelė skyriuje „Trukdančios medžiagos“, siekiant peržiūrėti iš 150 į 15 mg/dbl nekonjuguoto bilirubino tyrimo koncentraciją

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

Šis puslapis specialiai paliktas tuščias

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

Naudodamas šį gaminį, pirkėjas arba naudotojas sutinka su toliau išvardytomis sąlygomis.

1. Gaminį galima naudoti tik vadovaujantis su juo pateiktais protokolais, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su j šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.qiagen.com. QIAGEN naudotojams pateikiami keli papildomi protokoliai. Šių protokolų QIAGEN kruopščiai nepatikrino ir neoptimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokoliai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Jei aiškiai nenurodyta licencijose, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis komplektas ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Pagal suteiktą licenciją šį komplektą ir jo komponentus galima naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Komplekto pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti anksčiau nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir turi atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios ribotosios licencinės 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®, „Sample to Insight®“, „QIAamp®“, „therascreen®“, „Rotor-Gene®“, „Scorpions®“ („QIAGEN Group“); FAM™, HEX™ („Thermo Fisher Scientific Inc.“); IRESSA® („AstraZeneca Group“). Šiame dokumente vartojami registruotieji pavadinimai, prekių ženklai ir kt., net jeigu jie specialiai nepažymėti, vis tiek yra saugomi įstatymų.

2022 m. birželis, HB-1898-007 1127512LT © 2022 m. QIAGEN, visos teisės saugomos.

