

Czerwiec 2020 r.

therascreen[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit — Instrukcja obsługi



Wersja 1



Do diagnostyki in vitro

Do użytku z aparatami Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NIEMCY

R5

1121934PL

Spis treści

Przeznaczenie	4
Podsumowanie i objaśnienie.....	5
Zasada procedury	6
Układ zestawu	7
Oznaczenia	7
Kontrole	8
Dostarczone materiały	9
Zawartość zestawu	9
Materiały wymagane, ale niedostarczone	10
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	12
Informacje dotyczące bezpieczeństwa.....	12
Ogólne środki ostrożności.....	12
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami	14
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami	16
Procedura	17
Protokół: Wykrywanie mutacji genu EGFR	18
Protokół: Konfiguracja oznaczenia genu EGFR w aparacie Rotor-Gene Q.....	23
Analiza danych uzyskanych w wyniku oceny mutacji.....	30
Rozwiązywanie problemów.....	38
Kontrola jakości.....	40
Ograniczenia.....	40
Parametry skuteczności.....	42

Czułość analityczna — granica próby ślepej (Limit of Blank, LOB).....	42
Granica wykrywalności (Limit of Detection, LOD).....	42
Czułość analityczna — punkty odcięcia wartości ΔC_T oraz zakres określający punkty odcięcia wartości ΔC_T	44
Powtarzalność i odtwarzalność	44
Wpływ wejściowej ilości DNA na otrzymywane wartości C_T	45
Substancje zakłócające	45
Skuteczność kliniczna.....	50
Literatura	51
Informacje kontaktowe.....	51
Symbole.....	52
Załącznik A: Szczegółowe informacje dotyczące mutacji.....	53
Dane do zamówień.....	54
Historia zmian dokumentu	56

Przeznaczenie

Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit to diagnostyczny test in vitro przeznaczony do wykrywania delecji w eksonie 19 oraz substytucji w eksonie 20 i 21 (odpowiednio T790M i L858R) genu receptora naskórkowego czynnika wzrostu (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), który umożliwia jakościową ocenę statusu mutacji. Wyniki uzyskane za pomocą tego testu są przeznaczone do wspomagania lekarzy podczas identyfikacji pacjentów z NDRP, którzy mogą odnieść korzyści z leczenia preparatem IRESSA® (gefitynib), w sytuacji gdy nie można dokonać oceny próbki tkankowej.

Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jest przeznaczony do stosowania przez przeszkolony personel w warunkach laboratoryjnych z próbkami DNA wyizolowanego z osocza uzyskanego z krwi pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NDRP).

Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jest przeznaczony do diagnostyki in vitro.

Podsumowanie i objaśnienie

Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jest gotowym do użycia zestawem przeznaczonym do wykrywania mutacji w genie EGFR powiązanych z rakiem za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR) w aparatach Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit umożliwia wykrywanie określonych poniżej mutacji genu EGFR wobec tła genomowego DNA typu dzikiego w oparciu o technologie Scorpions® i ARMS.

- Delecje w eksonie 19
- T790M
- L858R

Stosowane metody są wysoce selektywne i, zależnie od całkowitej ilości obecnego DNA, umożliwiają wykrycie niewielkiego odsetka mutacji wobec tła genomowego DNA typu dzikiego. Granice selektywności i wykrywalności są lepsze niż w przypadku technologii takich jak sekwencjonowanie metodą „dye-terminator sequencing”.

Zasada procedury

W zestawie *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit do wykrywania mutacji podczas testu real-time PCR wykorzystywane są dwie technologie — ARMS i Scorpions.

ARMS

Amplifikacja swoista względem allelu lub mutacji jest przeprowadzana z wykorzystaniem systemu do detekcji mutacji opartego o oporność na amplifikację (ARMS, Amplification Refractory Mutation System). Polimeraza DNA *Taq* (*Taq*) jest skuteczna w rozróżnianiu dopasowania i niedopasowania nukleotydów przy końcu 3' startera PCR. Określone zmutowane sekwencje mogą być selektywnie amplifikowane, nawet w próbkach, w których większość sekwencji nie zawiera mutacji. Kiedy starter jest w pełni dopasowany, amplifikacja zachodzi z pełną wydajnością. Kiedy zasada przy końcu 3' nie jest dopasowana, zachodzi jedynie słaba amplifikacja tła.

Scorpions

Amplifikacja jest wykrywana z wykorzystaniem technologii Scorpions. Scorpions to dwufunkcyjne cząsteczki zawierające starter PCR kowalencyjnie związany z sondą. Fluorofor w takiej sondzie oddziałuje z wykorzystywanym w niej wygaszaczem, co zmniejsza fluorescencję. Podczas reakcji PCR, kiedy sonda wiąże się z amplikonem, fluorofor i wygaszacz zostają rozdzielone. Prowadzi to do wzrostu poziomu fluorescencji w próbówce reakcyjnej.

Układ zestawu

Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit zawiera cztery oznaczenia:

- jedno oznaczenie kontrolne (Ctrl);
- trzy oznaczenia mutacji.

Wszystkie mieszaniny reakcyjne zawierają odczynniki wyznakowane barwnikiem FAM™ umożliwiające wykrycie mutacji docelowych oraz odczynniki wyznakowane barwnikiem HEX™ do oznaczenia kontroli wewnętrznej. Oznaczenie kontroli wewnętrznej umożliwia wykrycie obecności inhibitorów, które mogą spowodować otrzymanie fałszywie negatywnych wyników. Amplifikacja wykrywana w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM może zachodzić silniej niż amplifikacja kontroli wewnętrznej i spowodować zagłuszenie sygnału otrzymywanego dla kontroli wewnętrznej. Kontrola wewnętrzna służy do wykazania, że, w przypadku braku amplifikacji w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM, uzyskany wynik jest prawdziwie negatywny, a nie wynika z nieudanej reakcji PCR.

Oznaczenia

Oznaczenie kontrolne

Oznaczenie kontrolne, wyznakowane barwnikiem FAM, służy do oszacowania całkowitej ilości DNA w próbce. Podczas oznaczenia zachodzi amplifikacja regionu eksonu 2 genu EGFR. Starter oraz sonda zostały zaprojektowane tak, aby pominąć wszystkie znane polimorfizmy genu EGFR.

Oznaczenia mutacji

Każde oznaczenie mutacji zawiera sondę Scorpion wyznakowaną barwnikiem FAM i starter ARMS do odróżnienia DNA typu dzikiego od określonego zmutowanego DNA.

Kontrole

Wszystkie reakcje eksperymentalne muszą zawierać następujące kontrole:

Kontrola pozytywna

W każdej reakcji należy uwzględnić kontrolę pozytywną w probówkach 1–4. Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit zawiera kontrolę pozytywną (Positive Control, PC) względem genu EGFR, która pełni rolę matrycy w reakcji kontroli pozytywnej. Wyniki kontroli pozytywnej podlegają ocenie w celu upewnienia się, że zestaw spełnia określone kryteria akceptacji.

Kontrola negatywna

W każdej reakcji należy uwzględnić kontrolę negatywną (kontrola bez matrycy — No Template Control, NTC) w probówkach 9–12. Kontrola NTC to woda wolna od nukleaz (H₂O), która pełni rolę „matrycy” w reakcji kontroli bez matrycy. Kontrola bez matrycy służy do oceny reakcji pod kątem obecności zanieczyszczeń, które mogły zostać wprowadzone podczas przygotowywania reakcji, oraz do oceny wydajności reakcji kontroli wewnętrznej.

Ocena reakcji kontroli wewnętrznej

Każda mieszanina reakcyjna oprócz odczynników przeznaczonych do reakcji wykrywającą sekwencją docelową zawiera również kontrolę wewnętrzną. Niepowodzenie tej reakcji wskazuje, że mogą być obecne inhibitory, które mogą prowadzić do otrzymania fałszywie negatywnych wyników, lub że operator popełnił błąd podczas przygotowywania reakcji dla tej próbki.

Jeśli niepowodzenie reakcji kontroli wewnętrznej jest spowodowane inhibicją reakcji PCR, wpływ inhibitorów można zmniejszyć, rozcieńczając próbkę. Należy jednak pamiętać o tym, że docelowa sekwencja DNA również zostanie rozcieńczona. Amplifikacja w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM może zachodzić silniej niż amplifikacja kontroli wewnętrznej i spowodować zagłuszenie sygnału otrzymywanego dla kontroli wewnętrznej, co może doprowadzić do sytuacji, w której wartość C_T wygenerowana dla IC (HEX) będzie poza określonym zakresem. Wyniki otrzymane w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM zachowują ważność dla takich próbek.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Nr katalogowy			870311
Liczba reakcji			24
Czerwony	Control Reaction Mix (Mieszanina reakcji kontrolne)	Ctrl	2 x 600 µl
Fioletowy	T790M Reaction Mix (Mieszanina reakcyjna do wykrywania mutacji T790M)	T790M	600 µl
Pomarańczowy	Deletions Reaction Mix (Mieszanina reakcyjna do wykrywania delecji)	Del	600 µl
Różowy	L858R Reaction Mix (Mieszanina reakcyjna do wykrywania mutacji L858R)	L858R	600 µl
Beżowy	EGFR Positive Control (Kontrola pozytywna EGFR)	PC	300 µl
Miętowy	<i>Taq</i> DNA Polymerase (Polimeraza DNA <i>Taq</i>)	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Biały	Nuclease-Free Water for No Template Control (Woda wolna od nukleaz do kontroli bez matrycy)	NTC	1 x 1,9 ml
Biały	Nuclease-Free Water for Dilution (Woda wolna od nukleaz do rozcieńczeń)	Dil	1 x 1,9 ml
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)			1

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

- Zestaw do izolacji DNA (patrz część „Procedura”, strona 17)
- Pipety* (z regulacją) przeznaczone do przygotowania próbek
- Pipety* (z regulacją) przeznaczone do przygotowania mieszaniny Master Mix do reakcji PCR
- Pipety* (z regulacją) przeznaczone do dozowania matrycy DNA
- Końcówki do pipet z filtrami, wolne od DNaz, RNaz i DNA (zalecamy stosowanie końcówek do pipet z barierami aerozolowymi, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego)
- Łażnia wodna lub podobne urządzenie, do którego można włożyć probówki wirówkowe o pojemności 50 ml i ogrzewać je w temperaturze 60°C.
- Blok grzewczy lub podobne urządzenie, w którym można prowadzić inkubację w temperaturze 56°C†
- Kruszony lód
- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla próbek reakcyjnych o pojemności 2 ml
- Wytrząsarka
- Aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*† z kanałami fluorescencyjnymi dla Cycling Green i Cycling Yellow (wykrywanie odpowiednio barwnika FAM i barwnika HEX)

* Upewnij się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

† Jeśli ma to zastosowanie, w niektórych krajach może być używany aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM wyprodukowany w maju 2011 roku lub później. Datę produkcji można odczytać z numeru seryjnego, który znajduje się na tylnej części aparatu. Numer seryjny ma format „mmrrnnn”, gdzie „mm” oznacza miesiąc produkcji (cyfry), „rr” oznacza dwie ostatnie cyfry roku produkcji, a „nnn” oznacza unikalny identyfikator aparatu.

-
- Oprogramowanie Rotor-Gene Q w wersji 2.3.5 lub wyższej
 - Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, do stosowania w rotorze 72-Well Rotor (nr kat. 981103 lub 981106)
 - Probówki mikrowirówkowe wolne od DNaz, RNaz i DNA, do przygotowywania mieszanin Master Mix
 - Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji za pomocą pipety jednokanałowej (QIAGEN, nr kat. 9018901)

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do diagnostyki in vitro

Do użytku profesjonalnego

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

Ogólne środki ostrożności

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę na następujące kwestie:

- Używać końcówek do pipet z filtrami, wolnych od DNaz, RNaz i DNA; pipety kalibrować zgodnie z instrukcjami producenta.
- Materiały pozytywne (próbki materiałów i kontrole pozytywne) przechowywać i przeprowadzać ich izolację oddzielnie od innych odczynników, a także dodawać je do mieszaniny reakcyjnej w osobnym miejscu.
- Przed rozpoczęciem oznaczenia całkowicie rozmrozić wszystkie odczynniki w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Po rozmrożeniu wymieszać składniki, **odwracając każdą probówkę 10 razy** i krótko odwirować.

Uwaga: Należy zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec zanieczyszczeniu reakcji PCR syntetycznym materiałem kontrolnym. Zalecane jest używanie osobnych pipet do przygotowania mieszanin reakcyjnych i dodawania matrycy DNA. Przygotowywanie i rozdzielanie mieszanin reakcyjnych należy wykonywać w obszarze oddzielnym od obszaru, w którym dodawana jest matryca. Nie otwierać probówek aparatu Rotor-Gene Q po zakończeniu reakcji PCR. Należy przestrzegać tego zalecenia, aby zapobiec zanieczyszczeniu laboratorium produktami powstałymi w wyniku reakcji PCR.

Uwaga: Odczynniki zostały zwalidowane do ręcznego przygotowywania reakcji. Stosowanie metody zautomatyzowanej może doprowadzić do zmniejszenia liczby możliwych do wykonania reakcji, ponieważ do wypełnienia „objętości martwych” w tych aparatach wymagana jest dodatkowa ilość odczynników.

Uwaga: Wszystkie odczynniki zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit zostały opracowane specjalnie do użycia z określonymi testami. Wszystkie odczynniki dostarczone w zestawie *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit są przeznaczone wyłącznie do stosowania z odczynnikami z tego samego zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Aby utrzymać optymalną skuteczność zestawu, nie należy zamieniać odczynników.

Uwaga: Należy używać wyłącznie polimerazy DNA *Taq* (*Taq*) dostarczonej w zestawie. Nie należy zastępować jej polimerazą DNA *Taq* z innych zestawów lub polimerazą DNA *Taq* innego producenta.

Uwaga: Odczynniki przeznaczone do stosowania z zestawem *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit zostały optymalnie rozcieńczone. Dalsze rozcieńczanie odczynników nie jest zalecane, gdyż może doprowadzić do utraty skuteczności. Stosowanie objętości reakcyjnych mniejszych niż 25 µl nie jest zalecane, ponieważ zwiększa to ryzyko otrzymania wyników fałszywie negatywnych.

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jest transportowany na suchym lodzie. Jeśli którykolwiek składnik zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit nie jest zamrożony w chwili odbioru, opakowanie zewnętrzne zostało otwarte podczas transportu lub przesyłka nie zawiera listy zawartości opakowania, instrukcji użycia lub odczynników, należy skontaktować się z jednym z działów serwisu technicznego firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (informacje znajdują się pod adresem www.qiagen.com).

Niezwłocznie po otrzymaniu zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit należy go umieścić w temperaturze od -30 do -15°C w zamrażarce o stałej temperaturze i chronić przed światłem. Zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit zachowuje stabilność do podanej daty ważności, jeśli jest przechowywany w określonych warunkach przechowywania.

Po otwarciu odczynniki można przechowywać w ich oryginalnych opakowaniach w temperaturze od -30 do -15°C przez 12 miesięcy lub do podanej daty ważności, w zależności od tego, co nastąpi wcześniej. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania. Nie przekraczać maksymalnej liczby ośmiu cykli zamrażania i rozmrażania.

Przed użyciem odczynników należy je rozmrażać w temperaturze otoczenia przez co najmniej 1 godzinę, ale nie dłużej niż przez 4,5 godziny. Gdy odczynniki będą gotowe do użycia, można rozpocząć przygotowywanie reakcji PCR. Probówki Rotor-Gene Q, zawierające mieszaniny Master Mix i próbki DNA, należy bezzwłocznie załadować do aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Łączny czas od rozpoczęcia przygotowywania reakcji PCR do rozpoczęcia reakcji nie powinien przekroczyć:

- 6 godzin, jeśli czynności te wykonywane są w temperaturze otoczenia
Uwaga: Czas ten obejmuje przygotowanie reakcji PCR i przechowywanie próbek.
- 18 godzin, jeśli czynności te wykonywane są w obniżonej temperaturze (2–8°C)
Uwaga: Czas ten obejmuje przygotowanie reakcji PCR i przechowywanie próbek.

Uwaga: Sondy Scorpions (jak wszystkie cząsteczki wyznakowane fluorescencyjnie) zawarte w odczynnikach wchodzących w skład mieszaniny reakcyjnej są wrażliwe na światło. Chronić mieszaniny reakcyjne i kontrole przed światłem, aby uniknąć fotowysbielenia cząsteczek.

Odczynniki zawarte w zestawie *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* są optymalnie rozcieńczone. Nie jest wymagane ich dalsze oczyszczanie ani obróbka tych odczynników przed ich użyciem do analizy zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)*.

Należy zwrócić uwagę na daty ważności oraz informacje o warunkach przechowywania wydrukowane na opakowaniu i etykietach wszystkich składników. Nie należy używać składników z przekroczoną datą ważności ani niewłaściwie przechowywanych.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Uwaga: Wszystkie próbki należy traktować jak materiał potencjalnie zakaźny.

Materiałem próbki musi być ludzkie genomowe DNA wyizolowane z osocza. W celu zapewnienia odpowiedniej jakości próbek należy je transportować zgodnie ze standardowymi metodami stosowanymi w patologii.

Procedura

Izolacja DNA

Parametry skuteczności tego zestawu wyznaczono przy użyciu DNA wyizolowanego za pomocą zestawu QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (nr kat. 55114). W przypadku korzystania z zestawu QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit izolację DNA należy wykonywać zgodnie z instrukcjami zawartymi w instrukcji obsługi tego zestawu, uwzględniając następujące kwestie:

- Wyściowa objętość osocza jest równa 2 ml.
- Przed izolacją DNA należy wirować 2 ml osocza przy 3000 obr./min przez 2 minuty, a następnie przenieść supernatant do czystej probówki.
- Objętość proteinazy K powinna być równa 250 µl.
- Trawienie proteinazą K należy wykonywać w temperaturze 60°C przez 1 godzinę.
- Oczyszczone genomowe DNA należy eluować w 55 µl buforu Buffer AVE (dostarczonego w zestawie QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Oczyszczone genomowe DNA przechowywać w temperaturze od –30 do –15°C.

Uwaga: Wszystkie oznaczenia zawarte w zestawie *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit generują krótkie produkty PCR. Jednakże zestaw *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit nie zadziała, jeśli DNA próbek będzie wysoce pofragmentowane.

Protokół: Wykrywanie mutacji genu EGFR

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Aby uzyskać prawidłowe wyniki, należy wykonywać przedstawioną procedurę mieszania na każdym etapie mieszania podczas przygotowywania oznaczenia.
- W ramach jednej analizy można przeprowadzić ocenę maksymalnie 16 próbek.
- Przed rozpoczęciem procedury należy przeczytać część „Ogólne środki ostrożności”, strona 12.
- Przed rozpoczęciem protokołu zapoznać się z obsługą aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Patrz instrukcja obsługi aparatu.
- Nie wytrząsać polimerazy DNA *Taq* (*Taq*) ani żadnej mieszaniny zawierającej polimerazę DNA *Taq*, gdyż może to doprowadzić do inaktywacji enzymu.
- Odmierzyć polimerazę DNA *Taq* za pomocą pipety, ostrożnie umieszczając końcówkę pipety tuż pod powierzchnią cieczy, aby uniknąć pokrycia zewnętrznej powierzchni końcówki nadmiarem enzymu.
- Aby uniknąć odchyień związanych z różnicami między reakcjami, dla każdej próbki DNA w tej samej reakcji PCR należy analizować oznaczenie kontrolne i oznaczenia mutacji.
- W celu optymalnego wykorzystania odczynników zestawu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit próbki DNA należy testować w partiach zawierających maksymalną liczbę próbek, które można zbadać w ramach jednej analizy. Testowanie pojedynczych próbek lub mniejszej liczby próbek powoduje zużycie większej ilości odczynników i zmniejszenie łącznej liczby próbek, które mogą zostać zbadane za pomocą jednego zestawu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przed każdym użyciem wszystkie odczynniki należy całkowicie rozmrozić, pozostawiając je w temperaturze pokojowej (15–25°C) na co najmniej 1 godzinę (nie dłużej niż na 4,5 godziny), wymieszać, **odwracając każdą probówkę 10 razy**, a następnie krótko odwirować, aby zebrać zawartość probówki na dnie.

- Przed każdym użyciem polimerazy DNA *Taq* należy upewnić się, że ma ona temperaturę pokojową (15–25°C). Krótко odwirować probówkę, aby zebrać enzym na dnie próbówki.
- Wymieszać próbki, **odwracając każdą probówkę 10 razy**, a następnie krótko odwirować, aby zebrać zawartość próbówki na dnie.

Procedura

1. Pozostawić wszystkie mieszaniny reakcyjne, wodę do stosowania jako kontrola bez matrycy (No Template Control, NTC) i kontrolę pozytywną EGFR (Positive Control, PC) w temperaturze pokojowej (15–25°C) na co najmniej 1 godzinę w celu całkowitego rozmrożenia (Tabela 1). Po rozmrożeniu odczynników wymieszać je, **odwracając każdą probówkę 10 razy**, aby uniknąć lokalnego gromadzenia się soli, a następnie krótko odwirować, aby zebrać zawartość probówek na dnie.

Tabela 1. Okresy rozmrażania, przygotowywania reakcji PCR i temperatury przechowywania

Minimalny okres rozmrażania	Maksymalny okres rozmrażania	Temperatura przechowywania po przygotowaniu reakcji PCR	Maksymalny okres przygotowywania reakcji PCR i przechowywania
1 godz.	4,5 godz.	Temperatura otoczenia (15–25°C)	6 godz.
1 godz.	4,5 godz.	2–8°C	18 godz.

Uwaga: Reakcję PCR należy przygotowywać w temperaturze otoczenia. Przechowywanie odnosi się do okresu od ukończenia przygotowywania reakcji PCR do rozpoczęcia reakcji PCR w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Uwaga: Polimerazę DNA *Taq* (próbówka *Taq*) należy doprowadzić do temperatury otoczenia (15–25°C) w tym samym czasie, co pozostałe odczynniki (patrz część „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami”, strona 14). Krótko odwirować probówkę, aby zebrać enzym na dnie próbówki.

2. Wykonać następujące kroki:

- 2a. Oznaczyć próbówki mikrowirówkowe (niedostarczone) nazwami odpowiednich mieszanin reakcyjnych wymienionych w Tabeli 2.

- 2b. Przygotować wystarczającą objętość mieszanin Master Mix (mieszanina reakcji kontrolnej lub reakcji swoistej względem mutacji [próbówka CTRL, T790M, delecje, L858R] i polimeraza DNA *Taq* [*Taq*]) dla próbek DNA, jedną reakcję kontroli pozytywnej EGFR (próbówka PC) i jedną reakcję wody wolnej od nukleaz do kontroli bez matrycy (próbówka NTC) zgodnie z objętościami podanymi w Tabeli 2.

Uwaga: Aby zapewnić wystarczającą nadwyżkę objętości do przygotowania reakcji PCR, należy dodać ilość odczynników odpowiadającą jednej dodatkowej próbce. Mieszaniny Master Mix zawierają wszystkie składniki wymagane do reakcji PCR oprócz próbki.

Tabela 2. Przygotowanie mieszaniny Master Mix*

Oznaczenie	Probówka z mieszaniną reakcyjną	Objętość mieszaniny reakcyjnej	Objętość polimerazy DNA <i>Taq</i> (próbówka <i>Taq</i>)
Kontrola	CTRL	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
T790M	T790M	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
Delecje	Del	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$
L858R	L858R	19,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$	0,50 $\mu\text{l} \times (n+1)$

* Aby zapewnić wystarczającą nadwyżkę objętości do przygotowania reakcji PCR, podczas przygotowywania mieszaniny Master Mix należy dodać ilość odczynników odpowiadającą jednej dodatkowej próbce.

Uwaga: Podczas przygotowywania mieszaniny Master Mix do odpowiedniej próbki należy najpierw dodać odpowiednią objętość mieszaniny reakcyjnej dla kontroli lub mutacji, a dopiero potem polimerazę DNA *Taq*.

3. Umieścić odpowiednią liczbę próbek w paskach zawierających po 4 próbki PCR (każdy pasek zawiera 4 próbki) w bloku ładowania zgodnie ze układem, który przedstawia Tabela 3. Nie zamykać próbek.

Uwaga: Zatyczki należy przechowywać w plastikowym pojemniku do momentu, gdy będą potrzebne.

4. Zamknąć próbkę zawierającą mieszaninę Master Mix i odwrócić ją 10 razy, aby dokładnie wymieszać mieszaninę. Następnie krótko odwirować próbkę w celu zgromadzenia całej objętości mieszaniny na dnie próbki. Niezwłocznie dodać po 20 μl mieszaniny Master Mix do każdej próbki PCR w pasku.

5. Niezwłocznie dodać po 5 µl wody wolnej od nukleaz (H₂O) do próbek PCR w paskach zawierających kontrolę bez matrycy (próbówki PCR o numerach 9–12), a następnie zamknąć próbówki.
6. Dodać po 5 µl próbki do próbek na próbki (próbówki PCR o numerach 5–8, 13–16 i 17–72), a następnie zamknąć próbówki.
7. Dodać po 5 µl kontroli pozytywnej EGFR (Positive Control, PC) do próbek na kontrolę pozytywną (próbówki PCR o numerach 1–4). Każda próbka DNA musi być testowana zarówno z kontrolą, jak i wszystkimi oznaczeniami mutacji. Układ oznaczeń przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Układ oznaczeń kontrolnych i mutacji

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

8. Oznaczyć wieczka pierwszych próbek na pozycjach o najniższych numerach dla każdego z pasków zawierających po 4 próbówki PCR (tj. pozycje 1, 5, 9 itd.), aby określić orientację, w której próbówki będą ładowane do rotora 72-dółkowego aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. **Odwrócić zamknięte próbówki 4 razy, aby wymieszać próbki z mieszaninami reakcyjnymi.**

10. Umieścić wszystkie próbówki w paskach zawierających po 4 próbówki PCR na odpowiednich pozycjach rotora 72-dółkowego i wzrokowo sprawdzić, czy we wszystkich próbówkach znajdują się jednakowe objętości cieczy.

Uwaga: Podczas przenoszenia próbówek w paskach należy uważać, aby ich nie odwrócić.

11. Jeśli rotor nie jest całkowicie zapełniony, należy włożyć w wolne miejsca zamknięte, puste próbówki.

12. Niezwłocznie umieścić rotor w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Upewnić się, że pierścień blokujący (akcesorium aparatu Rotor-Gene Q MDx) jest umieszczony na górze rotora, aby zabezpieczać próbówki podczas reakcji.

13. W celu utworzenia profilu temperaturowego i rozpoczęcia reakcji należy zapoznać się z konfiguracją aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (patrz część „Protokół: Konfiguracja oznaczenia genu EGFR w aparacie Rotor-Gene Q”, strona 23).

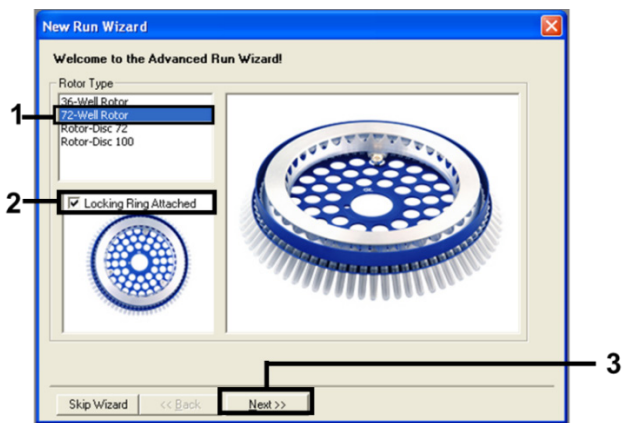
Protokół: Konfiguracja oznaczenia genu EGFR w aparacie Rotor-Gene Q

Parametry wykonywania cykli przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Parametry wykonywania cykli

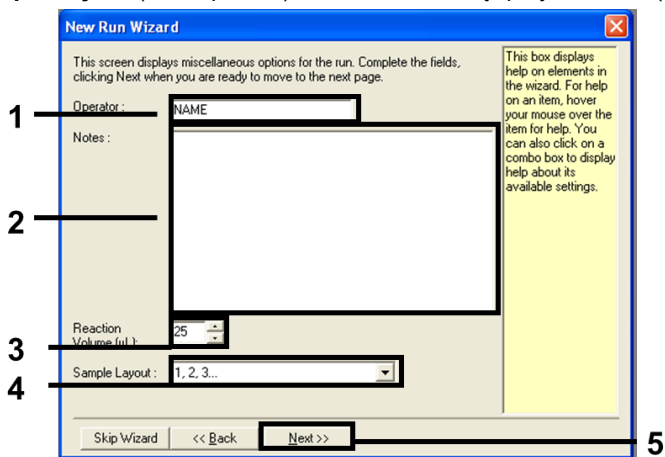
Cykle	Temperatura	Czas	Akwizycja danych
1	95°C	15 minut	Brak
40	95°C	30 sekund	Brak
	60°C	60 sekund	Kanał Green i Yellow

1. Kliknąć dwukrotnie ikonę oprogramowania **Rotor-Gene Q Series w wersji 2.3** na pulpicie komputera podłączonego do Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Wybrać kartę „Advanced” (Zaawansowane) w wyświetlonym oknie dialogowym „New Run” (Nowa reakcja).
2. Aby utworzyć nowy szablon, wybrać opcję **Empty Run** (Pusta reakcja), a następnie kliknąć opcję **New** (Nowa).
Zostanie wyświetlone okno dialogowe „New Run Wizard” (Kreator nowej reakcji).
3. Wybrać opcję **72-Well Rotor** (Rotor 72-dołkowy) jako typ rotora. Upewnić się, że pierścień blokujący jest zamocowany i zaznaczyć pole wyboru **Locking Ring Attached** (Pierścień blokujący zamocowany). Kliknąć przycisk **Next** (Dalej) (Ryc. 1).



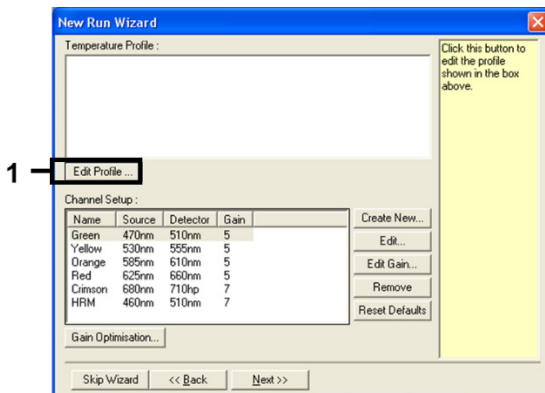
Ryc. 1. Okno dialogowe „New Run Wizard” (Kreator nowej reakcji).

4. Wprowadzić nazwisko operatora w polu **Operator**. Dodać wszelkie uwagi i ustawić wartość w polu **Reaction Volume** (Objętość reakcyjna) na **25**. Upewnić się, że wartości w polu **Sample Layout** (Układ próbek) to **1, 2, 3...** Kliknąć przycisk **Next** (Dalej) (Ryc. 2).



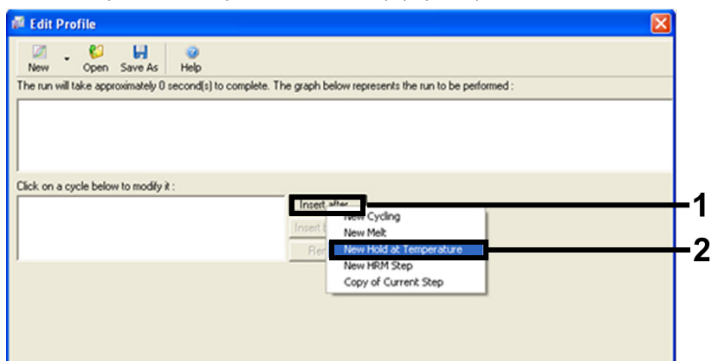
Ryc. 2. Wprowadzanie nazwiska operatora i objętości reakcyjnych.

5. Kliknąć przycisk **Edit Profile** (Edytuj profil) w oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowej reakcji) (Ryc. 3) i ustawić parametry reakcji zgodnie z informacjami podanymi w poniższych krokach.



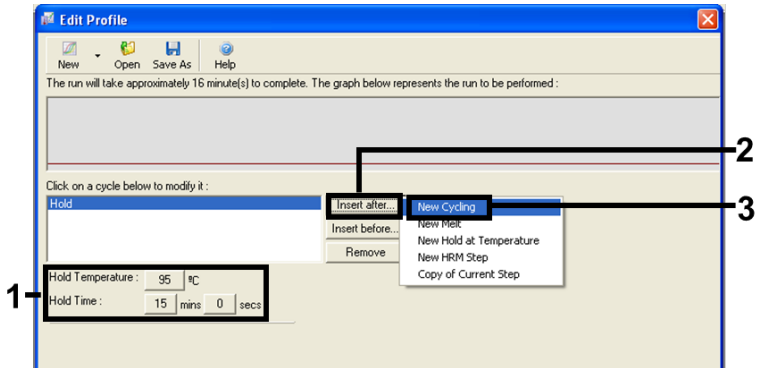
Ryc. 3. Edycja profilu.

6. Kliknąć przycisk **Insert after** (Wstaw po) i wybrać opcję **New Hold at Temperature** (Nowy etap wstrzymania przy temperaturze) (Ryc. 4).



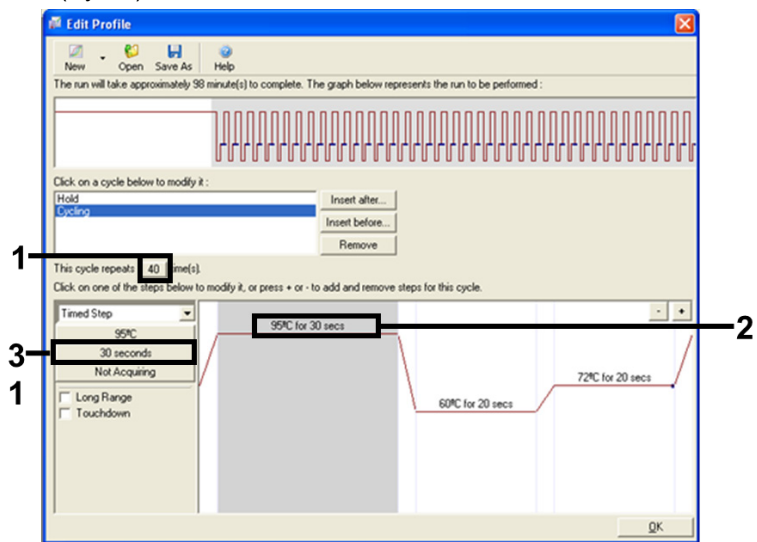
Ryc. 4. Wstawianie etapu wstępnej inkubacji.

7. Ustawić wartość w polu **Hold Temperature** (Temperatura wstrzymania) na 95°C, a wartość w polu **Hold Time** (Czas wstrzymania) na **15 mins 0 secs** (15 min 0 s). Kliknąć przycisk **Insert After** (Wstaw po) i wybrać opcję **New Cycling** (Nowy cykl) (Ryc. 5).



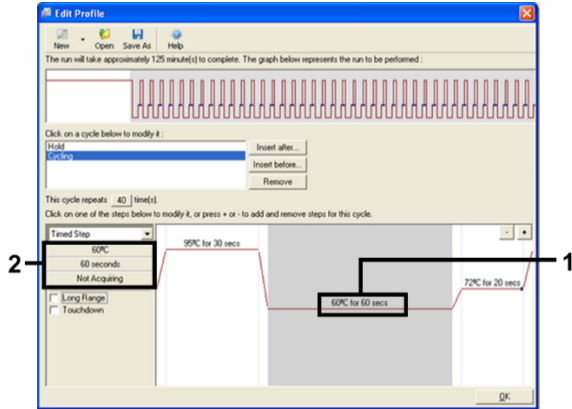
Ryc. 5. Początkowy etap inkubacji przy 95°C.

8. Ustawić liczbę powtórzeń cykli na **40**. Wybrać pierwszy etap i ustawić opcję **95°C przez 30 sekund** (Ryc. 6).



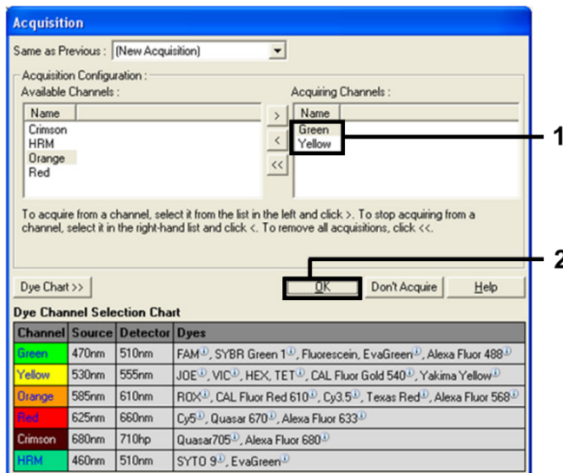
Ryc. 6. Etap cyklu wykonywany w temperaturze 95°C.

9. Wybrać drugi etap i ustawić opcję **60°C przez 60 sekund**. Kliknąć przycisk **Not Acquiring** (Brak akwizycji), aby włączyć akwizycję danych podczas tego etapu. (Ryc. 7).



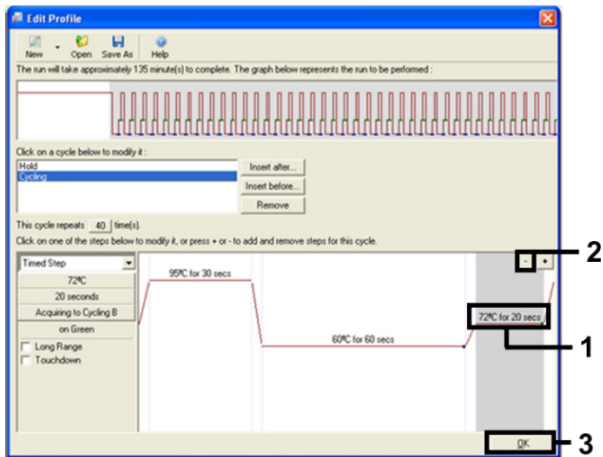
Ryc. 7. Etap cyklu wykonywany w temperaturze 60°C.

10. Na liście **Available Channels** (Dostępne kanały) wybrać kanały **Green** i **Yellow**, a następnie kliknąć symbol **>**, aby przenieść je na listę **Acquiring Channels** (Kanały do akwizycji danych). Kliknąć przycisk **OK** (Ryc. 8).



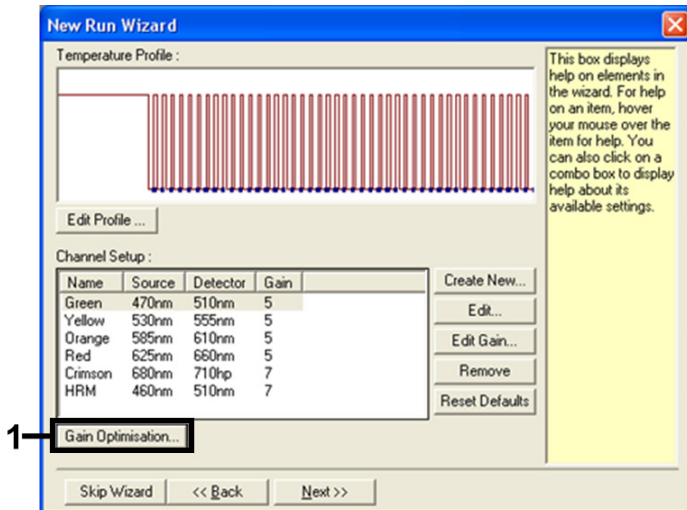
Ryc. 8. Akwizycja danych na etapie cyklu wykonywanego w temperaturze 60°C.

11. Wybrać trzeci etap i kliknąć przycisk -, aby usunąć ten etap. Kliknąć przycisk **OK** (Ryc. 9).



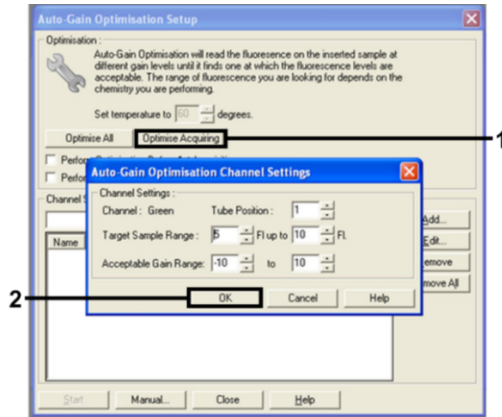
Ryc. 9. Usunięcie etapu wydłużania.

12. W kolejnym oknie dialogowym kliknąć opcję **Gain Optimisation** (Optymalizacja wzmocnienia) (Ryc. 10).



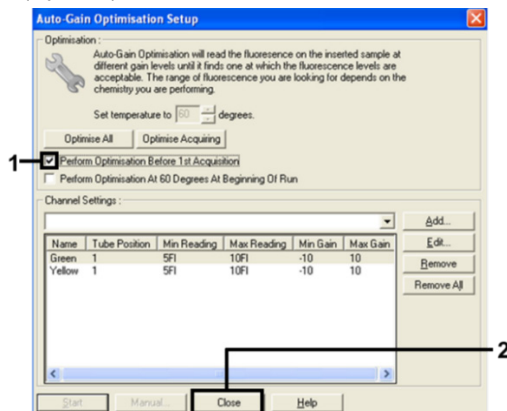
Ryc. 10. Optymalizacja wzmocnienia.

13. Kliknąć opcję **Optimise Acquiring** (Optymalizuj akwizycję). Zostaną wyświetlone ustawienia dla każdego kanału. Kliknąć przycisk **OK**, aby zaakceptować te wartości domyślne dla obu kanałów. (Ryc. 11).



Ryc. 11. Optymalizacja automatycznego wzmocnienia dla kanału Green.

14. Zaznaczyć pole **Perform Optimisation before 1st Acquisition** (Wykonaj optymalizację przed pierwszą akwizycją), a następnie kliknąć przycisk **Close** (Zamknij), aby powrócić do ekranu kreatora (Ryc. 12).



Ryc. 12. Wybór kanału Green i Yellow.

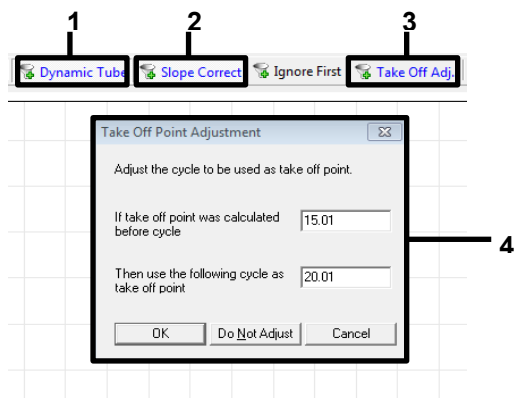
15. Kliknąć przycisk **Next** (Dalej), aby zapisać szablon w odpowiedniej lokalizacji, wybierając opcję „Save Template” (Zapisz szablon).

Analiza danych uzyskanych w wyniku oceny mutacji

Po ukończeniu reakcji należy przeanalizować dane, korzystając z poniższej procedury.

Konfigurowanie analizy w oprogramowaniu

1. Otworzyć odpowiedni plik za pomocą oprogramowania Rotor-Gene Q Series w wersji 2.3.5 lub wyższej.
2. Jeśli próbki nie zostały nazwane przed wykonaniem reakcji, kliknąć opcję **Edit Samples** (Edytuj próbki).
3. Wprowadzić nazwy próbek do kolumny **Name** (Nazwa).
Uwaga: Nie należy nadawać nazw pustym dołkom.
4. Kliknąć opcję **Analysis** (Analiza). Na stronie analizy kliknąć opcję **Cycling A Yellow**, aby wybrać kanał HEX.
5. Upewnić się, że zaznaczona jest opcja **Dynamic Tube** (Probówka dynamiczna). Kliknąć pozycje **Slope Correct** (Korekcja nachylenia) i **Linear scale** (Skala liniowa).
6. Kliknąć opcję **Take Off Adj** (Regulacja cyklu progowego) i wprowadzić wartości **15.01** i **20.01**, co przedstawiono na Ryc. 13.



Ryc. 13. Ustawienia normalizacji analizy genu EGFR. 1 = „Dynamic Tube” (Probówka dynamiczna), 2 = „Slope Correct” (Korekcja nachylenia), 3 = „Take Off Adj” (Regulacja cyklu progowego), 4 = okno dialogowe „Take Off Point Adjustment” (Regulacja cyklu progowego) z wartościami parametrów.

7. Ustawić wartość progową na **0.02** i sprawdzić wartości C_T kanału przeznaczonego dla barwnika HEX.
8. Na stronie analizy kliknąć opcję **Cycling A , Green**, aby wyświetlić kanał przeznaczony dla barwnika FAM. Ustawić parametry, tak jak na Ryc. 13 powyżej.
Powinna być wyróżniona próbka dynamiczna.
9. Kliknąć pozycje **Slope Correct** (Korekcja nachylenia) i **Linear scale** (Skala liniowa).
10. Ustawić wartość progową na 0.075 i sprawdzić wartości C_T kanału przeznaczzonego dla barwnika FAM.

Analiza kontroli reakcji

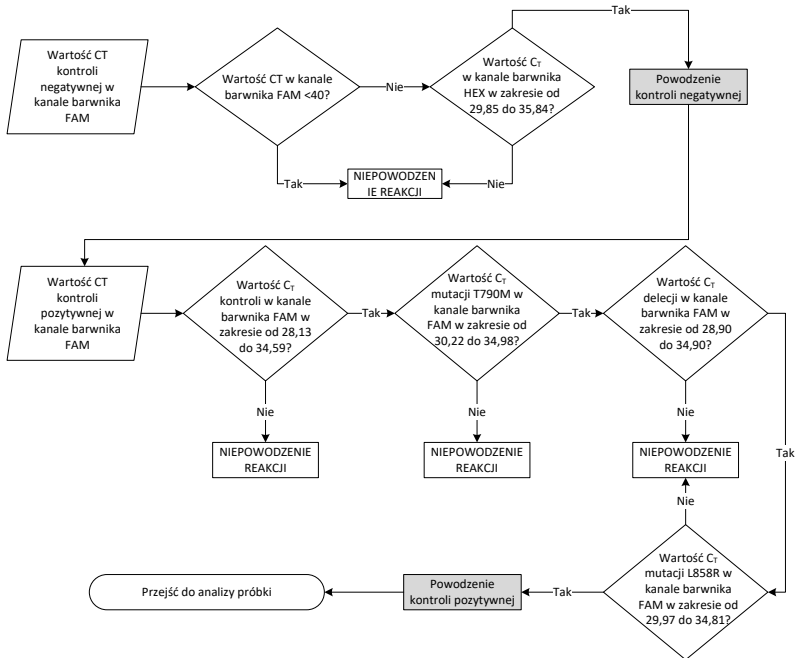
Po zakończeniu reakcji należy przeanalizować dane w następujący sposób.

- **Kontrola negatywna:** Aby można było stwierdzić brak zanieczyszczeń w postaci matrycy, wartość C_T wygenerowana przez kontrolę NTC w kanale zielonym (FAM) nie może przekroczyć wartości 40. Aby można było stwierdzić prawidłowe przygotowanie reakcji, kontrola NTC musi wykazywać amplifikację w kanale żółtym (HEX) (kontrola wewnętrzna) na poziomie od 29,85 do 35,84.
- Reakcja jest nieważna, jeśli w kanale zielonym wykryto amplifikację pozytywną i/lub amplifikacja w kanale żółtym nie mieści się w zakresie od 29,85 do 35,84.
- **Kontrola pozytywna:** Kontrola pozytywna EGFR (Positive Control, PC) musi dać wartość C_T dla każdej mieszaniny reakcyjnej, mieszczącą się w zakresie określonym w Tabeli 5. Wartość otrzymana dla kontroli pozytywnej, która nie mieści się w określonym zakresie, wskazuje problem przy przygotowaniu oznaczenia. Reakcję taką należy uznać za nieważną. Jeśli kontrola pozytywna daje wartość C_T w zakresie (FAM), ale wartość C_T kontroli wewnętrznej (HEX) jest poza zakresem od 29,85 do 35,84, należy kontynuować analizę.

Uwaga: Danych uzyskanych dla próbki nie należy brać pod uwagę, jeśli wyniki kontroli negatywnej lub kontroli pozytywnej są nieprawidłowe.

Tabela 5. Akceptowalny zakres wartości C_T dla kontroli reakcji

Kontrola reakcji	Oznaczenie	Kanał	Zakres wartości C_T
Kontrola pozytywna	Kontrola	Green (FAM)	28,13–34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22–34,98
	Delekcje	Green (FAM)	28,90–34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97–34,81
Kontrola bez matrycy	Wszystkie cztery mieszaniny reakcyjne	Green (FAM)	≥40,00
	Wszystkie cztery mieszaniny reakcyjne	Yellow (HEX)	29,85–35,84



Ryc. 14. Przebieg analizy kontroli reakcji.

Przyjmując, że obie kontrole reakcji są ważne, wartość C_T każdej próbki musi mieścić się w zakresie od 23,70 do 31,10 w kanale zielonym (FAM) (Tabela 6).

Tabela 6. Akceptowalny zakres wartości C_T w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM dla reakcji kontrolnej próbki

Mieszanina reakcyjna	Kanał	Akceptowalny zakres wartości C_T
Kontrola	Green (FAM)	23,70–31,10

Jeśli wartość otrzymana dla próbki jest poza tym zakresem, należy oprzeć się na przedstawionych poniżej wytycznych.

- **Wartość C_T oznaczenia kontroli próbki <23,70:** próbki, dla których wartość C_T kontroli jest <23,70, spowodują przeładowanie oznaczeń mutacji; należy je rozcieńczyć. Aby wykryć każdą mutację przy niskim poziomie, nadmiernie stężone próbki należy rozcieńczyć tak, aby otrzymywana dla nich wartość mieściła się w określonym powyżej zakresie, przyjmując, że rozcieńczenie o połowę zwiększa wartość C_T o 1.
- **Wartość C_T oznaczenia kontroli próbki >31,10:** próbka nie zawiera wystarczającej ilości DNA do przeprowadzenia analizy.

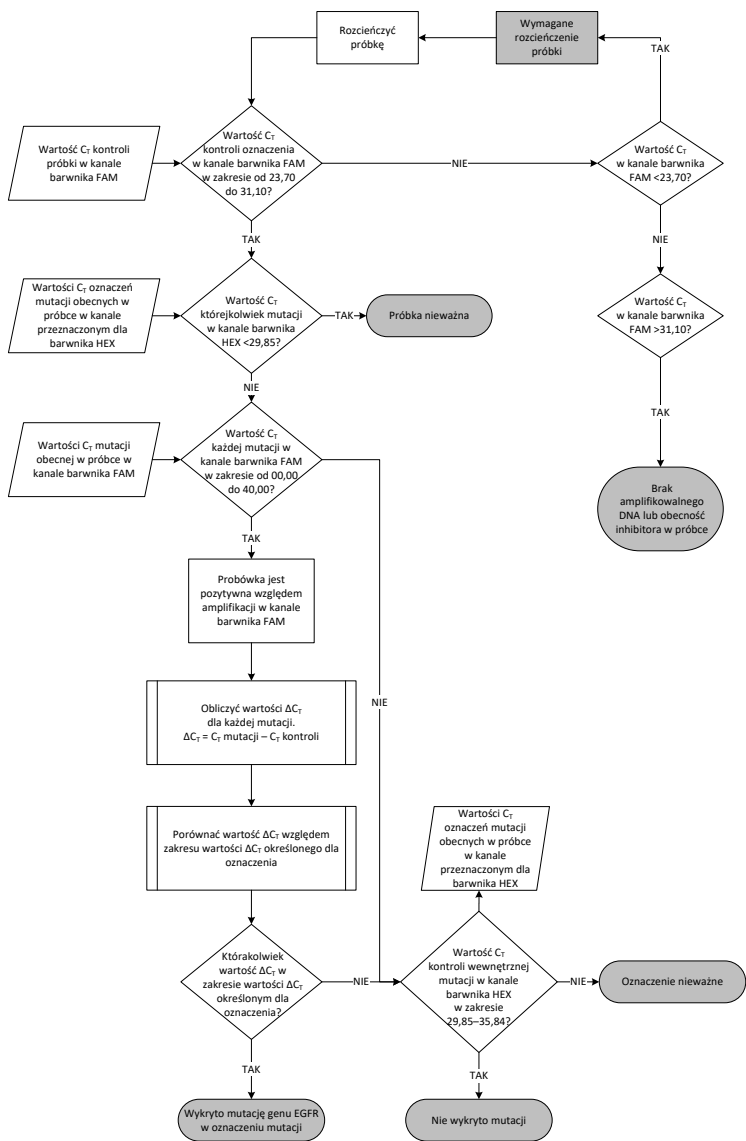
Przyjmując, że obie kontrole reakcji są ważne, a wynik oznaczenia kontroli mieści się w zakresie podanym w Tabeli 6, wartość C_T oznaczenia każdej mutacji w próbce musi mieścić się w zakresie wyszczególnionym w Tabeli 7 dla kanału zielonego (FAM). Jeśli wartość otrzymana dla próbki jest poza tym zakresem, należy oprzeć się na przedstawionych poniżej wytycznych.

Tabela 7. Akceptowalne wartości dla oznaczeń mutacji w próbkach

Reakcja	Mieszanina reakcyjna	Kanał	Zakres wartości C _T
Reakcja swoista względem mutacji	T790M	Green (FAM)	0,00–40,00
	Delecje	Green (FAM)	0,00–40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00–40,00
	Wszystkie trzy mutacje	Yellow (HEX)	29,85–35,84

Uwaga: Brak wartości C_T dla próbki (tj. wartość C_T >40), może wynikać z obecności inhibitora, błędu podczas przygotowania testu lub braku amplifikowalnego DNA genu EGFR.

- **Wartość C_T kontroli wewnętrznej mieści się w zakresie 29,85–35,84:** brak amplifikowalnego DNA genu EGFR.
- **Wartość C_T kontroli wewnętrznej nie mieści się w zakresie 29,85–35,84:** może to wskazywać na błąd podczas przygotowania testu lub obecność inhibitora. Wpływ inhibitorów można zmniejszyć, rozcieńczając próbkę, ale spowoduje to także rozcieńczenie DNA.



Ryc. 15. Schemat analizy mutacji.

Wartość C_T w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM dla oznaczeń mutacji w próbkach

Wartości barwnika FAM otrzymane dla wszystkich trzech mieszanin reakcyjnych swoistych względem mutacji należy sprawdzić względem wartości wymienionych w Tabeli 8.

Obliczyć punkt odcięcia ΔC_T dla każdej próbki zawierającej mutację, w której wykazano amplifikację, z poniższego wzoru, upewniając się, że podstawiono wartości C_T z oznaczenia mutacji i z oznaczenia kontroli otrzymane dla tej samej próbki.

$$\Delta C_T = \text{wartość } C_T \text{ z oznaczenia mutacji} - \text{wartość } C_T \text{ z oznaczenia kontroli}$$

Porównać wartość ΔC_T dla próbki z zakresem określającym punkty odcięcia wartości ΔC_T dla danego oznaczenia (Tabela 8), upewniając się, że zastosowano właściwy punkt odcięcia dla każdego oznaczenia.

Tabela 8. Zakres określający punkty odcięcia wartości ΔC_T dla oznaczeń mutacji

Oznaczenie mutacji	Zakres określający punkty odcięcia wartości ΔC_T
T790M	od -10,00 do 7,40 (włącznie)
Delecje	od -10,00 do 8,00 (włącznie)
L858R	od -10,00 do 8,90 (włącznie)

Górna granica zakresu określającego punkty odcięcia wartości ΔC_T to punkt, powyżej którego sygnał pozytywny może wynikać z sygnału tła generowanego przez starter ARMS przyłączony do DNA typu dzikiego. Jeśli wartość ΔC_T próbki przekracza górny punkt zakresu określającego punkty odcięcia wartości ΔC_T , próbka jest klasyfikowana jako „Mutation not detected” (Nie wykryto mutacji) lub poza granicami wykrywalności zestawu. Jeśli wartość próbki mieści się w zakresie określającym punkty odcięcia wartości ΔC_T , próbka jest klasyfikowana jako pozytywna pod względem wykrycia mutacji przez oznaczenie. Jeśli wartość próbki jest niższa niż dolna granica zakresu określającego punkty odcięcia wartości C_T , prawdopodobnie wystąpił artefakt sygnału fluorescencyjnego.

Uwaga: W przypadku próbek bez wartości C_T w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM, która wskazywałaby na obecność mutacji, konieczne jest dokonanie oceny wartości C_T kontroli wewnętrznej (HEX) w celu określenia, czy mutacja nie została wykryta lub czy oznaczenie zakończyło się niepowodzeniem. Jeśli wartość C_T w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX mieści się w zakresie od 29,85 do 35,84, nie wykryto mutacji. Jeśli punkt odcięcia wartości C_T w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX nie mieści się w tym zakresie, próbka jest nieważna.

Podsumowując, dla każdej próbki, każdej reakcji wykrywającej mutację zostanie nadany odpowiedni status: „wykryto mutację”, „nie wykryto mutacji” lub „wynik nieważny”, przy zastosowaniu następujących kryteriów.

- **Wykryto mutację:** Pozytywny wynik amplifikacji w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM; wartość ΔC_T mieści się w zakresie punktu odcięcia ΔC_T . Jeśli zostanie wykryta więcej niż jedna mutacja, można zgłosić wszystkie mutacje.
- **Nie wykryto mutacji:**
 - Pozytywny wynik amplifikacji w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM; punkt odcięcia wartości ΔC_T powyżej zakresu określającego punkty odcięcia wartości ΔC_T , a wartość w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX (kontrola wewnętrzna) w zakresie 29,85–35,84.
 - Negatywny wynik amplifikacji w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM; wartość w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX (kontrola wewnętrzna) w zakresie 29,85–35,84.
- **Wynik nieważny:** Negatywny wynik amplifikacji w kanale przeznaczonym dla barwnika FAM; amplifikacja w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX poza określonym zakresem.
 - Obliczona wartość ΔC_T poniżej zakresu określającego punkty odcięcia wartości ΔC_T ; amplifikacja w kanale przeznaczonym dla barwnika HEX (kontrola wewnętrzna) w zakresie wartości oczekiwanych. Wartość ΔC_T mniejsza niż $-10,00$ może świadczyć o wystąpieniu artefaktu sygnału fluorescencyjnego.

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może przydać się w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej stronie okładki lub pod adresem www.qiagen.com).

Komentarze i wskazówki

Brak sygnału kontroli pozytywnej EGFR (Positive Control, PC) w kanale fluorescencyjnym Cycling Green

- | | |
|--|--|
| a) Wybrany do analizy danych PCR kanał fluorescencyjny nie spełnia wymagań protokołu. | Do analizy danych wybrać kanał fluorescencyjny Cycling Green dla analitycznej reakcji PCR pod kątem EGFR oraz kanał fluorescencyjny Cycling Yellow dla kontroli wewnętrznej PCR. |
| b) Nieprawidłowe zaprogramowanie profilu temperaturowego w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM | Porównać profil temperaturowy z protokołem i, jeśli jest nieprawidłowy, powtórzyć reakcję. |
| c) Nieprawidłowa konfiguracja reakcji PCR | Sprawdzić etapy procedury według schematu pipetowania i w razie potrzeby powtórzyć reakcję PCR. |
| d) Warunki przechowywania co najmniej jednego z odczynników wchodzących w skład zestawu nie były zgodne z zaleceniami zawartymi w części „Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami” (strona 14) | Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |
| e) Minął termin ważności zestawu <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit | Sprawdzić warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyć nowego zestawu. |

Komentarze i wskazówki

Sygnaly dla kontroli negatywnych w kanale fluorescencyjnym Cycling Green analitycznej reakcji PCR

Podczas przygotowywania reakcji PCR doszło do zanieczyszczenia próbki

Powtórzyć reakcję PCR z nowymi odczynnikami w powtórzeniach. Jeśli to możliwe, zamknąć próbki PCR niezwłocznie po dodaniu próbki badanej. Upewnić się, że przestrzeń robocza oraz aparaty są regularnie odkażane.

Wiele punktów przecięcia określających cykl progowy lub wartość ΔC_T **poniżej zakresu określającego punkty odcięcia**

Nieprawidłowe wymieszanie podczas przygotowywania oznaczenia

Powtórzyć reakcję PCR, jeśli problem dotyczy kontroli, lub ponownie przetestować próbkę, dla której otrzymano nieważny wynik. Postępować zgodnie z instrukcją użycia, przykładając szczególną uwagę do etapów mieszania.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia powtarzalnej jakości produktu.

Ograniczenia

Wyniki uzyskane za pomocą tego produktu należy interpretować w kontekście wszystkich odpowiednich obserwacji klinicznych i laboratoryjnych; nie mogą one służyć jako jedyna podstawa diagnozy.

Produkt może być obsługiwany wyłącznie przez personel przeszkolony w dziedzinie procedur diagnostyki *in vitro* oraz obsługi aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Do badań walidacji analitycznej użyto ludzkiego DNA wyizolowanego z próbek osocza.

Produkt jest przeznaczony do stosowania wyłącznie z cyklerem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM do reakcji real-time PCR.

W celu uzyskania optymalnych wyników należy ściśle przestrzegać wytycznych zawartych w dokumencie *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit — *Instrukcja obsługi*. Rozcieńczanie odczynników w sposób inny niż opisany w niniejszej instrukcji obsługi nie jest zalecane i skutkuje utratą skuteczności.

Należy zwrócić uwagę na daty ważności oraz informacje o warunkach przechowywania wydrukowane na opakowaniu i etykietach wszystkich składników. Nie należy używać składników z przekroczoną datą ważności ani niewłaściwie przechowywanych.

Startery w mieszaninie reakcyjnej EGFR zaprojektowano w celu wykrywania wielu delecji w obrębie eksonu 19, obejmujących nukleotydy od 55174772 do 55174795 (GRCh38 chr7), zakres 23 par zasad (bp).

Oznaczenie delecji w eksonie 19 zostało zwalidowano analitycznie i wykazano, że umożliwia ono wykrycie swoistych delecji w obrębie eksonu 19 (patrz Tabela 13 niniejszej instrukcji obsługi). Mieszanina reakcyjna przeznaczona do wykrywania delecji może jednak powodować amplifikację sekwencji zawierających inne mutacje (między innymi inne delecje w obrębie eksonu 19, insercje w obrębie eksonu 19 oraz mutacją L747P).

Jeśli takie mutacje będą obecne w próbce pacjenta, spowodują wygenerowanie wyniku „Deletions Detected” (Wykryto delecje).

Dodatkowo możliwe jest wykrycie mutacji L858Q przez mieszaninę reakcyjną L858R. Z tego względu, jeśli w próbce pacjenta będzie obecna mutacja L858Q, może zostać wygenerowany wynik „L858R Mutation Detected” (Wykryto mutację L858R).

Parametry skuteczności

Czułość analityczna — granica próby ślepej (Limit of Blank, LOB)

W celu oceny działania zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit w przypadku braku matrycy oraz w celu zapewnienia, że próba ślepa lub próbka zawierająca DNA typu dzikiego nie generuje sygnału analitycznego, który może wskazywać na niskie stężenie mutacji, oceniono DNA genu EGFR typu dzikiego wyizolowanego z 59 różnych próbek osocza pacjentów z rakiem NDRP. Kryteria akceptacji badania (co najmniej 95% próbek typu dzikiego musi dawać wartości ΔC_T powyżej odpowiedniego punktu odcięcia) zostały spełnione.

Granica wykrywalności (Limit of Detection, LOD)

Granica LOD to minimalny odsetek zmutowanego DNA wykrywalnego w tle DNA typu dzikiego, gdy całkowita ilość amplifikowalnego DNA (w zakresie wejściowej ilości), generuje prawidłowe wywołania mutacji z prawdopodobieństwem 95% dla każdej próbki pozytywnej względem mutacji (C95). Zakres roboczy wejściowej ilości DNA dla oznaczenia jest definiowany przez wartość C_T kontroli przy wstępnie określonym zakresie od 23,70 do 31,10.

Granice LOD wyznaczono przy niskiej wejściowej ilości DNA (wartość C_T kontroli około 30,10) przy użyciu DNA pochodzącego z tkanki FFPE dla zestawu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Granice LOD wyznaczono przy użyciu klinicznych próbek FFPE i próbek FFPE z linii komórkowej przy niskiej wejściowej ilości DNA dla mutacji genu EGFR.

Wartości granic LOD wyznaczonych przy użyciu tkanki FFPE zweryfikowano dla zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit przy użyciu DNA wyizolowanego z wytworzonych sztucznie próbek osocza pozytywnych względem mutacji.

Ostateczne wyznaczone wartości granic LOD wymienione w Tabeli 9 na następnej stronie wskazują odsetek mutacji, dla którego przewidywane prawdopodobieństwo wygenerowania poprawnego wywołania plasuje się na poziomie 95% dla każdej z mutacji.

Tabela 9. Granice LOD dla każdego z oznaczeń mutacji genu EGFR

Ekson	Mutacja	Nr identyfikacyjny COSMIC*	Wyznaczona granica LOD (%)
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43†
		12419	16,87†
		12422	3,24†
		6218	9,83†
		6210	7,44†
		6254	10,2*
		12370	8,1*
		19	Delecje
12367	4,39†		
12384	7,54†		
6225	6,5*		
6220	2,7*		
6255	0,81*		
12382	1,45*		
12383	4,58*		
12387	4,91†		
21	L858R	6224	5,94*

* Wyznaczone granice LOD zweryfikowano w osoczu w ramach badania potwierdzającego granice LOD zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

† Tych mutacji nie potwierdzono w osoczu.

Czułość analityczna – punkty odcięcia wartości ΔC_T oraz zakres określający punkty odcięcia wartości ΔC_T

Przy ustalaniu punktów odcięcia oznaczeń w odniesieniu do częstości generowania wyników fałszywie dodatnich przyjęto podejście oparte na ryzyku, a przy opracowywaniu punktów odcięcia jako jeden ze składników wykorzystano szacunkowe wartości granic LOB.

Zakresy określające punkty odcięcia wartości ΔC_T wyznaczone dla każdego oznaczenia mutacji zawartego w zestawie *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit podano w Tabeli 10.

Tabela 10. Zakresy określające punkty odcięcia wartości ΔC_T dla zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Oznaczenie mutacji	Zakres określający punkty odcięcia wartości ΔC_T
T790M	od -10,00 do 7,40 (włącznie)
Delecja	od -10,00 do 8,00 (włącznie)
L858R	od -10,00 do 8,90 (włącznie)

Powtarzalność i odtwarzalność

Powtarzalność i odtwarzalność oceniono w badaniu poziomu mutacji przy stężeniu 3x LOD w tle genomowego DNA typu dzikiego w 3 ośrodkach, używając wielu partii zestawu, wykonując wiele reakcji w różnych dniach, przez wielu operatorów, badając każdą próbkę w 2 powtórzeniach. W przypadku wszystkich 3 oznaczeń mutacji dla 100% próbek ze zmutowanym DNA uzyskano wynik pozytywny względem mutacji. Próbki typu dzikiego dały wynik negatywny względem mutacji we wszystkich oznaczeniach wykonywanych we wszystkich ośrodkach.

Wpływ wejściowej ilości DNA na otrzymywane wartości C_T

Wejściowy poziom DNA jest definiowany jako całkowita ilość obecnego w próbce EGFR DNA, który może ulec amplifikacji, określona na podstawie wartości C_T otrzymanych dla reakcji kontrolnej. W celu wykazania stałej skuteczności zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit w całym zakresie wartości C_T dla reakcji kontrolnej (23,70–31,10) przygotowano sześciopunktowe seryjne rozcieńczenia w stosunku 1 do 3 dla każdego z 3 oznaczeń mutacji genu EGFR (DNA wyizolowane z próbek FFPE z linii komórkowych). Docelowa wartość C_T dla pierwszego rozcieńczenia, dla każdej mutacji, wynosiła około 24,70. Końcowe rozcieńczenie, które dawało wartość C_T na poziomie około 32–33, było poza zakresem wartości C_T dla reakcji kontrolnej. Ogólnie rzecz biorąc, punkty odcięcia wartości ΔC_T zmierzone na różnych poziomach wejściowych DNA były spójne w całym zakresie roboczym zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Substancje zakłócające

Endogenne substancje zakłócające

Substancje potencjalnie zakłócające dodano do wytworzonych sztucznie próbek osocza pozytywnych względem mutacji o stężeniu 3x LOD. Próbkę przetestowano następnie za pomocą zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Próbkę zawierającą substancje potencjalnie zakłócające porównano do wytworzonych sztucznie próbek osocza pozytywnych względem mutacji o stężeniu 3x LOD, do których nie dodano substancji zakłócającej. Każdą substancję zakłócającą testowano w 4 powtórzeniach.

Uznano, że różnica $>2x$ wartości odchyłeń standardowych (Standard Deviation, SD) (z badania precyzji) między wartością ΔC_T „testu” a wartością „kontroli” (tj. brak substancji zakłócającej) wskazuje obecność potencjalnego zakłócenia. W takich przypadkach podano zaobserwowaną różnicę wartości ΔC_T .

Badane stężenia podane w Tabeli 11 wybrano w oparciu o wskazówki zawarte w wytycznej EP07-A2 instytutu CLSI i są one reprezentatywne dla maksymalnych stężeń oczekiwanych w próbce klinicznej.

Uwaga: Te endogenne związki dodano do wytworzonych sztucznie próbek osocza pozytywnych względem mutacji, w których skład wchodziło osocze pobrane od zdrowych dawców. Z tego względu przed dodaniem tych endogennych związków mogły być one naturalnie obecne w próbkach w nieznanymi stężeniach. Końcowe stężenie każdej badanej endogennej substancji potencjalnie zakłócającej są prawdopodobnie większe niż stężenie badane.

Tabela 11. Endogenne substancje potencjalnie zakłócające

Substancja potencjalnie zakłócająca (Interfering Substance, IS)	Badane stężenie
Bilirubina niezwiązana	150 mg/dl
Hemoglobina (ludzka)	0,2 g/dl
Trójglicerydy	3 g/dl

Oznaczenie T790M

Następujące związki endogenne w stężeniach podanych w Tabeli 11 mają wpływ $>2x$ SD (ΔC_T 0,40) na skuteczność oznaczenia T790M:

- **Trójglicerydy, różnica wartości ΔC_T 1,37**

Oznaczenie delekcji

Następujące związki endogenne w stężeniach podanych w Tabeli 11 mają wpływ $>2x$ SD (ΔC_T 0,71) na skuteczność oznaczenia delekcji:

- **Hemoglobina, różnica wartości ΔC_T 0,80**

Oznaczenie L858R

Następujące związki endogenne w stężeniach podanych w Tabeli 11 mają wpływ $>2x$ SD (ΔC_T 0,56) na skuteczność oznaczenia L858R:

- Bilirubina, różnica wartości ΔC_T 1,13
- Trójglicerydy, różnica wartości ΔC_T 1,53

Egzogenne substancje zakłócające

Substancje potencjalnie zakłócające dodano do wytworzonych sztucznie próbek osocza pozytywnych względem mutacji o stężeniu $3x$ LOD. Próbki przetestowano następnie za pomocą zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Próbki zawierające substancje potencjalnie zakłócające porównano do wytworzonych sztucznie próbek osocza pozytywnych względem mutacji o stężeniu $3x$ LOD, do których nie dodano substancji zakłócającej. Każdą substancję zakłócającą testowano w 4 powtórzeniach.

Uznano, że różnica $>2x$ wartości odchyłeń standardowych (z badania precyzji) między wartością ΔC_T „testu” a wartością ΔC_T „kontroli” (tj. brak substancji zakłócającej) wskazuje na obecność potencjalnego zakłócenia. W takich przypadkach podano zaobserwowaną różnicę wartości ΔC_T .

Badane stężenia podane w Tabeli 12 wybrano w oparciu o wskazówki zawarte w wytycznej EP07-A2 instytutu CLSI i we wszystkich przypadkach przekraczają one stężenia terapeutyczne.

Tabela 12. Endogenne substancje potencjalnie zakłócające

Substancja potencjalnie zakłócająca (Interfering Substance, IS)	Badane stężenie (µg/ml)
Bromowodorek cytalopramu	0,75
Paroksetyna chlorowodoru półwodnego	1,14
Chlorowodorek sertraliny	0,67
Chlorowodorek fluoksetyny	3,87
Acetaminofen	200,7
K ₂ EDTA	3600

Oznaczenie T790M

Następujące związki egzogenne w stężeniach podanych w Tabeli 12 mają wpływ >2x SD (ΔC_T 0,40) na skuteczność oznaczenia T790M:

- Bromowodorek cytalopramu, różnica wartości ΔC_T 0,52
- Chlorowodorek sertraliny, różnica wartości ΔC_T 0,47
- Chlorowodorek fluoksetyny, różnica wartości ΔC_T 0,48

Oznaczenie delecji

Następujące związki egzogenne w stężeniach podanych w Tabeli 12 mają wpływ >2x SD (ΔC_T 0,71) na skuteczność oznaczenia delecji:

- **Fluoksetyna, różnica wartości ΔC_T 0,73**

Oznaczenie L858R

Następujące związki egzogenne w stężeniach podanych w Tabeli 12 mają wpływ $>2x$ SD (ΔC_T 0,56) na skuteczność oznaczenia L858R:

- Bromowodorek cytalopramu, różnica wartości ΔC_T 0,72
- Paroksetyna chlorowodoru półwodnego, różnica wartości ΔC_T 0,92
- Chlorowodorek sertraliny, różnica wartości ΔC_T 0,82
- Chlorowodorek fluoksetyny, różnica wartości ΔC_T 0,98
- Acetaminofen, różnica wartości ΔC_T 0,81
- K_2 EDTA, różnica wartości ΔC_T 0,57

Skuteczność kliniczna

Badanie kliniczne NCT01203917 było otwartym badaniem klinicznym fazy IV bez grupy kontrolnej, którego celem była ocena skuteczności i bezpieczeństwa/tolerancji gefitynibu stosowanego w pierwszej linii leczenia u pacjentów rasy kaukaskiej z rakiem NDRP w stadium IIIA/B/IV, pozytywnym względem mutacji genu EGFR.

Kwalifikowalność pacjentów do badania klinicznego NCT01203917 oceniona na podstawie obecności mutacji genu EGFR warunkujących wrażliwość na lek. Status mutacji genu EGFR u pacjentów z rakiem NDRP oceniano przy użyciu oznaczenia przeznaczonego wyłącznie na użytek danego badania klinicznego (Clinical Trial Assay, CTA) i DNA wyizolowanego ze skojarzonych próbek tkankowych i próbek osocza. Badanie obejmowało wstępnie zaplanowane badanie pod kątem biomarkera w celu ustalenia, czy próbki osocza mogą być brane pod uwagę do analizy mutacji, jeśli nie można pozyskać próbek tkankowych. Na podstawie wyników stwierdzono wysokie wskaźniki zgodności pomiędzy skojarzonymi próbkami tkankowymi i próbkami osocza na poziomie 94,3%, przy swoistości i czułości oznaczenia na poziomach odpowiednio 99,8% i 65,7%.

Próbki osocza pobrane od pacjentów poddanych badaniom przesiewowym w ramach badania klinicznego NCT01203917 przetestowano retrospektywnie przy użyciu zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Przeprowadzono badanie pomostowe w celu oceny zgodności zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit z oznaczeniem CTA używanym do wyboru pacjentów do badania klinicznego NCT01203917. Wykazano równoważność oznaczenia CTA i zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Literatura















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

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem **www.qiagen.com/Support**, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (patrz tylna okładka lub strona **www.qiagen.com**).

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
	Zawiera odczynniki wystarczające do wykonania <N> reakcji
	Termin ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału
	Składniki
	Zawiera
	Liczba
	Globalny numer jednostki handlowej
	Zakres temperatury
	Producent
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Przeostroga

Załącznik A: Szczegółowe informacje dotyczące mutacji

Tabela 13 przedstawia numery identyfikacyjne COSMIC pochodzące z Katalogu mutacji somatycznych w nowotworach (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabela 13. Lista mutacji i numerów identyfikacyjnych COSMIC

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

Dane do zamówień

Produkt	Zawartość	Nr kat.
therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit — do wykrywania mutacji genu EGFR		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Na 24 reakcje: 1 oznaczenie kontrolne, 3 oznaczeń mutacji, kontrola pozytywna, polimeraza DNA <i>Taq</i>	870311
Aparat Rotor-Gene Q MDx i akcesoria		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cyklery real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklery real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, roczna gwarancja na części i robociznę; obejmuje instalację i przeszkolenie	9002032

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji w probówkach w układzie 72 x 0,1 ml za pomocą pipety jednokanałowej	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 1000 reakcji	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 10 000 reakcji	981106
Produkty pokrewne		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Na 50 przygotowań: kolumny QIAamp Mini, przedłużacze probówek (20 ml), produkt QIAGEN Proteinase K, nośnik Carrier RNA, bufory, złącza VacConnectors i probówki Collection Tubes (1.5 ml i 2 ml)	55114

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Historia zmian dokumentu

Dokument	Zmiany
R3, styczeń 2019 r.	Dodano dane upoważnionego przedstawiciela (na pierwszej stronie okładki). Zaktualizowano część „Symbole”.
R4, październik 2019 r.	Zmieniono dane oficjalnego producenta (na stronie tytułowej). Zmieniono nazwę aparatu Rotor-Gene Q MDx na Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, aby odpowiadała ona nazwie znajdującej się na etykiecie aparatu Poprawiono instrukcje dotyczące przechowywania odczynnika z 90 dni na 12 miesięcy lub do daty ważności Zaktualizowano część „Ograniczenia”, uzupełniając ją o informacje dotyczące oznaczenia delecji w eksonie 19 i oznaczenia L858R Skorygowano Tabelę 9, zastępując dwukrotnie wymienioną mutację L858R w eksonie 21 delecją w eksonie 19 Usunięto symbol EC + REP ze strony tytułowej i części „Symbole”
R5, czerwiec 2020 r.	Zaktualizowano odniesienia do wersji oprogramowania RGQ z wersji 2.3 do wersji 2.3.5 lub nowszej Zaktualizowano Tabelę 8 i 10 w celu uwzględnienia nowego zakresu określającego punkty odcięcia wartości ΔC_T oraz skorygowano wszystkie opisy odnoszące się do tego zakresu w całej instrukcji obsługi Zaktualizowano wszystkie rozdziały dotyczące protokołów w celu uwzględnienia informacji o znaczeniu mieszania w częściach „Ważne informacje przed rozpoczęciem”; podkreślono szczegóły dotyczące mieszania na wszystkich etapach mieszania Dodano etap mieszania w części „Protokół: Wykrywanie mutacji genu EGFR” Zaktualizowano część „Rozwiązywanie problemów” w celu dodania rozwiązania problemu związanego z wieloma punktami przecięcia określającymi cykl progowy

Strona celowo pozostawiona pusta

Strona celowo pozostawiona pusta

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

1. Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:
2. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
3. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
4. Zestaw oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować ani sprzedawać.
5. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
6. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie www.qiagen.com.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *therascreen*®, Rotor-Gene®, Scorpions® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

1121934 06-2020 HB-1898-006 © 2020 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone

