

Juni 2020

Buku Pegangan *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Versi 1



Untuk penggunaan diagnostik in vitro

Untuk digunakan dengan instrumen Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, JERMAN



1121934ID

Isi

Penggunaan yang Ditujukan	5
Ringkasan dan Penjelasan	6
Prinsip Prosedur	7
Format kit.....	8
Uji Kadar.....	8
Kontrol	9
Bahan yang Disediakan	10
Isi kit.....	10
Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia	11
Peringatan dan Pencegahan	12
Informasi keselamatan.....	12
Tindakan pencegahan umum.....	12
Penyimpanan dan Penanganan Reagen	14
Penyimpanan dan Penanganan Spesimen	16
Prosedur	17
Protokol: Deteksi Mutasi EGFR.....	18
Protokol: Pengaturan Rotor-Gene Q EGFR.....	22
Analisis data penilaian mutasi	29
Panduan Pemecahan Masalah	36
Kontrol Kualitas.....	38
Batasan.....	38
Karakteristik Kinerja.....	40

Sensitivitas analisis — batasan kosong (LOB)	40
Batas deteksi (Limit of Detection - LOD)	40
Sensitivitas analisis — Cutoff ΔC_T dan rentang cutoff ΔC_T	42
Pengulangan dan reproduksibilitas	42
Pengaruh input DNA terhadap nilai C_T	42
Zat yang mengganggu	43
Kinerja klinis	47
Referensi	48
Informasi Kontak	48
Simbol	49
Lampiran A: Detail Mutasi	50
Informasi Pemesanan	51
Riwayat Revisi Dokumen	53

Penggunaan yang Ditujukan

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit adalah pengujian diagnostik in vitro untuk deteksi penghapusan ekson 19, substitusi ekson 20 dan 21 (masing-masing T790M dan L858R) dalam gen reseptor faktor pertumbuhan epidermal (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), dan akan memberikan penilaian kualitatif terhadap status mutasi. Hasilnya ditujukan untuk membantu dokter mengidentifikasi pasien dengan NSCLC yang dapat mendapat manfaat dari perawatan dengan IRESSA® (gefitinib) jika sampel jaringan tidak dapat dievaluasi.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit harus digunakan oleh personel terlatih di lingkungan laboratorium profesional dengan sampel DNA yang diekstrak dari plasma yang diperoleh dari darah pasien kanker paru bukan-sel kecil (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit ditujukan untuk penggunaan diagnostik in vitro.

Ringkasan dan Penjelasan

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit adalah kit yang siap digunakan untuk deteksi mutasi dalam gen terkait kanker EGFR menggunakan reaksi rantai polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Dengan teknologi Scorpions® dan ARMS, *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit memungkinkan deteksi mutasi gen EGFR berikut terhadap latar belakang DNA genomik tipe liar.

- Penghapusan dalam ekson 19
- T790M
- L858R

Metode yang digunakan sangat selektif dan, tergantung pada total jumlah DNA yang ada, memungkinkan deteksi persentase mutasi rendah dalam DNA genomik tipe liar. Selektivitas dan batasan deteksi unggul terhadap teknologi seperti pembentukan sekuens terminator warna.

Prinsip Prosedur

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR kit menggunakan dua teknologi — ARMS dan Scorpions — untuk deteksi mutasi dalam real-time PCR.

ARMS

Amplifikasi spesifik mutasi atau spesifik alel diperoleh menggunakan ARMS (Sistem Mutasi Refraktori Amplifikasi). Polimerase DNA *Taq* (*Taq*) efektif dalam membedakan antara kecocokan dan ketidakcocokan di 3' ujung primer PCR. Sekuens termutasi spesifik secara selektif diperkuat, bahkan dalam sampel di mana sebagian besar sekuens tidak membawa mutasi. Jika primer sepenuhnya cocok, amplifikasi akan memproses dengan efisiensi penuh. Jika dasar 3' tidak cocok, hanya amplifikasi latar belakang tingkat rendah yang terjadi.

Scorpions

Deteksi amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Scorpions. Scorpions adalah molekul dwi-fungsi yang mengandung primer PCR yang secara kovalen terkait dengan kuar. Fluorofor dalam kuar ini berinteraksi dengan pemadam, yang juga disertakan dalam kuar, yang mengurangi fluoresens. Selama PCR, ketika kuar terikat pada amplicon, fluorofor dan pemadam menjadi terpisah. Hal ini menyebabkan peningkatan fluoresens dari tabung reaksi.

Format kit

Empat uji kadar tersedia dalam *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit:

- Satu uji kadar kontrol (Ctrl)
- Tiga uji kadar mutasi

Semua campuran reaksi yang mengandung reagen untuk mendeteksi target yang berlabel FAM™, dan uji kadar kontrol internal yang berlabel HEX™. Uji kadar kontrol internal dapat mendeteksi adanya inhibitor yang dapat menyebabkan hasil negatif palsu. Amplifikasi FAM dapat bersaing dengan amplifikasi kontrol internal dan tujuan kontrol internal hanyalah untuk menunjukkan bahwa tidak ada amplifikasi FAM, hal ini merupakan hasil negatif nyata dan bukan reaksi PCR gagal.

Uji Kadar

Uji kadar kontrol

Uji kadar kontrol, yang berlabel FAM, digunakan untuk menilai total DNA dalam sampel. Uji kadar ini memperkuat wilayah ekson 2 dari gen EGFR. Primer dan kuar telah dirancang untuk menghindari setiap polimorfisme EGFR yang diketahui.

Uji kadar mutasi

Setiap uji kadar mutasi mengandung kuar Scorpion berlabel FAM dan primer ARMS membedakan antara DNA tipe liar dan DNA mutan tertentu.

Kontrol

Semua proses eksperimen harus mengandung kontrol berikut:

Kontrol positif

Setiap proses harus mengandung kontrol positif dalam tabung 1–4. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit berisi Kontrol Positif (Positive Control, PC) EGFR untuk digunakan sebagai templat dalam reaksi kontrol positif. Hasil kontrol positif akan dinilai untuk memastikan bahwa kit berkinerja dalam kriteria penerimaan yang ditetapkan.

Kontrol negatif

Setiap proses harus mengandung kontrol negatif (kontrol tanpa templat; [No Template Control, NTC]) dalam tabung 9–12. NTC mengandung Air Bebas Nuklease (H₂O) untuk digunakan sebagai 'templat' untuk kontrol tanpa templat. Kontrol tanpa templat digunakan untuk menilai adanya potensi kontaminasi selama pengaturan proses dan untuk menilai kinerja reaksi kontrol internal.

Penilaian reaksi kontrol internal

Tiap campuran reaksi mengandung kontrol internal selain reaksi target. Kegagalan menunjukkan bahwa mungkin terdapat inhibitor yang dapat menyebabkan hasil negatif palsu, atau terjadinya kesalahan pengaturan operator untuk tabung tersebut.

Jika kegagalan kontrol internal disebabkan oleh inhibisi PCR, pengenceran sampel dapat mengurangi pengaruh inhibitor, tetapi perlu dicatat bahwa hal ini juga akan mengencerkan DNA target. Amplifikasi FAM dapat bersaing dengan amplifikasi kontrol internal sehingga nilai C_T IC (HEX) yang dihasilkan dapat berada di luar rentang yang ditetapkan. Hasil FAM tetap valid untuk sampel ini.

Bahan yang Disediakan

Isi kit

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
No. Katalog			870311
Jumlah reaksi			24
Merah	Control Reaction Mix (Campuran Reaksi Kontrol)	Ctrl	2 x 600 µl
Ungu	T790M Reaction Mix (Campuran Reaksi T790M)	T790M	600 µl
Jingga	Deletions Reaction Mix (Campuran Reaksi Penghapusan)	Del	600 µl
Merah Muda	L858R Reaction Mix (Campuran Reaksi L858R)	L858R	600 µl
Krem	EGFR Positive Control (Kontrol Positif EGFR)	PC	300 µl
Mint	Taq DNA Polymerase (Polimerase DNA Taq)	Taq	2 x 80 µl
Putih	Nuclease-Free Water for No Template Control (Air Bebas Nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat)	NTC	1 x 1,9 ml
Putih	Nuclease-Free Water for Dilution (Air Bebas Nuklease untuk Pengenceran)	Dil	1 x 1,9 ml
Petunjuk Penggunaan (Buku Pegangan) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			1

Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (Safety Data Sheets, SDS) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

- Kit ekstraksi DNA (lihat “Prosedur,” halaman 17)
- Pipet khusus* (dapat disesuaikan) untuk penyiapan sampel
- Pipet khusus* (dapat disesuaikan) untuk penyiapan campuran master PCR
- Pipet khusus* (dapat disesuaikan) untuk penyaluran DNA templat
- Ujung pipet dengan DNase, RNase dan Bebas DNA dengan filter (untuk menghindari kontaminasi silang, kami merekomendasikan ujung pipet dengan penghalang aerosol)
- Penangas air atau perangkat serupa yang mampu menampung tabung sentrifugasi 50 ml pada suhu 60 °C.
- Blok pemanas atau perangkat serupa yang mampu melakukan inkubasi pada suhu 56 °C†
- Es yang dihancurkan
- Sentrifugasi atas meja* dengan rotor untuk tabung reaksi 2 ml
- Vorteks
- Instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*† dengan saluran fluoresens untuk Cycling Green dan Cycling Yellow (masing-masing deteksi FAM dan HEX)
- Perangkat lunak Rotor-Gene Q, versi 2.3.5 atau lebih baru
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, untuk digunakan dengan 72-well rotor (no. kat. 981103 atau 981106)
- Tabung mikrosentrifugasi DNase, RNase, dan Bebas DNA untuk penyiapan campuran master
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, blok aluminium untuk pengaturan reaksi manual dengan pipet saluran tunggal (QIAGEN, kat. no. 9018901)

* Pastikan bahwa instrumen telah diperiksa dan dikalibrasi sesuai dengan rekomendasi produsen.

† Di beberapa negara, jika sesuai, instrumen Rotor-Gene Q 5plex HRM dengan tanggal produksi Mei 2011 atau yang lebih baru dapat digunakan. Tanggal produksi dapat diperoleh dari nomor seri pada sisi belakang instrumen.

Nomor seri memiliki format “mmyynnn” di mana “mm” menunjukkan bulan produksi dalam digit, “yy” menunjukkan dua digit terakhir tahun pembuatan, dan “nnn” menunjukkan pengidentifikasi instrumen unik.

Peringatan dan Pencegahan

Untuk Penggunaan Diagnostik In Vitro

Untuk Penggunaan Profesional

Informasi keselamatan

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi lebih lanjut, silakan lihat lembar data keselamatan (Safety Data Sheets, SDS) yang sesuai. Panduan tersedia online dalam format PDF yang mudah dan praktis di www.qiagen.com/safety. Di sana Anda dapat menemukan, melihat, dan mencetak SDS untuk setiap kit dan komponen kit QIAGEN.

Tindakan pencegahan umum

Pengguna harus selalu memperhatikan hal-hal berikut:

- Gunakan ujung pipet DNase, RNase dan Bebas DNA dengan filter dan pastikan bahwa pipet telah dikalibrasi sesuai dengan petunjuk produsen.
- Simpan dan ekstrak bahan positif (kontrol positif dan spesimen) secara terpisah dari semua reagen lain, lalu tambahkan ke campuran reaksi dalam fasilitas di ruang yang terpisah.
- Cairkan semua komponen secara menyeluruh pada suhu kamar (15–25 °C) sebelum memulai uji kadar.
- Saat dicairkan, campurkan komponen dengan membalikkan setiap tabung 10 kali lalu sentrifugasi sekejap.

Catatan: Beri perhatian ekstrem untuk mencegah kontaminasi PCR dengan bahan kontrol sintesis. Kami menyarankan untuk menggunakan pipet khusus yang terpisah untuk menyiapkan campuran reaksi dan menambahkan templat DNA. Penyiapan dan penyaluran campuran reaksi harus dilakukan dalam area terpisah dari area yang digunakan untuk penambahan templat. Tabung Rotor-Gene Q tidak boleh dibuka setelah proses PCR telah selesai. Hal ini untuk mencegah kontaminasi laboratorium dengan produk pasca-PCR.

Catatan: Reagen telah divalidasi untuk pengaturan manual. Jika metode otomatis digunakan, ini dapat mengurangi jumlah kemungkinan reaksi karena reagen yang diperlukan untuk mengisi 'volume mati' pada instrumen ini.

Catatan: Semua reagen dalam *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit diformulasikan khusus untuk digunakan dengan pengujian yang disebutkan. Semua reagen yang disediakan dalam *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ditujukan untuk digunakan hanya dengan reagen lain dalam *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit yang sama.

Substitusi terhadap reagen dalam kit tidak boleh dilakukan jika akan menjaga kinerja yang optimal.

Catatan: Hanya gunakan polimerase DNA *Taq* (*Taq*) yang disediakan dalam kit. Jangan melakukan substitusi dengan polimerase DNA *Taq* dari kit lain pada tipe yang sama atau yang lain, atau dengan polimerase DNA *Taq* dari pemasok lain.

Catatan: Reagen untuk *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit telah diencerkan secara optimal. Kami tidak menyarankan pengenceran reagen lebih lanjut karena hal ini dapat menyebabkan hilangnya kinerja. Kami tidak menyarankan penggunaan volume reaksi kurang dari 25 µl, karena hal ini akan meningkatkan risiko negatif palsu.

Penyimpanan dan Penanganan Reagen

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit dikirimkan dengan es kering. Jika terdapat komponen *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit yang tidak beku saat kedatangan, kemasan luar telah terbuka selama transit, atau pengiriman tidak berisi nota pengemasan, Petunjuk Penggunaan, atau reagen lain, silakan hubungi salah satu Departemen Layanan Teknis QIAGEN atau distributor setempat (kunjungi www.qiagen.com).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit harus disimpan segera setelah diterima pada suhu -30 hingga -15 °C dalam lemari pembeku dengan suhu konstan dan terlindung dari cahaya. Jika disimpan dalam kondisi penyimpanan yang ditetapkan, *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit tetap stabil hingga tanggal kedaluwarsa yang tertera.

Setelah dibuka, reagen dapat disimpan dalam kemasan aslinya pada suhu -30 hingga -15 °C selama 12 bulan atau hingga tanggal kedaluwarsa yang tertera, mana pun yang terjadi lebih dulu. Hindari pencairan dan pembekuan berulang. Jangan melebihi maksimal delapan siklus beku-cair.

Reagen harus dicairkan pada suhu sekitar selama minimal 1 jam dan maksimal 4,5 jam. Setelah reagen siap digunakan, reaksi PCR dapat disiapkan dan tabung Rotor-Gene Q yang mengandung campuran master dan sampel DNA harus segera dimuat dalam Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Total waktu sejak dimulainya pengaturan PCR hingga dimulainya operasi tidak boleh lebih dari:

- 6 jam jika disimpan pada suhu sekitar
Catatan: Waktu ini mencakup pengaturan PCR dan penyimpanan.
- 18 jam jika disimpan dalam lemari pendingin ($2-8$ °C)
Catatan: Waktu ini mencakup pengaturan PCR dan penyimpanan.

Catatan: Scorpions (seperti dengan semua molekul berlabel fluoresens) dalam reagen campuran reaksi sensitif terhadap cahaya. Lindungi reagen campuran reaksi dan kontrol dari cahaya untuk menghindari pemutihan foto.

Reagen dalam *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit diencerkan secara optimal dan tidak ada perlakuan atau pemurnian lebih lanjut yang perlu dilakukan sebelum digunakan dalam analisis seperti arahan dari Penggunaan (Buku Pegangan) *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Tanggal kedaluwarsa dan kondisi penyimpanan yang tercetak pada kotak dan label di semua komponen harus diperhatikan. Jangan gunakan komponen yang disimpan dengan tidak benar atau kedaluwarsa.

Penyimpanan dan Penanganan Spesimen

Catatan: Semua sampel harus diperlakukan sebagai bahan yang berpotensi menular.

Bahan sampel harus berupa DNA genomik manusia yang diekstrak dari plasma. Spesimen harus dipindahkan sesuai dengan metodologi patologi standar untuk menjamin kualitas spesimen.

Prosedur

Ekstraksi DNA

Karakteristik kinerja untuk kit ini telah diperoleh menggunakan DNA yang diekstrak dengan QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (no. kat. 55114). Saat menggunakan QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, lakukan ekstraksi DNA sesuai dengan petunjuk dalam buku pegangan yang menyatakan hal-hal berikut:

- Volume awal plasma adalah 2 ml.
- Sebelum ekstraksi DNA, 2 ml plasma harus disentrifugasi pada 3000 rpm selama 2 menit dan supernatan dipindahkan ke tabung yang bersih.
- Volume Proteinase K harus sebanyak 250 µl.
- Pencernaan Proteinase K harus dilakukan selama 1 jam pada suhu 60 °C.
- DNA genomik yang dimurnikan harus dielusi dalam 55 µl Buffer AVE (tersedia dalam QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Simpan DNA genomik yang dimurnikan pada suhu -30 hingga -15 °C.

Catatan: Semua uji kadar dalam *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit menghasilkan produk PCR pendek. Akan tetapi, *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit tidak akan bekerja dengan DNA yang terfragmentasi secara drastis.

Protokol: Deteksi Mutasi EGFR

Poin penting sebelum memulai

- Untuk mendapatkan hasil yang tepat, pastikan prosedur pencampuran yang dijelaskan dilakukan di setiap tahap pencampuran proses pengaturan uji kadar.
- Maksimal 16 sampel dapat dinilai di setiap proses.
- Sebelum memulai prosedur, baca “Tindakan pencegahan umum,” halaman 12.
- Luangkan waktu untuk membiasakan diri Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sebelum memulai protokol. Lihat manual pengguna instrumen.
- Jangan melakukan proses vorteks Polimerase DNA *Taq* (*Taq*) atau campuran apa pun yang mengandung polimerase DNA *Taq*, karena hal ini dapat menonaktifkan enzim.
- Masukkan *Taq* dengan meletakkan ujung pipet di bawah permukaan cairan agar ujungnya tidak terlapsi lebih enzim.
- Untuk setiap sampel DNA, uji kadar mutasi dan kontrol harus dianalisis dalam proses PCR yang sama untuk menghindari variasi proses-ke-proses.
- Untuk penggunaan reagen yang efisien dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, tetapkan batch sampel DNA sejauh mungkin untuk menciptakan proses lengkap. Pengujian sampel secara individu atau dalam jumlah kecil menghabiskan lebih banyak reagen dan mengurangi jumlah keseluruhan sampel yang dapat diuji dengan satu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Hal yang harus dilakukan sebelum memulai

- Sebelum setiap penggunaan, semua reagen perlu dicairkan sepenuhnya selama minimal 1 jam dan maksimal 4,5 jam pada suhu ruang (15–25 °C), dicampurkan dengan membalikkan 10 kali, dan sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi di bagian dasar tabung.
- Pastikan bahwa *Taq* dalam suhu ruang (15–25 °C) sebelum tiap penggunaan. Sentrifugasi tabung sekejap untuk mengumpulkan enzim di bagian dasar tabung.
- Campurkan semua sampel dengan membalikkan 10 kali, lalu sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi di bagian dasar tabung.

Prosedur

1. Cairkan semua campuran reaksi sepenuhnya, Air Bebas Nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat (NTC), dan Kontrol Positif (PC) EGFR pada suhu ruang (15–25 °C) selama minimal 1 jam (Tabel 1). Jika reagen telah dicairkan, campurkan dengan membalik masing-masing tabung 10 kali untuk menghindari konsentrasi garam yang terlokalisasi, lalu sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi pada bagian dasar tabung.

Tabel 1. Waktu pencairan, waktu pengaturan PCR, dan suhu penyimpanan

Waktu minimal pencairan	Waktu maksimal pencairan	Suhu penyimpanan setelah pengaturan PCR	Maksimal waktu pengaturan PCR dan penyimpanan
1 jam	4,5 jam	Suhu sekitar (15–25 °C)	6 jam
1 jam	4,5 jam	2–8 °C	18 jam

Catatan: Pengaturan PCR harus dilakukan pada suhu sekitar. Penyimpanan merujuk pada waktu antara selesainya pengaturan PCR dan dimulainya proses PCR pada Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Catatan: Bawa polimerase DNA *Taq* (tabung *Taq*) pada suhu sekitar (15–25 °C) di waktu yang sama seperti reagen lain (lihat “Penyimpanan dan Penanganan Reagen,” halaman 14). Sentrifugasi tabung sekejap untuk mengumpulkan enzim di bagian dasar tabung.

2. Lakukan tahap-tahap berikut:

- 2a. Beri label empat tabung mikrosentrifugasi (tidak disediakan) sesuai dengan campuran reaksi terkait yang ditunjukkan dalam Tabel 2.
- 2b. Siapkan campuran master secukupnya (campuran reaksi mutasi atau kontrol [tabung CTRL, T790M, Penghapusan, L858R]) dan polimerase DNA *Taq* [*Taq*] untuk sampel DNA, satu reaksi Kontrol Positif (tabung PC) EGFR, dan satu Air Bebas Nuklease untuk reaksi Kontrol Tanpa Templat (tabung NTC) sesuai dengan volume dalam Tabel 2.

Catatan: Sertakan reagen untuk satu sampel tambahan untuk membiarkan lebih yang memadai untuk pengaturan PCR.

Campuran master mengandung semua komponen yang diperlukan untuk PCR kecuali sampel.

Tabel 2. Persiapan campuran master*

Uji Kadar	Tabung campuran reaksi	Volume campuran reaksi	Volume polimerase DNA <i>Taq</i> (tabung <i>Taq</i>)
Kontrol	CTRL	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
T790M	T790M	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
Penghapusan	Del	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
L858R	L858R	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$

* Saat menyiapkan campuran master, siapkan secukupnya untuk satu sampel tambahan untuk membiarkan adanya kelebihan yang memadai untuk pengaturan PCR.

Catatan: Saat menyiapkan campuran master, volume yang diperlukan untuk campuran reaksi mutasi atau kontrol ditambahkan ke tabung yang relevan terlebih dahulu kemudian polimerase DNA *Taq* ditambahkan terakhir.

3. Letakkan sejumlah tabung 4-strip PCR (tiap strip memiliki 4 tabung) secukupnya dalam blok pemuatan sesuai dengan tata letak dalam Tabel 3. Jangan menutup tabung.

Catatan: Letakkan penutup dalam wadah plastik hingga dibutuhkan.

4. Tutup tabung untuk campuran master lalu balikkan 10 kali untuk mencampur campuran master diikuti dengan sentrifugasi sekejap untuk memastikan campuran berada di bagian dasar tabung. Segera tambahkan 20 μl campuran master ke setiap tabung strip PCR yang sesuai.
5. Segera tambahkan 5 μl Air Bebas Nuklease (H_2O) pada tabung strip PCR kontrol tanpa templat (tabung PCR nomor 9–12) lalu tutup tabungnya.
6. Tambahkan 5 μl dari setiap sampel ke tabung sampel (tabung PCR 5–8, 13–16 dan 17–72) lalu tutup tabungnya.
7. Tambahkan 5 μl Kontrol Positif (PC) EGFR ke tabung kontrol positif (tabung PCR nomor 1–4). Tiap sampel DNA harus diuji dengan uji kadar kontrol dan semua uji kadar mutasi. Tata letaknya ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Tata letak uji kadar kontrol dan mutasi

Uji Kadar	Kontrol		Nomor sampel							
	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	
Penghapusan	3	11	19	27	35	43	51	59	67	
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68	
					Nomor sampel					
Uji Kadar	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	
Penghapusan	7	15	23	31	39	47	55	63	71	
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72	

8. Dengan spidol permanen, tandai penutup tabung pertama dalam posisi numerik terendah dalam tiap tabung 4-strip PCR (misal, posisi 1, 5, 9, dst.) untuk menunjukkan orientasi dalam memuat tabung ke dalam rotor 72-sumuran Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Balikkan tabung yang tertutup 4 kali untuk mencampurkan sampel dan campuran reaksi.
10. Letakkan semua tabung 4-strip PCR pada posisi yang sesuai dalam rotor 72-sumuran lalu periksa apakah semua tabung berisi volume yang sama.
Catatan: Pastikan bahwa strip tabung tidak terbalik saat mentransfernya pada rotor.
11. Jika rotor penuh, isi ruang yang tersisa dengan tabung kosong tertutup.
12. Segera letakkan rotor ke dalam Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Pastikan bahwa ring penguncian (aksesori Rotor-Gene Q MDx) diletakkan di atas rotor untuk mengamankan tabung selama proses berlangsung.
13. Lihat pengaturan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (lihat "Protokol: Pengaturan Rotor-Gene Q EGFR," halaman 22) untuk membuat profil suhu dan memulai proses.

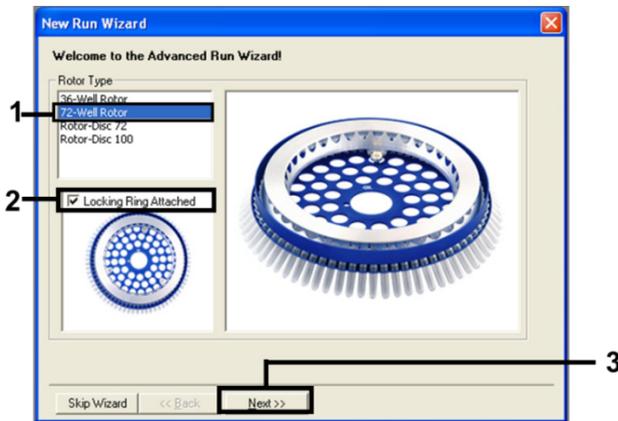
Protokol: Pengaturan Rotor-Gene Q EGFR

Parameter siklus ditunjukkan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Parameter siklus

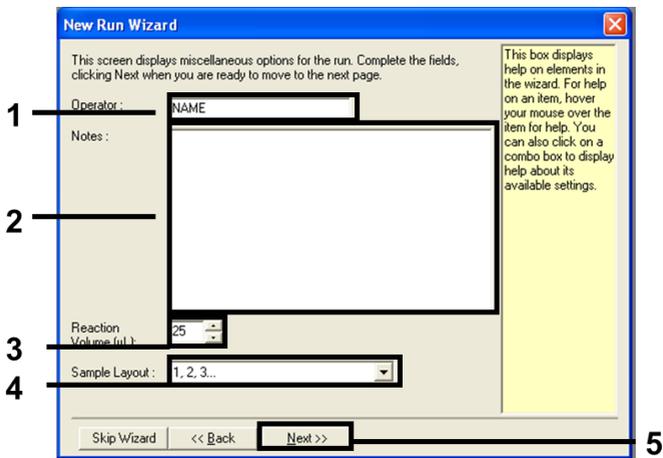
Siklus	Suhu	Waktu	Pemerolehan data
1	95 °C	15 menit	Tidak ada
40	95 °C	30 detik	Tidak ada
	60 °C	60 detik	Hijau dan Kuning

1. Klik dua kali ikon perangkat lunak Rotor-Gene Q Series Software 2.3 pada desktop laptop yang terhubung dengan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Pilih tab “Advanced” (Tingkat Lanjut) dalam kotak dialog “New Run” (Proses Baru) yang muncul.
2. Untuk membuat templat baru, pilih Empty Run (Proses Kosong), lalu klik New (Baru).
Jendela “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) akan muncul.
3. Pilih 72-Well Rotor sebagai tipe rotor. Pastikan bahwa ring penguncian terpasang lalu centang kotak Locking Ring Attached (Ring Penguncian Terpasang). Klik Next (Berikutnya) (Gambar 1).



Gambar 1. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru).

4. Masukkan nama operator dalam bidang Operator. Tambahkan catatan dan atur nilai dalam bidang Reaction Volume (Volume Reaksi) sebesar 25. Pastikan bahwa nilai dalam bidang Sample Layout (Tata Letak Sampel) diatur sebesar 1, 2, 3.... Klik Next (Berikutnya) (Gambar 2).



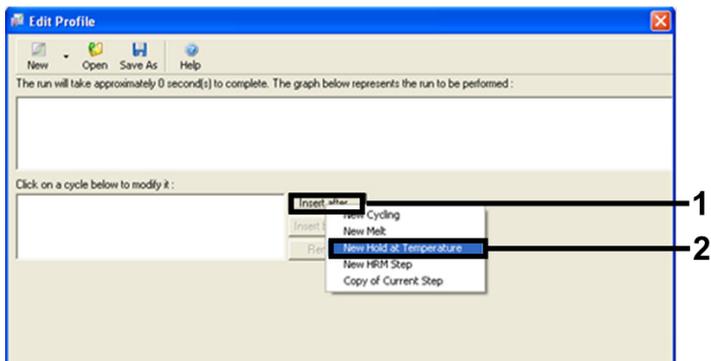
Gambar 2. Memasukkan nama operator dan volume reaksi.

5. Klik Edit Profile (Edit Profil) dalam kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) (Gambar 3) dan atur parameter proses sesuai dengan tahap berikut.



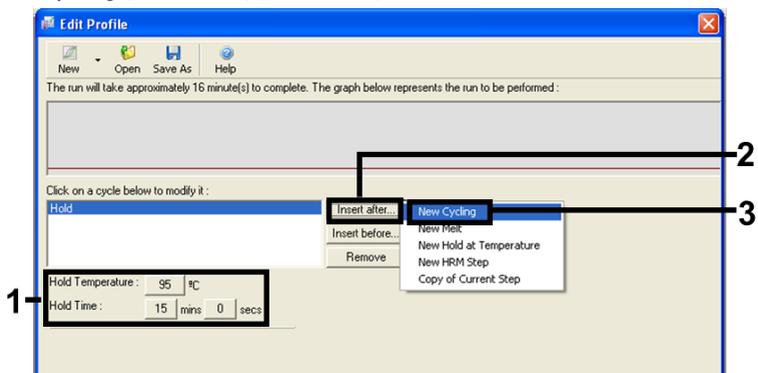
Gambar 3. Mengedit profil.

6. Klik Insert after (Sisipkan setelah) lalu pilih New Hold at Temperature (Jaga pada Suhu Baru) (Gambar 4).



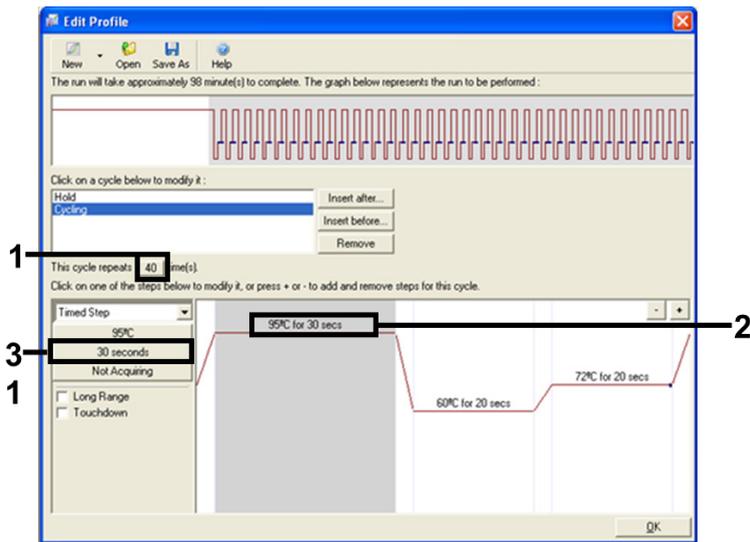
Gambar 4. Menyisipkan tahap inkubasi awal.

7. Atur nilai dalam bidang Hold Temperature (Jaga Suhu) 95 °C dan nilai dalam Hold Time (Jaga Waktu) 15 mins 0 secs (15 menit 0 detik). Klik Insert After (Sisipkan Setelah), lalu pilih New Cycling (Siklus Baru) (Gambar 5).



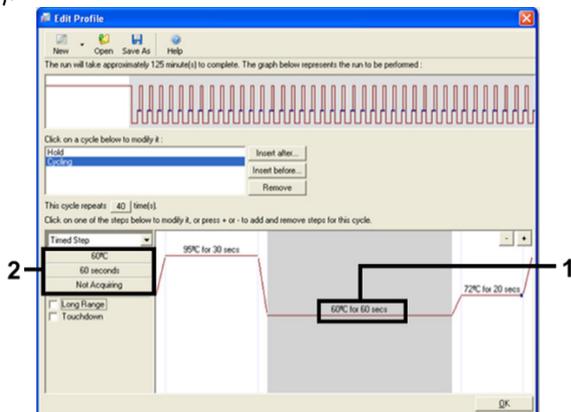
Gambar 5. Tahap inkubasi awal pada suhu 95 °C.

8. Atur jumlah pengulangan siklus menjadi 40. Pilih tahap pertama dan atur menjadi 95°C for 30 seconds (95 °C selama 30 detik) (Gambar 6).



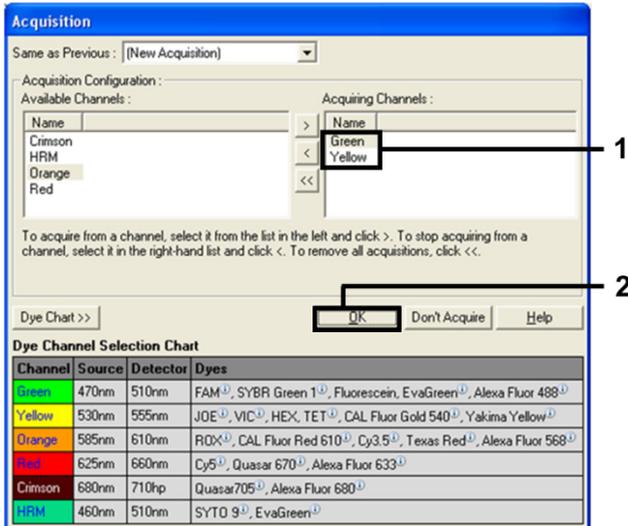
Gambar 6. Tahap siklus pada suhu 95 °C.

9. Soroti tahap kedua dan atur menjadi 60°C for 60 seconds (60 °C selama 60 detik). Klik Not Acquiring (Tidak Memperoleh) untuk mengaktifkan pemerolehan data selama tahap ini. (Gambar 7).



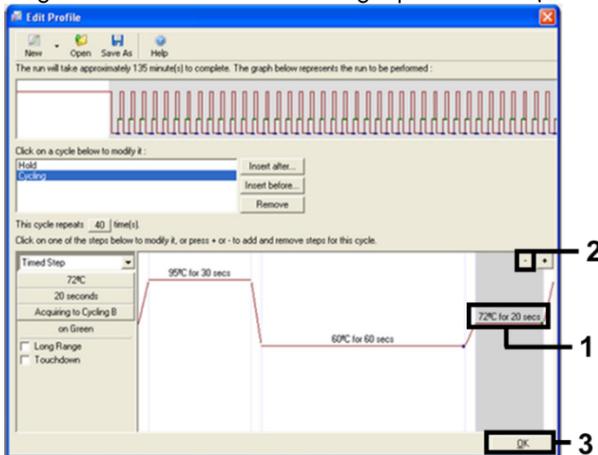
Gambar 7. Tahap siklus pada suhu 60 °C.

10. Pilih Green (Hijau) dan Yellow (Kuning) dari daftar Available Channels (Saluran yang Tersedia), lalu klik > untuk mentransfernya ke daftar Acquiring Channels (Saluran Pemerolehan). Klik OK (Gambar 8).



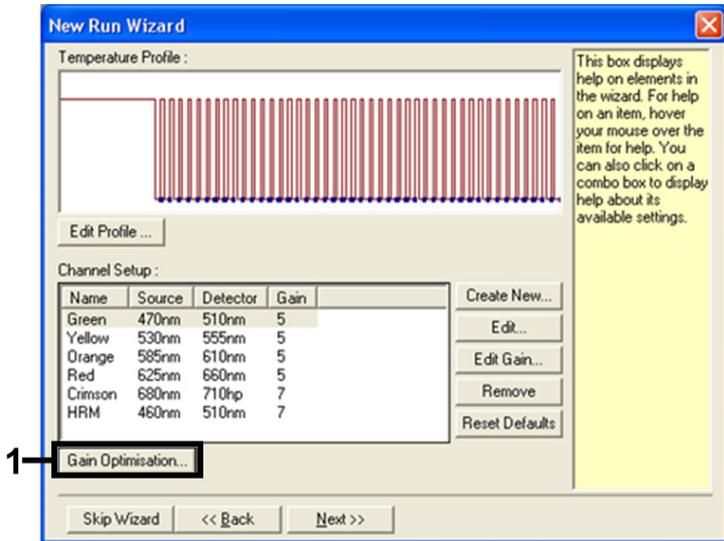
Gambar 8. Pemerolehan pada tahap siklus di suhu 60 °C.

11. Soroti tahap ketiga lalu klik tombol - untuk menghapus. Klik OK (Gambar 9).



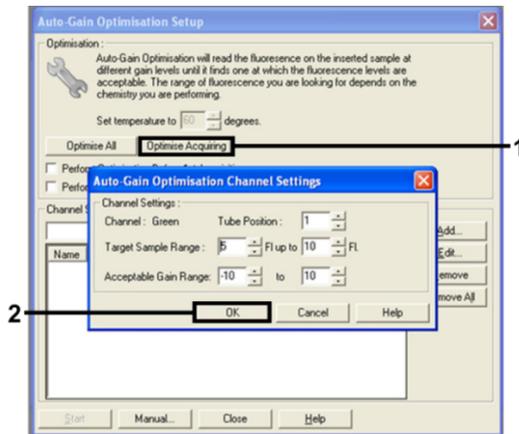
Gambar 9. Tahap penghapusan ekstensi.

12. Di kotak dialog berikutnya, klik Gain Optimisation (Dapatkan Optimasi) (Gambar 10).



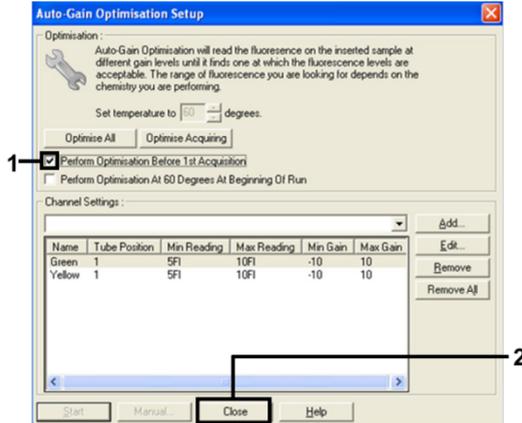
Gambar 10. Gain optimization (Dapatkan optimasi).

13. Klik Optimise Acquiring (Optimalkan Pemerolehan). Pengaturan saluran ditampilkan untuk tiap saluran. Klik OK untuk menerima nilai default kedua saluran. (Gambar 11).



Gambar 11. Auto-gain optimization (Dapatkan optimasi otomatis) untuk saluran Hijau.

14. Centang kotak Perform Optimisation before 1st Acquisition (Lakukan Optimasi sebelum Pemerolehan Pertama), lalu klik Close (Tutup) untuk kembali ke wizard (Gambar 12).



Gambar 12. Pemilihan saluran Hijau dan kuning.

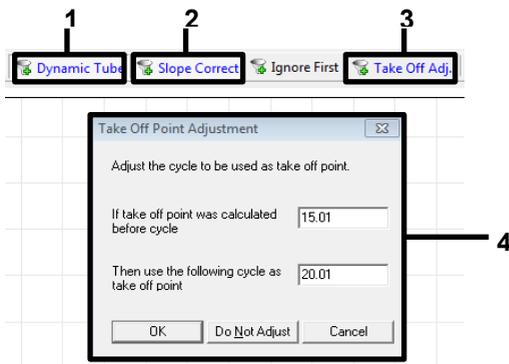
15. Klik Next (Berikutnya) untuk menyimpan templat dalam lokasi yang sesuai dengan memilih "Save Template" (Simpan Templat).

Analisis data penilaian mutasi

Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan prosedur berikut.

Mengatur analisis perangkat lunak

1. Buka file yang sesuai menggunakan Rotor-Gene Q Series Software 2.3.5 atau yang lebih baru.
2. Jika sampel belum diberi nama sebelum melakukan proses, klik Edit Samples (Edit Sampel).
3. Masukkan nama sampel, dalam kolom Name (Nama).
Catatan: Kosongkan nama setiap sumuran kosong.
4. Klik Analysis (Analisis). Di halaman analisis, klik Cycling A Yellow untuk memeriksa saluran HEX.
5. Periksa bahwa opsi Dynamic Tube (Tabung Dinamis) disoroti. Klik Slope Correct (Koreksi Kemiringan) dan Linear scale (Skala Linear).
6. Klik Take Off Adj (Penyesuaian Pelepasan) lalu masukkan 15.01 dan 20.01 seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 13.



Gambar 13. Pengaturan normalisasi analisis EGFR. 1 = "Dynamic Tube" (Tabung Dinamis), 2 = "Slope Correct" (Koreksi Kemiringan), 3 = "Take Off Adj." (Penyesuaian Pelepasan) 4 = Jendela dialog "Take Off Adj." (Penyesuaian Pelepasan) dengan nilai parameter.

7. Atur ambang batas menjadi 0,02 lalu periksa nilai C_T HEX.

8. Di halaman analisis, klik Cycling A , Green untuk menampilkan saluran FAM.
Atur parameter seperti dalam Gambar 13 di atas.
Tabung dinamis harus tersoroti.
9. Klik Slope Correct (Koreksi Kemiringan) dan Linear scale (Skala Linear).
10. Atur ambang batas menjadi 0,075 lalu periksa nilai C_T FAM.

Analisis kontrol proses

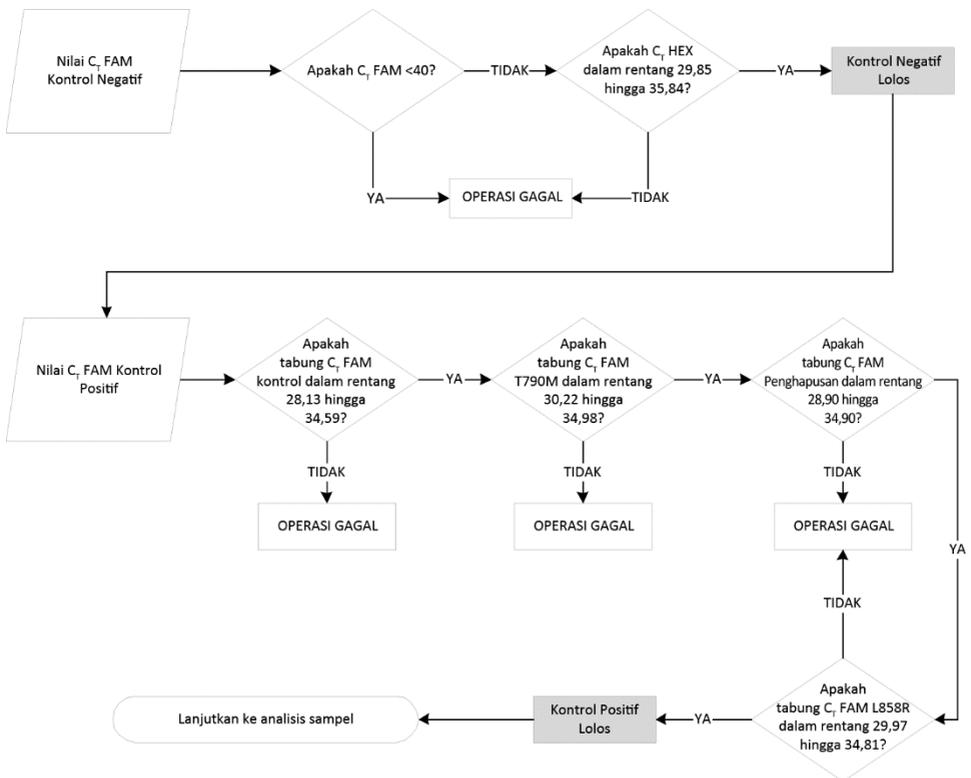
Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan berikut.

- **Kontrol negatif:** Untuk memastikan bahwa tidak ada kontaminasi templat, NTC tidak boleh menghasilkan nilai C_T dalam saluran hijau (FAM) di bawah 40. Untuk memastikan bahwa proses telah diatur dengan benar, NTC harus menampilkan amplifikasi sebesar 29,85 hingga 35,84 dalam saluran kuning (HEX) (Kontrol Internal).
Jika terdapat amplifikasi positif dalam saluran hijau dan/atau amplifikasi di luar rentang 29,85 hingga 35,84 dalam saluran kuning, maka proses tidak valid.
- **Kontrol positif:** Kontrol Positif (PC) EGFR harus menunjukkan C_T untuk setiap campuran reaksi dalam dan termasuk rentang yang ditetapkan dalam Tabel 5. Proses dengan nilai kontrol positif di luar rentang ini menunjukkan permasalahan pengaturan uji kadar dan proses harus ditetapkan sebagai kegagalan. Jika kontrol positif menunjukkan C_T dalam rentang (FAM) namun C_T kontrol internal (HEX) di luar rentang sebesar 29,85 hingga 35,84, lanjutkan analisis.

Catatan: Data sampel tidak boleh digunakan jika kontrol negatif atau positif gagal.

Tabel 5. Rentang C_T yang dapat diterima untuk kontrol proses

Kontrol Reaksi	Uji Kadar	Saluran	Rentang C_T
Kontrol positif	Kontrol	Green (FAM)	28,13–34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22–34,98
	Penghapusan	Green (FAM)	28,90–34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97–34,81
Kontrol tanpa templat	Keempat campuran reaksi	Green (FAM)	≥40,00
	Keempat campuran reaksi	Yellow (HEX)	29,85–35,84



Gambar 14. Alur kerja analisis kontrol proses.

Dengan ketentuan bahwa kedua kontrol proses valid, setiap nilai C_T uji kadar kontrol sampel harus berada dalam rentang 23,70 hingga 31,10 saluran hijau (FAM) (Tabel 6).

Tabel 6. Rentang C_T FAM yang dapat diterima untuk reaksi kontrol sampel

Campuran Reaksi	Saluran	Rentang C_T yang Dapat Diterima
Kontrol	Green (FAM)	23,70 – 31,10

Jika sampel berada di luar rentang ini, diberikan panduan berikut.

- C_T uji kadar kontrol sampel sebesar $<23,70$: Sampel dengan C_T kontrol sebesar $<23,70$ akan melebihi muatan uji kadar mutasi dan harus diencerkan. Untuk mendeteksi tiap mutasi di tingkat bawah, sampel dengan konsentrasi berlebih harus diencerkan agar berada dalam rentang atas dengan dasar bahwa pengenceran sebanyak setengah akan meningkatkan C_T sebesar 1.
- C_T uji kadar kontrol sampel $>31,10$: Sampel tidak mengandung DNA yang sesuai untuk memungkinkan analisis.

Dengan ketentuan bahwa kedua kontrol proses valid dan uji kadar kontrol berada dalam rentang yang tertera dalam Tabel 6, setiap nilai C_T mutasi sampel harus berada dalam rentang yang dirinci dalam Tabel 7 pada saluran hijau (FAM). Jika sampel berada di luar rentang ini, diberikan panduan berikut.

Tabel 7. Nilai reaksi mutasi sampel yang dapat diterima

Reaksi	Campuran reaksi	Saluran	Rentang C_T
Reaksi mutasi	T790M	Green (FAM)	0,00–40,00
	Penghapusan	Green (FAM)	0,00–40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00–40,00
	Ketiga mutasi	Yellow (HEX)	29,85–35,84

Catatan: Jika sampel tidak menghasilkan C_T (yakni, $C_T >40$), mungkin dikarenakan adanya inhibitor, kesalahan dalam pengaturan uji kadar, atau tidak ada DNA EGFR yang dapat diperkuat.

- Nilai C_T kontrol internal adalah dalam 29,85–35,84: Tidak ada DNA EGFR yang dapat diperkuat.
- Nilai C_T kontrol internal tidak dalam rentang 29,85–35,84: Hal ini dapat menunjukkan kesalahan pengaturan uji kadar atau adanya inhibitor. Pengenceran sampel dapat dilakukan untuk mengurangi pengaruh inhibitor, meski hal ini juga akan mengencerkan DNA.



Gambar 15. Bagan alir analisis mutasi.

Nilai C_T FAM uji kadar mutasi sampel

Nilai FAM untuk ketiga campuran reaksi mutasi harus diperiksa dengan nilai yang tercantum dalam Tabel 8.

Hitung nilai cutoff ΔC_T untuk setiap sampel mutasi yang menunjukkan amplifikasi positif seperti berikut ini, dengan memastikan bahwa C_T kontrol dan mutasi berasal dari sampel yang sama.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutasi} - C_T \text{ kontrol}$$

Bandungkan nilai ΔC_T untuk sampel dengan rentang cutoff ΔC_T untuk uji kadar terkait (Tabel 8), dengan memastikan bahwa titik batas yang tepat diterapkan pada tiap uji kadar.

Tabel 8. Rentang cutoff ΔC_T uji kadar mutasi

Uji kadar mutasi	Rentang cutoff ΔC_T
T790M	-10,00 \geq hingga \leq 7,40
Penghapusan	-10,00 \geq hingga \leq 8,00
L858R	-10,00 \geq hingga \leq 8,90

Batas atas rentang cutoff ΔC_T adalah titik di atas di mana sinyal positif kemungkinan dapat disebabkan karena sinyal latar belakang primer ARMS pada DNA tipe liar. Jika nilai ΔC_T sampel lebih tinggi dari titik atas rentang cutoff ΔC_T , maka digolongkan "Mutation not detected" (Mutasi tidak terdeteksi) atau di luar batas deteksi kit. Jika nilai sampel berada dalam titik cutoff ΔC_T , sampel dianggap positif untuk mutasi yang terdeteksi oleh uji kadar tersebut. Jika nilai sampel di bawah batas bawah rentang cutoff ΔC_T , hal ini mungkin berpotensi karena artefak fluoresens.

Catatan: Untuk sampel yang tidak menunjukkan C_T mutasi FAM, evaluasi C_T kontrol internal (HEX) diperlukan untuk menentukan apakah mutasi tidak terdeteksi atau apakah uji kadar tidak valid. Jika nilai C_T HEX antara 29,85 dan 35,84, maka mutasi tidak terdeteksi. Jika nilai cutoff ΔC_T HEX berada di luar rentang ini, maka sampel tidak valid.

Ringkasnya, untuk setiap sampel, tiap reaksi mutasi akan diberi status mutasi terdeteksi, mutasi tidak terdeteksi, atau tidak valid menggunakan kriteria berikut.

- **Mutasi terdeteksi:** Positif amplifikasi FAM dan ΔC_T berada dalam rentang cutoff ΔC_T . Jika beberapa mutasi terdeteksi, seluruhnya dapat dilaporkan.
- **Mutasi tidak terdeteksi:**
 - Positif amplifikasi FAM dan nilai cutoff ΔC_T di atas rentang cutoff ΔC_T dan HEX (kontrol internal) dalam 29,85–35,84.
 - Negatif amplifikasi FAM dan HEX (kontrol internal) dalam 29,85–35,84.
- **Tidak valid:** Negatif amplifikasi FAM dan amplifikasi HEX di luar spesifikasi.
 - ΔC_T yang di hitung berada di bawah rentang cutoff ΔC_T dan HEX (kontrol internal) berada dalam rentang yang diharapkan. Nilai ΔC_T di bawah -10,00 menunjukkan bahwa mungkin terdapat artefak fluoresens.

Panduan Pemecahan Masalah

Panduan pemecahan masalah ini dapat berfungsi untuk memecahkan masalah yang mungkin muncul. Untuk informasi selengkapnya, lihat juga halaman Pertanyaan Umum di Pusat Dukungan Teknis kami: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Ilmuwan di Layanan Teknis QIAGEN senantiasa dengan senang hati menjawab setiap pertanyaan yang mungkin Anda miliki tentang informasi dan protokol dalam buku pegangan ini maupun teknologi uji kadar dan sampel (untuk informasi kontak, lihat sampul belakang atau kunjungi www.qiagen.com).

Komentar dan saran

Tidak ada sinyal dengan Kontrol Positif (PC) EGFR dalam saluran fluoresens Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) Saluran fluoresens yang dipilih untuk analisis data PCR tidak sesuai dengan protokol. | Untuk analisis data saluran fluoresens Cycling Green untuk PCR EGFR analitis dan saluran fluoresens Cycling Yellow untuk PCR kontrol internal. |
| b) Pemrograman yang tidak benar untuk profil instrumen Rotor Gene Q MDx 5plex HRM | Bandingkan profil suhu dengan protokol, dan jika tidak benar, ulangi proses. |
| c) Konfigurasi PCR tidak benar | Periksa tahapan kerja Anda dengan skema pemipetan lalu ulangi PCR, bila perlu. |
| d) Kondisi penyimpanan untuk satu atau beberapa komponen kit tidak sesuai dengan instruksi yang diberikan dalam "Penyimpanan dan Penanganan Reagen" (halaman 14) | Periksa kondisi penyimpanan dan tanggal kedaluwarsa (lihat label kit) dari reagen dan gunakan kit baru, bila perlu. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit sudah kedaluwarsa | Periksa kondisi penyimpanan dan tanggal kedaluwarsa (lihat label kit) dari reagen dan gunakan kit baru, bila perlu. |

Sinyal dengan kontrol negatif dalam saluran fluoresens Cycling Green dari PCR analitis

Kontaminasi terjadi selama persiapan PCR	Ulangi PCR dengan reagen baru dalam replika. Bila memungkinkan, langsung tutup tabung PCR setelah menambahkan sampel untuk diuji. Pastikan ruang kerja dan instrumen didekontaminasi secara berkala.
--	--

Beberapa ambang batas saling silang atau Δ nilai C_t di bawah rentang cut off

Pencampuran yang tidak benar selama pengaturan uji kadar	Ulangi PCR jika hal ini memengaruhi kontrol atau uji ulang sampel yang gagal. Ikuti Petunjuk Penggunaan, dengan memperhatikan secara cermat tahapan pencampuran.
--	---

Kontrol Kualitas

Sesuai dengan Sistem Manajemen Kualitas bersertifikat ISO dari QIAGEN, setiap *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* telah diuji spesifikasinya yang telah ditentukan untuk memastikan kualitas produk yang konsisten.

Batasan

Hasil dari produk harus diinterpretasikan dalam konteks semua temuan laboratorium dan klinis terkait dan tidak untuk digunakan secara terpisah untuk diagnosis.

Produk ini hanya untuk digunakan oleh personel yang mendapat instruksi khusus dan terlatih dalam prosedur diagnostik *in vitro* dan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Studi validasi analitik meliputi DNA manusia yang diekstrak dari sampel plasma.

Produk ini ditujukan hanya untuk digunakan pada *cycler real-time PCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*.

Kepatuhan ketat terhadap *Buku Pegangan theascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* diperlukan untuk hasil yang optimal. Pengenceran reagen, selain sebagaimana yang diuraikan dalam buku pegangan ini, tidak direkomendasikan dan akan menyebabkan hilangnya kinerja.

Tanggal kedaluwarsa dan kondisi penyimpanan yang tercetak pada kotak dan label di semua komponen harus diperhatikan. Jangan gunakan komponen yang disimpan dengan tidak benar atau kedaluwarsa.

Primer dalam campuran Reaksi Penghapusan EGFR telah dirancang untuk menargetkan beberapa penghapusan Ekson 19, yang merentangkan nukleotida 55174772 hingga 55174795 (GRCh38 chr7), rentang sebesar 23 bp.

Meski uji kadar penghapusan Ekson 19 telah tervalidasi secara analitik dan ditunjukkan untuk mendeteksi penghapusan tertentu dalam Ekson 19 (lihat Tabel 13 dalam buku pegangan ini), akan tetapi, kemungkinan terjadi bagi mutasi tambahan (termasuk, namun tidak terbatas pada, tambahan penghapusan Ekson 19, penyisipan Ekson 19, dan mutasi L747P) untuk diperkuat oleh Campuran Reaksi Penghapusan.

Jika ada, mutasi tambahan tersebut akan memunculkan hasil "Deletions Detected" (Penghapusan Terdeteksi) untuk sampel pasien yang ditetapkan.

Selain itu, mungkin juga bagi mutasi L858Q untuk terdeteksi oleh Campuran Reaksi L858R. Sehingga, jika terdapat pada sampel pasien, mutasi L858Q dapat memunculkan hasil "L858R Mutation Detected" (Mutasi L858R Terdeteksi).

Karakteristik Kinerja

Sensitivitas analisis — batasan kosong (LOB)

Untuk menilai kinerja *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit pada tidak adanya templat dan untuk memastikan bahwa sampel kosong atau sampel dengan DNA tipe liar tidak menghasilkan sinyal analitik yang dapat mengindikasikan konsentrasi mutasi yang rendah, DNA tipe liar EGFR plasma NSCLC dievaluasi dari 59 sampel yang berbeda. Kriteria penerimaan studi (minimal 95% sampel tipe liar harus memiliki nilai cutoff ΔC_T di atas cutoff masing-masing) terpenuhi.

Batas deteksi (Limit of Detection - LOD)

LOD adalah persentase minimal DNA mutan yang dapat terdeteksi dalam latar belakang DNA tipe liar jika total DNA yang dapat diperkuat (berada dalam rentang input), memproduksi panggilan mutasi yang benar di 95% untuk setiap sampel positif mutasi (C95). Rentang kerja input DNA untuk uji kadar ditentukan oleh rentang yang telah ditentukan sebelumnya dari C_T kontrol sebesar 23,70 hingga 31,10.

LOD ditetapkan pada tingkat input DNA yang rendah (C_T kontrol sekitar 30,10) menggunakan DNA yang berasal dari jaringan FFPE untuk *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD ditetapkan menggunakan spesimen klinis FFPE dan lini sel FFPE pada tingkat input DNA yang rendah untuk mutasi EGFR tersebut.

Nilai LOD yang ditetapkan menggunakan jaringan FFPE diverifikasi untuk *therascreen* EGFR Plasma RQG PCR Kit dengan DNA yang berasal dari sampel plasma positif mutan yang dibuat.

Klaim LOD akhir yang tertera dalam Tabel 9, halaman berikutnya, menunjukkan persentase mutasi yang menunjukkan prediksi probabilitas panggilan tepat, sebesar 95% untuk masing-masing mutasi.

Tabel 9. LOD untuk setiap uji kadar mutasi EGFR

Ekson	Mutasi	ID COSMIC*	% klaim LOD
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43 [†]
		12419	16,87 [†]
		12422	3,24 [†]
		6218	9,83 [†]
		6210	7,44 [†]
		6254	10,2*
		12370	8,1*
		19	Penghapusan
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*

* Klaim LOD yang terverifikasi dalam plasma sebagai bagian dari studi konfirmasi LOD *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

[†] Mutasi ini tidak terkonfirmasi dalam plasma.

Sensitivitas analisis – Cutoff ΔC_T dan rentang cutoff ΔC_T

Pendekatan berbasis risiko dilakukan sehubungan dengan tingkat positif palsu saat mengatur cutoff uji kadar, dan nilai LOB yang diperkirakan digunakan sebagai satu komponen dalam mengembangkan nilai cutoff.

Rentang cutoff ΔC_T masing-masing yang ditetapkan untuk setiap uji kadar mutasi dalam *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit disajikan dalam Tabel 10.

Tabel 10. Rentang cutoff C_T *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit Δ

Uji kadar mutasi	Rentang cutoff ΔC_T
T790M	-10,00 \geq hingga \leq 7,40
Penghapusan	-10,00 \geq hingga \leq 8,00
L858R	-10,00 \geq hingga \leq 8,90

Pengulangan dan reproduksibilitas

Pengulangan dan reproduksibilitas dinilai dengan menguji tingkat mutasi pada 3xLOD dalam latar belakang DNA genomik tipe liar pada 3 lokasi pengujian menggunakan beberapa batch kit, operator, dan proses di hari yang berbeda, dengan 2 replika dari setiap sampel. Untuk 3 uji kadar mutasi, 100% sampel DNA mutan menguji positif-mutasi. Sampel tipe liar menguji negatif-mutasi di semua uji kadar pada semua lokasi.

Pengaruh input DNA terhadap nilai C_T

Tingkat input DNA ditetapkan sebagai total jumlah DNA EGFR yang dapat diperkuat dalam sampel seperti yang ditentukan oleh nilai C_T dari reaksi kontrol. Untuk menunjukkan bahwa kinerja *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit konsisten di seluruh rentang C_T reaksi kontrol (23,70–31,10), 3 uji kadar mutasi EGFR diuji terhadap seri pengenceran 1-in-3, enam-titik (DNA yang diekstrak dari lini sel FFPE). C_T target untuk pengenceran satu, untuk tiap mutasi,

adalah sekitar 24,70. Pengenceran akhir, yang menunjukkan C_T sekitar 32–33, berada di luar rentang C_T reaksi kontrol. Secara keseluruhan, nilai cutoff ΔC_T yang diukur di berbagai tingkat total input DNA konsisten di seluruh rentang kerja *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Zat yang mengganggu

Zat yang mengganggu endogen

Zat yang berpotensi mengganggu dimasukkan ke dalam sampel plasma positif mutan 3xLOD yang dibuat. Kemudian sampel diuji dengan *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Sampel yang mengandung zat yang berpotensi mengganggu dibandingkan dengan sampel plasma positif mutan 3xLOD yang dibuat yang mengandung zat yang mengganggu yang tidak dimasukkan. Setiap zat yang mengganggu diuji dengan 4 replika.

Selisih $>2x$ simpangan baku (SD) (diambil dari studi presisi) antara ΔC_T “pengujian” dan “kontrol” (yakni, tidak ada zat yang mengganggu) dianggap menunjukkan potensi gangguan. Dalam hal ini, selisih yang diamati dalam ΔC_T diberikan.

Konsentrasi pengujian yang tercantum dalam Tabel 11 dipilih berdasarkan panduan yang tersedia dalam panduan CLSI EP07-A2 dan merupakan perwakilan konsentrasi maksimal yang diharapkan untuk diamati dalam sampel klinis.

Catatan: Senyawa endogen ini dimasukkan ke dalam sampel plasma positif mutan yang dibuat yang terdiri dari plasma dari donor sehat. Sehingga, senyawa endogen ini akan secara alami terdapat dalam sampel pada konsentrasi yang belum diketahui sebelum dimasukkan. Konsentrasi akhir untuk setiap zat yang berpotensi mengganggu endogen yang diuji akan cenderung lebih besar dari konsentrasi uji.

Tabel 11. Zat yang berpotensi mengganggu endogen

Zat yang berpotensi mengganggu (IS)	Konsentrasi uji
Bilirubin tak terkonjugasi	150 mg/dl
Hemoglobin (manusia)	0,2 g/dl
Trigliserida	3 g/dl

Uji kadar T790M

Senyawa endogen berikut pada konsentrasi yang tertera dalam Tabel 11 ditunjukkan memiliki pengaruh $>2xSD$ (ΔC_T 0,40) pada kinerja uji kadar T790M:

- Trigliserida, selisih ΔC_T 1,37

Uji kadar penghapusan

Senyawa endogen berikut pada konsentrasi yang tertera dalam Tabel 11 ditunjukkan memiliki pengaruh $>2xSD$ (ΔC_T 0,71) pada kinerja uji kadar penghapusan:

- Hemoglobin, selisih ΔC_T 0,80

Uji kadar L858R

Senyawa endogen berikut pada konsentrasi yang tertera dalam Tabel 11 ditunjukkan memiliki pengaruh $>2xSD$ (ΔC_T 0,56) pada kinerja uji kadar L858R:

- Bilirubin, selisih ΔC_T 1,13
- Trigliserida, selisih ΔC_T 1,53

Zat yang mengganggu eksogen

Zat yang berpotensi mengganggu dimasukkan ke dalam sampel plasma positif mutan 3xLOD yang dibuat. Kemudian sampel diuji dengan *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Sampel yang mengandung zat yang berpotensi mengganggu dibandingkan dengan sampel plasma positif mutan 3xLOD yang dibuat, yang mengandung zat yang mengganggu yang tidak dimasukkan. Setiap zat yang mengganggu diuji dengan 4 replika.

Selisih >2x simpangan baku (diambil dari studi presisi) antara ΔC_T "pengujian" dan ΔC_T "kontrol" (yakni, tidak ada zat yang mengganggu) dianggap menunjukkan potensi gangguan. Dalam hal ini, selisih yang diamati dalam ΔC_T diberikan.

Konsentrasi pengujian yang tercantum dalam Tabel 12 dipilih berdasarkan panduan yang tersedia dalam panduan CLSI EP07-A2 dan merupakan lebih konsentrasi terapeutik di semua kasus.

Tabel 12. Zat yang berpotensi mengganggu endogen

Zat yang berpotensi mengganggu (IS)	Konsentrasi uji ($\mu\text{g/ml}$)
Citalopram hidrobromida	0,75
Paroksetin hidroklorida hemihidrat	1,14
Sertralin hidroklorida	0,67
Fluoksetin hidroklorida	3,87
Asetaminofen	200,7
K ₂ EDTA	3600

Uji kadar T790M

Senyawa eksogen berikut pada konsentrasi yang tertera dalam Tabel 12 ditunjukkan memiliki pengaruh $>2xSD$ (ΔC_T 0,40) pada kinerja uji kadar T790M:

- Citalopram hidrobromida, selisih ΔC_T 0,52
- Sertralin hidroklorida, selisih ΔC_T 0,47
- Fluoksetin hidroklorida, selisih ΔC_T 0,48

Uji kadar penghapusan

Senyawa eksogen berikut pada konsentrasi yang tertera dalam Tabel 12 ditunjukkan memiliki pengaruh $>2xSD$ (ΔC_T 0,71) pada kinerja uji kadar penghapusan:

- Fluoksetin, selisih ΔC_T 0,73

Uji kadar L858R

Senyawa eksogen berikut pada konsentrasi yang tertera dalam Tabel 12 ditunjukkan memiliki pengaruh $>2xSD$ (ΔC_T 0,56) pada kinerja uji kadar L858R:

- Citalopram hidrobromida, selisih ΔC_T 0,72
- Paroksetin hidroklorida hemihidrat, selisih ΔC_T 0,92
- Sertralin hidroklorida, selisih ΔC_T 0,82
- Fluoksetin hidroklorida, selisih ΔC_T 0,98
- Asetaminofen, selisih ΔC_T 0,81
- K₂ EDTA, selisih ΔC_T 0,57

Kinerja klinis

Uji klinis NCT01203917 adalah studi fase-IV, berlabel terbuka, lengan-tunggal (single-arm) untuk menilai efisiensi dan keselamatan/tolerabilitas gefitinib lini pertama dalam pasien Kaukasian dengan NSCLC positif mutasi EGFR, tahap IIIA/B/IV.

Kelayakan pasien untuk pendaftaran uji klinis NCT01203917 ditentukan oleh adanya mutasi kepekaan EGFR. Status mutasi EGFR pasien NSCLC dinilai menggunakan Uji Kadar Uji Klinis (Clinical Trial Assay, CTA), dengan DNA dari sampel plasma dan jaringan yang cocok. Studi ini terdiri dari tujuan eksploratori biomarker yang telah direncanakan sebelumnya untuk menentukan apakah sampel plasma dapat dipertimbangkan untuk analisis mutasi jika sampel jaringan tidak tersedia. Hasilnya menunjukkan tingkat tinggi pada kesesuaian antara sampel plasma dan jaringan yang cocok pada persentase 94,3%, dengan spesifisitas uji kadar 99,8% dan sensitivitas sebesar 65,7%.

Pengujian retrospektif spesimen plasma dari pasien yang disaring untuk uji klinis NCT01203917 dilakukan menggunakan *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Studi yang menjembatani dilakukan untuk menilai kesesuaian *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit dengan CTA yang digunakan untuk memilih pasien untuk uji klinis NCT01203917. Ekuivalensi antara CTA dan *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ditunjukkan.

Referensi

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

Informasi Kontak

Untuk bantuan teknis dan informasi lebih lanjut, silakan lihat Pusat Dukungan Teknis kami di www.qiagen.com/Support, hubungi 00800-22-44-6000, atau hubungi salah satu Departemen Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal (lihat sampul belakang atau kunjungi www.qiagen.com).

Simbol

Simbol berikut ini mungkin terdapat di kemasan dan label:

Simbol	Definisi simbol
 Σ <N>	Berisi reagen yang cukup untuk reaksi <N>
	Gunakan sebelum
	Perangkat medis diagnostik in vitro
	Nomor katalog
	Nomor lot
	Nomor materi
	Komponen
	Mengandung
	Nomor
	Nomor Item Perdagangan Global
	Batas suhu
	Produsen
	Baca petunjuk penggunaan
	Perhatian

Lampiran A: Detail Mutasi

Tabel 13 menunjukkan ID COSMIC yang diambil dari Katalog Mutasi Somatis dalam Kanker (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabel 13. Daftar mutasi dan ID COSMIC

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

Informasi Pemesanan

Produk	Isi	No. Kat.
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – untuk deteksi mutasi dalam gen EGFR		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Untuk 24 reaksi: 1 Uji Kadar Kontrol, 7 Uji Kadar Mutasi, Kontrol Positif, Polimerase DNA <i>Taq</i>	870311
Rotor-Gene Q MDx dan aksesoris		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cycler real-time PCR dan penganalisis Pelelehan Resolusi Tinggi dengan 5 saluran (hijau, kuning, jingga, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, komputer laptop, perangkat lunak, aksesoris, 1-tahun garansi suku cadang dan tenaga kerja, tidak termasuk pemasangan dan pelatihan	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cycler real-time PCR dan penganalisis Pelelehan Resolusi Tinggi dengan 5 saluran (hijau, kuning, jingga, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, komputer laptop, perangkat lunak, aksesoris, 1-tahun garansi suku cadang dan tenaga kerja, pemasangan, dan pelatihan	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Blok aluminium untuk pengaturan reaksi manual dengan pipet bersaluran tunggal dalam tabung 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strip 4 tabung dan penutup untuk 1000 reaksi	981103

Produk	Isi	No. Kat.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strip 4 tabung dan penutup untuk 10.000 reaksi	981106
Produk terkait		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Untuk 50 penyiapan: QIAamp Mini Columns, Tube Extenders (20 ml), QIAGEN Proteinase K, Carrier RNA, Buffers, VacConnectors, dan Collection Tubes (1,5 ml dan 2 ml)	55114

Untuk informasi pelisensian terbaru dan penafian produk-spesifik, lihat buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN. Buku pegangan atau panduan pengguna kit QIAGEN tersedia di www.qiagen.com atau dapat dipesan dari Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal Anda.

Riwayat Revisi Dokumen

Dokumen	Perubahan
R3, Januari 2019	Tambahan Perwakilan Resmi (sampul depan). Bagian "Simbol" diperbarui.
R4, Oktober 2019	<p>Perubahan produsen legal (halaman sampul)</p> <p>Adaptasi nama instrumen dari Rotor-Gene Q MDx menjadi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM agar selaras dengan nama pada label instrumen</p> <p>Koreksi petunjuk penyimpanan reagen dari 90 hari menjadi 12 bulan atau hingga tanggal kedaluwarsa</p> <p>Pembaruan bagian Batasan dengan informasi sehubungan dengan uji kadar penghapusan ekson 19 dan uji kadar L858R</p> <p>Revisi Tabel 9 untuk menggantikan ekson 21 L858R yang diduplikat dengan Penghapusan ekson 19</p> <p>Simbol EC + REP dihapus dari halaman depan dan bab Simbol</p>
R5, Juni 2020	<p>Pembaruan referensi pada versi perangkat lunak RGQ dari 2.3 menjadi 2.3.5 atau yang lebih baru</p> <p>Pembaruan Tabel 8 dan 10 untuk menerapkan rentang cutoff ΔC_T yang baru dan menyesuaikan semua deskripsi terkait yang sesuai di seluruh buku pegangan</p> <p>Pembaruan semua bab Protokol untuk menyertakan informasi tentang pentingnya pencampuran dalam bagian Poin penting sebelum memulai; menyoroti detail pencampuran di semua tahapan pencampuran</p> <p>Penambahan tahap pencampuran pada bagian "Protokol: Deteksi Mutasi EGFR"</p> <p>Pembaruan bagian "Pemecahan Masalah" untuk menambahkan solusi terhadap beberapa ambang batas saling silang</p>

Halaman ini sengaja dikosongkan

Perjanjian Lisensi Terbatas untuk *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

1. Penggunaan produk ini menyatakan perjanjian pembeli atau pengguna produk dengan ketentuan berikut:
2. Produk hanya boleh digunakan sesuai dengan protokol yang disediakan bersama produk dan buku pegangan ini dan hanya digunakan dengan komponen yang terdapat di dalam kit saja. QIAGEN tidak memberikan lisensi apa pun berdasarkan kekayaan intelektualnya untuk menggunakan atau menggabungkan komponen yang tersedia dengan kit ini dengan komponen apa pun yang tidak termasuk dalam kit ini kecuali sebagaimana dijelaskan dalam protokol yang disediakan dengan produk, buku pegangan ini, dan protokol tambahan yang tersedia di www.qiagen.com. Beberapa protokol tambahan ini telah disediakan oleh pengguna QIAGEN bagi pengguna QIAGEN. Protokol-protokol tersebut belum diuji secara menyeluruh atau dioptimalkan oleh QIAGEN. QIAGEN tidak memberi garansi atau menjamin bahwa protokol tersebut tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
3. Selain lisensi yang dinyatakan secara tegas, QIAGEN tidak membuat jaminan bahwa kit ini dan/atau penggunaannya tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
4. Kit ini serta komponennya dilisensikan untuk penggunaan satu kali dan tidak boleh digunakan kembali, diperbarui, atau dijual kembali.
5. QIAGEN secara khusus menyangkal segala lisensi lain, yang dinyatakan secara tegas maupun tersirat selain yang dinyatakan secara tegas di atas.
6. Pembeli dan pengguna kit setuju untuk tidak mengambil atau mengizinkan orang lain mengambil langkah apa pun yang dapat menyebabkan atau mendukung tindakan apa pun yang dilarang di atas. QIAGEN dapat memberlakukan larangan Perjanjian Lisensi Terbatas ini di Pengadilan mana pun, dan akan memulihkan semua biaya investigasi dan Pengadilannya, termasuk biaya pengacara, dalam tindakan apa pun untuk menegakkan Perjanjian Lisensi Terbatas ini atau hak kekayaan intelektualnya yang terkait dengan kit dan/atau komponennya.

Untuk ketentuan lisensi yang diperbarui, lihat www.qiagen.com.

Merek Dagang: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *therascreen*®, Rotor-Gene®, Scorpions® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group). Nama, merek dagang terdaftar, dll. yang digunakan di dalam dokumen ini, meski tidak secara khusus ditandai sebagaimana demikian, tidak akan dianggap sebagai tanpa perlindungan undang-undang.

1121934 06-2020 HB-1898-006 © 2020 QIAGEN, hak cipta dilindungi undang-undang

