

Kesäkuu 2020

therascreen[®] EGFR RGQ PCR Kit -sarjan käsikirja



Versio 2



In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -laitteiden kanssa



874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, SAKSA



1121935FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Yhteenveto ja selitykset.....	6
Menetelmän toimintaperiaate.....	9
Toimitetut materiaalit.....	13
Sarjan sisältö.....	13
Tarvitavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.....	14
Varoitukset ja varotoimet.....	16
Yleiset varotoimet.....	16
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	18
Kuljetusolosuhteet.....	18
Säilytysolosuhteet.....	18
Näytteen käsittely ja säilytys.....	20
Menetelmä.....	21
DNA:n eristäminen ja valmistelu.....	21
Protokolla: Näytteen arviointi.....	22
Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen.....	35
Tulosten tulkinta (automaattinen).....	48
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package -määrityspakkauksen merkinnät.....	50
Vianmääritys.....	54
Laadunvalvonta.....	55

Rajoitukset	55
Suorituskykyominaisuudet	57
Analyttinen suoritus	57
Tyhjän raja (Limit of Blank, LOB), työalue, raja-arvot ja ΔC_T -raja-arvoalueet	57
Lähtö-DNA:n vaikutus ΔC_T -arvoihin	58
Ristireagoivuus	58
Tarkkuus: Vertailu analyttiseen vertailumenetelmään	59
Havaitsemisraja (Limit of Detection, LOD) -arvot	60
Häiriöt	62
Uusittavuus	63
Kliininen suorituskyky	67
Kliinisten tulosten tiedot: GIOTRIF®	67
Kliinisten tulosten tiedot: IRESSA®	69
Lähdeviitteet	72
Symbolit	74
Liite A: <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit -sarjan manuaalinen protokolla	75
Yleistä	75
Protokolla: Lämpötilaprofilin luominen	75
Toimenpide (manuaalinen)	87
Protokolla: Näytteen arviointi (manuaalinen)	87
Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen (manuaalinen)	87
Protokolla: <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset	88
Tulosten tulkinta (manuaalinen)	93
Ohjelmiston analyysiasetukset	93

Näytteen arviointitietojen analyysi.....	95
EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi.....	96
Liite B <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package -määrittämisspaketin asennus	105
Yhteystiedot	108
Tilaustiedot	109
Asiakirjan muutoshistoria	111

Käyttötarkoitus

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja on diagnostinen in vitro -testi, jonka avulla pystytään havaitsemaan 29 EGFR-geenin somaattista mutaatiota. Se tuottaa kvalitatiivisen arvioinnin mutaation statuksesta ei-pienisoluisista keuhkosyöpää (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) sairastavilta potilailta otetuista kasvainnäytteistä.

Tulosten on tarkoitus auttaa tunnistamaan NSCLC-potilaat, jotka voivat hyötyä EGFR-tyrosiini-kinasaasin estäjähoidosta.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla testataan formaliinifiksoiduista parafiinivaletuista (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded FFPE), NSCLC-potilailta otetuista kudoksenäytteistä eristettyjä DNA-näytteitä, jotka käsitellään Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella. Se on tarkoitettu koulutettujen henkilöiden käytettäväksi ammattimaisessa laboratorioympäristössä.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja on tarkoitettu in vitro -diagnostiseen käyttöön.

Yhteenveto ja selitykset

EGFR-syöpägeenin mutaatioita on löydetty ihmisen syövästä (1, 2). Näiden mutaatioiden esiintyminen korreloi tiettyjen tyrosiinikinaasin estäjähoitojen vasteen kanssa potilailla, joilla on ei-pienisolainen keuhkosyöpä (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) (3–8). Tällaisia EGFR-syöpägeenin mutaatioita esiintyy yleisessä NSCLC-potilaspopulaatiossa noin 10 %:lla eurooppalaista tai australialaisista potilaista ja jopa 30 %:lla japanilaisista ja taiwanilaisista potilaista (1, 2, 9).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja on käyttövalmis sarja syöpään liittyvän EGFR-geenin 29 mutaation havaitsemiseen polymeraasiketjureaktiomenetelmän (Polymerase Chain Reaction, PCR) avulla Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laiteella.

Scorpions®- (10) ja ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (11) -tekniikoita käyttämällä *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan avulla voidaan havaita 29 mutaatiota EGFR-syöpägeenin eksoneissa 18, 19, 20 ja 21 villityypin genomisessa DNA:ssa (Taulukko 1).

Yhteenveto:

- 19 deleetiota eksonissa 19 (havaitsee minkä tahansa deleetion yhteensä 19 deleetiosta, mutta ei erota niitä toisistaan)
- kolme insertiota eksonissa 20 (havaitsee minkä tahansa insertion yhteensä kolmesta insertiosta, mutta ei erota niitä toisistaan)
- G719X (havaitsee G719S:n, G719A:n tai G719C:n olemassaolon, mutta ei erota niitä toisistaan)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

Käytetyt menetelmät ovat erittäin selektiivisiä ja mahdollistavat DNA:n kokonaismäärän mukaan matalan tason DNA:n mutaatioiden havaitsemisen villityypin genomisessa DNA:ssa. Annetut selektiivisyy- ja havaitsemisrajat ovat tehokkaampia kuin väriaineeseen perustuva sekvensointi.

Taulukko 1. Mutaatioluettelo ja COSMIC-tunnisteet

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Emäsjärjestyksen muutos
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deleetiot	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
		6223	2235_2249del15
		6225	2236_2250del15
		6254**	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369**	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C
12383	2239_2251>C		

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (syövän somaattisten mutaatioiden luettelo): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Taulukko 1. Mutaatioluettelo ja COSMIC-tunnisteet

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Emäsjärjestyksen muutos
20	S768I	6241	2303G>T
	Insertiot	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (syövän somaattisten mutaatioiden luettelo): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

** COSM6254 (2239_2253del15)- ja COSM12369(2240_2254del15) -mutaatiot aiheuttavat 15 emäsparin deleetioitumisen EGFR-sekvenssistä. Molemmat mutaatiot generoivat saman loppusekvenssin, ja nämä mutaatiot eivät ole erotettavissa toisistaan. Siksi mutaatio COSM6254 (2239_2253del15) on poistettu viimeisimmästä COSMIC-versiosta (v. 83) ja molemmat mutaatiot sisältyvät nyt mutaatioon COSM12369 (2240_2254del15). Tämä noudattaa HGVS:n ohjetta esittäen yleisin 3'-deleetio. *therascreen* EGFR -testi ei erottele 19 deleetion mutaatioiden välillä, ja kaikki positiiviset deleetiot on nimetty "Deletions" (Deleetiot). Tämä muutos vaikuttaa vain dokumentaatioon, ei sarjaan tai sen kykyyn havaita yksittäinen mutaatio.

Menetelmän toimintaperiaate

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja koostuu kahdeksasta erillisestä PCR-monistuksen reaktioseoksesta: seitsemästä EGFR-syöpägeenien eksonien 18, 19, 20 ja 21 mutaatiokohtaisista reaktiosta ja yhdestä eksonin 2 villityypin kontrollista. Sarjan tärkeimmät osat on esitelty alla.

ARMS

Alleeli- tai mutaatiokohtainen monistus saadaan aikaan ARMS-tekniikan avulla. *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) erottaa tehokkaasti vastaavuudet ja poikkeamat PCR-alukkeen 3'-päässä. Spesifiset mutaation läpikäyneet sekvenssit monistetaan tasaisesti näytteissä, joissa suurimmassa osassa sekvenssejä mutaatiota ei ole. Kun alukkeen vastaavuus on täydellinen, monistus jatkuu täydellä teholla. Kun 3'-pään emäs ei ole vastaava, ilmenee vain matalan tason taustan monistusta.

Scorpions

Monistuksen tunnistamisessa käytetään Scorpions-tekniikkaa. Scorpionsit ovat bifunktionaalisia molekyyliä, jotka sisältävät PCR-aluketta, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt koettimeen. Koettimen fluorofori liittyy koettimessa olevaan sammuttajaan, joka vähentää fluoresenssia. Kun koetin PCR:n aikana sitoutuu amplikoniin, fluorofori ja sammuttaja irtoavat toisistaan ja aiheuttavat fluoresenssin havaittavan kasvun.

Sarjan rakenne

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjaan sisältyy kahdeksan määrittystä:

- yksi kontrollimäärittys (CTRL)
- seitsemän mutaatiomäärittystä.

Kaikki reaktioseokset sisältävät reagensseja, joissa on karboksyylifluoreseiniä (FAM™), ja sisäisen kontrollimäärityksen, jossa on heksakloorifluoreseiniä (HEX™). Sisäinen kontrollimääritys voi havaita inhibiittoreita, jotka voivat johtaa väärin negatiivisiin tuloksiin. FAM-monistus voi ylikilpailla kontrollimonistuksen kanssa ja sisäisen kontrollin tarkoitus on vain osoittaa, että jos FAM-monistusta ei ole, tulos on todellinen negatiivinen tulos eikä syynä ole epäonnistunut PCR-reaktio.

Määritykset

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja koostuu kaksivaiheisesta toimenpiteestä. Ensimmäisessä vaiheessa suoritetaan kontrollimääritys näytteen monistettavissa olevan EGFR-DNA:n arvioimiseksi. Toisessa vaiheessa suoritetaan sekä mutaatio- että kontrollimääritys DNA:n mutaation läsnäolon vahvistamiseksi/poissulkemiseksi.

Kontrollimääritys

Kontrollimäärityksellä, jossa on FAM-merkintä, arvioidaan näytteen monistettavissa oleva EGFR-DNA. Kontrollimääritys monistaa EGFR-geenin eksoni 2 -alueen. Alukkeet ja Scorpion-koetin on suunniteltu välttämään tunnettuja EGFR-polymorfismeja.

Mutaatiomääritykset

Jokaisessa mutaatiomäärityksessä on FAM-leimattu Scorpion-koetin ja ARMS-alue, joilla erotetaan villityypin DNA ja erityinen DNA:n mutaatio.

Kontrollit

Huomautus: Kaikissa testierissä on oltava mukana positiiviset ja negatiiviset kontrollit.

Positiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana positiivinen kontrolli putkissa 1–8. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarja sisältää EGFR-positiivisen kontrollin (Positive Control, PC), jota käytetään mallina positiivisessa kontrollireaktiossa. Positiiviset kontrollitulokset arvioidaan, jotta voidaan varmistaa, että sarja toimii mainittujen hyväksyntäkriteerien vaatimusten mukaisesti.

Negatiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana negatiivinen kontrolli (No Template Control (malliton kontrolli): NTC) putkissa 9–16. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarja sisältää vettä sitä NTC:tä varten, jota käytetään "mallina" mallittomassa kontrollissa. Mallitonta kontrollia käytetään arvioimaan mahdollinen kontaminaatio erän valmistelun aikana sekä arvioimaan sisäisen kontrollin reaktion toimintaa.

Sisäisen kontrollireaktion arviointi

Jokainen reaktioseos sisältää kohdereaktion lisäksi sisäisen kontrollin (Internal Control, IC). Epäonnistuminen osoittaa, että läsnä saattaa olla inhibiittoreita, jotka voivat johtaa epätarkkaan tulokseen tai kyseessä saattaa olla testin suorittajan virheellinen putken käsittely erän valmistelun aikana. IC:ssä on EGFR:ään liittymätön oligonukleotidikohdesekvenssi, leimaamaton aluke ja HEX-leimattu Scorpions-aluke, jotta se voidaan erottaa FAM-leimatusta Scorpions-alukkeesta kontrolli- ja mutaatioreaktioseoksissa. FAM-monistus voi ylikilpailla sisäisen kontrollin monistuksen kanssa niin, että saatu IC C_T (HEX) -arvo voi olla määritetyn vaihteluvälin ulkopuolella. Näiden näytteiden FAM-tulokset ovat silti hyväksyttäviä.

Näytteen arviointi

On erittäin suoriteltavaa käyttää *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitettua kontrollireaktioseosta (CTRL-putki) näytteen monistettavissa olevan EGFR-DNA:n arvioimiseen. Kontrollimääritys monistaa EGFR-geenin eksoni 2 -alueen. On suositeltavaa valmistaa näytteitä käyttämällä ainoastaan kontrollimääritystä, käyttämällä EGFR-positiivista kontrollia positiivisena kontrollina ja malliin tarkoitettua vettä mallittomana kontrollina.

Huomautus: DNA:n arvioinnin tulisi perustua PCR:ään, ja se saattaa erota absorbanssilukemiin perustuvasta kvantifikaatiosta. Sarjan mukana toimitetaan myös ylimääräinen kontrollireaktioseos (CTRL-putki), jonka avulla voidaan arvioida näytteiden DNA:n laatu ja määrä ennen *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla suoritettavaa analyysia.

Alusta ja ohjelmisto

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja on suunniteltu käytettäväksi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteiden kanssa. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteisiin on ohjelmoitu erilaisia jakson parametrejä, ajoja *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin mukaisesti.

therascreen EGFR CE -määrityspaketti koostuu kahdesta mallista: "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" -mallista (näytteen arviointiin) ja "therascreen EGFR CE Locked Template" -mallista (EGFR-mutaatioiden havaitsemiseen). Nämä mallit sisältävän PCR-ajon parametrit ja laskevat tulokset.

Tarkoitukseen voidaan käyttää myös *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa yhdessä Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3 kanssa avoimessa tilassa (eli ilman Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE -määrityspakettia). Lisätietoja on kohdassa Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan manuaalinen protokolla.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Tuotenumero				874111
Reaktioiden määrä				24
Väri	Nimi	Putken tunnus		Määrä
Punainen	Control Reaction Mix (kontrollireaktioseos)	1	CTRL	2 x 600 µl
Violetti	T790M Reaction Mix (T790M-reaktioseos)	2	T790M	600 µl
Oranssi	Deletions Reaction Mix (deleetioiden reaktioseos)	3	Del	600 µl
Vaaleanpunainen	L858R Reaction Mix (L858R-reaktioseos)	4	L858R	600 µl
Vihreä	L861Q Reaction Mix (L861Q-reaktioseos)	5	L861Q	600 µl
Keltainen	G719X Reaction Mix (G719X-reaktioseos)	6	G719X	600 µl
Harmaa	S768I Reaction Mix (S768I-reaktioseos)	7	S768I	600 µl
Sininen	Insertions Reaction Mix (insertioiden reaktioseokset)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-positiivinen kontrolli)	9	PC	300 µl
Mintunvihreä	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA-polymeraasi)	<i>Taq</i>	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Valkoinen	Nuclease-free water for no template control (nukleasiton vesi mallittomaan kontrolliin)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Valkoinen	Nuclease-free water for dilution (nukleasiton vesi laimennukseen)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit -sarjan käsikirja				1

Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkaa, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvallisuustiedotteissa (Safety Data Sheets, SDS), joita saa tuotteen toimittajalta.

Reagenssit

- DNA:n eristysarja (katso DNA:n eristäminen ja valmistelu)

Kulutustuotteet ja yleiset laboratoriolaitteet

- tarkoitukseen sopivia pipettejä* (säädettäviä) näytteen valmisteluun
- tarkoitukseen sopivia pipettejä* (säädettäviä) PCR-päaseoksen valmisteluun
- tarkoitukseen sopivia pipettejä* (säädettäviä) malli-DNA:n annosteluun
- DNAasittomia, RNAasittomia ja DNA:ttomia, suodattimellisia pipetin kärkiä (ristikontaminaation välttämiseksi suosittelemme käyttämään pipetin kärkiä, joissa on aerosoliesteet)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, käytettäväksi tuotteen 72-well rotor kanssa (tuotenro 981103 tai 981106)
- DNAasittomat, RNAasittomat ja DNA:ttomat mikrosentrifugiputket pääseosten valmistusta varten
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, alumiinilohko manuaaliseen reaktion valmisteluun, sis. yksikanavainen pipetti (tuotenro 9018901).
- lämpösekoitin*, kuumennettava ravistava inkubaattori*, kuumennuslohko* tai vesihaude*, joka mahdollistaa inkuboinnin 90 °C:ssa
- pöytämallinen sentrifugi*, jossa roottori 2ml:n reaktioputkille
- vortex-sekoitin*

* Varmista, että välineet ja tarvikkeet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Laitteet PCR:ää varten

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite, jossa on Cycling Green- ja Cycling Yellow -fluoresenssikanava (FAM:n ja HEX:n havaitsemiseen)* †
- Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3.5 tai uudempi
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketti, versio 3.0.6 (ladattavissa *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan version 2 tuotesivulta osoitteessa www.qiagen.com. Siirry kohtaan Product Resources (Lisämateriaalit) > Supplementary Protocols (Täydentävät protokollat) ja lataa määrityspaketti.)

Huomautus: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspakkausohjelmisto vaatii Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3.5 tai uudemman.

* Varmista, että välineet ja tarvikkeet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

† Joissakin maissa voidaan tilanteen mukaan käyttää Rotor-Gene Q 5plex HRM -laitetta, jonka valmistuspäivä on toukokuussa 2011 tai myöhemmin. Valmistuspäivämäärä käy ilmi laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (Safety Data Sheets, SDS). Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voidaan tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjojen ja sarjakomponenttien käyttöturvallisuustiedotteita.

Katso Rotor-Gene Q -laitteen turvallisuustiedot laitteen mukana toimitetusta käyttöoppaasta.

Hävitä näyte- ja määritysäte paikallisten turvallisuusmääräysten mukaisesti.

Yleiset varotoimet

Noudata aina seuraavia ohjeita:

- Testi on tarkoitettu käytettäväksi FFPE NSCLC -näytteiden kanssa.
- Säilytä ja uuta positiiviset materiaalit (näytteet ja positiiviset kontrollit) erillään, poissa kaikkien muiden reagenssien läheisyydestä ja lisää ne reaktioseokseen erillisessä tilassa.
- Varmista huolellisesti, etteivät PCR:t pääse kontaminoitumaan synteettisestä kontrollimateriaalista. Suosittelemme käyttämään reaktioseosten valmistuksessa ja DNA-mallin lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä. Reaktioseosten valmistaminen ja annostelu on suoritettava eri paikassa kuin mallin lisääminen. Rotor-Gene Q -putkia ei saa avata PCR-ajon on päättymisen jälkeen. Syynä on laboratorionkontaminoitumisen estäminen PCR-ajon jälkeen.
- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.

- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan reagenssit on laimennettu optimaaliseen vahvuuteen. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen. Älä käytä reagensseja, joiden reaktiivilavuus on alle 25 µl, koska muutoin väärin negatiivisten tulosten riski kasvaa.
- Kaikki *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä korvaa *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan reagensseja tai vaihda niitä muiden *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjojen reagenssien kanssa, sillä tämä voi vaikuttaa suorituskykyyn.
- Käytä vain *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*-putki), joka toimitetaan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan yhteydessä. Älä korvaa *Taq* DNA -polymeraasia muiden saman- tai toisentyypisten sarjojen polymeraaseilla tai muiden toimittajien *Taq* DNA -polymeraaseilla.
- Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Huomautus: varmista, että testaat oikean näytteen. Varo erityisesti väärän näytteen käyttämistä, latausvirheitä ja pipetointivirheitä.

Huomautus: Reagenssit on hyväksytty käytettäväksi manuaalisessa valmistelussa. Jos käytetään automaattista menetelmää, se voi vähentää mahdollisten reaktioiden määrää, koska reagenssin on täytettävä näiden laitteiden kuolleet tilat.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kuljetusolosuhteet

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja toimitetaan pakattuna hiilihappojäähän, ja sen on oltava jäässä toimitushetkellä. Jos *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarja ei ole toimitushetkellä jäässä, ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin paikalliseen tekniseen tukipalveluun tai jälleenmyyjään (katso yhteystiedot takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytysolosuhteet

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa $-30...-15\text{ °C}$:n lämpötilassa olevaan pakastimeen valolta suojattuna. Scorpions-alkukeet (kuten kaikki fluoresoivalla aineella leimatut molekyylit) on suojattava auringonvalolta, jotta valon aiheuttama valkaisu ja suorituskyvyn menetys voidaan välttää. Alkuperäispakkauksessaan suositelluissa säilytysolosuhteissa säilytetty sarja on käyttökelpoinen etiketissä mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan $-30...-15\text{ °C}$:n lämpötilassa 12 kuukautta tai pakkauksessa olevaan viimeiseen käyttöpäivään asti (näistä ensin umpeutuvaan). Sarjan toistuvaa pakastamista ja sulattamista on vältettävä. Suosittelemme korkeintaan kahdeksaa pakastus-sulatusjaksoa.

Reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä ($15-25\text{ °C}$) vähintään 1 tunti ja enintään 4,5 tuntia. Kun reagenssit ovat valmiita käytettäväksi, PCR-reaktiot voidaan valmistella ja pääseokset sisältävät Rotor-Gene Q -putket ja DNA-näyte on lisättävä Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen välittömästi. Kokonaisuika PCR:n valmistelun aloittamisesta ajon alkuun ei saa olla yli:

- 6 tuntia, jos putkia säilytetään huoneenlämmössä

Huomautus: tämä aika sisältää sekä PCR:n valmistelun että säilytyksen.

- 18 tuntia, jos putkia säilytetään jääkaapissa (2–8 °C:ssa)

Huomautus: tämä aika sisältää sekä PCR:n valmistelun että säilytyksen.

Huomautus: testin paras mahdollinen aktivoituminen ja suorituskkyky on taattava suojaamalla Scorpions-alukkeet (kuten kaikki fluoresoivalla aineella leimatut molekyylit) auringonvalolta, jotta valon aiheuttama valkaisu voidaan välttää.

Huomautus: Jotta reagensseja voi käyttää *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjassa, näytteet on jaettava eriin. Jos näytteitä testataan erikseen, testauksessa kuluu enemmän reagensseja ja tämä vähentää *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla testattavien näytteiden määrää.

Näytteen käsittely ja säilytys

Huomautus: Kaikkia näytteitä on käsiteltävä tartuntavaarallisena materiaalina.

Näytteen materiaalin on oltava ihmisen genomista DNA:ta, joka on eristetty FFPE-kudoksesta. Näytteen hyväksyttävä laatu on varmistettava kuljettamalla näytteet tavanomaisia patologian käytäntöjä noudattaen.

Kasvainnäytteet ovat ei-homogeenisiä, ja kasvainnäytteen tiedot eivät välttämättä ole yhdenmukaisia saman kasvaimen muiden osien tietojen kanssa. Kasvainnäytteet saattavat sisältää kasvaimen lisäksi myös muuta kudosta. Muun kudoksen kuin kasvinkudoksen DNA:n ei oleteta sisältävän *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan havaitsemia mutaatioita.

Kudosnäytteiden valmistelu DNA:n eristämiseen:

- Käytä vakiomuotoisia materiaaleja ja menetelmiä ja kiinnitä kudosnäyte 10-prosenttiseen neutraaliin formaliinipuskuriin (Neutral Buffered Formalin, NBF) sekä upota kudosnäyte parafiiniin. Leikkaa mikrotomilla sarjassa 5 µm:n paloja parafiinilohkosta ja aseta ne objektilaseille.
- Anna koulutetun henkilön (esim. patologi) arvioida hematoksyliini-eosiinivärjätty osa, ja varmistaa, että osassa on kasvain.
- Värjättyjä osia ei saa käyttää DNA:n eristämiseen.
- Säilytä kaikkia FFPE-lohkoja ja objektilaseja huoneenlämmössä (15–25 °C). Objektilaseja voidaan säilyttää huoneenlämmössä korkeintaan kuukausi ennen DNA:n eristämistä.

Menetelmä

DNA:n eristäminen ja valmistelu

Tämän sarjan suorituskykyominaisuudet on saatu käyttämällä QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjalla (luettelonro 60404) eristettyä DNA:ta. DNA:n valmisteluun on käytettävä tätä sarjaa, jos se on saatavilla maassasi. Jos käytössä on toiminnoltaan vastaava QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarja (luettelonro 56404), eristä DNA käsikirjan ohjeiden mukaisesti huomioiden myös alla esitetyt ohjeet.

- Älä käytä QIAGEN Deparaffinization Solution -liuosta. Käytä deparaffinisointiin ainoastaan *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan käsikirjassa* kuvattua ksyleeni-/etanolimenetelmää.
- Käytä kaikissa vaadituissa vaiheissa molekyylibiologiaan soveltuvan luokan etanolia*.
- Raaputa koko kudoksen alue kahdesta osasta leimattuun mikrosentrifugiputkeen. Käytä jokaiselle näytteelle uutta skalpellia.
- Proteinaasi K:n pilkkoutuminen (vaihe 11 *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan käsikirjassa*) on tehtävä 1 tunnin (± 5 min) kohdalla $56\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Proteinaasi K:n pilkkoutuminen (vaihe 12 *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan käsikirjassa*) on tehtävä 1 tunnin (± 5 min) kohdalla $90\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Älä käytä *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan käsikirjassa* kuvattua RNAasivaihetta.
- Näytteet on eluoitava 120 μl :an *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan* eristyspuskuria (ATE) (vaihe 20 *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjan käsikirjassa*).
- Genomista DNA:ta voidaan säilyttää $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa viikon ajan eristämisen jälkeen, tai $-30\text{...}-15\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa korkeintaan 8 viikkoa ennen käyttöä.

Huomautus: Kaikki *therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjan* määritykset tuottavat lyhyitä PCR-tuotteita. *therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja* ei kuitenkaan toimi voimakkaasti fragmentoituneen DNA:n kanssa.

* Älä käytä denaturoitua alkoholia, joka sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

Protokolla: Näytteen arviointi

Tämän protokollan avulla arvioidaan näytteiden monistettavissa olevan DNA:n kokonaismäärä käyttäen "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" -mallia Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspakkauksesta automatisoituun näytteen arviointiin.

Huomautus: Katso lisätietoja manuaalisesta DNA-näytteen arvioinnista kohdasta Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan manuaalinen protokolla.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Jotta saisit oikeita tuloksia, varmista, että kaikkia ohjeessa kuvattuja sekoitusvaiheita on noudatettu määrityksen valmistelussa.
- Kontrollireaktioseoksen avulla voidaan arvioida enintään 24 näytettä.
- Lue ennen toimenpiteen aloittamista kohta Yleiset varotoimet.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Tutustu laitteen käyttöoppaaseen.
- Älä käytä *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*-putki) tai mitään *Taq* DNA -polymeraasia sisältävää seosta vortex-laitteessa, sillä käsittely saattaa inaktivoida entsyymiin.
- Pipetoi *Taq* asettamalla pipetin kärki aivan nestepinnan alapuolelle, jotta kärkeen ei pääse liikaa entsyymiä.
- Käytä kontrollireaktioseosta (CTRL-putki) DNA:n arviointiin ennen testausta.
Huomautus: On tärkeää käyttää kontrollireaktioseosta tälle määritykselle annettujen alla olevien ohjeiden mukaan. Spektrofotometriassa tai muissa menettelyissä käytettäviä käyttötapoja ei saa käyttää. Huomattavasti huonontunut DNA ei ehkä monistu, vaikka alukkeet loisivat lyhyitä DNA-fragmenteja.
- Jotta *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan reagensseja voisi käyttää mahdollisimman tehokkaasti, muodosta mahdollisuuksien mukaan DNA-näytteistä mahdollisimman hyviä eriä, jotta ajot olisivat kokonaisia. Näytteiden testaaminen yksittäin tai pieninä erinä kuluttaa enemmän reagensseja ja vähentää yhdellä *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla testattavien näytteiden määrää.

Ennen kuin aloitat

- Varmista, että *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin ohjelmisto on asennettu ennen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen ensimmäistä käyttökertaa (katso Liite B *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin asennus).
- Ennen jokaista reagenssien käyttökertaa kaikkia reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ja enintään 4,5 tunnin ajan, kunnes ne ovat täysin sulaneet, käänneltävä 10 kertaa ja käytettävä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että *Taq* on huoneenlämpöistä (15–25 °C). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Sekoita kaikkia näytteitä kääntämällä ne ylösalaisin 10 kertaa ja käyttämällä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

Menetelmä

1. Sulata kontrollireaktioseosta (CTRL), mallittamaan kontrolliin (No Template Control, NTC) tarkoitettua vettä ja EGFR:n positiivista kontrollia (Positive Control, PC) huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden ja enintään 4,5 tunnin ajan.

Reagenssien sulatusajat, PCR-valmisteluajat ja testiajoa edeltävän säilytyksen tiedot on merkitty taulukkoon 2.

Taulukko 2. Sulatusajat, PCR:n valmisteluajat ja säilytyslämpötilat

Vähimmäissulatusaika	Enimmäissulatusaika	Säilytyslämpötila PCR:n valmistelun jälkeen	PCR:n valmistelun ja säilytyksen enimmäisaika
1 h	4,5 h	Huoneenlämpötila (15–25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2–8°C	18 h

Huomautus: PCR-asetukset tehdään huoneenlämmössä (15–25 °C). ”Säilytyksellä” tarkoitetaan aikaa PCR:n valmistelun ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella aloitettavan PCR-ajon välillä.

Huomautus: Tuo *Taq* huoneenlämpöön (15–25 °C) samaan aikaan kuin muut reagenssit (katso Reagenssien säilytys ja käsittely). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

2. Kun reagenssit ovat sulaneet, sekoita ne kääntelemällä jokaista putkea 10 kertaa, jotta paikallisia suolakertymiä ei pääse muodostumaan, ja käytä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
3. Valmista riittävä määrä pääkontrolliseoksia (kontrollireaktioseos [CTRL] sekä *Taq*) DNA-näytteitä varten, yksi positiivinen EGFR-kontrollireaktio ja yksi NTC-reaktio noudattaen taulukossa 3 annettuja määriä koskevia ohjeita. Sisällytä mukaan reagensseja yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määritystä varten.

Huomautus: Pääseos sisältää kaikki PCR:ää varten tarvittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 3. Kontrollimäärityksen pääseoksen valmistaminen

Komponentti	Määrä
Kontrollireaktioseos (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
<i>Taq</i> DNA -polymeraasi (<i>Taq</i>)	0,5 µl × (n + 1)
Kokonaismäärä	20 µl/reaktio

* n = reaktioiden määrä (näytteet plus kontrollit). Valmista pääseosta riittävä määrä yhtä ylimääräistä näytettä varten (n+1), jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-asetuksia varten. Arvo n ei saa olla yli 26 (24 näytettä plus 2 kontrollia).

Huomautus: valmistettaessa pääseosta kontrollireaktioseokseen tarvittava määrä lisätään asianomaiseen putkeen ensin ja *Taq* lisätään viimeiseksi.

4. Sekoita pääseos huolellisesti pipetoimalla sitä varovasti 10 kertaa ylös ja alas. Aseta sopiva määrä liuskaputkia latauslohkoon taulukossa 4 esitetyllä tavalla. Lisää välittömästi 20 µl pääseosta jokaiseen PCR-liuskaputkeen.

Pidä korkit muovisäiliössä myöhempää käyttöä varten. DNA-näytteen arviointia varten kontrollimäärityksen pääseosta lisätään yhteen positiivisen kontrollin putkeen, yhteen negatiivisen kontrollin putkeen ja jokaisen näytteen yhteen putkeen.

Taulukko 4. Latauslohkossa olevien DNA-näytteiden arviointi. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Määrittäminen	Paikka								
Kontrolli	1[PC]	9	17	25	-	-	-	-	-
Kontrolli	2[NTC]	10	18	26	-	-	-	-	-
Kontrolli	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Kontrolli	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Kontrolli	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Kontrolli	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Kontrolli	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Kontrolli	8	16	24	-	-	-	-	-	-

5. Lisää välittömästi 5 µl NTC:hen tarkoitettua vettä sijainnissa 2 olevaan putkeen ja aseta putken korkki paikalleen.
6. Lisää näyteputkiin 5 µl jokaista näytettä (putket sijainneissa 3–26) ja aseta putkien korkit paikoilleen.
7. Lisää 5 µl EGFR PC -kontrollia sijainnissa 1 olevaan putkeen ja aseta putken korkki paikalleen.
Huomautus: Vältä lataus- ja pipetointivirheitä varmistaaksesi, että NTC, näytteet ja PC lisätään virheettömästi oikeisiin putkiin. Merkitse putkien korkkeihin suunta, jota noudattaen putket ladataan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen.
8. Kun kaikkien PCR-putkien korkit on asetettu paikoilleen, tarkista näyteputkien täyttötasot silmämääräisesti, jotta voit varmistaa, että näyte on lisätty kaikkiin putkiin.
9. Kääntelee kaikkia PCR-putkia 4 kertaa, jotta näytteet ja reaktioseokset sekoittuvat.
10. Aseta PCR-liuskaputket oikeisiin kohtiinsa 72-kuoppaiseen roottoriin taulukon 4 mallin mukaan.
Jos roottori ei ole täynnä, aseta tyhjiin kohtiin tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan.
11. Aseta 72-kuoppainen roottori välittömästi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen. Varmista, että lukkorengas (Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen varuste) on asetettu roottorin päälle, jotta putket pysyvät paikoillaan käytön aikana.

Huomautus: jos näytteet arvioidaan manuaalisesti, katso lisätietoja kohdasta Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan manuaalinen protokolla.

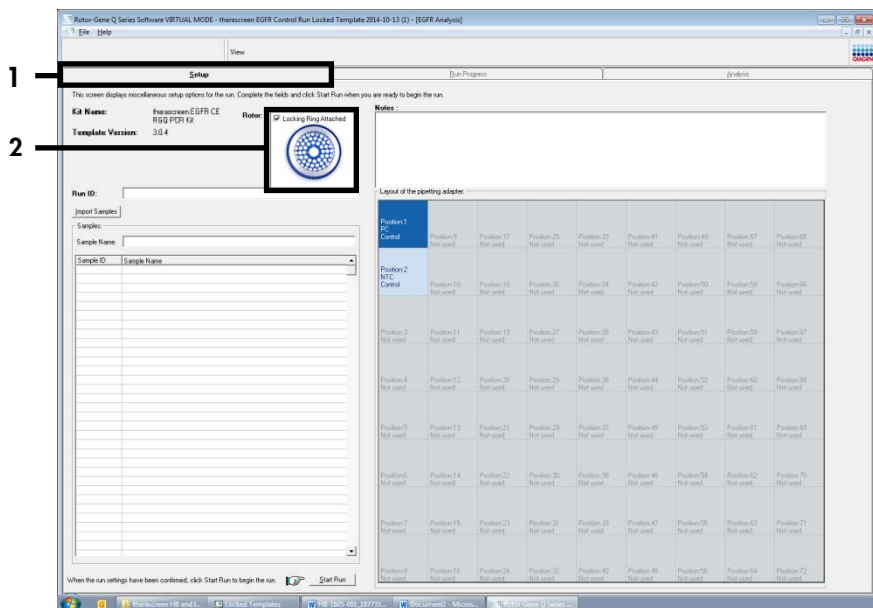
12. Avaa Rotor-Gene Q -ohjelmisto kaksoisnapsauttamalla Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn tietokoneen näytössä näkyvää *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template (*therascreen* EGFR CE -kontrolliajon lukittu malli) -kuvaketta (katso kuva 1).



therascreen EGFR CE
Control Run Locked
Template

Kuva 1. EGFR CE lukittu malli -kuvake kontrolliajoo (näytteen arviointia) varten.

13. Setup (Asennus) -välilehti tulee oletuksena näkyviin (kuva 2). Varmista, että lukkorengas on kunnolla paikallaan ja laita rasti Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Sulje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen kansi.



Kuva 2. "Setup" (Asennus) -välilehti (1) ja "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu (2).

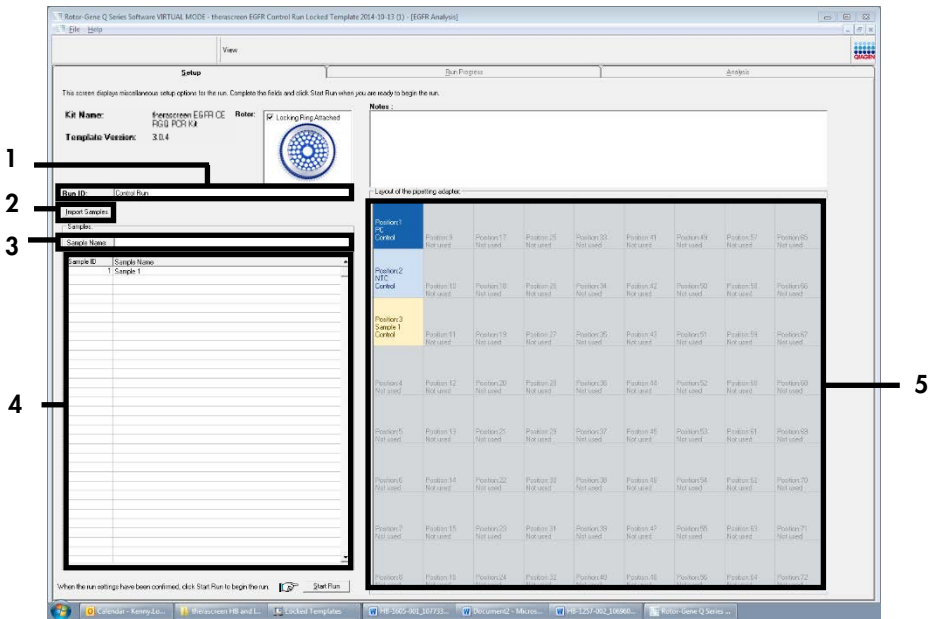
14. Anna Run ID (Ajon tunniste) -kenttään ajon tunniste oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Anna Sample Name (Näytteen nimi) -kenttään näytteen nimi oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti ja paina Enter-näppäintä.

Tällöin näytteen nimi lisätään alla olevaan näyteluetteloon ja näytteelle annetaan Sample ID (Näytteen tunniste) -nimi (1, 2, 3 jne.). Lisäksi näytteen nimi päivittyy oikealla puolella näkyvään Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeliin (kuva 3).

Huomautus: Vaihtoehtoisesti *.smp (Rotor-Gene Q -näytetiedosto) -muodossa tai *.csv (CSV-tiedosto) -muodossa (arvojen välissä on pilkku) tallennetut näytteet voidaan tuoda valitsemalla Import Samples (Tuo näytteet) -toiminto. Näytteiden nimet täytetään automaattisesti tätä menetelmää käyttäen.

Huomautus: Tarkista Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa, että lisätty näytteen nimi on korostettu eri värillä kuin muut nimet ja että näytteen nimi on näytekohdassa (kuva 3).

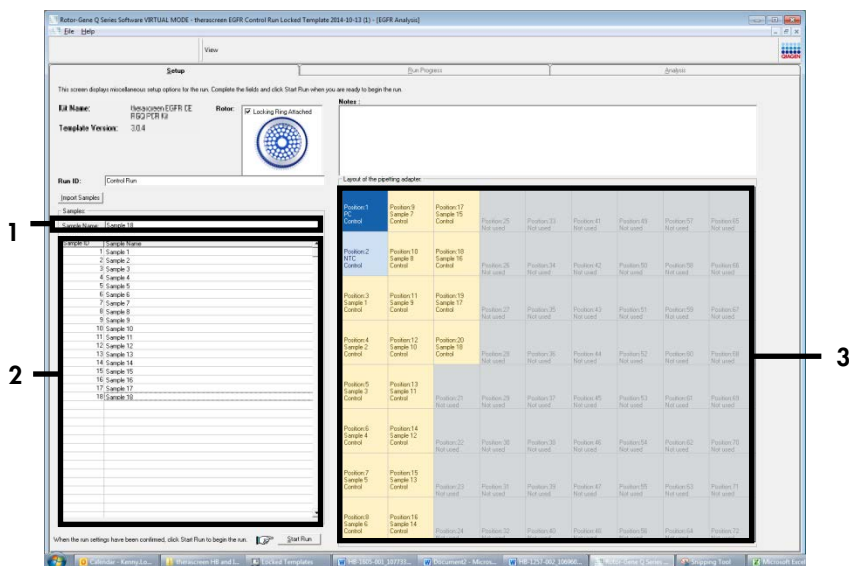
Huomautus: Jos näytteen nimessä on yli kahdeksan merkkiä, nimi ei mahdollisesti näy Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa kokonaan.



Kuva 3. Run ID (Ajon tunnistus)- ja Sample Name (Näytteen nimi) -tietojen antaminen. 1 = Run ID (Ajon tunnistus) -kenttä, 2 = Import Samples (Tuo näytteet) - painike 3 = Sample Name (Näytteen nimi) -kenttä, 4 = Sample List (Näyteluettelo), 5 = Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeli.

15. Anna kakkien muiden näytteiden nimet toistamalla vaihe 14 (kuva 4).

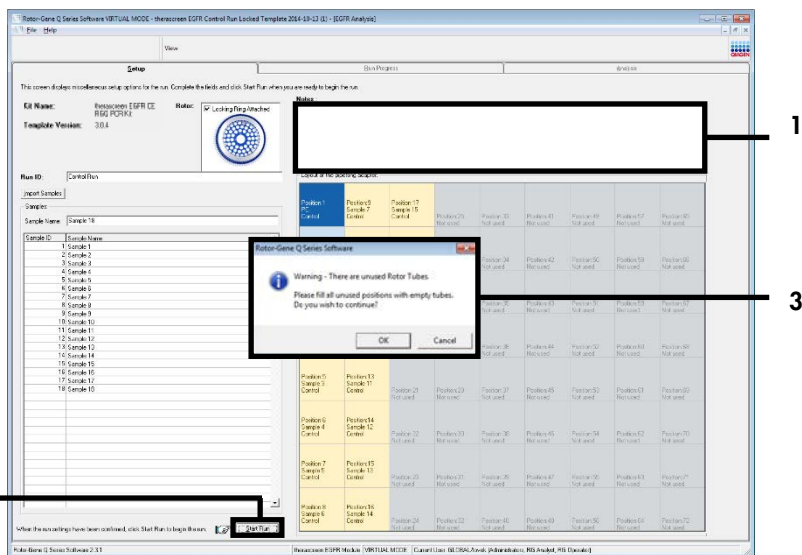
Huomautus: Voit muokata näytteen nimeä napsauttamalla näyteluettelossa kohtaa Sample Name (Näytteen nimi), jolloin valittu näyte tulee edellä mainittuun Sample Name (Näytteen nimi) -kenttään. Muokkaa nimeä oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti ja päivitä nimi painamalla Enter-painiketta.



Kuva 4. Muiden näytteiden nimien lisääminen Sample Name (Näytteen nimi) -kenttään. 1 = Sample Name (Näytteen nimi) -kenttä, 2 = Sample List (Näyteluettelo), 3 = Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asetus) -paneeli.

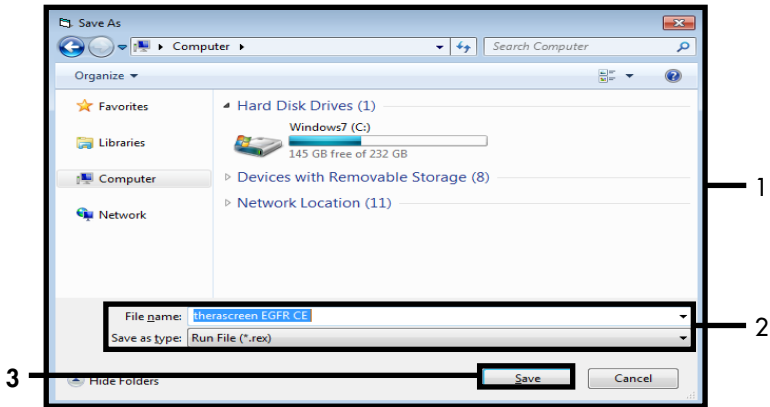
16. Kun kaikkien näytteiden nimet on annettu, varmista, että ne ovat oikein. Lisää tarvittaessa lisätietoja Notes (Huomautukset) -kenttään ja napsauta Start Run (Käynnistä ajo) -painiketta (kuva 5).

Huomautus: Jos jokin roottorin paikka on tyhjä, näkyviin tulee Warning (Varoitus) (kuva 5), jolla käyttäjää muistutetaan siitä, että kaikkiin roottorin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjiä korkilla suljettu putki. Tarkista, että kaikissa roottorin tyhjissä kohdissa on tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan, ja jatka valitsemalla OK. Save As (Tallenna nimellä) -ikkuna avautuu.



Kuva 5. Notes (Huomautukset) -kenttä (1), Start Run (Käynnistä ajo) -painike (2) ja tyhjiä roottorin paikkoja koskeva Warning (Varoitus) (3).

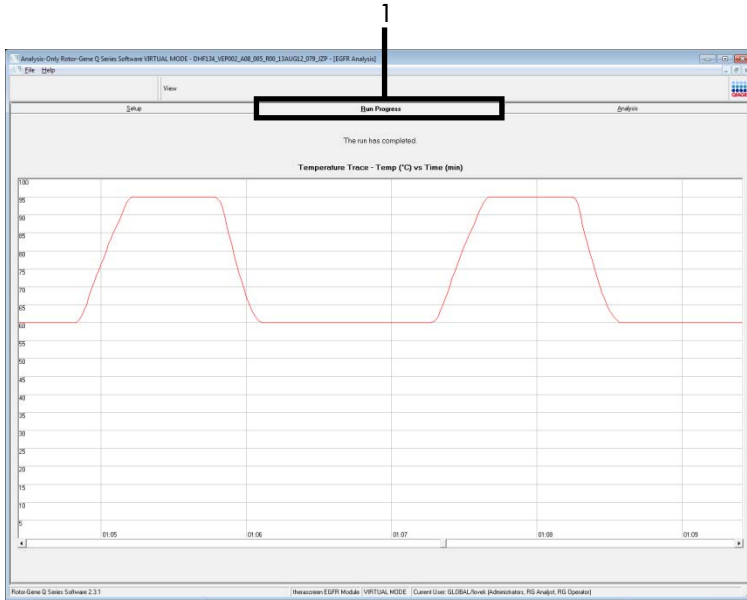
17. Valitse haluamasi tiedostonimi ja tallenna PCR-ajo *.rex-tiedostona valittuun sijaintiin. Valitse Save (Tallenna) (kuva 6).



Kuva 6. Save As (Tallenna nimellä) -ikkuna (1). 2 = File Name (Tiedostonimi)- ja Save as type (Tallenna tyyppinä) -kentät, 3 = Save (Tallenna) -painike.

PCR-ajo käynnistyy.

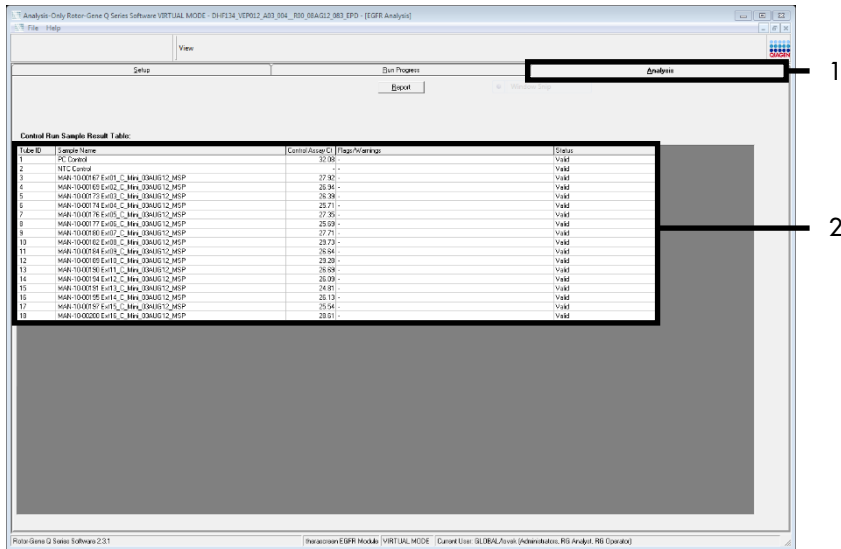
Huomautus: Kun ajo alkaa, Run Progress (Ajon edistyminen) -välilehti avautuu, ja siinä näkyvät lämpötilatiedot ja jäljellä oleva ajoaika (kuva 7).



Kuva 7. Run Progress (Ajon edistyminen) -välilehti (1).

Huomautus: Kun ajo on valmis, Analysis (Analyysi) -välilehti avautuu automaattisesti. Jos Analysis (Analyysi) -välilehti ei avaudu, napsauta Analysis (Analyysi) -välilehteä (kuva 8).

Huomautus: laskentamenetelmä on selitetty kohdassa Tulosten tulkinta (automaattinen).



Kuva 8. Analysis (Analyysi) -välilehti (1) ja tulosten raportoiminen (2 = Control Run Sample Result Table [Kontrollioajon tulostaulukko]).

Kontrollitulokset raportoidaan, kuten kohdassa Control Run Sample Result Table (Kontrollioajon tulostaulukko) (kuva 8) on esitetty.

Aja kontrollit (PC ja NTC, putkien sijainnit 1 ja 2). Jos tulokset ovat hyväksyttävillä alueilla, jokaisen kohdalla näkyy Valid (Kelvollinen). Muussa tapauksessa tuloksena näkyy Invalid (Epäkelpo).

Näytteen kontrollireaktion $C_t > 31,10$ kohdalle tulee teksti Invalid (Epäkelpo). DNA:n määrä ei ole riittävä mutaatioanalyysia varten. Testaa näyte uudelleen. Jos DNA:n määrä on edelleen riittämätön, eristä lisää kasvainkudosta, jos sitä on saatavilla.

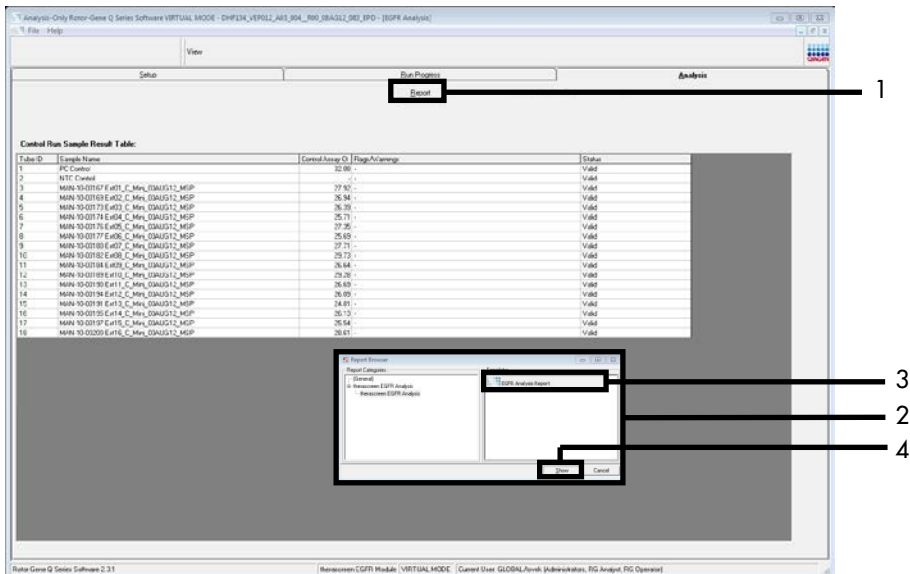
Näytteen kontrollireaktion $C_T < 23,70$ kohdalle tulee teksti Invalid (Epäkelpo). DNA:n konsentraatio on liian korkea mutaatioanalyysia varten. Laimenna nukleasittomalla laimentamiseen tarkoitetulla vedellä (Dil.) ja suorita testi uudelleen. Laimenna pitoisuuteen C_T 23,70-31,10. Laimennussuhde 1:1 kasvattaa C_T -arvoa 1,0:lla.

Näytteen kontrollireaktion C_T -arvon 23,70–31,10, ($23,70 \leq$ kontrolli $C_T \leq 31,10$) kohdalle tulee teksti Valid (Kelvollinen). DNA:n konsentraatio on sopiva mutaatioanalyysia varten.

Huomautus: Jos uudelleeneristys tai laimennus on tarpeellinen, toista kontrollireaktio, jotta voit varmistaa, että DNA:n pitoisuus on sopiva käyttöä varten.

18. Luo raporttiedosto valitsemalla Report (Raportti). Report Browser (Raporttiselain) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse kohdasta Templates (Mallit) kohta EGFR CE Analysis Report (EGFR CE -analyysiraportti) ja napsauta sen jälkeen Show (Näytä) -painiketta (kuva 9).

Huomautus: Jos haluat tallentaa raportit Web Archives -muodossa toiseen sijaintiin, napsauta kunkin raportin vasemmassa yläkulmassa Save As (Tallenna nimellä) -painiketta.



Kuva 9. EGFR CE Analysis Report (EGFR CE -analyysiraportti) -kohdan valitseminen. 1 = Report (Raportti) -painike, 2 = Report Browser (Raporttiselain) -paneeli, 3 = EGFR CE Analysis Report (EGFR CE -analyysiraportti) -valinta, 4 = Show (Näytä) -painike.

Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen

Tämä protokolla koskee EGFR-mutaatioiden havaitsemista. Kun näyte on läpäissyt DNA-näytteen arvioinnin, se voidaan testata EGFR-mutaatiomäärityksillä automatisoitua ohjelmistoa käyttäen.

Huomautus: katso lisätietoja manuaalisesta mutaatioiden havaitsemisesta kohdasta Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan manuaalinen protokolla.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Jotta saisit oikeita tuloksia, varmista, että kaikkia ohjeessa kuvattuja sekoitusvaiheita on noudatettu määrityksen valmistelussa.
- Lue ennen toimenpiteen aloittamista kohta Yleiset varoitimet.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Tutustu laitteen käyttöoppaaseen.
- Näyte voidaan testata EGFR-mutaatiomäärityksillä, kun näyte on läpäissyt DNA-näytteen arvioinnin.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan tehokkaan toiminnan takaamiseksi näytteet on jaettava seitsemän kappaleen eriin. Jos eräkoko on pienempi, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla voidaan testata yhteensä pienempi määrä näytteitä.
- Näytteen testaamiseen on käytettävä kaikkia *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjassa olevia reaktioseoksia.
- Älä sekoita *Taq*-seosta tai mitään *Taq*-ainetta sisältävää seosta vortex-laitteessa, sillä sekoittaminen saattaa inaktivoida entsyymiä.
- Pipetoi *Taq* asettamalla pipetin kärki varovasti aivan nestepinnan alapuolelle, jotta kärkeen ei pääse liikaa entsyymiä.

Ennen kuin aloitat

- Varmista, että *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin ohjelmisto on asennettu ennen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen ensimmäistä käyttökertaa (katso Liite B *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin asennus).
- Ennen jokaista reagenssien käyttökertaa kaikkia reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ja enintään 4,5 tunnin ajan, kunnes ne ovat täysin sulaneet, käänneltävä 10 kertaa ja käytettävä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Sekoita kaikkia näytteitä kääntämällä ne ylösalaisin 10 kertaa ja käyttämällä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että *Taq* on huoneenlämpöistä (15–25 °C). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

Menetelmä

1. Sulata kaikkia reaktioseosputkia, mallittomaan kontrolliin (No Template Control, NTC) tarkoitettua vettä ja EGFR:n positiivista kontrollia (Positive Control, PC) huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden ja enintään 4,5 tunnin ajan.

Reagenssien sulatusajat, PCR-valmisteluajat ja testiajoa edeltävän säilytyksen tiedot on merkitty taulukkoon 5.

Taulukko 5. Sulatusajat, PCR:n valmisteluajat ja säilytyslämpötilat

Vähimmäissulatusaika	Enimmäissulatusaika	Säilytyslämpötila PCR:n valmistelun jälkeen	PCR:n valmistelun ja säilytyksen enimmäisaika
1 h	4,5 h	Huoneenlämpötila (15–25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2–8 °C	18 h

Huomautus: PCR-asetukset tehdään huoneenlämmössä (15–25 °C). Säilytyksellä tarkoitetaan aikaa PCR:n valmistelun ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella aloitettavan PCR-ajon välillä.

Huomautus: Tuo *Taq* (putki *Taq*) huoneenlämpöön (15–25 °C) samaan aikaan kuin muut reagenssit (katso Reagenssien säilytys ja käsittely). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

2. Kun reagenssit ovat sulaneet, sekoita ne kääntelemällä jokaista putkea 10 kertaa, jotta paikallisia suolakertymiä ei pääse muodostumaan, ja käytä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
3. Valmista riittävä määrä pääseoksia (määrittelyn reaktioseos sekä *Taq*) DNA-näytteitä varten, yksi positiivinen EGFR-kontrollireaktio ja yksi NTC-reaktio noudattaen taulukossa 6 annettuja määriä koskevia ohjeita. Sisällytä mukaan reagensseja yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten. Pääseokset sisältävät kaikki PCR:ää varten tarvittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 6. Määrittelyn pääseosten valmistaminen

Määrittely	Reaktioseosputki	Reaktioseoksen määrä	<i>Taq</i> DNA -polymeraasin (putki <i>Taq</i>) määrä
Kontrolli	CTRL	19,5 µl × (n + 1)*	0,5 µl × (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Deleetiot	Del	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L858R	L858R	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L861Q	L861Q	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
G719X	G719X	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
S768I	S768I	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Insertiot	Ins	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)

* n = reaktioiden määrä (näytteet plus kontrollit). Valmista pääseosta riittävä määrä yhtä ylimääräistä näytettä varten (n + 1), jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-asetuksia varten. Arvon n pitäisi olla suurempi kuin seitsemän (plus kontrollien määrä), sillä seitsemän on yhdellä kerralla käsiteltävien näytteiden enimmäismäärä.

4. Sekoita määrittelyn pääseoksia huolellisesti pipetoimalla sitä varovasti 10 kertaa ylös ja alas. Aseta sopiva määrä liuskaputkia latauslohkoon taulukossa 7 esitetyllä tavalla. Lisää välittömästi 20 µl sopivaa määrittelyn pääseosta jokaiseen PCR-liuskaputkeen.

Pidä korkit muovisäiliössä myöhempää käyttöä varten.

Taulukko 7. Latauslohkossa olevien kontrolli- ja mutaatiomääritysten arviointi. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Määrittäminen	PC	Paikka							
		Kontrollit		Näytteen numero					
		NTC	1	2	3	4	5	6	7
Kontrolli	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deleetiot	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insertiot	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Lisää välittömästi 5 µl NTC:hen tarkoitettua vettä sijainneissa 9–16 oleviin putkiin ja aseta putkien korkit paikalleen.
- Lisää 5 µl vettä jokaiseen näyteputkeen (putkien sijainnit 17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64 ja 65–72) ja aseta putkien korkit paikoilleen.
- Lisää 5 µl EGFR PC -kontrollia sijainneissa 1–8 oleviin putkiin ja aseta putkien korkit paikalleen.

Vältä lataus- ja pipetointivirheitä varmistaaksesi, että NTC, näytteet ja EGFR PC lisätään virheettömästi oikeisiin putkiin.

Jokaisessa putkessa on oltava yhteensä 25 µl reaktioliuosta (20 µl vaiheessa 3 [taulukko 6] valmistettua määrittämisen pääseosta ja 5 µl NTC-/näyte-/PC-liuosta). Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Merkitse putkien korkkeihin suunta, jota noudattaen putket ladataan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen.

8. Kun kaikkien PCR-putkien korkit on asetettu paikoilleen, tarkista näyteputkien täyttötasot silmämääräisesti, jotta voit varmistaa, että näyte on lisätty kaikkiin putkiin.
9. Kääntele kaikkia PCR-putkia 4 kertaa, jotta näytteet ja reaktiioseokset sekoittuvat.
10. Aseta PCR-liuskaputket oikeisiin kohtiinsa 72-kuoppaiseen roottoriin taulukon 7 mallin mukaan.

Yhdessä PCR-ajossa voi olla mukana enintään seitsemän näytettä. Jos roottori ei ole täynnä, aseta tyhjiin kohtiin tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan.
11. Aseta 72-kuoppainen roottori välittömästi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen. Varmista, että lukkorengas (Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen varuste) on asetettu roottorin päälle, jotta putket pysyvät paikoillaan käytön aikana.

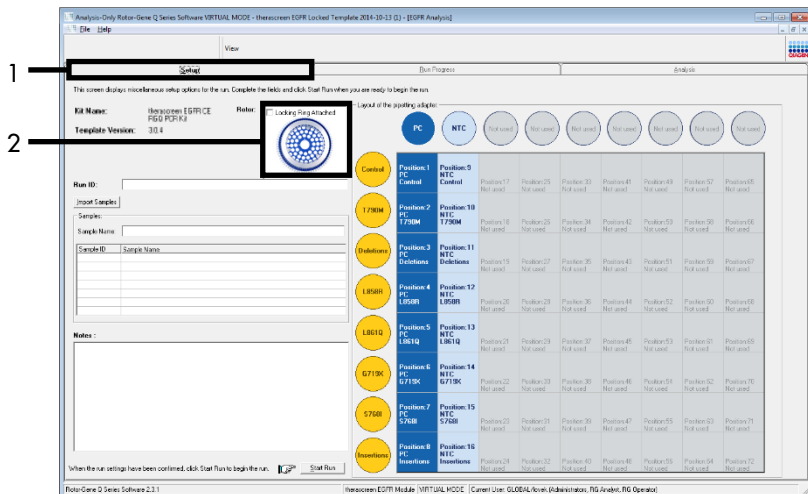
Huomautus: Jos käytät manuaalista EGFR-mutaation tunnistusta, katso liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan manuaalinen protokolla.
12. Avaa Rotor-Gene Q -ohjelmisto kaksoinsapsauttamalla Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen liitetyn tietokoneen näytössä näkyvää *therascreen* EGFR CE Locked Template (*therascreen* EGFR CE lukittu malli) -kuvaketta (katso kuva 10).



therascreen EGFR CE
Locked Template

Kuva 10. EGFR CE Locked Template (EGFR CE lukittu malli) -kuvake (EGFR-mutaation havaitseminen).

13. Setup (Asennus) -välilehti tulee oletuksena näkyviin (kuva 11). Varmista että lukkorengas on kunnolla paikallaan ja laita rasti Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Sulje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen kansi.



Kuva 11. Setup (Asennus) -välilehti (1) ja Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu (2).

14. Anna Run ID (Ajon tunniste) -kenttään ajon tunniste oman laitteesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Anna Sample Name (Näytteen nimi) -kenttään näytteen nimi oman laitteesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti ja paina Enter-näppäintä.

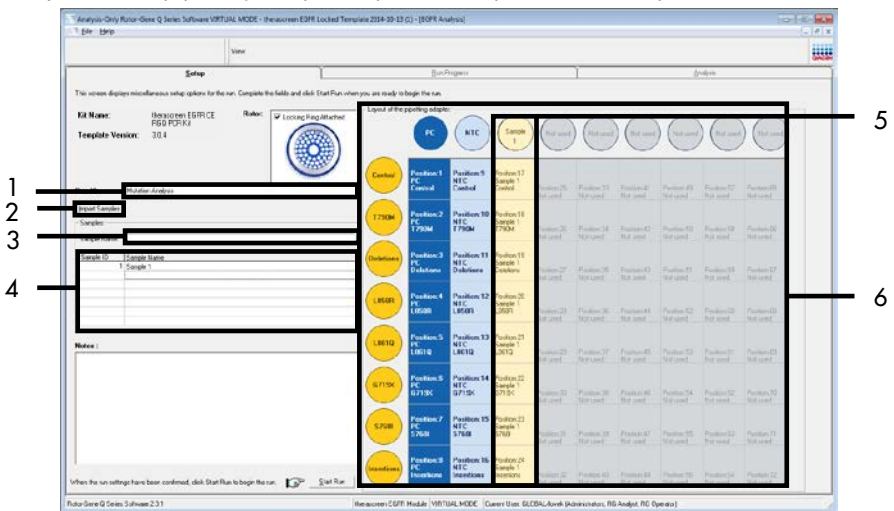
Tällöin näytteen nimi lisätään alla olevaan näyteluetteloon ja näytteelle annetaan Sample ID (Näytteen tunniste) -nimi (1, 2, 3 jne.). Lisäksi näytteen nimi päivittyy oikealla puolella näkyvään Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeliin (kuva 12).

Huomautus: Vaihtoehtoisesti *.smp (Rotor-Gene Q -näytetiedosto) -muodossa tai *.csv (CSV-tiedosto) -muodossa tallennetut näytteet voidaan tuoda valitsemalla Import Samples (Tuo näytteet) -painike. Näytteiden nimet täytetään automaattisesti tätä menetelmää käyttäen.

Huomautus: Tarkista Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa, että lisätty näytteen nimi on korostettu eri värillä kuin muut nimet ja että näytteen nimi on näytekohdassa (kuva 12).

Huomautus: Lisättävien näytteiden enimmäismäärä on seitsemän. Näytteiden tunnisteet (näyteympyröihin) annetaan automaattisesti käyttäen numeroita 1–7.

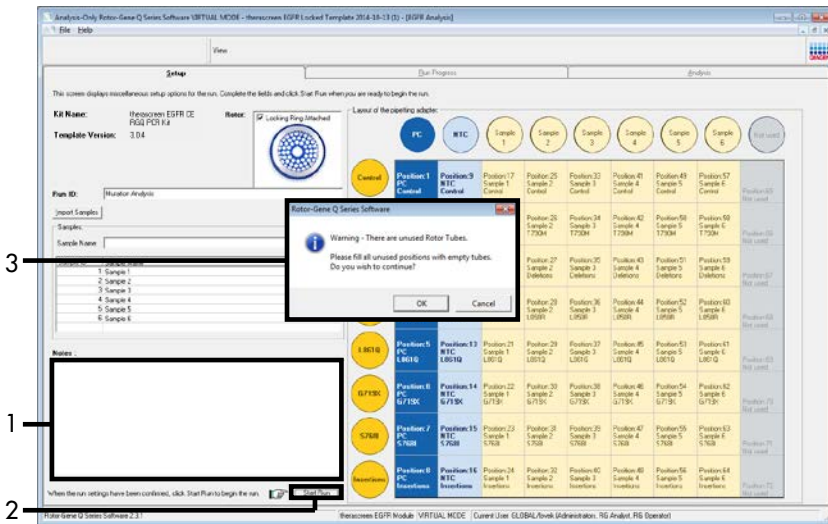
Huomautus: Jos näytteen nimessä on yli kahdeksan merkkiä, nimi ei mahdollisesti näy Layout of the pipetting adapter (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa kokonaan.



Kuva 12. Run ID (Ajon tunnistus)- ja Sample Name (Näytteen nimi) -tietojen antaminen. 1 = "Run ID" (Ajon tunnistus) -kenttä, 2 = "Import Samples" (Tuo näytteet) -painike 3 = "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttä, 4 = "Sample List" (Näyteluettelo), 5 = "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeli, 6 = Korostettu näyteympyrä ja 8 määrittynsä sarakkeeseen alapuolella

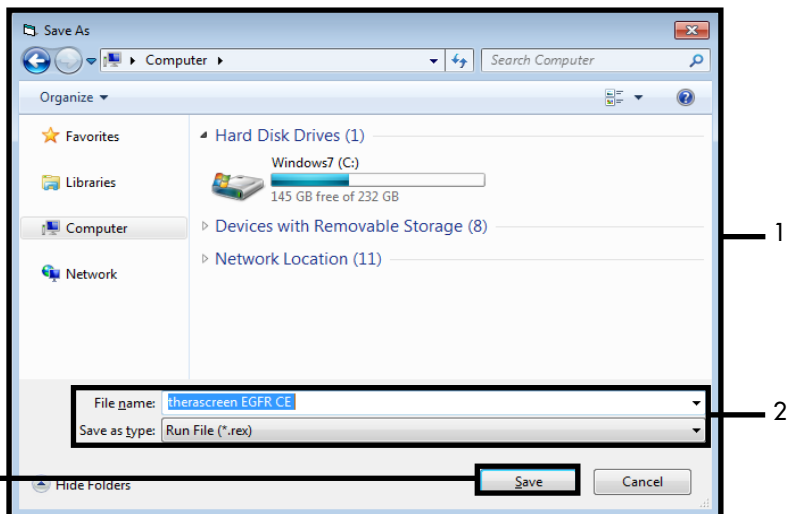
16. Kun kaikkien näyttöiden nimet on annettu, varmista, että ne ovat oikein. Lisää tarvittaessa lisätietoja Notes (Huomautukset) -kenttään ja napsauta Start Run (Käynnistä ajo) -painiketta (kuva 14).

Huomautus: Jos jokin roottorin paikka on tyhjä, näkyviin tulee Warning (Varoitus) (kuva 14), jolla käyttäjää muistutetaan siitä, että kaikkiin roottorin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjä korkilla suljettu putki. Tarkista, että kaikissa roottorin tyhjisä kohdissa on tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan, ja jatka valitsemalla OK.



Kuva 14. Notes (Huomautukset) -kenttä (1), Start Run (Käynnistä ajo) -painike (2) ja tyhjiä roottorin paikkoja koskeva Warning (Varoitus) (3).

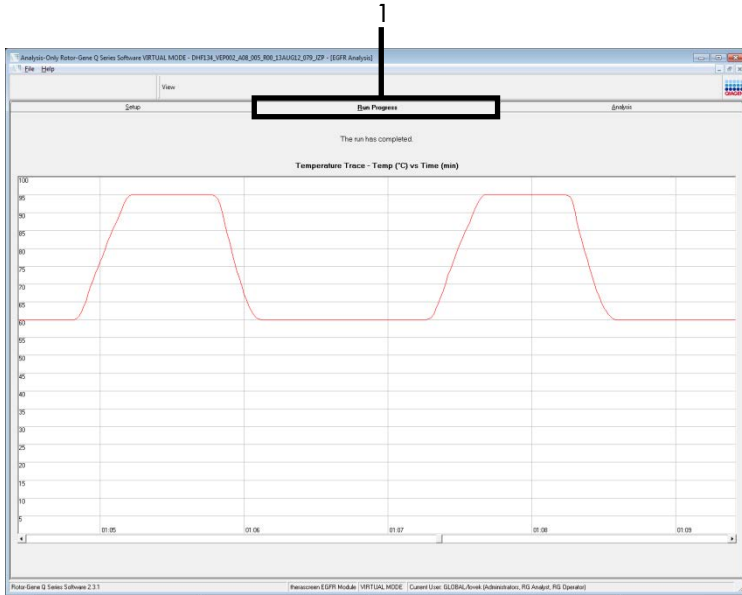
17. Save As (Tallenna nimellä) -ikkuna avautuu. Kirjoita haluamasi tiedostonimi ja tallenna PCR-ajo *.rex-tiedostona valittuun sijaintiin. Napsauta Save (Tallenna) -painiketta (Kuva 15).



Kuva 15. Save As (Tallenna nimellä) -ikkuna (1). 2 = File Name (Tiedostonimi)- ja Save as type (Tallenna tyyppiä) -kentät, 3 = Save (Tallenna) -painike.

PCR-ajo käynnistyy.

Huomautus: Kun ajo alkaa, Run Progress (Ajon edistyminen) -välilehti avautuu, ja siinä näkyvät lämpötilatiedot ja jäljellä oleva ajoaika (kuva 16).

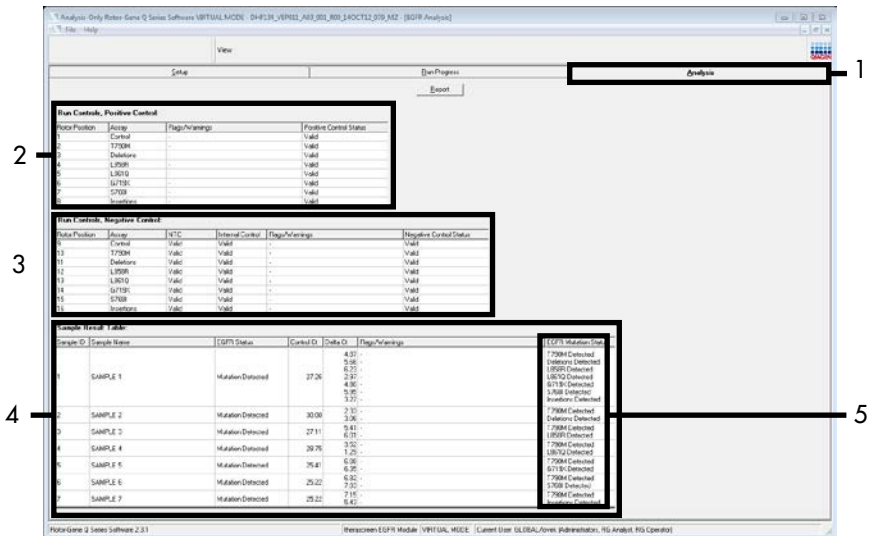


Kuva 16. Run Progress (Ajon edistyminen) -välilehti.

Kun ajo on valmis, Analysis (Analyysi) -välilehti avautuu automaattisesti.

Huomautus: jos Analysis (Analyysi) -välilehti ei avaudu, napsauta Analysis (Analyysi) -välilehteä (kuva 17).

Huomautus: laskentamenetelmä on selitetty kohdassa Tulosten tulkinta (automaattinen).



Kuva 17. Analysis (Analyysi) -välilehti (1) ja tulosten raportointi. 2 = Run Controls, Positive Control (Ajon kontrollit, positiivinen kontrolli) -paneeli, 3 = Run Controls, Negative Control (Ajon kontrollit, negatiivinen kontrolli) -paneeli, 4 = Sample Result Table (Näytteen tulostaulukko), 5 = Mutation Status (Mutaatiostatus) -paneeli.

Määrityksen tulokset raportoidaan seuraavasti (kuva 18):

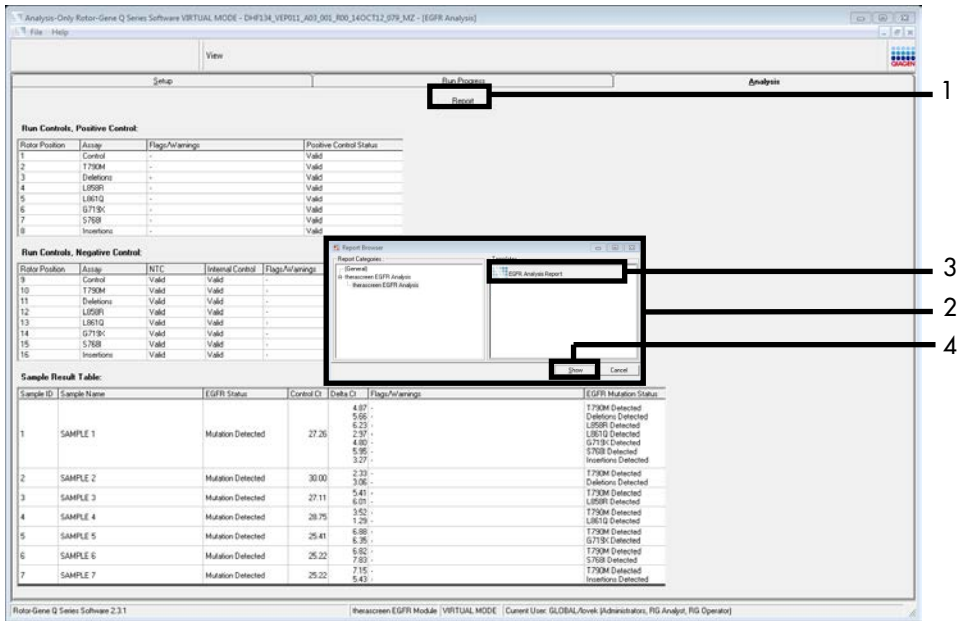
Run Controls, Positive Control (Ajon kontrollit, positiivinen kontrolli): jos tulokset ovat hyväksyttävän alueen rajoissa, Positive Control Status (Positiivisen kontrollin tila) -kentässä näkyy Valid (Kelvollinen). Muussa tapauksessa näyttöön tulee teksti Invalid (Epäkelpo).

Run Controls, Negative Control (Ajon kontrollit, negatiivinen kontrolli): jos sekä NTC- että Internal Control (Sisäinen kontrolli) -tulokset ovat hyväksyttävän alueen rajoissa, Negative Control Status (Negatiivisen kontrollin status) -kentässä näkyy teksti Valid (Kelvollinen). Muussa tapauksessa näyttöön tulee teksti Invalid (Epäkelpo).

Sample Result Table (Näytteen tulostaulukko): spesifiset mutaatiot raportoidaan mutaatioposiitivisten näytteiden taulukossa EGFR Mutation Status (EGFR-mutaatiostatus) -sarakeessa.

18. Luo raporttiedosto valitsemalla Report (Raportti). Report Browser (Raporttiselain) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse kohdasta Templates (Mallit) kohta EGFR CE Analysis Report (EGFR CE -analyysiraportti) ja napsauta sen jälkeen Show (Näytä) -painiketta (kuva 18).

Huomautus: jos haluat tallentaa raportin Web Archives -muodossa toiseen sijaintiin, napsauta kunkin raportin vasemmassa yläkulmassa Save As (Tallenna nimellä) -painiketta.



Kuva 18. EGFR CE Analysis Report (EGFR CE -analyysiraportti) -kohdan valitseminen. 1 = Report (Raportti) -painike, 2 = Report Browser (Raporttiselain) -paneeli, 3 = EGFR CE Analysis Report (EGFR CE -analyysiraportti), 4 = Show (Näytä) -painike.

Tulosten tulkinta (automaattinen)

therascreen EGFR Assay Package -määrityspaketti suorittaa ajon lopuksi automaattisesti analyysin ja mutaation havaitsemisen. Alla on kuvattu, miten *therascreen* EGFR Assay Package -määrityspaketti suorittaa analyysin ja mutaation havaitsemisen.

Huomautus: katso lisätietoja manuaalisesta analyysin suorittamisesta kohdasta Tulosten tulkinta (manuaalinen).

PCR-jakso, jossa tietyn reaktion fluoresenssi ylittää raja-arvon, on määritetty C_T -arvoksi. C_T -arvot ilmaisevat spesifisen input-DNA:n määrän. Matalat C_T -arvot merkitsevät korkeampia input-DNA:n tasoja ja korkeat C_T -arvot merkitsevät matalia input-DNA:n tasoja. C_T -arvon reaktiot luokitellaan positiivisiksi monistuksiksi.

Rotor-Gene Q -ohjelmisto interpoloi fluoresenssisignaalit minkä tahansa kahden tallennetun arvon välillä. C_T -arvot voivat näin ollen olla mitä tahansa reaalitylukuja (ei pelkkiä kokonaislukuja) alueella 0–40. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan kynnyksarvoksi on asetettu 0,075 suhteellista fluoresenssiyksikköä Green (FAM) -kanavalle ja 0,02 yksikköä Yellow (HEX) -kanavalle. Nämä arvot on konfiguroitu *therascreen* EGFR Assay Package -määrityspakettiin automaattisesti. Ajon kontrollit (PC, NTC ja IC) arvioidaan, jotta voidaan varmistaa, että hyväksytyt C_T -arvot on saavutettu ja että reaktiot on suoritettu oikein.

Näytteen ΔC_T -arvot lasketaan jokaisessa mutaatiomäärityksessä seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$\Delta C_T = [\text{mutaatiomäärityksen } C_T\text{-arvo}] - [\text{kontrollimäärityksen } C_T\text{-arvo}]$$

Näytteet luokitellaan mutaatioposiivisiksi, jos niiden ΔC_T -arvo on määrittämisen ΔC_T -raja-arvoalueella. Tämän ΔC_T -raja-arvoalueen ylittäviltä osin näyte voi sisältää mutaation, jonka prosenttiosuus on pienempi kuin *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan havaitsema prosenttiosuus (määrittämisen alapuolella), tai näyte on mutaationegatiivinen, jolloin testin tulokseksi raportoidaan No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu). Jos arvo on ΔC_T -raja-arvoalueen alapuolella, näytteen tulokseksi määritetään Invalid (Epäkelpo).

Jos mutaatioreaktioissa ei ilmene monistuksia, tuloksena on No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu). ΔC_T -arvojen, jotka on laskettu taustan monistuksesta, oletetaan olevan suurempia kuin ΔC_T -raja-arvoalueen ylempi raja, ja näytteen tulokseksi raportoidaan No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu).

Määrittämistulokset ovat seuraavat: Mutation Detected (Mutaatio havaittu), No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu), Invalid (Epäkelpo) tai, jos ajon kontrolli epäonnistuu, Run Control Failed (Ajon kontrolli epäonnistui). Näytteille, joiden tulos on mutaation osalta positiivinen, ilmoitetaan havaittu mutaatio. Kasvain saattaa sisältää useamman kuin yhden mutaation. Tällaisissa tilanteissa ilmoitetaan useampi kuin yksi mutaatio.

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package -määrityspakkauksen merkinnät

Taulukossa 8 (seuraava sivu) on lueteltu Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package -määrityspakkauksessa mahdollisesti käytetyt merkinnät, niiden merkitys ja suoritettavat toimenpiteet.

Merkintöjen nimien tarkoitus on antaa tietoja pakkauksen komponentista, näytteestä tai kontrollista, jota ongelma koskee, ja vikatilasta.

Esimerkki:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = positiivinen kontrolli (Positive Control, PC), kontrollitesti (CTRL_ASSAY) on epäonnistunut (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = malliton kontrolli (No Template Control, NTC), sisäinen kontrolli (INT_CTRL) on epäonnistunut (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = näytteen (SAMPLE), kontrollitestin (CTRL) pitoisuus on korkea (HIGH_CONC).

Taulukko 8. Merkinnot, niiden merkitykset ja toimenpiteet

Merkinnot	Merkitys	Toimenpide
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-ajo hylätty – FAM C _T -arvo kontrollireaktion positiivisen kontrollin sallitun alueen ulkopuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR-ajo hylätty – FAM C _T -arvo sallitun alueen ulkopuolella yhdessä tai useammassa mutaatiokontrollireaktiossa.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR-ajo hylätty – positiivisen kontrollin (kontrollireaktioseos) fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Toista koko PCR-ajo, noudata sekoituksen vaiheita erityisen tarkasti.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR-ajo hylätty – positiivisen kontrollin (mutaatioreaktioseos) fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Toista koko PCR-ajo, noudata sekoituksen vaiheita erityisen tarkasti.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin sisäinen kontrolli rajan yläpuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin sisäinen kontrolli rajan alapuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INVALID_CT	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin FAM hylätty (rajan alapuolella).	Toista koko PCR-ajo, noudata sekoituksen vaiheita erityisen tarkasti.
NTC_INVALID_DATA	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Toista koko PCR-ajo, noudata sekoituksen vaiheita erityisen tarkasti.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Näyte hylätty – näytteen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Valmistele uusi PCR-ajo toistaaksesi olennaiset näytteet, noudata sekoituksen vaiheita erityisen tarkasti.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Näyte virheellinen – näytteen kontrollin FAM C _T liian alhainen.	Laimenna näytettä, jotta kontrollin C _T -arvo suurenee. Laimennussuhde on laskettava siten, että oletuksena on, että kun näytettä laimennetaan sarjan mukana toimitetulla vedellä suhteessa 1:1, arvo nousee C _T 1,0:llä. Kun näyte on laimennettu, suorita näytteelle mutaatiotesti. Tai jos näyte on laimennettu DNA-näytteen arvioinnin jälkeen, jatka suoraan EGFR-mutaation havaitsemiseen laimennetusta näytteestä.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Merkintä	Merkitys	Toimenpide
SAMPLE_CTRL_FAIL	Näyte hylätty – näytteen kontrollin FAM C _T liian korkea.	Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty myös toistetussa PCR-ajossa, ja jos DNA:n määrä ei vielä riitä, eristä kaksi uutta FFPE-kudososaa, jos mahdollista. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty, toista PCR-ajo toiselle näytteelle. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Sisäisen kontrollin (HEX) C _T liian korkea (tai ei C _T :tä), FAM-kanavan mutaatiotulos negatiivinen.	Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitsevällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätestaus ei ole tarpeen. Laimenna näytettä pakkauksen mukana toimitetulla vedellä sillä oletuksella, että näytteen laimentaminen 1:1-suhteeseen nostaa kontrollireaktion C _T :tä arvolla 1,0, että lopullinen tilavuus on > 40 µl (eli 40 µl DNA:ta ja 40 µl vettä putkesta, jossa on merkintä DIL). Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on hylätty, eristä näyte kahdesta FFPE-lisäosasta. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos toinen näyte on hylätty, tee laimennus yllä olevien ohjeiden mukaan. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutaatioputki hylätty – näytteen (sisäinen kontrolli) C _T HEX on liian matala.	Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitsevällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätestaus ei ole tarpeen. Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos toistettu PCR-ajo on hylätty, eristä uudet näytteet kahdesta (2) FFPE-kudososasta, jos niitä on. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty, toista PCR-ajo toiselle näytteelle. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Merkintä	Merkitys	Toimenpide
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutaatioputki hylätty – sisäisen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	<p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitsevällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätестaus ei ole tarpeen.</p> <p>Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos toistettu PCR-ajo on hylätty, eristä uudet näytteet kahdesta (2) FFPE-kudososiesta, jos niitä on. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty, toista PCR-ajo toiselle näytteelle. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiotilastus, eikä sille tule suorittaa enää lisätестejä.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Näytteessä on yksi tai useampi positiivinen mutaatio, samalla yksi tai useampi saman näytteen mutaatioista on hylätty.	<p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitsevällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätестaus ei ole tarpeen.</p> <p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joiden kliinisesti merkityksellisen mutaatioreaktioseoksen tulos on INVALID (Epäkelpo), on testattava uudelleen kaikkien reaktioseoksien kanssa merkinnän mukaisen toimenpiteen tekemisen jälkeen.</p> <p>Jos SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkintä annetaan kyseessä olevan näytteen muun merkinnän yhteydessä, on noudatettava SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkinnän toimenpiteen mukaista näytteen laimennusta. Valmistele uusi PCR-ajo ja testaa näyte uudelleen.</p> <p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joiden kliinisesti merkityksellisen mutaatioreaktioseoksen tulos toistetussa PCR-ajossa on INVALID (Epäkelpo), on eristettävä uudelleen kahdesta uudesta FFPE-osasta. Valmistele uusi PCR-ajo kaikilla reaktioseoksilla tämän eristetyn näytteen testaamista varten.</p> <p>Jos näyte tuottaa virheellisen tuloksen jälkeen kliinisesti merkityksellisille mutaatioreaktioseoksille, testaa näyte uudelleen kaikkien reaktioseoksien kanssa virheellisyydestä ilmoittavan merkinnän mukaisen toimenpiteen tekemisen jälkeen. Jos SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkintä annetaan kyseessä olevan näytteen muun merkinnän yhteydessä, on noudatettava SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkinnän toimenpiteen mukaista näytteen laimennusta. Valmistele uusi PCR-ajo ja testaa näyte uudelleen.</p> <p>Jos tämän toiston aikana havaitaan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkintä, näytteelle annetaan määrittämättömän mutaation status.</p>

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Merkintä	Merkitys	Toimenpide
MUTATION_EARLY_CT	Näyte epäkelpo – ΔC_T liian matala tai C_T on raja-arvoalueen alapuolella	Valmistele uusi PCR-ajo toistaaksesi näytteen ajon, noudata sekoituksen vaiheita erityisen tarkasti.

Vianmääritys

Tämä ongelmien ratkaisupuos voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustostamme usein kysytyjen kysymysten (Frequently Asked Questions, FAQ) osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja määrytyksiin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän käsikirjan takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com.)

Huomautuksia ja ehdotuksia

NTC-näytteiden tulos on positiivinen Green FAM -kanavassa

PCR:n valmistelun aikana tapahtui kontaminaatio

Toista PCR uusilla reagensseilla replikaateissa.

Jos mahdollista, sulje PCR-putket heti testattavan näytteen lisäämisen jälkeen.

Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti.

EGFR-positiivinen kontrolli ei anna signaalia

a) PCR-tietojen analysointia varten valittu fluoresenssikanava ei ole protokollan mukainen.

Tietojen analysoimisessa pitää valita Cycling Green -fluoresenssikanava analyttistä EGFR:n PCR:ää varten ja Cycling Yellow -fluoresenssikanava sisäisen kontrollin PCR:ää varten.

b) Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen lämpötilaprofiiliin virheellinen ohjelmointi

Vertaa lämpötilaprofiilia protokollaan. Jos se on virheellinen, toista ajo.

Huomautuksia ja ehdotuksia

- | | |
|--|---|
| c) PCR on määritetty väärin | Tarkista, noudattavatko työskentelyvaiheesi pipetointitapaa ja toista PCR tarvittaessa. |
| d) Yhden tai useamman sarjan osan säilytysolosuhteet eivät vastanneet kohdassa Reagenssien säilytys ja käsittely (sivu 18) annettuja ohjeita | Tarkista säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit -sarja on vanhentunut. | Tarkista säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |

Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Rajoitukset

Tuotteella saatujen tulosten tulkinnassa on otettava huomioon kaikki asianmukaiset kliinisten löydökset ja laboratoriolöydökset, eikä diagnoosia saa tehdä yksin testitulosten pohjalta.

Tätä tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet erityisopastuksen ja -koulutuksen *in vitro* -diagnostisiin toimenpiteisiin ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen käyttöön.

Tuote on tarkoitettu käytettäväksi vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen real-time PCR-laitteessa.

Optimaalisten tulosten saavuttaminen edellyttää kaikkien *therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjan käsikirjassa annettujen* ohjeiden huolellista noudattamista. Reagenssien muu kuin tässä käsikirjassa määritetty laimentaminen ei ole suositeltavaa, ja se johtaa suorituskyvyn heikkenemiseen.

On tärkeää, että näytteen sisältämän DNA:n määrä ja laatu arvioidaan ennen näytteen analysointia *therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa* käyttämällä. Määrittämiseen vaadittava hyväksyttävä C_T -arvo voidaan määrittää sarjan mukana toimitettavaa ylimääräistä kontrollireaktioseosta käyttäen. Absorbanssilukemien käyttö ei ole hyväksyttävää, sillä ne eivät korreloi DNA:n C_T -arvojen kanssa.

EGFR-deleetioreaktioseoksen alukkeet on suunniteltu kohdistumaan useisiin eksonin 19 deleetioihin, jotka kattavat nukleotidit 55174772–55174795 (GRCh38 chr7), 23 emäsparin alue.

Kun eksonin 19 deleetiomääritys on analyttisesti validoitu ja sen on osoitettu tunnistavan 14 määritettyä deleetiota eksonissa 19 (katso taulukko 1 tässä käsikirjassa), on kuitenkin mahdollista, että deleetioiden alukesarjan monistaa lisämutaatioita (mukaan lukien mm. ylimääräisiä eksonin 19 deleetioita, eksonin 19 insertioita ja L747P-mutaation).

Mikäli näitä lisämutaatioita ilmenee, ne aiheuttavat Deletions Detected (Deleetioita tunnistettu) -tuloksen tietystä potilasnäytteestä.

Lisäksi on mahdollista, että L858R-määritys tunnistaa L858Q-mutaation. Jos L858Q-mutaatiota esiintyy potilasnäytteessä, tuloksena voi siis olla L858R Detected (L858R tunnistettu).

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivämäärää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Suorituskykyominaisuudet

Analyttinen suoritus

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjan suorituksen ominaispiirteet on määritetty tutkimuksissa, joissa käytettiin NSCLC-potilailta kerättyjä FFPE-näytteitä ja ihmisen FFPE-solulinjoja (FFPE-solulinjat). FFPE-solulinjat luotiin käyttämällä keuhkosyövän solulinjaa (A549), jotta saatiin aikaa haluttuja tiettyjä EGFR-mutaatioita sisältäviä solulinjoja. Jos kudosnäytteitä tai solulinjoja ei ollut käytettävissä, käytettiin DNA-plasmidia.

Tyhjän raja (Limit of Blank, LOB), työalue, raja-arvot ja ΔC_T -raja-arvoalueet

Yhteensä 417 FFPE-näytettä testattiin tutkimuksessa NCCLS EP17-A -ohjeiden (2004) (12) mukaisesti LOB-arvojen ja ΔC_T -raja-arvojen määrittämiseksi kussakin mutaatiomäärityksessä. Lisäksi työskentelyalue määritettiin. ΔC_T -raja-arvoalueet näkyvät taulukossa Taulukko 9.

Taulukko 9. Mutaatiomäärityksille luodut ΔC_T -raja-arvoalueet

Määrittäminen	C_T -alue	ΔC_T -raja-arvoalue (ΔC_T)
T790M	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 7,40$
Deleefiot	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,00$
L858R	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
L861Q	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
G719X	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
S768I	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
Insertiot	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,00$

Kontrollireaktion C_T -alueeksi määritettiin 23,70–31,10 C_T .

Määrityksen raja-arvot ja toiminta-alueet varmistettiin standardiliuosten avulla sekä lisäksi FFPE-näytteillä. Varmistuksen aikana raja-arvoista arvioitiin niiden kyky erottaa oikea mutaatio villityypin DNA:ssa arvioimalla jokainen määritys suurella genomisella input-DNA:lla ja suurella DNA-mutaatiomäärällä (katso Ristireagoivuus). Myös lähtö-DNA:n vaikutus mutaation havaitsemiseen arvioitiin (katso sivu Lähtö-DNA:n vaikutus ΔC_T -arvoihin). Alueen alaraja kerrotaan, jotta PCR-fluoresenssiartefakti voidaan sulkea pois.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjan suorituskyvyn arvioimiseksi mallin puuttuessa sekä sen varmistamiseksi, että tyhjä näyte tai villityypin DNA:ta sisältävä näyte ei tuota pienen pitoisuuden mutaatiota ilmaisevaa analyttistä signaalia, ja mallittomat näytteet ja villityypin NSCLC EGFR DNA arvioitiin. Tuloksissa ei ilmennyt positiivisia mutaatioilmoituksia NTC-näytteistä tai villityypin FFPE-näytteistä.

Lähtö-DNA:n vaikutus ΔC_T -arvoihin

DNA-lähtötaso on monistettavan EGFR DNA:n kokonaismäärä näytteessä kontrollireaktion C_T -arvoilla määritettynä. Jotta voitiin osoittaa, että *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan suorituskyky on yhdenmukainen koko kontrollireaktion C_T -alueella (23,70–31,10), kaikki seitsemän (7) EGFR-mutaatiomääritystä testattiin kuusipisteisellä 1-in-3-laimennussarjalla (DNA eristetty FFPE-solulinjoista). Kunkin mutaation ensimmäisen laimennuksen C_T -tavoitearvo oli noin 24,70. Lopullinen laimennus, joka antoi C_T -arvoksi noin 32–33, oli kontrollireaktion C_T -alueen ulkopuolella. Eri DNA-kokonaislähtötasoilla mitatut ΔC_T -arvot olivat yleensä yhdenmukaisia *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan työskentelyalueella.

Ristireagoivuus

Villityypin EGFR DNA testattiin korkeana lähtö-DNA:na ei-spesifisen monistumisen arvioimiseksi. Tulokset osoittivat, että matalimmat ΔC_T -arvot ylittivät määritetyt raja-arvot, mikä tarkoitti, että ei-spesifistä monistumista ei tapahtunut.

Mahdollinen ristireaktiivisuus arvioitiin testaamalla FFPE-solulinjat korkeana lähtö-DNA:na kaikilla reaktioseoksilla. Tuloksissa ei ilmennyt ristireaktiivisuuden aiheuttamia vaikutuksia mutanttireaktioiden välillä. Vähimmäisarvot arvolle ΔC_T olivat korkeampia kuin kulloisenkin määrittämisen raja-arvot kaikille yhteensopimattomille reaktioseoksille ja DNA-näytteille.

Tarkkuus: Vertailu analyttiseen vertailumenetelmään

Tutkimuksessa ilmeni *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan korrelaatio mutaatiostatuksen suhteen kaksisuuntaisen Sanger-sekvensoinnin kanssa. Tässä tutkimuksessa testattiin 360 FFPE-näytettä.

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Positive Percent Agreement, PPA), negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Negative Percent Agreement, NPA) ja yleinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Overall Percent Agreement, OPA) määritettiin analysoimalla näytteet, joiden sekä Sanger- ja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan tulokset olivat hyväksytyjä. Nämä prosentuaaliset arvot sekä niitä vastaavat kaksipuoliset 95 %:n luottamusväli (Confidence Intervals, CI) on koottu taulukkoon 10.

Taulukko 10. Yhtäpitävyyden arviointi

Mittari	Prosentuaalinen yhtäpitävyys (N)	95 %:n luottamusväli (CI)
Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys	99,4 % (157/158)	96,5–100,0 %
Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys	86,6 % (175/202)	81,2–91,0 %
Yleinen prosentuaalinen yhtäpitävyys	92,2 % (332/360)	89,0–94,8 %

Huomiot 28 ristiriitaisesta yleisen prosentuaalisen yhtäpitävyyden tuloksesta:

- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan mukaan 1 (3,6%) näyte oli villityyppiä (eli mutaatiota ei havaittu), mutta Sanger-sekvensointi antoi tulokseksi havaitun mutaation.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarja havaitsi mutaation 27 (96,4%) näytteessä, mutta Sanger-sekvensointi antoi tulokseksi villityypin näytteen.

Havaitsemisraja (Limit of Detection, LOD) -arvot

Jokaisen 29 EGFR-mutaation LOD määritettiin tutkimuksessa. Tutkimuksessa havaitsemisraja määritettiin matalimmaksi määräksi mutaatio-DNA:ta villityypin DNA:ssa, jolla mutaationäyte antaa 95 prosentissa testituloksista mutaatioposiitiivisen tuloksen (C_{95}).

Havaitsemisrajan määrittämiseksi kustakin mutaatiosta valmistettiin näytteitä, jotka erosivat toisistaan mutaatioprosentin ja matalan ja korkean lähtö-DNA:n pitoisuuden suhteen. Näytteet testattiin *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla (Taulukko 11). Kunkin määrittämisen havaitsemisraja laskettiin logistisella regressiolla. LOD varmistettiin testaamalla mutaationäytteet, joiden LOD oli määritetty, ja vahvistamalla positiivinen testitulos.

Taulukko 11. LOD määritettiin käyttämällä matalaa ja korkeaa lähtö-DNA:ta, kliinisiä FFPE-näytteitä, FFPE-solulinjoja ja plasmideja

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Emäsjärjestyksen muutos	LOD (mutantti-%)	
				Heikko	Voimakas
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	– [¶]
19	Deleetiot	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	– [¶]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	– [¶]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	– [¶]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	– [¶]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]		
12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]		

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Emäsjärjestyksen muutos	LOD (mutantti-%)	
				Heikko	Voimakas
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Insertiot	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 [†]	– [‡]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (syövän somaattisten mutaatioiden luettelo): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] LOD-arvot saatiin käyttämällä solulinjoja

[†] LOD-arvot saatiin käyttämällä plasmideja

[†] LOD-arvot saatiin käyttämällä kliinisiä näytteitä

[‡] ei arvioitu

Häiriöt

Nekroottisen kudoksen aiheuttamat häiriöt

Kliiniset NSCLC FFPE -näytteet, joissa oli korkeintaan 50 % nekroottista kudossisältöä eivät häirinneet *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan tulosten tulkintaa EGFR-mutaation tai villityypin näytteillä.

Eksogeeniset aineet

Seuraavia DNA-eristysprosessin sisältämiä mahdollisesti häiritseviä aineita testattiin mutantti- ja villityypin näytteissä 10-kertaisella pitoisuudella: parafiinivaha, ksyleeni, etanoli, proteinaasi K. Tulokset todistivat, että nämä aiheet eivät häirinneet *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan tulosten tulkintaa.

Uusittavuus

Erienvälinen uusittavuus

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjan järjestelmässä käytetään kahta erillistä sarjaa: QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa tai QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarjaa DNA:n eristämiseen ja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa DNA:n monistamiseen ja EGFR-mutaatioiden tilan havaitsemiseen. Erienvälinen uusittavuus ja vaihtokelpoisuus todettiin käyttämällä kolmea eri QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjan erää ja kolmea (3) eri *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan erää. Erien välinen oikeiden tulosten kokonaisprosentti oli EGFR-mutaatiomääritysten osalta 97,8 % (317/324) ja villityypin näytteiden osalta 100 % (379/379).

Näytteiden käsittely

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjan uusittavuus tutkittiin käyttämällä kolmesta FFPE-näytelohkosta otettuja osioita, erityisesti eksonin 19 deleetion mutaatiota (2235-2249 del15), eksonin 21 L858R-mutaatiota ja yhtä villityppiä. Kullekin näytteelle eristykset tehtiin kaksoiskappaleina kolmessa (3) tutkimuskeskuksessa ja testattiin kolmena (3) ei-peräkkäisenä päivänä kuuden (6) päivän sisällä toisistaan, jolloin tulokseksi saatiin yhteensä 18 tietopistettä jokaiselle näytteelle. Kussakin tutkimuskeskuksessa kaksi (2) käyttäjää teki testauksen käyttämällä yhtä QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -sarjan erää (yksi erä jokaisessa tutkimuskeskuksessa, yhteensä kolme erää) ja yhden *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan erän reagensseja (kaikissa tutkimuskeskuksissa sama erä). Kaikkien mutantti- ja villityypin näytteiden tulokset olivat hyväksyttäviä ja tuottivat odotetun tuloksen (oikea tulos = 100 %, 18/18 kaikille näytteille), mikä tuki *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan uusittavuus- ja toistettavuustuloksia analyysiä edeltävässä DNA:n eristämisvaiheessa.

Tarkkuus ja uusittavuus

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjan tarkkuus ja uusittavuus tutkittiin testaamalla kliinisistä NSCLC FFPE -näytteistä tai FFPE-solulinjoista eristettyä DNA:ta, joka vastasi *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan seitsemää mutaatiomääritystä. Testiin kuului myös kliinisiä NSCLC-villityypin FFPE-näytteitä (Taulukko 12).

Matriisitutkimusmallia käytettiin määrityksen uusittavuuden arvioimiseen testaamalla näytteitä kolmessa (3) laboratoriossa (tutkimuskeskus) kolmella (3) eri *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan erällä niin, että kussakin tutkimuskeskuksessa oli kaksi (2) käyttäjää, kaksi (2) laitetta ja kaikki näytteet (valmisteltu miltei LOD:ta vastaavalle pitoisuudelle) testattiin kaksoiskappaleina 16 päivän aikana. Kunkin yksittäisen mutaation uusittavuus määritettiin kaikissa tutkimuskeskuksissa tekemällä testit muina kuin toisiaan seuraavina päivinä. Oikeiden tulosten jakauma on esitetty taulukossa 12 seuraavalla sivulla.

Taulukko 12. Määrittelyn uusittavuus – oikeiden tulosten osuus testatuista EGFR-mutaatioista

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*- tunniste	Tulokset		% oikein Matalampi yksipuolinen 95 %:n CI	
			Oikein/yhteensä	% oikein		
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06	
19	Deleetiot	12384	92/92	100	96,80	
		12387	95/95	100	96,90	
		12419	83/83	100	96,46	
		12422	94/94	100	96,86	
		13551	95/95	100	96,90	
		6220	96/96	100	96,93	
		6223	95/95	100	96,90	
		6225	91/95	95,79	90,62	
		6254	92/92	100	96,80	
		6255	94/96	97,92	93,59	
		12369	95/95	100	96,90	
		12370	62/63	98,41	92,69	
		12382	92/95	96,84	92,04	
		12383	93/93	100	96,83	
20	S768I	6241	82/82	100	96,41	
		Insertiot	12376	92/92	100	96,80
			12378	93/93	100	96,83
			12377	94/94	100	96,86
		T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48	
	L861Q	6213	84/84	100	96,50	
Villityyppi	-	-	77/78	98,72	94,06	

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (syövän somaattisten mutaatioiden luettelo):
<http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Keskihajonta ja 95 %:n luottamusvälit arvioitiin ajon aikana, ajojen välillä, päivien välillä, erien välillä ja tutkimuskeskusten välillä tekemällä varianssikomponentin analyysi. Kaikissa varianssikomponenteissa variaatiokerroin (Coefficient of Variation, CV) oli yhteensä $\leq 14,11$ % kaikille testatuille EGFR-mutaatioille. Kaikille mutanttipaneelin osille CV:n prosentti oli $\leq 8,33$ % erien välillä, päivien välillä ja ajojen välillä. CV:n prosentti ajon aikana vaihteli (uusittavuus/tarkkuus) alueella 5,99–13,49 %.

Kliininen suorituskyky

Kliinisten tulosten tiedot: GIOTRIF®

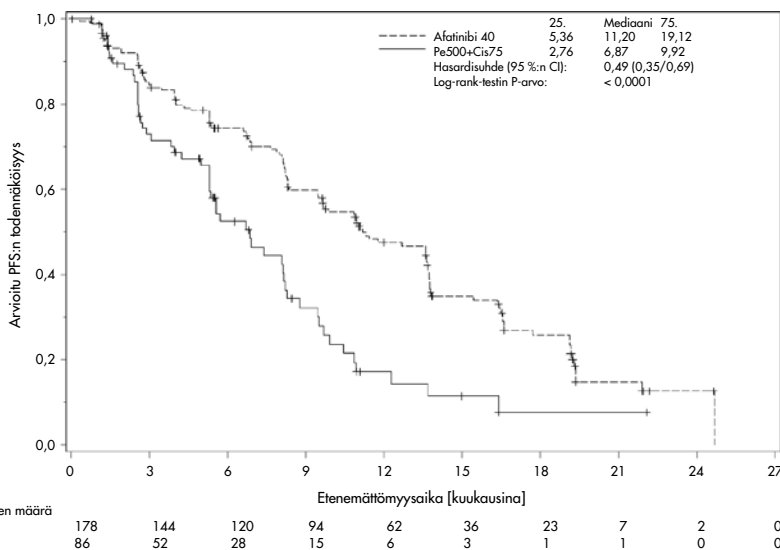
Kliininen LUX-Lung 3 -tutkimus oli kansainvälinen, avoin, satunnaistettu III:n vaiheen monikeskustutkimus, jossa verrattiin afatinibia ja kemoterapiaa ensisijaisena hoitona potilaille, joilla oli vaiheen IIIB tai IV keuhkojen adenokarsinooma, johon liittyi EGFR-aktivoiva mutaatio (ClinicalTrials.gov-numero NCT00949650). Tutkimukseen otettavien potilaiden sisäänottokriteerit määritettiin testaamalla potilaan EGFR-mutaation tila kliinisen tutkimuksen testillä (Clinical Trial Assay, CTA). Kudosnäytteille tehtiin retrospektiivinen testaus *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla. CTA-testin ja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan yhdenmukaisuutta arvioitiin järjestelmällä yhdistävä tutkimus.

CTA-testin tuloksien mukaan 345 potilasta satunnaistettiin tutkimuksen alussa (afatinibi: 230 potilasta, kemoterapia: 115 potilasta). Tehokkuuden ensisijainen tulos oli etenemättömyysaika (Progression-Free Survival, PFS), jonka arvioi itsenäinen arviointitoimikunta (independent Review Committee, IRC). 345 satunnaistetun potilaan joukosta 264 potilaan (afatinibi: 178 potilasta, kemoterapia: 86 potilasta) kasvainnäytteet testattiin retrospektiivisesti *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan avulla. Tilastollisesti merkitsevä parannus PFS:ssä havaittiin IRC:n mukaan potilaille, jotka oli satunnaistettu saamaan afatinibihoitoa, verrattuna potilaisiin, jotka oli satunnaistettu saamaan kemoterapiaa, yleisesti CTA+-populaatiossa ja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarja+ / CTA+ -populaatiossa. Tehokkuuden kokonaistuloksien yhteenveto on esitetty taulukossa 13 ja kuvassa 19.

Taulukko 13. Kliiniset hyödyt *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla testatuilla kliinisen LUX-Lung 3 -tutkimuksen populaation potilailla

Parametri	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit -sarja +/ CTA+ -populaatio n = 264		CTA+-populaatio, n = 345	
	Kemoterapia n = 86	Afatinibi n = 178	Kemoterapia n = 115	Afatinibi n = 230
Etenemättömyysaika (Progression-Free Survival, PFS)				
Kuolemien tai etenemisien määrä, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4 %)	69 (60,0 %)	152 (66,1 %)
PFS:n mediaani (kuukaudet)	6,9	11,2	6,9	11,1
PFS:n 95 %:n CI:n mediaani	5,3; 8,2	9,7; 13,7	5,4; 8,2	9,6; 13,6
Hasardisuhte		0,49		0,58
Hasardisuhteen 95 %:n CI		0,35; 0,69		0,43; 0,78
P-arvo (ositettu log-rank-testi)*		< 0,0001		< 0,001

* ositettu EGFR-mutaatiostatuksen ja rodun suhteen.



Kuva 19. Kaplan-Meier-käyrä etenemättömyysajasta (Progression-Free Survival, PFS) itsenäisen arviointitoimikunnan mukaan hoitoryhmittäin (*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarja+ / CTA+ - populaatiossa).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja + / CTA+ -aliryhmän (n = 264) analyysi paljasti, että afatinibihoitoa saavien potilaiden ryhmässä PFS-aika (PFS-mediaani 11,2 vs. 6,9 kuukautta) piteni merkittävästi, ja tässä ryhmässä etenevän sairaustapahtuman tai kuoleman (HR = 0,49, 95 %:n CI [0,35; 0,69], p < 0,0001) todennäköisyys oli pienempi kuin kemoterapiaa saaneiden potilaiden ryhmässä. Havaittua kliinistä hyötyä *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla testattujen potilaiden aliryhmässä verrattiin koko tutkimuspopulaation (n = 345) vastaavaan havaittuun arvoon.

Kliinisten tulosten tiedot: IRESSA®

Kliininen IRESSA Follow-up Measure (IFUM) -seurantatutkimus oli faasin IV avoin yhden tutkimusryhmän tutkimus (NCT01203917), jossa arvioitiin ensisijaisen gefitinibihoiton tehokkuutta ja turvallisuutta/siedettävyyttä valkoihoisilla potilailla, joilla oli vaiheen IIIA/B/IV EGFR-mutaatiopositiivinen paikallisesti levinnyt tai metastaattinen NSCLC. IFUM-tutkimus suunniteltiin arvioimaan RECIST-kriteerien mukaista objektiivista vasteosuutta valkoihoisissa NSCLC-potilaissa, joilla oli prospektiivisesti valittu EGFR-mutaatio.

Tutkimukseen otettavilla potilailla piti olla deleetio EGFR:n eksonissa 19, L858R:n, L861Q:n tai G719X:n korvaava mutaatio eikä T790M- tai S768I-mutaatiota tai eksonin 20 insertiota kasvainnäytteissä prospektiivisesti tehdyn kliinisen tutkimuksen määrittämisen (CTA, Clinical Trial Assay) mukaan. Kliiniseen IFUM-tutkimukseen otettujen potilaiden plasmanäytteiden myöhempi testaus tehtiin käyttämällä lisäksi diagnostista *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa. Yhdistävällä tutkimuksella arvioitiin *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan yhdenmukaisuutta sen CTA:n kanssa, jolla potilaat valikoitiin kliiniseen IFUM-tutkimukseen. Kahden määrittämisen välinen kokonaiskonkordanssi EGFR:n eksonin 19 deleetioiden ja L858R-mutaatioiden havaitsemisessa oli 98,2 % (n = 700/713; 95 %:n CI: 96,9 %, 99,0 %), jossa PPA oli 88,2 % (n = 90/102; 95 %:n CI: 80,4 %, 93,8 %), jossa NPA oli 99,8 % (n = 610/611; 95 %:n CI: 99,1 %, 100,0 %).

CTA-testien tulokset saatiin 859 seulotulta potilaalta, joista 106 oli hyväksyttävissä käyttämään gefitinibihoitoa. Yhteensä 859 näytteestä, joista oli olemassa CTA-tulokset, 765 näytettä oli myöhemmin käytettävissä testaukseen *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla. Näihin kuului 87 EGFR-mutaatioposiitiivisen tuloksen CTA-testillä ja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla antanutta näytettä.

Tärkein tehokkuustulos oli objektiivinen vasteisuus (Objective Response Rate, ORR), jonka arvioivat sokkoutettu erillinen keskustoimikunta (Blinded Independent Central Review, BICR) ja tutkijat. Havaittua kliinistä hyötyä *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla testattujen potilaiden aliryhmässä verrattiin koko tutkimuspopulaation vastaavaan havaittuun arvoon.

Tehokkuuden kokonaistuloksien yhteenvedo on esitetty taulukossa 14.

Taulukko 14. Kliiniset hyödyt *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla testatuilla kliinisen IFUM-tutkimuksen populaation potilailla

Parametri	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit - sarja+ -populaatio, n = 87	CTA+-populaatio, n = 106
Objektiivinen vasteisuus (Objective Response Rate, ORR) BICR:n mukaan		
Vastemäärä (N)	42	53
ORR, % (95 %-n CI)	48,3 (38,1–58,6)	50,0 (40,6–59,4)
Vasteen mediaanikesto (kuukausina)	6,9 (5,6–11,4)	6,0 (5,6–11,1)
Objektiivinen vasteisuus (Objective Response Rate, ORR) tutkijoiden mukaan		
Vastemäärä (N)	62	74
ORR, % (95 %-n CI)	71,3 (61,0–79,7)	69,8 (60,5–77,7)
Vasteen mediaanikesto (kuukausina)	8,3 (7,2–11,3)	8,3 (7,6–11,3)

BICR: Blinded independent central review (sokkoutettu erillinen keskustoimikunta), CI: Confidence interval (luottamusväli);
CTA: Clinical trial assay (kliinisen tutkimuksen määrittely).

Huomaus: sarja+ ovat positiivisia eksonin 19 deleetioiden/L8585R:n/L861Q:n/G719X:n osalta.

Huomioitaessa, että *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa ei käytetty potilaiden valintaan kliiniseen IFUM-tutkimukseen, tehokkuuden lisäanalyysinä tehtiin, jotta voitiin huomioida myös tutkimuksen ulkopuoliset potilaat, jotka olivat saaneet negatiivisen tuloksen CTA-testissä, mutta olisivat saattaneet saada positiivisen tuloksen *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla (eli *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), sekä tutkimukseen otetut potilaat, joiden *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjalla uudelleen tehdyt testitulokset eivät olleet hyväksyttäviä (eli *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarja tuntematon/CTA+). Kaikkien hypoteettisten analyysien tulokset olivat yleisesti samankaltaisia kuin ensisijaiset tehokkuuden analyysit.













Lähdeviitteet

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* 23, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525.
3. Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* 24, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May 3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* 26 (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* 15, 2442.
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* 26 (May 20 suppl), abstr 8038.

-
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 12, 4416s.
 10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
 11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Selitys
	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	Suojattava valolta
	GTIN-numero
Rn	R tarkoittaa käyttöohjeen versiota ja n on versionumero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Katso käyttöohjeet
	Huomio

Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan manuaalinen protokolla

Tässä osioissa on ohjeet *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan käyttöön yhdessä Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3.5 tai uudemman version kanssa avoimessa tilassa (eli ilman Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspakkausta).

Yleistä

- Katso tarvittavien materiaalien luettelo Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen.
- Katso yksityiskohtaiset ohjeet näytteen valmistelusta ja asettelusta kohdista Protokolla: Näytteen arviointi ja Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että jakson parametrit on asetettu oikein.

Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen

Luo ennen aloittamista lämpötilaprofiili *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan analysointia varten. Jakson parametrit ovat samat sekä DNA-näytteen että mutaation havaitsemisessa.

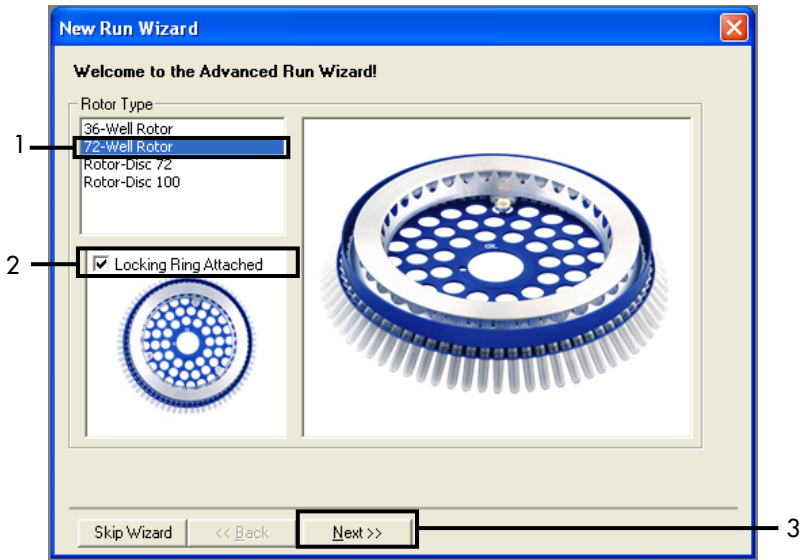
Menetelmä

Jakson parametrien yhteenveto on esitetty taulukossa 15.

Taulukko 15. Lämpötilaprofiili

Jaksot	Lämpötila	Aika	Tiedonkeruu
1	95 °C	15 minuuttia	Ei mitään
40	95 °C	30 sekuntia	Ei mitään
	60 °C	60 sekuntia	Green ja Yellow

1. Kaksoisnapsauta Rotor-Gene Q Series Software 2.3 -kuvaketta Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen liitetyn tietokoneen työpöydällä.
2. Luo uusi malli valitsemalla Empty Run (Tyhjä ajo), valitse New (Uusi) ja käynnistä New Run Wizard (Uuden ajon asetusohjelma).
3. Valitse roottorityyppi 72-well rotor (72-kuoppainen roottori). Varmista, että lukkorengas on paikallaan ja laita rasti Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Valitse Next (Seuraava) (kuva 20).



Kuva 20. New Run Wizard (Uuden ajon asetusohjelma) -valintaruutu. 1 = Rotor type (Roottorityyppi), 2 = Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu, 3 = Next (Seuraava) -painike.

4. Anna testaajan nimi. Lisää mahdolliset huomautukset ja anna reaktiomääräksi 25. Varmista, että Sample Layout (Näyteasettelu) -kentässä on valittuna 1, 2, 3.... Valitse Next (Seuraava) (kuva 21).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator :

Notes :

Reaction Volume (µL):

Sample Layout :

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

Skip Wizard << Back **Next >>**

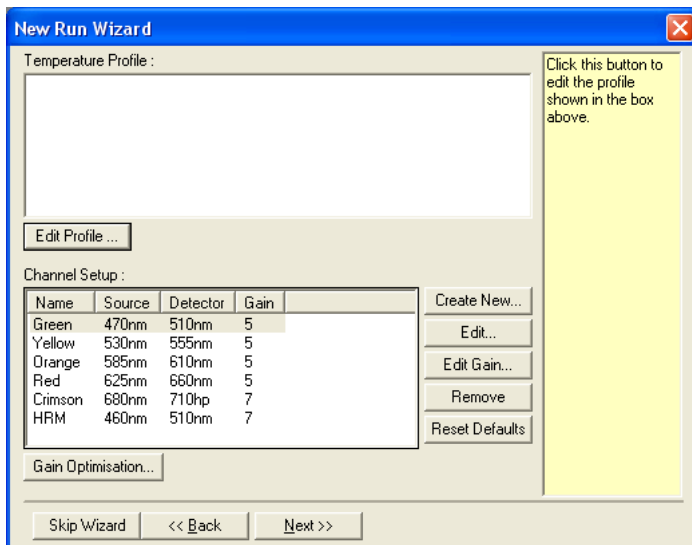
1

2

3

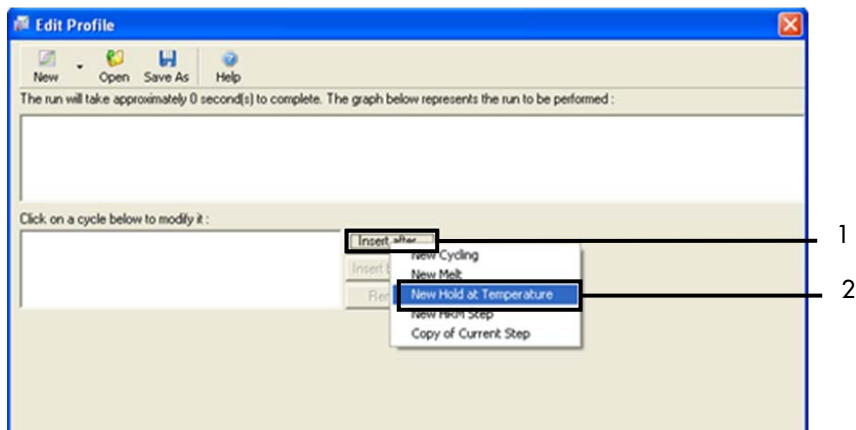
Kuva 21. Testaajan nimen ja reaktiomäärän antaminen. 1 = Operator (Testaaja) -kenttä ja Notes (Huomautukset) -kenttä, 2 = Reaction Volume (Reaktiomäärä) -kenttä ja Sample Layout (Näytteen asettelu) -kenttä, 3 = Next (Seuraava)

5. Napsauta New Run Wizard (Uuden ajon asetushjelma) -ikkunassa Edit Profile (Muokkaa profiilia) -painiketta (kuva 22) ja tarkista ajon parametrit seuraavien vaiheiden mukaisesti.



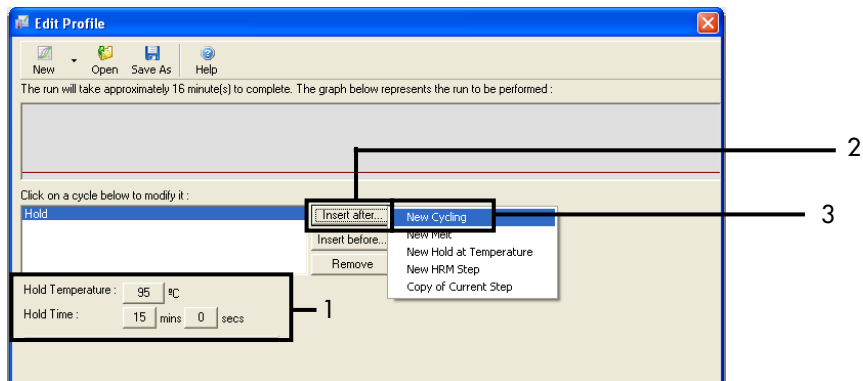
Kuva 22. Edit Profile (Muokkaa profiilia) New Run Wizard (Uuden ajon asetushjelma) -ikkunassa.

6. Napsauta Insert after (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta New Hold at Temperature (Uusi pito lämpötilassa) (kuva 23).



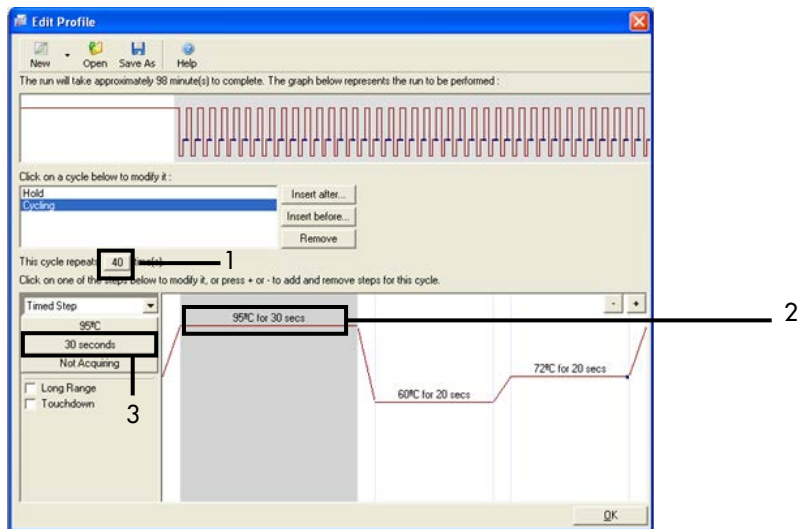
Kuva 23. Alun inkubointivaiheen määrittäminen. 1 = Insert after (Syötä seuraavan jälkeen) -painike, 2 = New Hold at Temperature (Uusi pito lämpötilassa).

7. Aseta Hold Temperature (Pitolämpötila) -kentän arvoksi 95°C ja Hold Time (Pitoaika) -arvoksi 15 mins 0 secs (15 minuuttia 0 sekuntia). Napsauta Insert after (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta New Cycling (Uusi jakso) (Kuva 24).



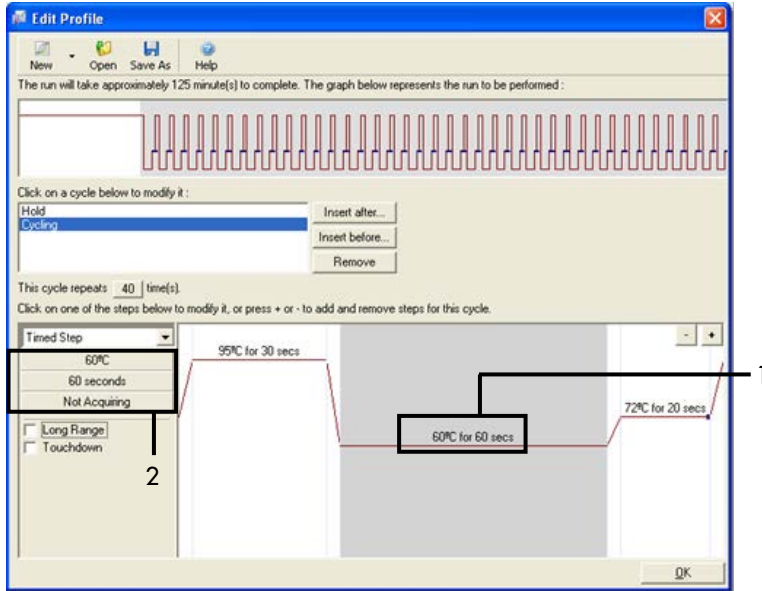
Kuva 24. Alun inkubointivaiheen lämpötila 95 °C. 1 = Hold Temperature (Pitolämpötila) -painike, Hold Time (Pitoaika) -painike, 2 = Insert after (Syötä seuraavan jälkeen) -painike, 3 = New Cycling (Uusi jakso).

8. Vaihda jakson toistojen määräksi 40. Valitse ensimmäinen vaihe ja asetus 95°C ajaksi 30 sekuntia (kuva 25).



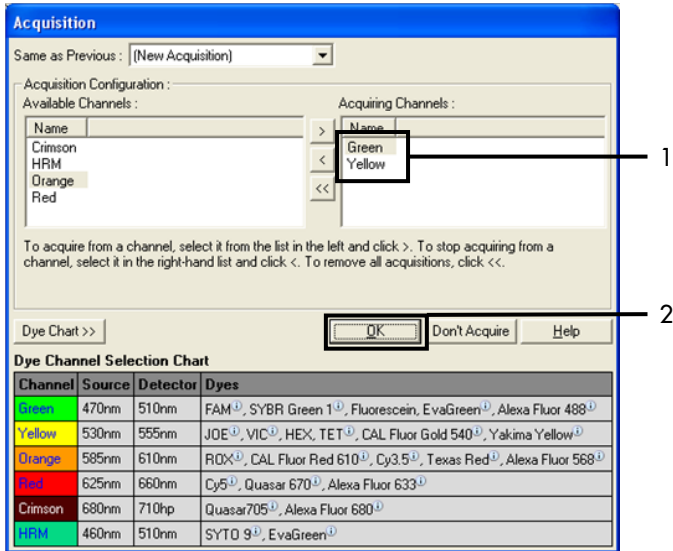
Kuva 25. Jakson vaiheen lämpötila 95 °C. 1 = Cycle repeats (Jakson toistot) -ruutu, 2 = 1. vaiheen lämpötila-asetus, 3 = 1. vaiheen ajan asetus.

9. Korosta toinen vaihe ja valitse asetukset 60°C ajaksi 60 sekuntia. Ota tiedonkeruu käyttöön tämän vaiheen aikana valitsemalla Not Acquiring (Ei kerää) (Kuva 26).



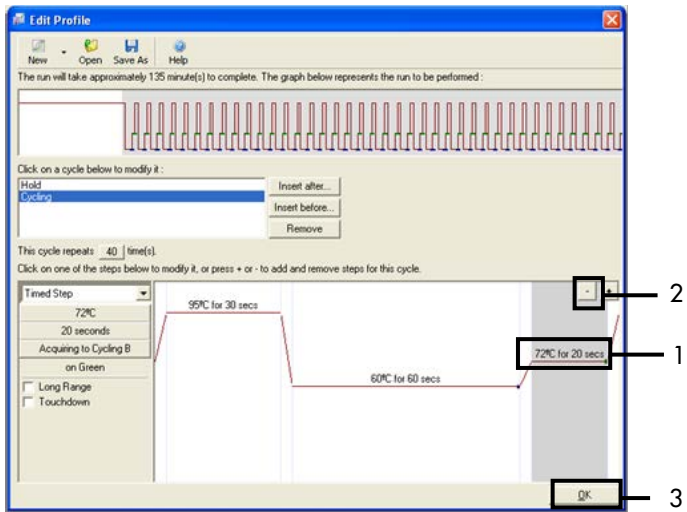
Kuva 26. Jakson vaiheen lämpötila 60 °C. (1 = 2. Vaiheen lämpötilan ja ajan asetus, 2 = Not Acquiring (Ei kerätä) -painike).

10. Valitse keräyskanaviksi Green ja Yellow. Siirrä nämä kanavat Available Channels (Saatavilla olevat kanavat) -luettelosta Acquiring Channels (Keräyskanavat) -luetteloon valitsemalla >-merkki. Valitse OK (Kuva 27).



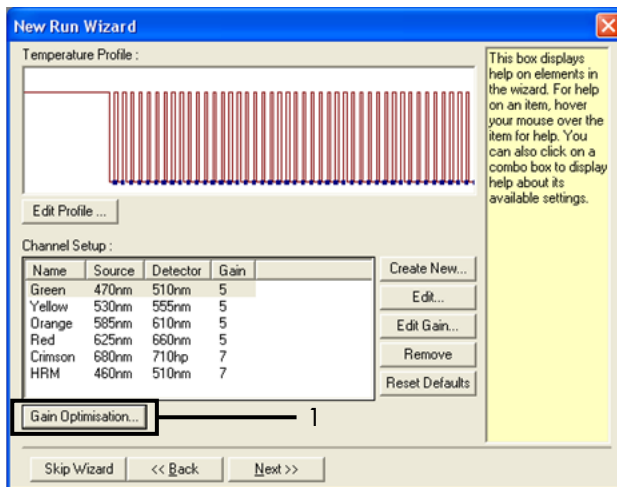
Kuva 27. Keruu vaiheen 60 °C :nlämpötilassa. 1 = Valitut kanavat, 2 = OK.

11. Korosta kolmas vaihe ja poista napsauttamalla painiketta -. Valitse OK (kuva 28).



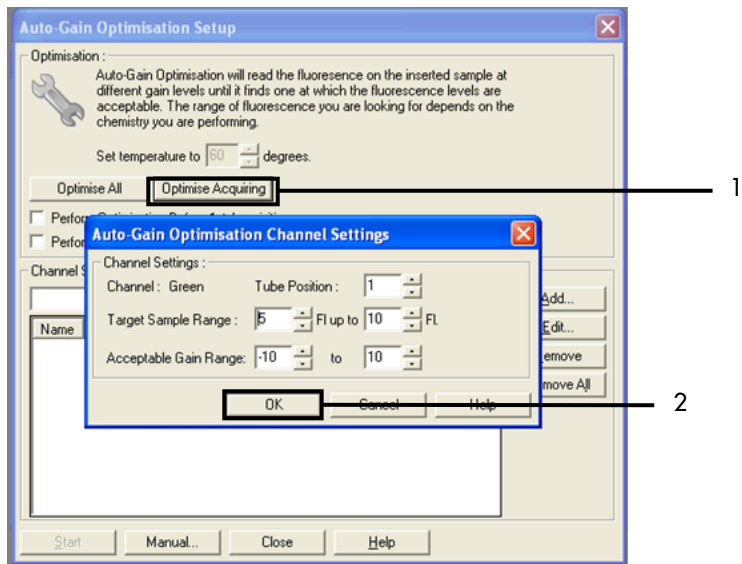
Kuva 28. Laajennusvaiheen poistaminen. 1 = 3. vaihe, 2 = Poistopainike, 3 = OK-painike.

12. Napsauta seuraavassa valintaikkunassa Gain Optimisation (Vahvistuksen optimointi) -painiketta (kuva 29).



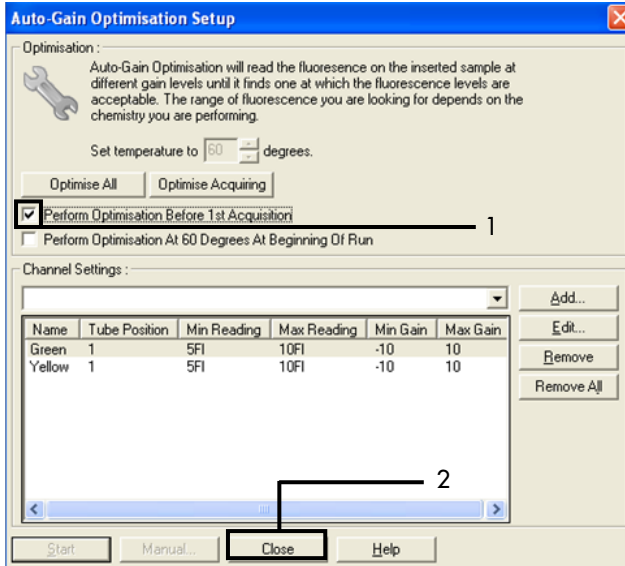
Kuva 29. Gain optimisation (Vahvistuksen optimointi) (1).

13. Valitse Optimise Acquiring (Optimoi keräys). Kanavan asetukset näkyvät kustakin kanavasta. Hyväksy nämä oletusarvot molemmille kanaville valitsemalla OK (Kuva 30).



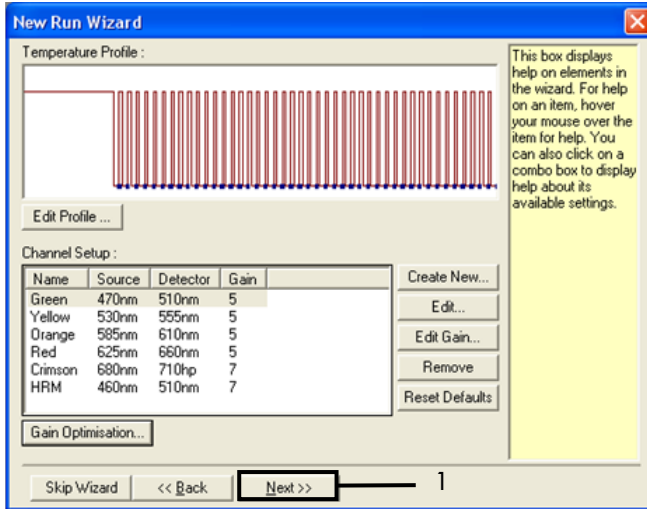
Kuva 30. Green-kanavan poiminnan automaattinen optimointi. 1 = Optimise Acquiring (Optimoi keruu) -painike, 2 = OK-painike.

14. Valitse Perform Optimisation before 1st Acquisition (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu ja palaa ohjattuun toimintoon napsauttamalla Close (Sulje) -painiketta (kuva 31).



Kuva 31. Green- ja Yellow-kanavan valinta. 1. Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu, 2 = Close (Sulje) -painike.

15. Valitse Next (Seuraava) (kuva 32). Tallenna *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan malli (*.ret-tiedosto) haluamaasi sijaintiin valitsemalla Save Template (Tallenna malli).



Kuva 32. Next (Seuraava) (1).

Toimenpide (manuaalinen)

Protokolla: Näytteen arviointi (manuaalinen)

Tätä protokollaa käytetään arvioimaan näytteissä olevan monistettavissa olevan DNA:n kokonaismäärä. Arviointi tulisi suorittaa ennen EGFR-mutaatioanalyysin tekemistä.

- Valmistele näytteet noudattamalla kohdassa Protokolla: Näytteen arviointi annettuja ohjeita vaiheeseen 11 asti.
- Suorita PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteessa kohdassa Protokolla: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset esitettyjen ohjeiden mukaisesti.
- Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot kohdassa Näytteen arviointitietojen analyysi esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen (manuaalinen)

- Kun näyte on läpäissyt näytteen arvioinnin, se voidaan testata EGFR-mutaatiotesteillä.
- Valmistele näytteet noudattamalla kohdassa Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen annettuja ohjeita vaiheeseen 11 asti.
- Suorita PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteessa kohdassa Protokolla: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset esitettyjen ohjeiden mukaisesti.
- Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot kohdassa EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

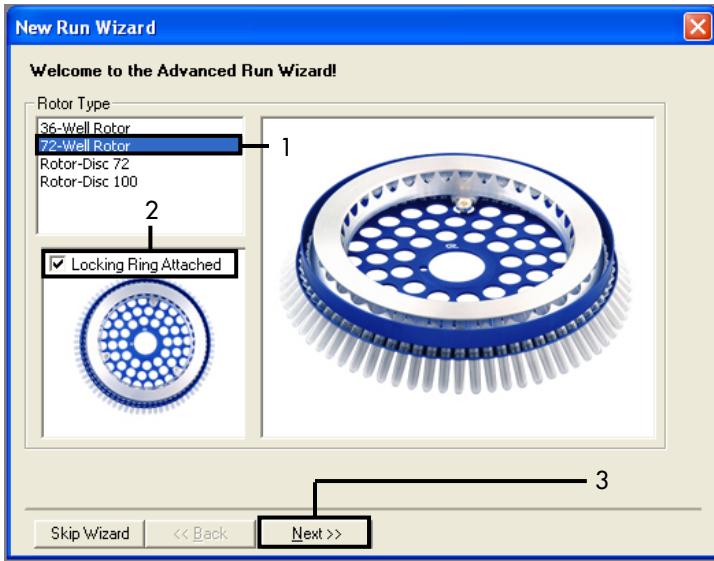
Protokolla: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset

Menetelmä

1. Avaa Rotor-Gene Q -sarjan ohjelmistoversio 2.3.5 tai uudempi ja avaa soveltuva *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan lämpötilaprofiili (*.ret-tiedosto).

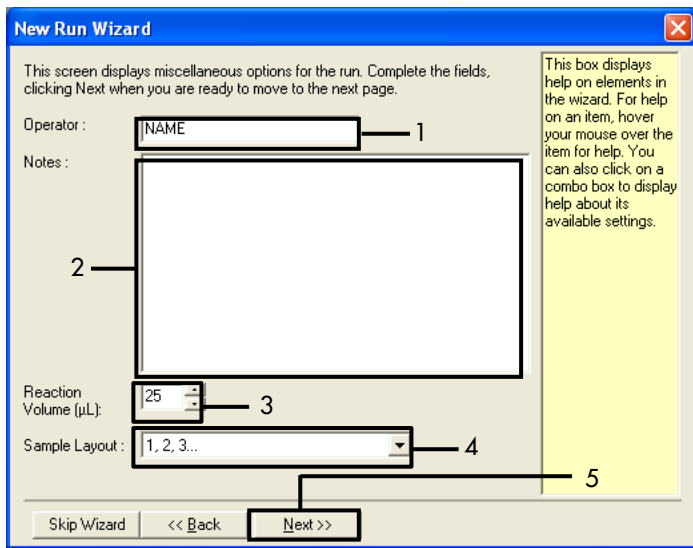
Katso ohjeet lämpötilaprofiilin luomisesta ja ajoparametrien tarkistamisesta kohdasta Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen.

2. Varmista, että oikea roottori on valittu, ja laita rasti Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Valitse Next (Seuraava) (kuva 33).



Kuva 33. New Run Wizard (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja Tervetuloa-ruutu. 1 = Rotor type (Roottorityyppi), 2 = Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu, 3 = Next (Seuraava) -painike.

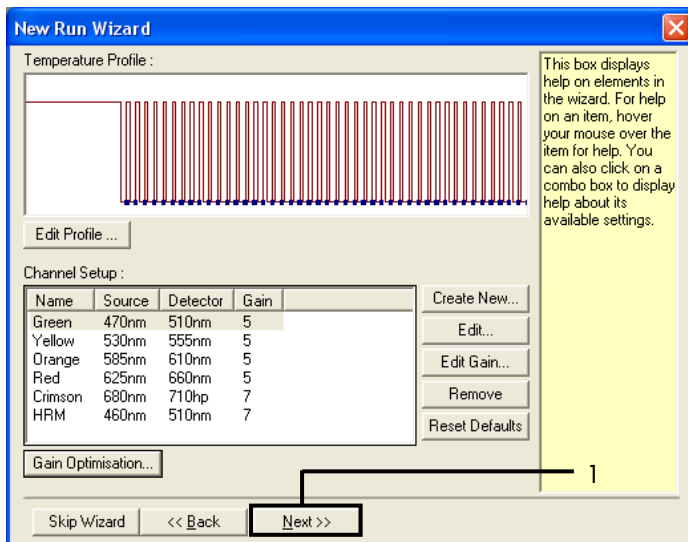
3. Anna testiajan nimi. Lisää mahdolliset huomautukset ja tarkista, että reaktiomääräksi on asetettu 25 ja että Sample Layout (Näytteen asettelu) -kohdassa lukee 1, 2, 3.... Valitse Next (Seuraava) (kuva 34).



Kuva 34. New Run Wizard (Uusi ohjattu ajo) -valintaikkuna. 1 = Operator (Testaaja) -kenttä, 2 = Notes (Huomautukset) -kenttä, 3 = Reaction Volume (Reaktiomäärä) -kenttä 4 = Sample Layout (Näytteen asettelu) -kenttä, 5 = Next (Seuraava) -painike.

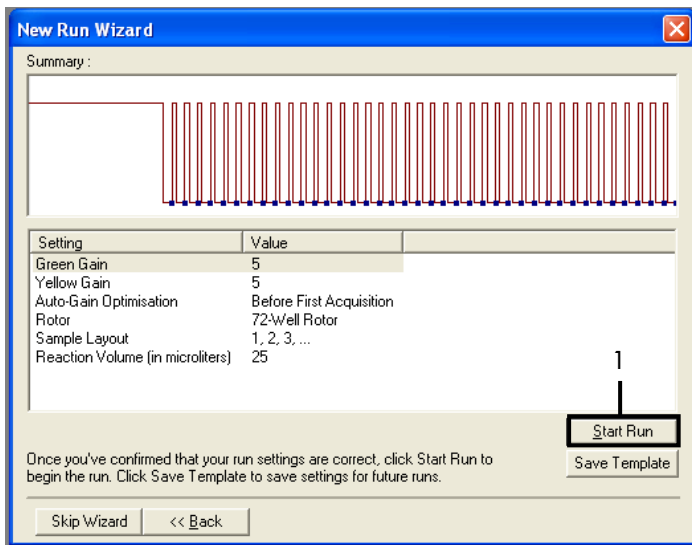
Huomautus: Seuraavassa ikkunassa voit muokata lämpötilaprofiilia. (Muokkaus ei ole tarpeen, koska lämpötilaprofiili luotiin kohdan Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen ohjeiden mukaan.)

4. Valitse Next (Seuraava) (kuva 35).



Kuva 35. New Run Wizard (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja lämpötilanmuokkausruutu (1 = Next [Seuraava]).

5. Tarkista tiivistelmä ja valitse Start Run (Käynnistä ajo), kun haluat tallentaa suoritettavan tiedoston ja käynnistää ajon (kuva 36).



Kuva 36. New Run Wizard (Uuden ajon asetusohjelma) -valintaruutu ja tiivistelmäruutu (1 = Start Run [Käynnistä ajo]).

6. Tee jokin seuraavista toimista ajon jälkeen näkyviin tulevassa uudessa ikkunassa:

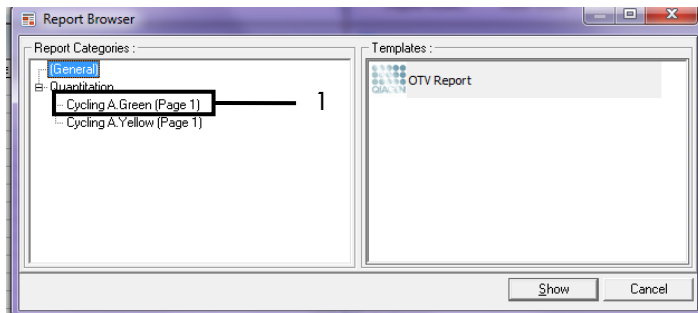
- Anna näytteiden nimet.
- Valitse Finish (Lopeta) ja anna näytteiden nimet myöhemmin. Tee tämä valitsemalla Sample (Näyte) ajon aikana tai ajon päättymisen jälkeen.

Tärkeää: Jos valitset Finish and Lock Samples (Lopeta ja lukitse näytteet), et voi enää muokata näytteiden nimiä. Ole erityisen huolellinen antaessasi näytteiden nimiä, jotta näytteiden testaus ja analyysi suoritetaan oikein.

Huomautus: Näytteitä nimettäessä tyhjen kuoppien kohdat Name (Nimi) -sarakeessa on jätettävä tyhjiksi.

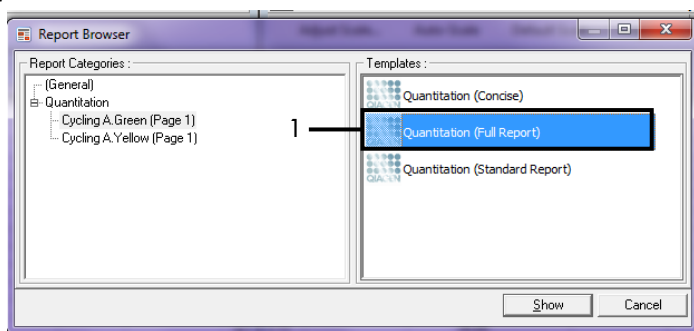
7. Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot kohdissa Näytteen arviointitietojen analyysi tai EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi esitettyjen ohjeiden mukaisesti tai tilanteen mukaan.

8. Jos tarvitaan kvantitatiivisia raportteja, napsauta Rotor-Gene Q -ajotiedoston työkalupalkissa olevaa Reports (Raportit) -kuvaketta.
9. Valitse raporttiselaimen Report Categories (Raporttiluokat) -kohdassa Cycling A Green (Page 1) (Cycling A Green [sivu 1]) (kuva 37).



Kuva 37. Report Browser (Raporttiselain) (1 = Cycling A. Green [Page 1] [sivu 1]).

10. Valitse Templates (Mallit) -kohdasta Quantitation (Full Report) (Kvantitointi [täysi raportti]) (kuva 38).



Kuva 38. Kvantitointiraportti (täysi raportti) (1).

11. Luo raportti valitsemalla Show (Näytä).
12. Tallenna elektroninen versio valitsemalla Save As (Tallenna nimellä).
13. Toista Cycling A Yellow (Page 1) (Cycling A Yellow [sivu 1]).

Tulosten tulkinta (manuaalinen)

Kun *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan ajo (DNA-näytteen arviointi tai EGFR-mutaatioanalyysi) on päättynyt, analysoi tiedot seuraavien toimenpiteiden mukaan:

- ohjelmistoasetukset analyysiä varten
- DNA-näytteen arviointianalyysi (manuaalinen)
Huomautus: Katso putkien asettelumalli taulukosta 4.
- EGFR-mutaation havaitsemisanalyysi (manuaalinen)
Huomautus: Katso putkien asettelumalli taulukosta 7.

Ohjelmiston analyysiasetukset

1. Avaa tarvittava ajotiedosto (*.rex) Rotor-Gene Q -sarjan ohjelmistoversiolla 2.3.5 tai uudemmalla versiolla.
2. Jos näytteitä ei ole nimetty ennen ajon suorittamista, valitse Edit Samples (Muokkaa näytteitä).
3. Anna näytteille nimet Name (Nimi) -sarakkeessa.
Huomautus: jätä tyhjen kuoppien nimet tyhjiksi.
4. Valitse Analysis (Analyysi). Valitse Cycling A. Yellow, jos haluat tarkastella Yellow (HEX) -kanavaa.
5. Valitse Named On (Nimetty).
Huomautus: näin voit varmistaa, ettei tyhjiä putkia käytetä analyysissä.
6. Valitse Dynamic tube (Dynaaminen putki).
7. Valitse Slope correct (Kulmakerroin oikea).
8. Valitse Linear scale (Lineaariasteikko).

9. Valitse Take Off Adj (Mittauspisteen säätö) ja anna arvo 15.01 yläruutuun (If take off point was calculated before cycle [Jos mittauspiste laskettiin ennen jaksoa]) ja arvo 20.01 alaruutuun (then use the following cycle and take off point [käytä silloin seuraavaa jaksoa ja mittauspistettä]).
10. Aseta kynnyksarvoksi 0.02 ja tarkista Yellow-kanavan (HEX) C_T-arvot.
11. Valitse analyysisivulla Cycling A Green, jos haluat tarkastella Green (FAM) -kanavaa.
12. Valitse Named On (Nimetty).
13. Valitse Dynamic tube (Dynaaminen putki).
14. Valitse Slope correct (Kulmakerroin oikea).
15. Valitse Linear scale (Lineaariasteikko).
16. Valitse Take Off Adj (Mittauspisteen säätö) ja anna arvo 15.01 yläruutuun (If take off point was calculated before cycle [Jos mittauspiste laskettiin ennen jaksoa]) ja arvo 20.01 alaruutuun (then use the following cycle and take off point [käytä silloin seuraavaa jaksoa ja mittauspistettä]).
17. Aseta kynnyksarvoksi 0.075 ja tarkista Green-kanavan (FAM) C_T-arvot.

Näytteen arviointitietojen analyysi

Kun DNA-näytteen arviointiajo on tehty, katso lisätietoja kohdasta Ohjelmiston analyysiasetukset ja analysoi tiedot seuraavien ohjeiden mukaan. (Katso putkien asettelumalli taulukosta 4, sivulta 25.)

Ajon kontrollin analyysi

Negatiivinen kontrolli

Mallin kontaminoitumisen estämiseksi NTC ei saa tuottaa alle 40:n C_T -arvoa Green (FAM) -kanavassa.

Jotta voisit varmistaa, että ajo on määritetty oikein, NTC:ssä ei saa näkyä monistusta alueella 29,85–35,84 Yellow (HEX) -kanavassa. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot.

Positiivinen kontrolli

EGFR PC:n C_T -arvon on oltava alueella 28,13–34,59 Green (FAM) -kanavassa. Tämän alueen ulkopuolella oleva arvo merkitsee ongelmaa määrittelyn valmistelussa. Ajo on epäonnistunut.

Huomaus: näytteen tietoja ei saa käyttää, jos negatiivinen tai positiivinen kontrolli epäonnistuu.

Näytteen analyysi

Jos DNA-näytteen arviointiajan kontrollit ovat kelvollisia, analyysia voi jatkaa. Kontrollin C_T -arvon näytteelle on oltava alueella 23,70–31,10 Green (FAM) -kanavalle. Jos näytteen C_T on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

- Näytteen kontrollimääritys $C_T < 23,70$:

Näytteet, joiden kontrollin C_T -arvo on $< 23,70$ (korkea DNA-pitoisuus), ylikuormittavat mutaatiomäärityksiä, ja ne on laimennettava. Jotta kaikki mutaatiot voi havaita matalammalla tasolla, ylikuormittavat näytteet on laimennettava niin, että niiden C_T -arvo on alueella $23,70-31,10$. DNA-näytteen laimentaminen nostaa C_T -arvoa (laimennussuhde 1:1 kasvattaa C_T -arvoa 1,0:lla). Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Vesi laimennukseen [Dil.]).

- Näytteen kontrollimääritys $C_T > 31,10$:

Suosittellemme eristämään uudelleen näytteet, joiden kontrollien C_T -arvo on $> 31,10$ Green (FAM) -kanavassa. Riittämättömän aloitus-DNA:n malli on annettu, jotta voidaan havaita kaikki EGFR-mutaatiot määrityksen ilmoitettujen raja-arvojen mukaan.

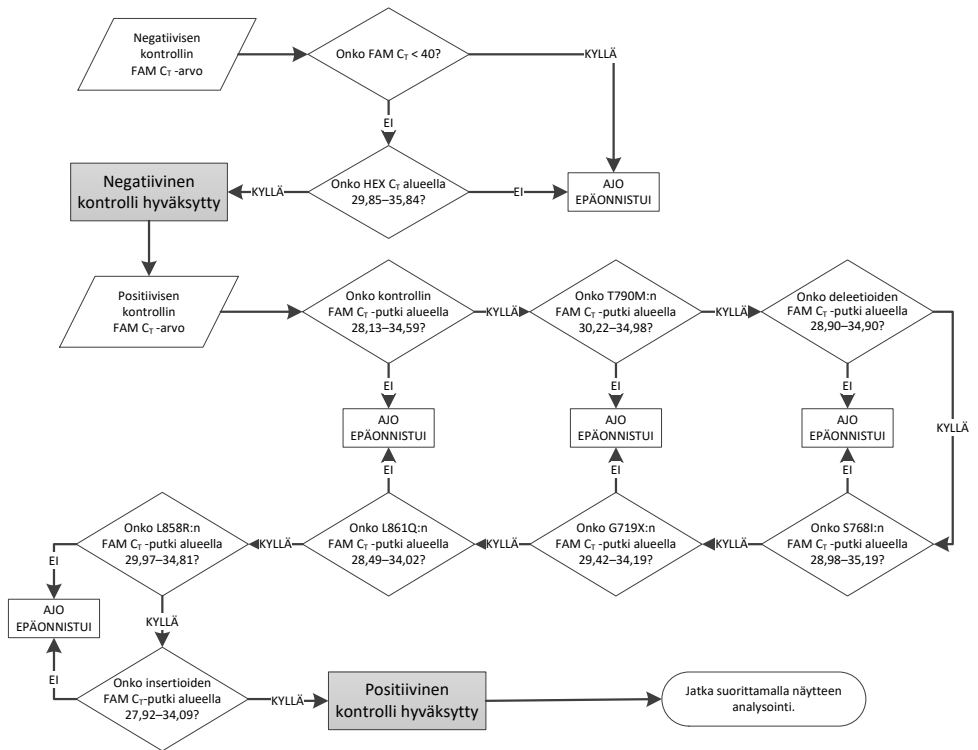
EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi

Näytteen on läpäistävä DNA-näytteen arviointi hyväksyttävästi, ennen kuin siitä voidaan havaita EGFR-mutaatiot (katso Näytteen arviointitietojen analyysi).

Kun EGFR-mutaation havaitseminen on tehty, katso lisätietoja kohdasta Ohjelmiston analyysiasetukset ja analysoi tiedot seuraavien ohjeiden mukaan. (Katso putkien asettelumalli taulukosta 7.)

Ajon kontrollin analyysi

Katso ajon kontrollin analyysin vaihekaavio kuvassa 39.



Kuva 39. Ajon kontrollin analyysin vaihekaavio EGFR-mutaation havaitsemiseen.

Negatiivinen kontrolli

Mallin kontaminoitumisen estämiseksi minkään EGFR-mutaatiomäärityksen NTC ei saa tuottaa alle 40:n C₁-arvoa Green (FAM) -kanavassa.

Jotta voitaisiin varmistaa, että ajo on määritetty oikein, NTC:ssä ei saa näkyä monistusta alueella 29,85–35,84 Yellow (HEX) -kanavassa. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot.

Positiivinen kontrolli

Kaikkien EGFR-mutaatiomääritysten EGFR PC:n C_T-arvojen on oltava alueella Green (FAM) -kanavassa, kuten taulukossa 16. Tämän alueen ulkopuolella oleva arvo merkitsee ongelmaa määrittelyn valmistelussa. Ajo on epäonnistunut.

Huomautus: näytteen tietoja ei saa käyttää, jos negatiivinen tai positiivinen kontrolli epäonnistuu.

Taulukko 16. Hyväksyttävät C_T-alueet reaktioiden positiivisille kontrolleille (EGFR-mutaatioiden havaitsemismäärittely)

Reaktioseos	Näyte	Kanava	ΔC _T -raja-arvoalue
Kontrolli	PC	Green	28,13–34,59
T790M	PC	Green	30,22–34,98
Deleetiot	PC	Green	28,90–34,90
L858R	PC	Green	29,97–34,81
L861Q	PC	Green	28,49–34,02
G719X	PC	Green	29,42–34,19
S768I	PC	Green	28,98–35,19
Insertiot	PC	Green	27,92–34,09

Näytteen analyysi – näytteen kontrollin Green (FAM) -kanavan C_T -arvo

Jos EGFR-mutaation havaitsemisen ajon positiivisen ja negatiivisen kontrollin tulokset ovat hyväksyttäviä, voidaan jatkaa EGFR-mutaation havaitsemiseen näytteistä.

Kontrollin C_T -arvon on oltava alueella 23,70–31,10 Green (FAM) -kanavassa. (Katso putkien asettelumalli taulukosta 7.)

Jos näytteen kontrollin C_T on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

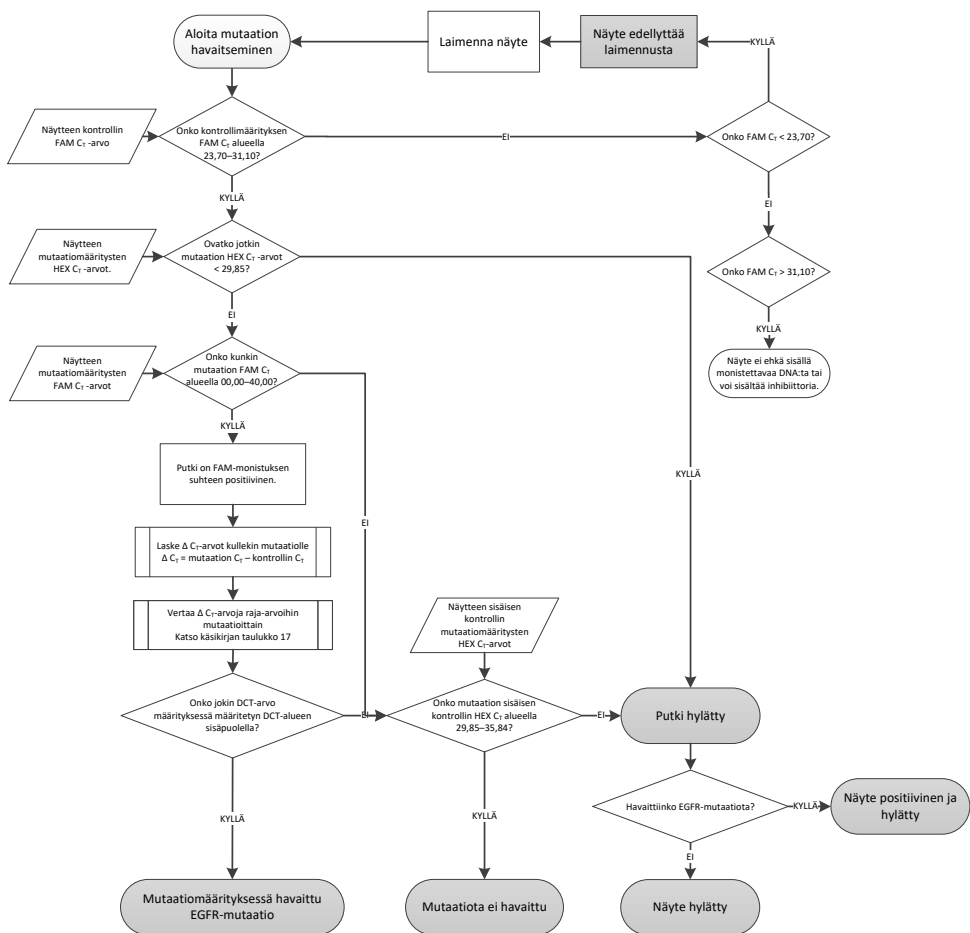
- Näytteen kontrollimääritys $C_T < 23,70$:

Näytteet, joiden kontrollin C_T -arvo on $< 23,70$ (korkea DNA-pitoisuus), ylikuormittavat mutaatiomäärityksiä, ja ne on laimennettava. Jotta kaikki mutaatiot voi havaita matalammalla tasolla, ylikuormittavat näytteet on laimennettava niin, että niiden C_T -arvo on alueella 23,70–31,10. DNA-näytteen laimentaminen nostaa C_T -arvoa (laimennussuhde 1:1 kasvattaa C_T -arvoa 1,0:lla). Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Vesi laimennukseen [Dil.]).

- Näytteen kontrollimääritys $C_T > 31,10$:

Suosittelimme eristämään uudelleen näytteet, joiden kontrollien C_T -arvo on $> 31,10$ Green (FAM) -kanavassa. Riittämättömän aloitus-DNA:n malli on annettu, jotta voidaan havaita kaikki EGFR-mutaatiot määrityksen ilmoitettujen raja-arvojen mukaan.

Katso EGFR-mutaation havaitsemisen ajon näytteen analyysin vaihekaavio kuvassa 40.



Kuva 40. Näytteen analyysin vaihekaavio EGFR-mutaation havaitsemiseen.

Näytteen analyysi – näytteen sisäisen kontrollin Yellow (HEX) -kanavan C_T -arvo

Huomautus: Katso EGFR-mutaation havaitsemisen ajon näytteen analyysin vaihekaavio kuvassa 40.

Jokaisen näytteen kaikki putket on analysoitava. Varmista, että jokainen putki antaa sisäiselle kontrollille Yellow (HEX) -kanavasta HEX-signaalin alueella 29,85–35,84. Mahdollisia tuloksia on kolmenlaisia.

- Jos sisäisen kontrollin C_T -arvo on määritetyn alueen (<29,85) alapuolella mille tahansa mutaatiomääritykselle, Yellow (HEX) -kanavan monistuksen tulos on hylätty. Yellow (HEX) -kanavan monistus tälle putkelle on hylätty.
- Jos sisäisen kontrollin C_T -arvo on määritetyllä alueella (29,85–35,84), Yellow (HEX) -kanavan monistuksen tulos on positiivinen. Yellow (HEX) -kanavan monistus tälle putkelle on hyväksytty.
- Jos sisäisen kontrollin C_T -arvo ylittää määritetyn alueen (>35,84), Yellow (HEX) -kanavan monistuksen tulos on negatiivinen.

Jos Green (FAM) -kanavassa on tehty monistus ja kyseisen reaktion ΔC_T -arvo on matalampi tai yhtä suuri kuin putken määrittämisen mukainen raja-arvo, Yellow (HEX) -kanavan monistuksen tulos on hyväksytty. Jos putkelle ei ole tehty monistusta Green (FAM) -kanavassa tai ΔC_T -arvo on korkeampi kuin määrittämisen mukainen raja-arvo, Yellow (HEX) -kanavan monistuksen tulos on hylätty.

Sisäisen kontrollin monistuminen Yellow (HEX) -kanavassa voi epäonnistua PCR-eston takia. Näytteen laimentaminen voi vähentää estäjien vaikutuksia. On huomioitava, että laimentaminen laimentaa myös näytteessä olevaa kohde-DNA:ta. Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Vesi laimennukseen [Dil.]).

Näytteen analyysi – näytteen mutaatiomäärityksen Green (FAM) -kanavan C_T -arvo
 Green (FAM) -kanavan arvot kaikille seitsemälle mutaatioreaktioosokselle on tarkistettava taulukossa 17 esitettyjen arvojen avulla. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot. (Katso putkien asettelumalli taulukosta 7.)

Taulukko 17. Hyväksyttävät arvot EGFR-mutaatioreaktiolle Green (FAM) -kanavassa (EGFR-mutaation havaitsemisen määrittäminen)

Määrittäminen	C_T -alue	ΔC_T -raja-arvoalue
T790M	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 7,40$
Deleetit	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,00$
L858R	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
L861Q	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
G719X	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
S768I	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,90$
Insertiot	0,00–40,00	$-10,00 \geq \dots \leq 8,00$

- Jos näytteen saama Green (FAM) -kanavan C_T -arvo on määritetyllä alueella, se on FAM-monistuspositiivinen.
- Jos näytteen saama Green (FAM) -kanavan C_T -arvo on määritetyn alueen yläpuolella, tai monistusta ei ilmene, se on FAM-monistusnegatiivinen.

Laske ΔC_T -arvo kaikille FAM-monistuspositiivisille EGFR-mutaation havaitsemisen putkille alla esitetyllä tavalla varmistaen että mutaation ja kontrollin C_T -arvot ovat peräisin samasta näytteestä. (Katso putkien asettelumalli taulukosta 7.)

$$\Delta C_T = [\text{mutaatiomäärityksen } C_T\text{-arvo}] - [\text{kontrollimäärityksen } C_T\text{-arvo}]$$

Vertaa näytteen ΔC_T -arvoa kyseisen määrityksen ΔC_T -raja-arvoalueeseen (Taulukko 17). Varmista, että vertailussa käytetään oikeaa ΔC_T -raja-arvoaluetta.

ΔC_T -raja-arvoalueen yläraja on arvo, jonka ylittävä määrittelykohtainen positiivinen signaali voi johtua villityypin DNA:n ARMS-alukkeen taustasignaalista. Jos näytteen ΔC_T -arvo on korkeampi kuin määrittelyksen ΔC_T -raja-arvoalue, näyte luokitellaan negatiiviseksi tai määrittelyksen havaitsemisrajojen ulkopuolella olevaksi. Jos näytteen arvo on matalampi kuin ΔC_T -raja-arvoalueen alaraja, syynä voivat olla fluoresenssiartefaktit.

Jokaisen näytteen jokaisen mutaatioreaktion tila voi olla jokin seuraavista:

- Mutaatio havaittu
- Mutaatiota ei havaittu
- Epäkelpo

Mutaatio havaittu

Green (FAM) -kanavan monistus on positiivinen ja ΔC_T -arvo on ΔC_T -raja-arvoalueella. Jos testi havaitsee näytteestä useita mutaatioita, kaikki voidaan raportoida.

Mutaatiota ei havaittu

Green (FAM) -kanavan monistus on positiivinen ja ΔC_T -arvo on ΔC_T -raja-arvoalueen yläpuolella.

Green (FAM) -kanavan monistus on negatiivinen ja Yellow (HEX) -kanavan monistus (sisäinen kontrolli) on positiivinen.

Epäkelpo

Yellow (HEX) -kanavan monistus (sisäinen kontrolli) on hylätty.

Green (FAM) -kanavan monistus on negatiivinen ja Yellow (HEX) -kanavan monistus (sisäinen kontrolli) on negatiivinen.

Huomautus: Näytteen yhden putken tulos Yellow (HEX) -kanavan monistuksen osalta voi olla negatiivinen, mutta toisen putken tulos Green (FAM) -kanavan monistuksen osalta voi olla positiivinen. Tässä tilanteessa toisen putken "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tulosta voidaan pitää hyväksyttynä, mutta havaittu mutaatio ei välttämättä ole ainoa näytteestä mahdollisesti havaittu mutaatio.

Laskettu ΔC_T on matalampi kuin ΔC_T -raja-arvoalueen alaraja ja Yellow (HEX) -kanavan monistuminen (sisäinen kontrolli) on odotetulla alueella.

Liite B *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin asennus

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja on tarkoitettu käytettäväksi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen ja 72-kuoppaisen roottorin kanssa. *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketti on ladattavissa *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan tuotesivulta osoitteessa www.qiagen.com. Lataa määrityspaketti siirtymällä kohtaan Product Resources (Lisämateriaalit) > Supplementary Protocols (Täydentävät protokollat). Määrityspaketti sisältää *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template- ja *therascreen* EGFR CE Locked Template -mallit.

Huomautus: *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketti on yhteensopiva vain Rotor-Gene Q -ohjelmiston version 2.3.5 tai uudemman version kanssa. Varmista, että oikea Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio on asennettu, ennen kuin aloitat *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin asennuksen. Jos Rotor-Gene Q MDx -laitteesi sisälsi toimitettaessa aiemman ohjelmistoversion, päivitä ohjelmisto lataamalla Rotor Gene Q -ohjelmiston versio 2.3.5 tai uudempi versio Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen tuotesivulta kohdasta Product Resources (Lisämateriaalit) > Operating Software (Käyttöohjelmisto), katso sivu www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

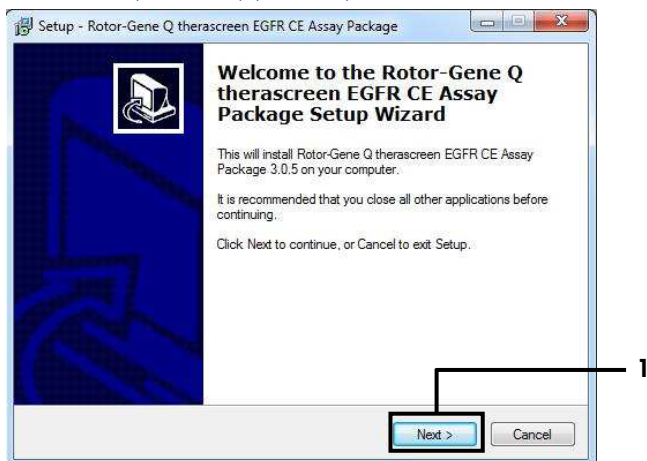
Menetelmä

1. Lataa *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketti osoitteesta www.qiagen.com ja siirrä se viruksettomaan USB-tallennuslaitteeseen.

Huomautus: Määrityspaketti on saatavissa *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit -sarjan version 2 tuotesivulla. Lataa määrityspaketti siirtymällä kohtaan Product Resources (Lisämateriaalit) > Supplementary Protocols (Täydentävät protokollat).

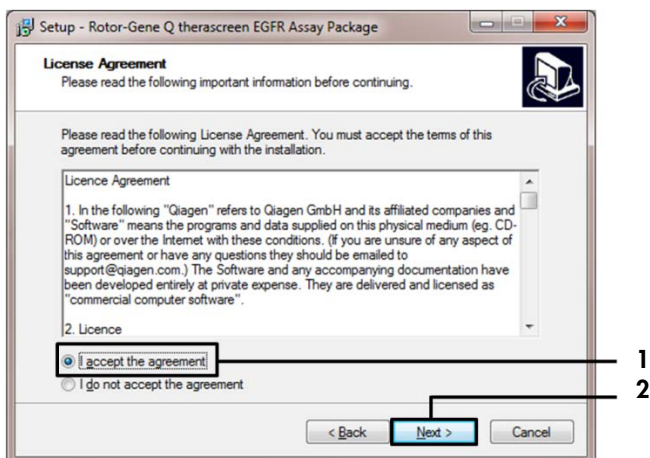
2. Yhdistä USB-tallennuslaite Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen liitettyyn tietokoneeseen.
3. Etsi *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspaketin tiedosto.

4. Napsauta hiiren kakkospainikkeella *therascreen* EGFR CE Assay Package -määrityspakettia ja pura pakattu tiedosto valitsemalla Extract all (Pura kaikki).
5. Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla *therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.6.exe* -tiedostoa.
Tai etsi ja avaa suoritettava tiedosto tietokoneen resurssienhallinnan kautta.
therascreen EGFR CE Assay Package -määrityspaketin ohjattu asennus avautuu.
6. Jatka valitsemalla Next (Seuraava) (kuva 41).



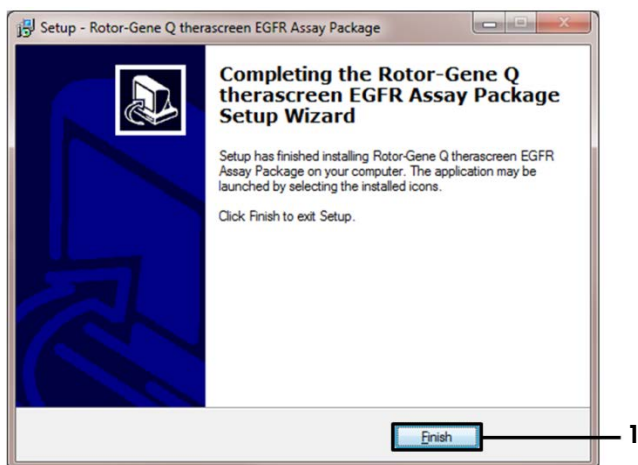
Kuva 41. Setup Wizard (Ohjattu asennus) -ikkuna (1 = Next [Seuraava]).

7. Lue lisenssisopimus näkyviin tulevassa ikkunassa ja valitse I accept the agreement (Hyväksyn sopimuksen). Jatka valitsemalla Next (Seuraava) (kuva 42).
Asennus alkaa automaattisesti.



Kuva 42. License Agreement (Lisenssisopimus) -valintaikkuna. 1 = I accept the agreement (Hyväksyn sopimuksen), 2 = Next (Seuraava).

8. Kun asennus on valmis, valitse Finish (Lopeta) viimeisessä Setup Wizard (Asetusohjelma) -valintaikkunassa (kuva 43).



Kuva 43. Ohjatun asennuksen päättäminen (1 = Finish [Valmis]).

9. Käynnistä tietokone uudelleen.

Pikakuvakkeet *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template (*therascreen* EGFR CE -kontrolliajon lukittu malli) -malliin ja *therascreen* EGFR CE Locked Template (*therascreen* EGFR CE lukittu malli) -malliin generoituvat työpöydälle automaattisesti (kuva 44).



therascreen EGFR CE
Control Run Locked
Template



therascreen EGFR CE
Locked Template

Kuva 44. EGFR CE Control Run Locked Template (*therascreen* EGFR CE -kontrolliajon lukittu malli)- ja EGFR CE Locked Template (*therascreen* EGFR CE lukittu malli) -kuvakkeet.

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tuen sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support, soita ilmaisnumeroon 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenumero
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	24 reaktioon: kontrollimääritys, 7 mutaatiotestiä, positiivinen kontrolli, <i>Taq</i> DNA -polymeraasi, NTC-testissä käytettävä vesi ja näytteen laimennuksessa käytettävä vesi	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package	ohjelmistoprotokollapaketti käytettäväksi <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit -sarjan ja QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen kanssa	Ladattava
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit -sarja		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50:een DNA:n valmistelukertaan: QIAamp MinElute® -kolonneja, proteinaasi K, puskureita ja Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 preparaatiota varten: 50 QIAamp MinElute -kolonneja, proteinaasi K, puskureita ja Collection Tubes (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ja lisävarusteet		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033

Tuote	Sisältö	Tuotenumero
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR -sykləri ja High Resolution Melt -analysoittori, jossa 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1 vuoden takuun osille ja työlle. Ei sisällä asennusta ja koulutusta.	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktioon valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 kpl:ssa 0,1 ml:n putkia	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteessa www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä palvelusta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Asiakirjan muutoshistoria

Päivämäärä	Muutokset
R5, tammikuu 2019	Valtuutetun edustajan lisäys (etukanteen). Symbolit-osan päivitys.
R6, lokakuu 2019	Lainmukainen valmistaja vaihdettu (kansilehti) Laitteen nimi vaihdettu laitteesta Rotor-Gene Q MDx laitteeksi Rotor-Gene Q MDx Splex HRM tuote-etiketin mukaisesti Lisätty reagenssien säilytysolosuhde Reagenssien säilytys ja käsittely -kohtaan Päivitetty taulukkoon 1 huomautus COSM6254:n poistamisesta COSMIC-tietokannasta Päivitetty Rajoitukset-osaan tiedot eksonin 19 deleetiomäärityksestä ja L858R-määrityksestä Poistettu EC + REP -symboli kansilehdeltä ja Symbolit-osasta
R7, heinäkuu 2020	Päivitetty EGFR Assay Package -määrityspaketin numero 3.0.5 > 3.0.6 Päivitetty viittaus RGQ-ohjelmistoversiosta 2.3 versioon 2.3.5 tai uudempaan. Päivitetty taulukot 9 ja 17 uusilla raja-arvoalueilla ja muokattu kaikkia asiaan liittyviä kuvauksia (koko käsikirjassa.) Päivitetty kaikkiin protokollalukuihin tietoja oikean sekoituksen tärkeydestä lisäämällä tieto Tärkeitä huomioita ennen aloittamista -kohtiin, korostettu kaikki sekoituksen yksityiskohdat kaikissa sekoitusvaiheissa. Lisätty sekoitusvaiheet tarvittaviin kohtiin. Lisätty MUTATION_EARLY_CT -merkintä taulukkoon 8 Poistettu kaikki viittaukset CD-levyyn ja korvattu ne lataukseen liittyvillä tiedoilla.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarjaa koskeva rajoitettu lisenssisopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsisikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä immateriaaliomaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsisikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssin osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN voi kääntäjä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellon ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianojopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GLOTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca Group). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit -sarja on CE-merkitty diagnostinen sarja in vitro -diagnostiikkaan tarkoitetuista lääkinneissä laitteista annetun eurooppalaisen direktiivin 98/79/EY mukaisesti. Ei saatavana kaikissa maissa.

1121935 06-2020 HB-1909-007 © 2020 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

