

Ιούνιος 2020

# Εγχειρίδιο *therascreen*<sup>®</sup> EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Έκδοση 1

**IVD**

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Για χρήση με τα όργανα Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM

**CE**

**REF**

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ΓΕΡΜΑΝΙΑ

R5 **MAT**

1121934EL

# Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση .....	4
Σύνοψη και επεξήγηση .....	5
Αρχή της διαδικασίας.....	6
Μορφή κιτ.....	7
Προσδιορισμοί.....	7
Μάρτυρες.....	8
Υλικά που παρέχονται .....	9
Περιεχόμενα του κιτ .....	9
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται.....	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	11
Πληροφορίες ασφάλειας .....	11
Γενικές προφυλάξεις.....	11
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων.....	13
Αποθήκευση και χειρισμός των δοκιμίων.....	15
Διαδικασία.....	16
Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR .....	17
Πρωτόκολλο: Ρύθμιση Rotor-Gene Q EGFR .....	23
Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης μεταλλάξεων .....	30
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	38
Έλεγχος ποιότητας.....	40
Περιορισμοί.....	40
Χαρακτηριστικά απόδοσης.....	42

---

Αναλυτική ευαισθησία – όριο τυφλού (Limit of Blank, LOB).....	42
Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD).....	42
Αναλυτική ευαισθησία — Οριακές τιμές αποκοπής $\Delta C_T$ και εύρος οριακών τιμών αποκοπής $\Delta C_T$ .....	44
Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα .....	44
Επίδραση του εισαγόμενου DNA στις τιμές $C_T$ .....	45
Παρεμβαλλόμενες ουσίες.....	45
Κλινική απόδοση .....	50
Βιβλιογραφία.....	51
Στοιχεία επικοινωνίας .....	51
Σύμβολα .....	52
Παράρτημα Α: Λεπτομέρειες μετάλλαξης.....	53
Πληροφορίες παραγγελίας.....	54
Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου .....	56

---

## Προβλεπόμενη χρήση

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit είναι μια in vitro διαγνωστική δοκιμασία για την ανίχνευση των ελλείψεων στο εξόνιο 19 και των αντικαταστάσεων στα εξόνια 20 και 21 (T790M και L858R αντίστοιχα) στο γονίδιο του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), που επιτρέπει την ποιοτική αξιολόγηση της κατάστασης μετάλλαξης. Τα αποτελέσματα προορίζονται για την υποστήριξη του κλινικού ιατρού στην αναγνώριση των ασθενών με NSCLC που ενδέχεται να ωφεληθούν από τη θεραπεία με IRESSA® (γεφινιμίπη), σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η αξιολόγηση δείγματος ιστού.

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit θα πρέπει να χρησιμοποιείται από εκπαιδευμένο προσωπικό σε επαγγελματικό εργαστηριακό περιβάλλον, με δείγματα DNA που έχουν εξαχθεί από πλάσμα προερχόμενο από αίμα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση.

---

## Σύνοψη και επεξήγηση

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit είναι ένα έτοιμο για χρήση προϊόν για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο EGFR, που σχετίζεται με τον καρκίνο, με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) σε όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Ο συνδυασμός των τεχνολογιών Scorpions® και ARMS επιτρέπει στο *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit να ανιχνεύει τις παρακάτω μεταλλάξεις του γονιδίου EGFR έναντι ενός υποβάθρου γονιδιωματικού DNA άγριου τύπου.

- Ελλείψεις στο εξόνιο 19
- T790M
- L858R

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι εξαιρετικά επιλεκτικές και, ανάλογα με τη συνολική ποσότητα του DNA που υπάρχει, μπορούν να ανιχνεύσουν ένα χαμηλό ποσοστό μετάλλαξης σε υπόβαθρο γονιδιωματικού DNA άγριου τύπου. Η επιλεκτικότητα και τα όρια ανίχνευσης είναι ανώτερα από άλλες τεχνολογίες, όπως η αλληλούχιση τερματισμού επιμήκυνσης με χρωστικές.

# Αρχή της διαδικασίας

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit χρησιμοποιεί δύο τεχνολογίες —ARMS και Scorpions— για την ανίχνευση μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της μεθόδου real-time PCR.

## ARMS

Η ειδική για αλληλόμορφα ή μεταλλάξεις ενίσχυση επιτυγχάνεται με χρήση της τεχνολογίας ARMS (Amplification Refractory Mutation System, Σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση). Η *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) είναι αποτελεσματική στη διάκριση μεταξύ σωστής και εσφαλμένης αντιστοίχισης στο 3' άκρο ενός εκκινητή PCR. Ειδικές μεταλλαγμένες αλληλουχίες υφίστανται επιλεκτική ενίσχυση, ακόμη και σε δείγματα στα οποία η πλειοψηφία των αλληλουχιών δεν παρουσιάζει μετάλλαξη. Όταν υπάρχει πλήρης αντιστοίχιση του εκκινητή, η απόδοση της ενίσχυσης είναι πλήρης. Σε περίπτωση εσφαλμένης αντιστοίχισης της 3' βάσης, πραγματοποιείται μόνο ενίσχυση υποβάθρου χαμηλού επιπέδου.

## Scorpions

Η ανίχνευση ενίσχυσης πραγματοποιείται με την τεχνολογία Scorpions. Η τεχνολογία Scorpions συνίσταται σε διλειτουργικά μόρια που περιέχουν έναν εκκινητή PCR ομοιοπολικά συνδεδεμένο με έναν ανιχνευτή. Το φθορισμοφόρο στον ανιχνευτή αυτόν αλληλεπιδρά με έναν παρεμποδιστή, που περιλαμβάνεται επίσης στον ανιχνευτή, ο οποίος μειώνει τον φθορισμό. Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR, όταν ο ανιχνευτής δεσμεύεται στο αμπλικόνιο, το φθορισμοφόρο και ο παρεμποδιστής διαχωρίζονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του φθορισμού στο σωληνάριο αντίδρασης.

## Μορφή ΚΙΤ

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit περιλαμβάνει τέσσερις προσδιορισμούς:

- Έναν προσδιορισμό μάρτυρα (Ctrl)
- Τρεις προσδιορισμούς μετάλλαξης

Όλα τα μείγματα αντίδρασης περιλαμβάνουν αντιδραστήρια για την ανίχνευση στόχων επισημασμένων με FAM™, καθώς και έναν προσδιορισμό εσωτερικού μάρτυρα επισημασμένο με HEX™. Ο προσδιορισμός εσωτερικού μάρτυρα ανιχνεύει την παρουσία αναστολέων που ενδέχεται να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Η ενίσχυση FAM μπορεί να υπερισχύσει της ενίσχυσης εσωτερικού μάρτυρα. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός εσωτερικού μάρτυρα χρησιμοποιείται για να υποδείξει απλά ότι τυχόν απουσία ενίσχυσης FAM αποτελεί αληθώς αρνητικό αποτέλεσμα και όχι αποτυχία της αντίδρασης PCR.

## Προσδιορισμοί

### Προσδιορισμός μάρτυρα

Ο προσδιορισμός μάρτυρα, που είναι επισημασμένος με FAM, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού DNA σε ένα δείγμα. Ο προσδιορισμός αυτός ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 2 του γονιδίου EGFR. Ο εκκινητής και ο ανιχνευτής έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποφεύγονται οι γνωστοί πολυμορφισμοί του EGFR.

### Προσδιορισμοί μετάλλαξης

Κάθε προσδιορισμός μετάλλαξης περιέχει έναν ανιχνευτή *Scorpions* επισημασμένο με FAM και έναν εκκινητή *ARMS* για τη διάκριση μεταξύ του DNA άγριου τύπου και ενός συγκεκριμένου μεταλλαγμένου DNA.

## Μάρτυρες

Όλες οι εκτελέσεις πειραμάτων πρέπει να περιλαμβάνουν τους παρακάτω μάρτυρες:

### Θετικός μάρτυρας

Κάθε εκτέλεση πρέπει να περιέχει θετικό μάρτυρα στα σωληνάρια 1–4. Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit περιέχει έναν θετικό μάρτυρα EGFR (Positive Control, PC) για χρήση ως μήτρας στην αντίδραση θετικού μάρτυρα. Τα αποτελέσματα θετικού μάρτυρα θα αξιολογηθούν, για να διασφαλιστεί ότι η απόδοση του kit βρίσκεται εντός των καθορισμένων κριτηρίων αποδοχής.

### Αρνητικός μάρτυρας

Κάθε εκτέλεση πρέπει να περιέχει αρνητικό μάρτυρα χωρίς μήτρα (No-Template Control, NTC) στα σωληνάρια 9–12. Ο NTC αποτελείται από νερό χωρίς νουκλεάση (H<sub>2</sub>O) για χρήση ως «μήτρα» στην αντίδραση μάρτυρα χωρίς μήτρα. Ο μάρτυρας χωρίς μήτρα χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση πιθανής επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία της εκτέλεσης και για την αξιολόγηση της απόδοσης της αντίδρασης εσωτερικού μάρτυρα.

### Αξιολόγηση αντίδρασης εσωτερικού μάρτυρα

Κάθε μείγμα αντίδρασης περιέχει έναν εσωτερικό μάρτυρα επιπλέον στην αντίδραση-στόχο. Η μη επιτυχής έκβαση υποδεικνύει είτε την ύπαρξη αναστολέων, που ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, είτε την ύπαρξη σφάλματος στην προετοιμασία της ανάλυσης από τον χειριστή για το συγκεκριμένο σωληνάριο.

Σε περίπτωση που η μη επιτυχής ανάλυση του εσωτερικού μάρτυρα οφείλεται σε αναστολή της PCR, η αραιώση του δείγματος μπορεί να μειώσει τη δράση των αναστολέων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτή αραιώνεται και το DNA-στόχος. Η ενίσχυση FAM μπορεί να υπερισχύσει της ενίσχυσης με εσωτερικό μάρτυρα, με αποτέλεσμα η τιμή του IC<sub>C<sub>T</sub></sub> (HEX) που προκύπτει να βρίσκεται ενδεχομένως εκτός του καθορισμένου εύρους. Τα αποτελέσματα FAM παραμένουν έγκυρα για αυτά τα δείγματα.



# Υλικά που παρέχονται

## Περιεχόμενα του kit

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Αρ. καταλόγου			870311
Αριθμός αντιδράσεων			24
Κόκκινο	Control Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης μάρτυρα)	Ctrl	2 × 600 μl
Μωβ	T790M Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης T790M)	T790M	600 μl
Πορτοκαλί	Deletions Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης ελλείψεων)	Del	600 μl
Ροζ	L858R Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης L858R)	L858R	600 μl
Μπεζ	EGFR Positive Control (Θετικός μάρτυρας EGFR)	PC	300 μl
Πράσινο της μέντας	Taq DNA Polymerase (Taq DNA πολυμεράση)	Taq	2 × 80 μl
Λευκό	Nuclease-Free Water for No Template Control (Νερό χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα)	NTC	1 x 1,9 ml
Λευκό	Nuclease-Free Water for Dilution (Νερό χωρίς νουκλεάση για αραίωση)	Dil	1 x 1,9 ml
Οδηγίες χρήσης (Εγχειρίδιο) του <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			1

# Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά τον χειρισμό χημικών ουσιών, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheets, SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

- Κιτ εκχύλισης DNA (βλ. «Διαδικασία» στη σελίδα 16)
- Ειδικές πιπέτες\* (ρυθμιζόμενες) για προετοιμασία δειγμάτων
- Ειδικές πιπέτες\* (ρυθμιζόμενες) για την προετοιμασία του κύριου μείγματος PCR
- Ειδικές πιπέτες\* (ρυθμιζόμενες) για τη διοχέτευση της μήτρας DNA
- Ρύγχη πιπέτας χωρίς δεοξυριβονουκλεάση, ριβονουκλεάση και DNA, με φίλτρα (για την αποφυγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης, συνιστάται η χρήση ρυγχών πιπέτας με φραγμό αερολυμάτων)
- Υδατόλουτρο ή παρόμοια συσκευή με δυνατότητα διατήρησης σωληναρίων φυγοκέντρισης των 50 ml στους 60 °C.
- Θερμαντικό μπλοκ ή παρόμοια συσκευή με δυνατότητα επώασης στους 56 °C†
- Θρυμματισμένος πάγος
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος\* με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης 2 ml
- Αναδευτήρας τύπου vortex
- Όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\*† με κανάλια φθορισμού για Cycling Green και Cycling Yellow (ανίχνευση FAM και HEX, αντίστοιχα)
- Λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3.5 ή νεότερη
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, για χρήση με 72-Well Rotor (αρ. κατ. 981103 ή 981106)
- Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου χωρίς δεοξυριβονουκλεάση, ριβονουκλεάση και DNA, για την προετοιμασία κύριων μειγμάτων
- Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes, μονάδα αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία αντίδρασης με μονοκάναλη πιπέτα (QIAGEN, αρ. κατ. 9018901)

\* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

† Σε ορισμένες χώρες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το όργανο Rotor-Gene Q 5plex HRM με ημερομηνία παραγωγής Μαΐου 2011 ή μεταγενέστερη, κατά περίπτωση. Η ημερομηνία παραγωγής μπορεί να προσδιοριστεί από τον αριθμό σειράς στο πίσω μέρος του οργάνου. Ο αριθμός σειράς αναγράφεται σε μορφή «μμεεααα», όπου το «μμ» υποδεικνύει τον μήνα παραγωγής σε ψηφία, το «εε» υποδεικνύει τα δύο τελευταία ψηφία του έτους παραγωγής και το «ααα» υποδεικνύει το μοναδικό αναγνωριστικό του οργάνου.

# Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Για επαγγελματική χρήση

## Πληροφορίες ασφάλειας

Κατά τον χειρισμό χημικών ουσιών, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheet, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), όπου μπορείτε να βρείτε, να εμφανίσετε και να εκτυπώσετε τα SDS για όλα τα κιτ της QIAGEN καθώς και για τα συστατικά τους.

## Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει πάντοτε να λαμβάνει υπόψη του τα ακόλουθα σημεία:

- Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπέτας χωρίς δεοξυριβονουκλεάση, ριβονουκλεάση και DNA, με φίλτρα, και βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες έχουν βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Αποθηκεύετε και εξάγετε τα θετικά υλικά (δοκίμια και θετικούς μάρτυρες) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετε τα στο μείγμα αντίδρασης σε ξεχωριστό χώρο.
- Όλα τα συστατικά πρέπει να αποψύχονται πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) πριν από την έναρξη του προσδιορισμού.
- Αφού αποψυχθούν, τα συστατικά πρέπει να αναμειχθούν με **αναστροφή κάθε σωληναρίου 10 φορές** και να φυγοκεντριστούν για σύντομο χρονικό διάστημα.

---

**Σημείωση:** Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή της επιμόλυνσης των αντιδράσεων PCR με συνθετικό υλικό μάρτυρα. Συνιστάται η χρήση ξεχωριστών, ειδικών πιπιετών για την προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης και την προσθήκη της μήτρας DNA. Η προετοιμασία και η διοχέτευση των μειγμάτων αντίδρασης θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ξεχωριστό χώρο από εκείνον που χρησιμοποιήθηκε για την προσθήκη της μήτρας. Τα σωληνάρια Rotor-Gene Q δεν πρέπει να ανοίγονται μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης PCR. Αυτό αποσκοπεί στην αποτροπή τυχόν εργαστηριακής επιμόλυνσης από προϊόντα που προκύπτουν μετά την ανάλυση PCR.

**Σημείωση:** Τα αντιδραστήρια έχουν εγκριθεί για χειροκίνητη προετοιμασία. Εάν χρησιμοποιήσετε αυτοματοποιημένη μέθοδο, ενδέχεται να μειωθεί ο αριθμός πιθανών αντιδράσεων, καθώς σε αυτά τα όργανα απαιτείται πλήρωση «νεκρών όγκων» με αντιδραστήρια.

**Σημείωση:** Όλα τα αντιδραστήρια του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit έχουν παρασκευαστεί ειδικά για χρήση με τις δοκιμασίες που αναφέρονται. Όλα τα αντιδραστήρια που παρέχονται στο *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit προορίζονται για χρήση αποκλειστικά με τα άλλα αντιδραστήρια που παρέχονται στο ίδιο *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Τα αντιδραστήρια του kit δεν πρέπει να αντικαθίστανται, ώστε να διατηρηθεί η βέλτιστη επίδοση.

**Σημείωση:** Χρησιμοποιείτε μόνο την *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) που παρέχεται με το kit. Μην την αντικαθιστάτε με *Taq* DNA πολυμεράση άλλων kit ίδιου ή διαφορετικού τύπου ή με *Taq* DNA πολυμεράση άλλου προμηθευτή.

**Σημείωση:** Τα αντιδραστήρια για το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit έχουν αραιωθεί σε βέλτιστο βαθμό. Δεν συνιστάται περαιτέρω αρραίωση των αντιδραστηρίων, καθώς κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης. Δεν συνιστάται η χρήση όγκων αντίδρασης κάτω από 25 μl, καθώς στην περίπτωση αυτή αυξάνεται ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

# Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit αποστέλλεται σε ξηρό πάγο. Εάν οποιοδήποτε συστατικό του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit δεν είναι κατεψυγμένο κατά την παραλαβή, η εξωτερική συσκευασία έχει ανοίξει κατά τη μεταφορά ή στο κιβώτιο αποστολής δεν περιλαμβάνονται το δελτίο συσκευασίας, οι οδηγίες χρήσης ή τα αντιδραστήρια, επικοινωνήστε με κάποιο από τα τμήματα τεχνικής υποστήριξης ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους της QIAGEN (επισκεφτείτε την ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit θα πρέπει να αποθηκεύεται αμέσως μετά την παραλαβή στους  $-30$  έως  $-15$  °C σε καταψύκτη σταθερής θερμοκρασίας, σε σκοτεινό χώρο. Το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit παραμένει σταθερό μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης, εφόσον αποθηκεύεται υπό τις καθορισμένες συνθήκες αποθήκευσης.

Μετά το άνοιγμα, τα αντιδραστήρια μπορούν να αποθηκευτούν στην αρχική τους συσκευασία σε θερμοκρασία  $-30$  έως  $-15$  °C για 12 μήνες ή μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης, όποιο επέλθει πρώτο. Η επανειλημμένη απόψυξη και κατάψυξη θα πρέπει να αποφεύγεται. Μην υπερβαίνετε το μέγιστο όριο οκτώ κύκλων κατάψυξης-απόψυξης.

Η απόψυξη των αντιδραστηρίων πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον 1 ώρα και μέχρι 4,5 ώρες το μέγιστο. Όταν τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα προς χρήση, μπορείτε να προετοιμάσετε τις αντιδράσεις PCR, ενώ θα πρέπει να φορτώσετε αμέσως στο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM τα σωληνάρια Rotor-Gene Q που περιέχουν τα κύρια μείγματα και το δείγμα DNA. Ο συνολικός χρόνος από την έναρξη της προετοιμασίας PCR έως την έναρξη της εκτέλεσης δεν θα πρέπει να υπερβαίνει:

- τις 6 ώρες, σε περίπτωση αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος  
**Σημείωση:** Ο χρόνος αυτός περιλαμβάνει την προετοιμασία PCR και την αποθήκευση.
- τις 18 ώρες, σε περίπτωση αποθήκευσης σε ψυγείο ( $2-8$  °C)  
**Σημείωση:** Ο χρόνος αυτός περιλαμβάνει την προετοιμασία PCR και την αποθήκευση.

---

**Σημείωση:** Τα Scorpions (όπως όλα τα επισημασμένα με φθορισμό μόρια) στα αντιδραστήρια μείγματος αντίδρασης είναι φωτοευαίσθητα. Απαιτείται η προστασία του μάρτυρα και των αντιδραστηρίων του μείγματος αντίδρασης από το φως, ώστε να αποφευχθεί τυχόν φωτολεύκανση.

Τα αντιδραστήρια στο *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit έχουν αραιωθεί σε βέλτιστο βαθμό και δεν απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός ή επεξεργασία πριν από τη χρήση τους στην ανάλυση, σύμφωνα με τις *Οδηγίες χρήσης του theascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit (Εγχειρίδιο)*.

Εφιστάται η προσοχή στις ημερομηνίες λήξης και τις συνθήκες αποθήκευσης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.

---

## Αποθήκευση και χειρισμός των δοκιμών

**Σημείωση:** Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.

Το υλικό δείγματος πρέπει να είναι γονιδιωματικό DNA ανθρώπινης προέλευσης εκχυλισμένο από πλάσμα. Η μεταφορά των δοκιμών πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την τυπική μεθοδολογία της παθολογοανατομίας, για τη διασφάλιση της ποιότητάς τους.

# Διαδικασία

## Εκχύλιση DNA

Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων αυτού του κιτ προσδιορίστηκαν με χρήση DNA που εκχυλίστηκε με το QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (αρ. κατ. 55114). Όταν χρησιμοποιείτε το QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, εκτελέστε την εκχύλιση του DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου, προσέχοντας τα εξής:

- Ο αρχικός όγκος πλάσματος είναι 2 ml.
- Πριν από την εκχύλιση του DNA πρέπει να γίνει φυγοκέντριση 2 ml πλάσματος σε ταχύτητα 3.000 σ.α.λ. για 2 λεπτά και να μεταφερθεί το υπερκείμενο υγρό σε καθαρό σωληνάριο.
- Ο όγκος της πρωτεΐνάσης K πρέπει να είναι 250 μl.
- Η διάσπαση με πρωτεΐνάση K πρέπει να πραγματοποιηθεί για 1 ώρα στους 60 °C.
- Η έκλυση του καθαρού γονιδιωματικού DNA πρέπει να πραγματοποιείται σε 55 μl Buffer AVE (παρέχεται στο QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Αποθηκεύστε το καθαρό γονιδιωματικό DNA στους –30 έως –15 °C.

**Σημείωση:** Από όλους τους προσδιορισμούς στο *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, δημιουργούνται προϊόντα PCR μικρού μήκους. Ωστόσο, το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit δεν είναι αποτελεσματικό όταν το DNA είναι ιδιαίτερα κατακερματισμένο.



# Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR

## Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Για λήψη σωστών αποτελεσμάτων, βεβαιωθείτε ότι η διαδικασία ανάμειξης που περιγράφεται, εκτελείται σε κάθε βήμα ανάμειξης της διαδικασίας ρύθμισης του προσδιορισμού.
- Σε κάθε εκτέλεση μπορούν να αξιολογηθούν έως και 16 δείγματα.
- Πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε την ενότητα «Γενικές προφυλάξεις» στη σελίδα 11.
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM πριν προχωρήσετε στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου.
- Μη στροβιλίζετε την *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) ή οποιοδήποτε μείγμα που περιέχει *Taq* DNA πολυμεράση, καθώς υπάρχει κίνδυνος αδρανοποίησης του ενζύμου.
- Αναρροφήστε την *Taq* τοποθετώντας το ρύγχος της πιπέτας ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφευχθεί η επικάλυψη του ρύγχους με περίσσεια ενζύμου.
- Για κάθε δείγμα DNA, οι προσδιορισμοί μάρτυρα και μετάλλαξης πρέπει να αναλύονται στην ίδια εκτέλεση PCR, ώστε να αποφευχθούν διακυμάνσεις μεταξύ προσδιορισμών.
- Για την αποτελεσματική χρήση των αντιδραστηρίων στο *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, ομαδοποιείτε τα δείγματα DNA σε παρτίδες όσο γίνεται περισσότερο για τη δημιουργία ολοκληρωμένων εκτελέσεων προσδιορισμών. Εάν τα δείγματα υποβληθούν σε δοκιμασία μεμονωμένα ή σε μικρότερους αριθμούς, χρησιμοποιούνται περισσότερα αντιδραστήρια και μειώνεται ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να εξεταστούν με ένα *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται εντελώς για τουλάχιστον 1 ώρα και μέχρι 4,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C), να **αναμειγνύονται με αναστροφή 10 φορές** και να φυγοκεντρίζονται για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Βεβαιωθείτε ότι η *Taq* βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από κάθε χρήση. Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- **Αναμείξτε όλα τα δείγματα αναστρέφοντας 10 φορές** και φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

## Διαδικασία

1. Αποψύξτε πλήρως όλα τα μείγματα αντίδρασης, το νερό χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα (No Template Control, NTC) και τον θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC) EGFR σε θερμοκρασία δωματίου (15–25 °C) για τουλάχιστον 1 ώρα (Πίνακας 1). Όταν τα αντιδραστήρια έχουν αποψυχθεί, **αναμείξτε τα αναστρέφοντας κάθε σωληνάριο 10 φορές** για την αποφυγή τοπικών συγκεντρώσεων αλάτων και, στη συνέχεια, εκτελέστε φυγοκέντριση για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.

Πίνακας 1. Χρόνοι απόψυξης, χρόνοι προετοιμασίας PCR και θερμοκρασίες αποθήκευσης

Ελάχιστος χρόνος απόψυξης	Μέγιστος χρόνος απόψυξης	Θερμοκρασία αποθήκευσης μετά την προετοιμασία PCR	Μέγιστος χρόνος προετοιμασίας PCR και αποθήκευσης
1 ώρα	4,5 ώρες	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25 °C)	6 ώρες
1 ώρα	4,5 ώρες	2–8 °C	18 ώρες

**Σημείωση:** Η προετοιμασία PCR πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο όρος «αποθήκευση» αναφέρεται στον χρόνο μεταξύ της ολοκλήρωσης της προετοιμασίας PCR και της έναρξης της εκτέλεσης ανάλυσης PCR στο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

**Σημείωση:** Αφήστε την *Taq* DNA πολυμεράση (σωληνάριο *Taq*) να επέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (15–25 °C) συγχρόνως με τα άλλα αντιδραστήρια (βλ. «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 13). Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

## 2. Εκτελέστε τα ακόλουθα βήματα:

- 2a. Επισημάνετε τέσσερα σωληνάρια μικροφυγόκεντρου (δεν παρέχονται) για κάθε ένα από τα αντίστοιχα μείγματα αντίδρασης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.
- 2b. Παρασκευάστε επαρκείς ποσότητες κύριων μειγμάτων (μείγμα αντίδρασης μάρτυρα ή μετάλλαξης [σωληνάριο CTRL, T790M, ελλείψεις, L858R] και *Taq* DNA πολυμεράση [*Taq*]) για τα δείγματα DNA, μία αντίδραση θετικού μάρτυρα (σωληνάριο PC) EGFR και μία αντίδραση με νερό χωρίς νουκλεάση για μάρτυρα χωρίς μήτρα (σωληνάριο NTC) σύμφωνα με τους όγκους που αναφέρονται στον Πίνακα 2.

**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε αντιδραστήρια για ένα επιπλέον δείγμα, ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για την προετοιμασία της PCR.

Τα κύρια μείγματα περιέχουν όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την PCR εκτός από το δείγμα.

**Πίνακας 2. Παρασκευή κύριων μειγμάτων\***

Προσδιορισμός	Σωληνάριο μείγματος αντίδρασης	Όγκος μείγματος αντίδρασης	Όγκος <i>Taq</i> DNA πολυμεράσης (σωληνάριο <i>Taq</i> )
Μάρτυρας	CTRL	19,50 μl × (n + 1)	0,50 μl × (n + 1)
T790M	T790M	19,50 μl × (n + 1)	0,50 μl × (n + 1)
Ελλείψεις	Del	19,50 μl × (n + 1)	0,50 μl × (n + 1)
L858R	L858R	19,50 μl × (n + 1)	0,50 μl × (n + 1)

\* Κατά την παρασκευή του κύριου μείγματος, παρασκευάστε αρκετή ποσότητα για ένα επιπλέον δείγμα, ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για την προετοιμασία της PCR.

**Σημείωση:** Κατά την παρασκευή του κύριου μείγματος, προστίθεται αρχικά ο απαιτούμενος όγκος του μείγματος αντίδρασης μάρτυρα ή μετάλλαξης στο σχετικό σωληνάριο και, στη συνέχεια, προστίθεται η *Taq* DNA πολυμεράση.

3. Τοποθετήστε τον κατάλληλο αριθμό σωληναρίων για PCR σε σειρές των 4 (κάθε σειρά έχει 4 σωληνάρια) στο μπλοκ φόρτωσης, σύμφωνα με τη διάταξη στον Πίνακα 3. Μην τοποθετείτε πώματα στα σωληνάρια.

**Σημείωση:** Αφήστε τα πώματα στον πλαστικό περιέκτη μέχρι να τα χρειαστείτε.

4. Πωματίστε το σωληνάριο για το κύριο μείγμα, αναστρέψτε 10 φορές για να αναμείξετε το κύριο μείγμα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα ώστε το μείγμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου. Προσθέστε αμέσως 20 μl κύριου μείγματος στο κάθε κατάλληλο σωληνάριο της σειράς για PCR.
5. Προσθέστε αμέσως 5 μl νερού χωρίς νουκλεάση (H<sub>2</sub>O) στις σειρές σωληναρίων για PCR του μάρτυρα χωρίς μήτρα (σωληνάρια PCR αρ. 9–12) και πωματίστε τα σωληνάρια.
6. Προσθέστε 5 μl κάθε δείγματος στα σωληνάρια δείγματος (σωληνάρια PCR 5–8, 13–16 και 17–72) και πωματίστε τα.
7. Προσθέστε 5 μl θετικού μάρτυρα (Positive Control, PC) EGFR στα σωληνάρια θετικού μάρτυρα (σωληνάρια PCR αρ. 1–4). Κάθε δείγμα DNA πρέπει να υποβληθεί σε δοκιμασία με τον προσδιορισμό μάρτυρα και όλους τους προσδιορισμούς μετάλλαξης. Η διάταξη παρατίθεται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3. Διάταξη προσδιορισμών μάρτυρα και μετάλλαξης**

Προσδιορισμός	Μάρτυρες			Αριθμός δείγματος					
	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
Ελλείψεις	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
Αριθμός δείγματος									
Προσδιορισμός	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
Ελλείψεις	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. Με έναν ανεξίτηλο μαρκαδότη, επισημάνετε τα καπάκια των πρώτων σωληναρίων στη χαμηλότερη αριθμητική θέση σε κάθε σωληνάριο για PCR στη σειρά των 4 (π.χ. θέσεις 1, 5, 9 κ.λπ.) για να υποδεικνύεται ο προσανατολισμός για τη φόρτωση των σωληναρίων μέσα στον ρότορα 72 βυθισμάτων του Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. **Αναστρέψτε τα πωματισμένα σωληνάρια 4 φορές για να αναμιχθεί το δείγμα και το μείγμα αντιδρασης.**
10. Τοποθετήστε όλα τα σωληνάρια για PCR σε σειρές των 4 στις αντίστοιχες θέσεις στον ρότορα 72 βυθισμάτων και βεβαιωθείτε μέσω οπτικού ελέγχου ότι όλα τα σωληνάρια περιέχουν τον ίδιο όγκο υλικού.  
**Σημείωση:** Βεβαιωθείτε ότι οι σειρές σωληναρίων δεν έχουν αναστραφεί κατά τη μεταφορά τους στον ρότορα.
11. Εάν ο ρότορας δεν είναι πλήρης, τοποθετήστε άδεια σωληνάρια με πώμα στις κενές θέσεις.

- 
12. Τοποθετήστε αμέσως τον ρότορα στο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (παρελκόμενο του Rotor-Gene Q MDx) είναι τοποθετημένος στο επάνω μέρος του ρότορα για την ασφάλιση των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης.
  13. Ανατρέξτε στις ρυθμίσεις του οργάνου Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (βλ. «Πρωτόκολλο: Ρύθμιση Rotor-Gene Q EGFR», σελίδα 23), για να δημιουργήσετε το προφίλ θερμοκρασίας και να ξεκινήσετε την εκτέλεση.

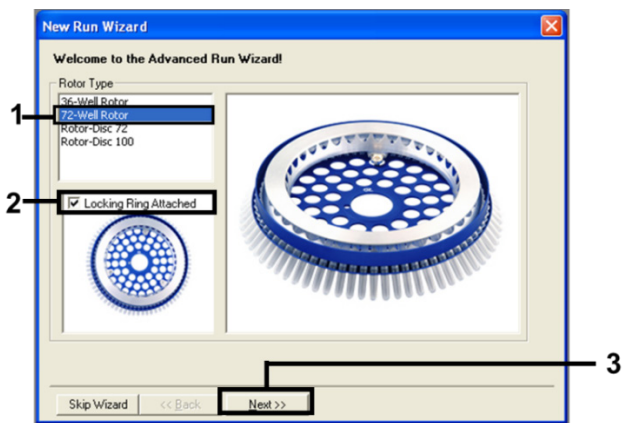
# Πρωτόκολλο: Ρύθμιση Rotor-Gene Q EGFR

Οι παράμετροι κυκλοποίησης παρατίθενται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Παράμετροι κυκλοποίησης

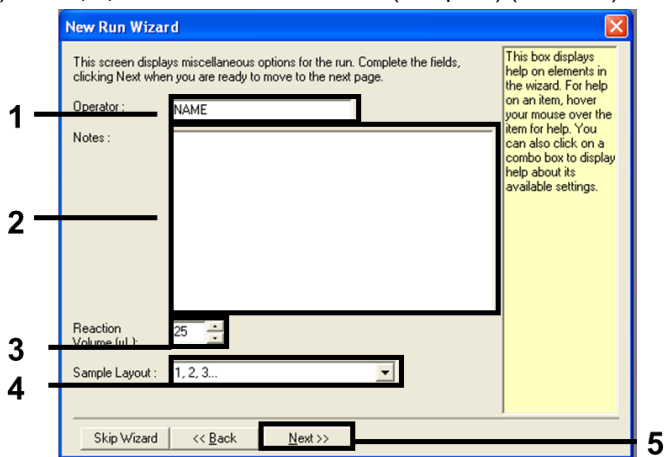
Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος	Λήψη δεδομένων
1	95°C	15 λεπτά	Κανένα
40	95°C	30 δευτερόλεπτα	Κανένα
	60°C	60 δευτερόλεπτα	Green και Yellow

1. Κάντε διπλό κλικ στο εικονίδιο του **λογισμικού σειράς Rotor-Gene Q, έκδοση 2.3**, στην επιφάνεια εργασίας του φορητού υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor Gene Q MDx 5plex HRM. Επιλέξτε την καρτέλα «Advanced» (Για προχωρημένους) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run» (Νέα εκτέλεση) που εμφανίζεται.
2. Για να δημιουργήσετε ένα νέο πρότυπο, επιλέξτε Empty Run (Κενή εκτέλεση) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο New (Νέα).  
Εμφανίζεται το παράθυρο «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).
3. Στον τύπο ρότορα επιλέξτε «**72-Well Rotor**» (Ρότορας 72 βυθισμάτων). Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος σωστά και επιλέξτε το πλαίσιο Locking Ring Attached (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κάντε κλικ στο Next (Επόμενο) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Το πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας εκτέλεσης).

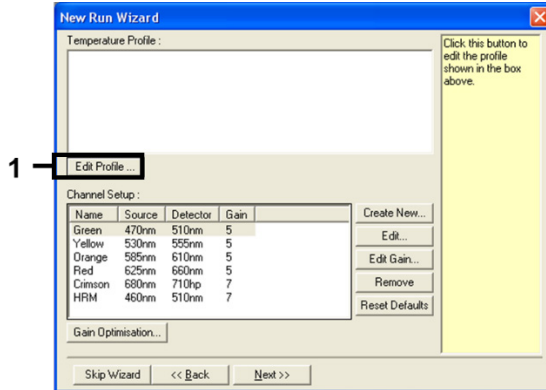
4. Εισαγάγετε το όνομα του χειριστή στο πεδίο **Operator** (Χειριστής). Προσθέστε, αν θέλετε, σημειώσεις και ορίστε την τιμή στο πεδίο **Reaction Volume** (Όγκος αντίδρασης) στο **25**. Βεβαιωθείτε ότι οι τιμές στο πεδίο **Sample Layout** (Διάταξη δειγμάτων) είναι **1, 2, 3...** Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Εισαγωγή ονόματος χειριστή και όγκων αντίδρασης.

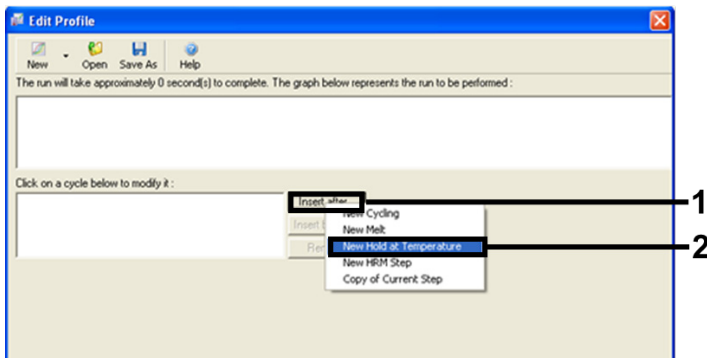


5. Κάντε κλικ στο **Edit Profile** (Επεξεργασία προφίλ) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης) (Εικόνα 3) και ορίστε τις παραμέτρους της εκτέλεσης σύμφωνα με τις οδηγίες των παρακάτω βημάτων.



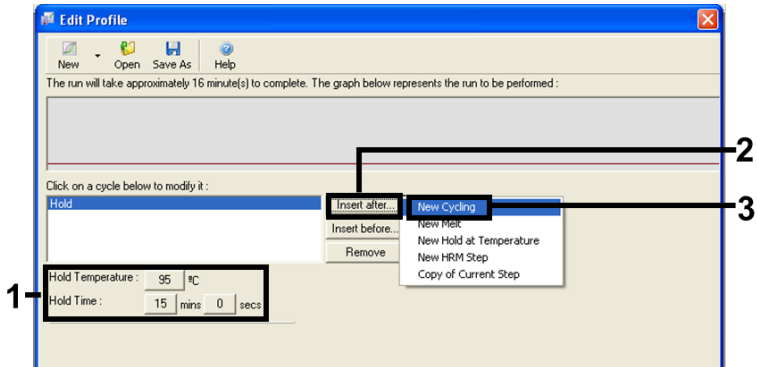
Εικόνα 3. Επεξεργασία του προφίλ.

6. Κάντε κλικ στο κουμπί **Insert after** (Εισαγωγή μετά από) και επιλέξτε **New Hold at Temperature** (Νέα θερμοκρασία διατήρησης) (Εικόνα 4).



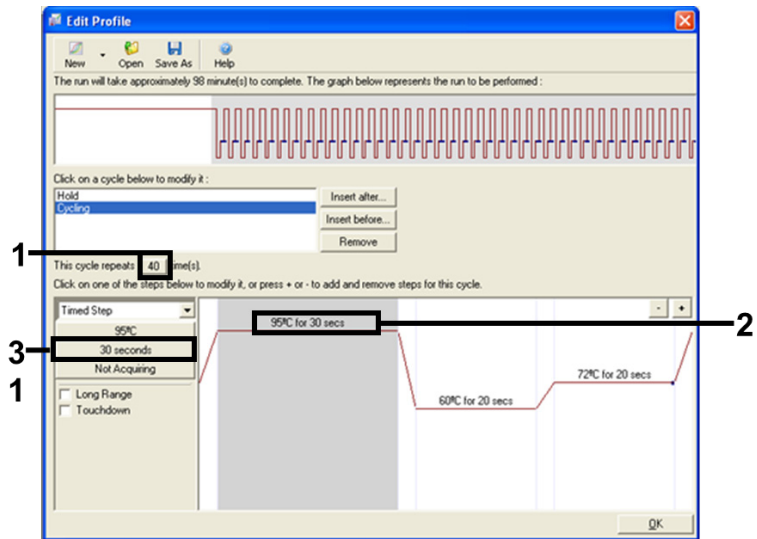
Εικόνα 4. Εισαγωγή ενός αρχικού βήματος επώασης.

7. Ρυθμίστε την τιμή του πεδίου **Hold Temperature** (Θερμοκρασία διατήρησης) στους 95 °C και την τιμή του πεδίου **Hold Time** (Χρόνος διατήρησης) σε **15 mins 0 secs** (15 λεπτά 0 δευτερόλεπτα). Κάντε κλικ στο **Insert After** (Εισαγωγή μετά από) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **New Cycling** (Νέα κυκλοποίηση) (Εικόνα 5).



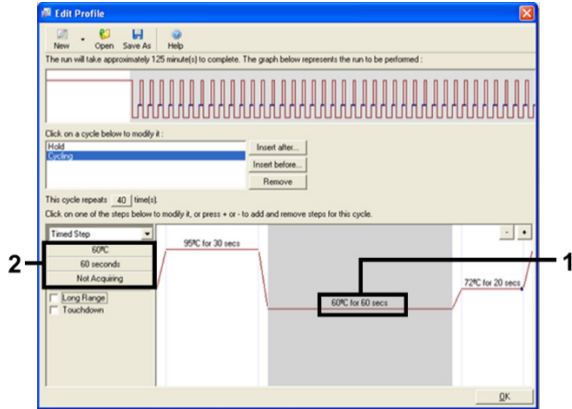
Εικόνα 5. Αρχικό βήμα επώασης στους 95°C.

8. Αλλάξτε τον αριθμό επαναλήψεων κύκλου σε **40**. Επιλέξτε το πρώτο βήμα και ρυθμίστε σε **95 °C για 30 δευτερόλεπτα** (βλ. Εικόνα 6).



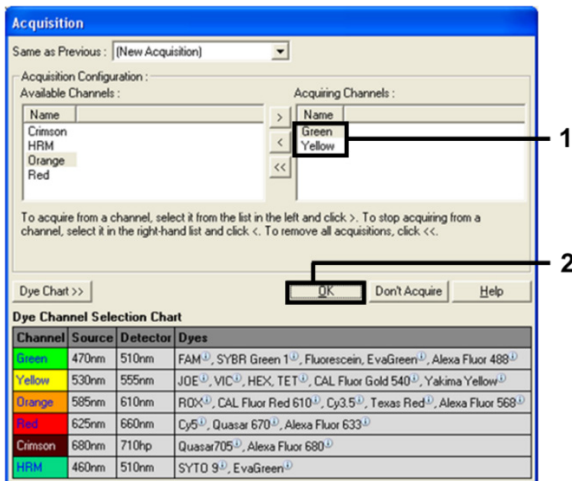
Εικόνα 6. Βήμα κυκλοποίησης στους 95°C.

9. Επισημάνετε το δεύτερο βήμα και ρυθμίστε σε **60 °C για 60 δευτερόλεπτα**. Κάντε κλικ στο **Not Acquiring** (Δεν γίνεται λήψη) για να ενεργοποιήσετε τη λήψη δεδομένων σε αυτό το βήμα. (Εικόνα 7).



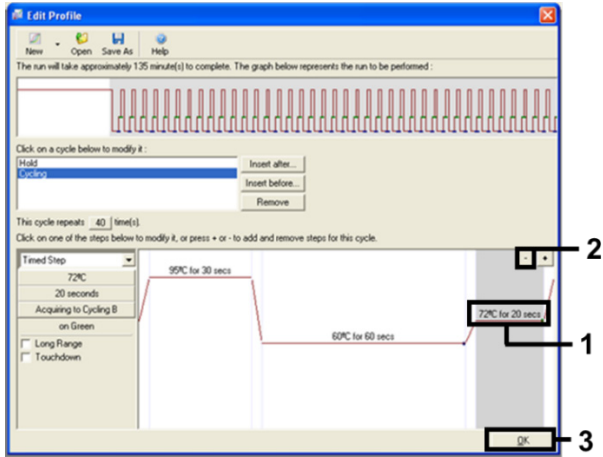
Εικόνα 7. Βήμα κυκλοποίησης στους 60°C.

10. Επιλέξτε **Green** και **Yellow** από τη λίστα **Available Channels** (Διαθέσιμα κανάλια) και ύστερα κάντε κλικ στο **>** για να τα μεταφέρετε στη λίστα **Acquiring Channels** (Κανάλια λήψης). Κάντε κλικ στο **OK** (Εικόνα 8).



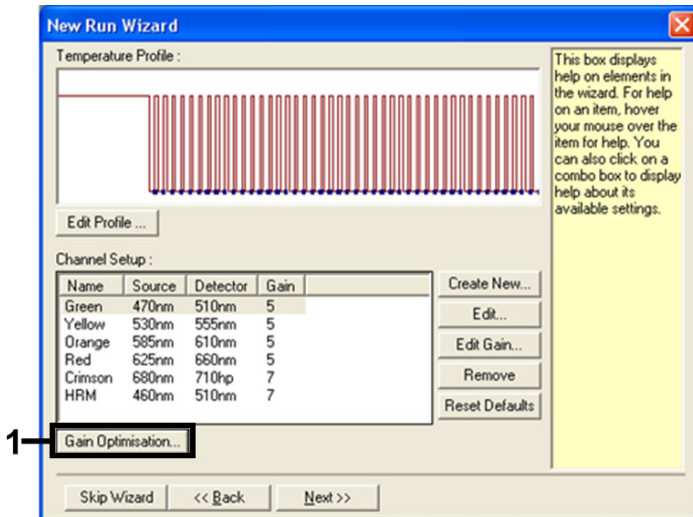
Εικόνα 8. Λήψη στο βήμα κυκλοποίησης των 60°C.

11. Επισημάνετε το τρίτο βήμα και εκτελέστε διαγραφή κάνοντας κλικ στο κουμπί -. Κάντε κλικ στο **OK** (Εικόνα 9).



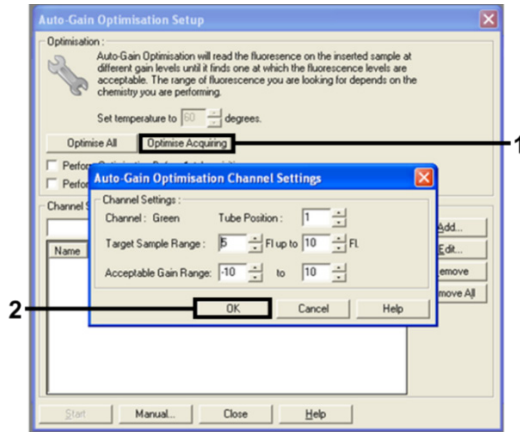
Εικόνα 9. Διαγραφή του βήματος επέκτασης.

12. Στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου, κάντε κλικ στο **Gain Optimisation** (Βελτιστοποίηση απολαβής) (Εικόνα 10).



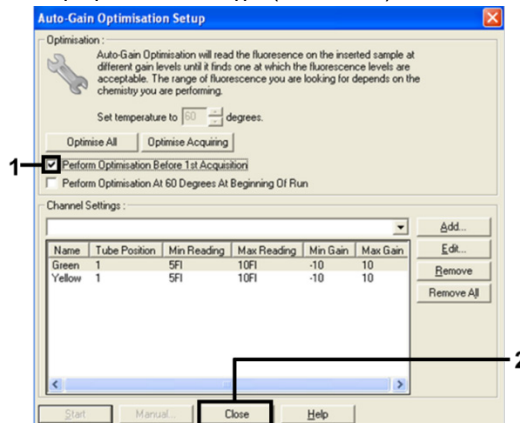
Εικόνα 10. Βελτιστοποίηση απολαβής.

13. Κάντε κλικ στο **Optimise Acquiring** (Βελτιστοποίηση λήψης). Εμφανίζονται οι ρυθμίσεις καναλιού για κάθε κανάλι. Κάντε κλικ στο **OK** για αποδοχή αυτών των προεπιλεγμένων τιμών και για τα δύο κανάλια. (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Αυτόματη βελτιστοποίηση απολαβής για το πράσινο κανάλι Green.

14. Επισημάνετε το πλαίσιο **Perform Optimisation before 1st Acquisition** (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την 1η λήψη) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο κουμπί **Close** (Κλείσιμο) για να επιστρέψετε στον οδηγό (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Επιλογή καναλιών Green και Yellow.

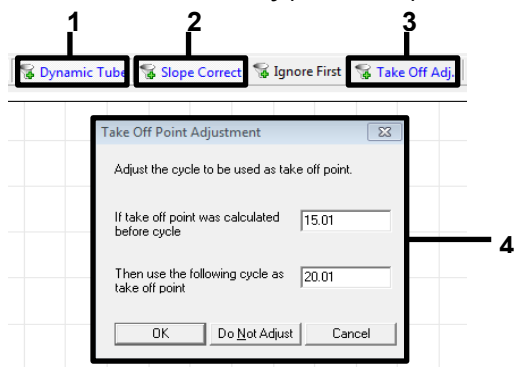
15. Κάντε κλικ στο **Next** (Επόμενο) για να αποθηκεύσετε το πρότυπο σε κατάλληλη θέση επιλέγοντας «Save Template» (Αποθήκευση προτύπου).

## Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης μεταλλάξεων

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, αναλύστε τα δεδομένα σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

### Προετοιμασία της ανάλυσης λογισμικού

1. Ανοίξτε το κατάλληλο αρχείο με τη χρήση του λογισμικού της σειράς Rotor-Gene Q έκδοση 2.3.5 ή μεταγενέστερη.
2. Εάν τα δείγματα δεν έχουν ονομαστεί πριν από την εκτέλεση, κάντε κλικ στο **Edit Samples** (Επεξεργασία δειγμάτων).
3. Εισαγάγετε τα ονόματα δειγμάτων στη στήλη **Name** (Όνομα).  
**Σημείωση:** Αφήστε κενά τα ονόματα τυχόν άδειων βυθισμάτων.
4. Κάντε κλικ στο **Analysis** (Ανάλυση). Στη σελίδα της ανάλυσης, κάντε κλικ στο **Cycling A Yellow** για να ελέγξετε το κανάλι HEX.
5. Βεβαιωθείτε ότι είναι επισημασμένο το **Dynamic Tube** (Δυναμικό σωληνάριο). Κάντε κλικ στο **Slope Correct** (Διόρθωση κλίσης) και στο **Linear scale** (Γραμμική κλίμακα).
6. Κάντε κλικ στο **Take Off Adj** (Προσαρμογή σημείου μέτρησης) και πληκτρολογήστε **15.01** και **20.01** όπως φαίνεται στην Εικόνα 13.



**Εικόνα 13. Ρυθμίσεις κανονικοποίησης ανάλυσης EGFR.** 1 = «Dynamic Tube» (Δυναμικό σωληνάριο), 2 = «Slope Correct» (Διόρθωση κλίσης), 3 = «Take Off Adj.» (Προσαρμογή σημείου μέτρησης), 4 = παράθυρο διαλόγου «Take Off Point Adjustment» (Προσαρμογή σημείου έναρξης μέτρησης) με τιμές παραμέτρων.

7. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο **0.02** και ελέγξτε τις τιμές HEX C<sub>T</sub>.
8. Στη σελίδα της ανάλυσης, κάντε κλικ στο **Cycling A, Green** για να προβάλετε το κανάλι FAM. Ρυθμίστε τις παραμέτρους όπως φαίνεται στην Εικόνα 13 παραπάνω.  
Το δυναμικό σωληνάριο θα πρέπει να είναι επισημασμένο.
9. Κάντε κλικ στο **Slope Correct** (Διόρθωση κλίσης) και στο **Linear scale** (Γραμμική κλίμακα).
10. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο 0.075 και ελέγξτε τις τιμές FAM C<sub>T</sub>.

## Ανάλυση μαρτύρων εκτέλεσης

Μετά την ολοκλήρωση της εκτέλεσης, αναλύστε τα δεδομένα ως εξής:

- **Αρνητικός μάρτυρας:** Για να διασφαλιστεί ότι δεν έχει σημειωθεί επιμόλυνση μήτρας, ο μάρτυρας NTC δεν πρέπει να δώσει τιμή C<sub>T</sub> στο πράσινο κανάλι (FAM) μικρότερη του 40. Για να διασφαλίσετε ότι η εκτέλεση προετοιμάστηκε σωστά, ο μάρτυρας NTC πρέπει να εμφανίζει τιμή ενίσχυσης από 29,85 έως 35,84 στο κίτρινο κανάλι (HEX) (εσωτερικός μάρτυρας).

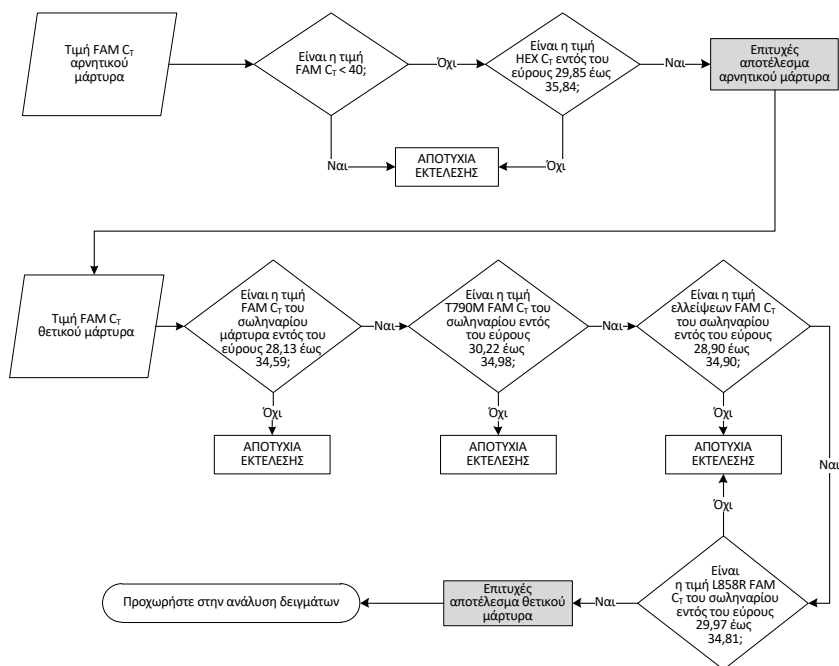
Εάν υφίσταται θετική ενίσχυση στο πράσινο κανάλι και/ή ενίσχυση εκτός του εύρους 29,85 έως 35,84 στο κίτρινο κανάλι, η εκτέλεση είναι άκυρη.

- **Θετικός μάρτυρας:** Για κάθε μείγμα αντίδρασης, ο θετικός μάρτυρας (Positive Control, PC) EGFR πρέπει να δίνει τιμή C<sub>T</sub> εντός του εύρους που παρατίθεται στον Πίνακα 5, συμπεριλαμβανομένων των ακραίων τιμών. Μια εκτέλεση με τιμή θετικού μάρτυρα εκτός αυτού του εύρους υποδεικνύει πρόβλημα προετοιμασίας του προσδιορισμού και η εκτέλεση θα πρέπει να χαρακτηριστεί ανεπιτυχής. Εάν ο θετικός μάρτυρας εμφανίζει τιμή C<sub>T</sub> εντός εύρους (FAM) αλλά η τιμή C<sub>T</sub> ενός εσωτερικού μάρτυρα (HEX) είναι εκτός του εύρους 29,85 έως 35,84, συνεχίστε την ανάλυση.

**Σημείωση:** Τα δεδομένα των δειγμάτων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν ο αρνητικός ή ο θετικός μάρτυρας δεν είναι επιτυχής.

**Πίνακας 5. Αποδεκτό εύρος C<sub>T</sub> για μάρτυρες εκτέλεσης**

Μάρτυρας αντίδρασης	Προσδιορισμός	Κανάλι	Εύρος C <sub>T</sub>
Θετικός μάρτυρας	Μάρτυρας	Green (FAM)	28,13–34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22–34,98
	Ελλείψεις	Green (FAM)	28,90–34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97–34,81
Μάρτυρας χωρίς μήτρα	Και τα τέσσερα μείγματα αντίδρασης	Green (FAM)	≥ 40,00
	Και τα τέσσερα μείγματα αντίδρασης	Yellow (HEX)	29,85–35,84



**Εικόνα 14. Ροή εργασιών ανάλυσης μαρτύρων εκτέλεσης.**

Υπό την προϋπόθεση ότι και οι δύο μάρτυρες εκτέλεσης είναι έγκυροι, η τιμή C<sub>T</sub> κάθε προσδιορισμού μάρτυρα δείγματος πρέπει να κυμαίνεται εντός του εύρους 23,70 έως 31,10 στο πράσινο (FAM) κανάλι (Πίνακας 6).



**Πίνακας 6. Εύρος αποδεκτών τιμών C<sub>T</sub> στο FAM για αντίδραση μάρτυρα δείγματος**

Μείγμα αντίδρασης	Κανάλι	Εύρος αποδεκτών τιμών C <sub>T</sub>
Μάρτυρας	Green (FAM)	23,70–31,10

Σε περίπτωση που η τιμή του δείγματος βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους τιμών, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες.

- **Τιμή προσδιορισμού μάρτυρα δείγματος C<sub>T</sub> < 23,70:** Τα δείγματα με τιμή μάρτυρα C<sub>T</sub> < 23,70 θα προκαλέσουν υπερκορεσμό των προσδιορισμό μετάλλαξης και πρέπει να αραιωθούν. Για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων σε χαμηλό επίπεδο, είναι απαραίτητη η αρραίωση των υπερβολικά συμπυκνωμένων δειγμάτων, ώστε οι τιμές τους να κυμαίνονται εντός του παραπάνω εύρους τιμών, λαμβανομένου υπόψη ότι η αρραίωση κατά το ήμισυ θα προκαλέσει αύξηση της τιμής C<sub>T</sub> κατά 1 μονάδα.
- **Τιμή προσδιορισμού μάρτυρα δείγματος C<sub>T</sub> > 31,10:** Το δείγμα δεν περιέχει επαρκή ποσότητα DNA, ώστε να είναι δυνατή η εκτέλεση της ανάλυσης.

Υπό την προϋπόθεση ότι και οι δύο μάρτυρες εκτέλεσης είναι έγκυροι και ο προσδιορισμός μάρτυρα είναι εντός του εύρους που αναφέρεται στον Πίνακα 6, η τιμή C<sub>T</sub> κάθε μετάλλαξης δείγματος πρέπει να είναι εντός του εύρους που αναφέρεται στον Πίνακα 7 στο πράσινο (FAM) κανάλι. Σε περίπτωση που η τιμή του δείγματος βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους τιμών, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες.

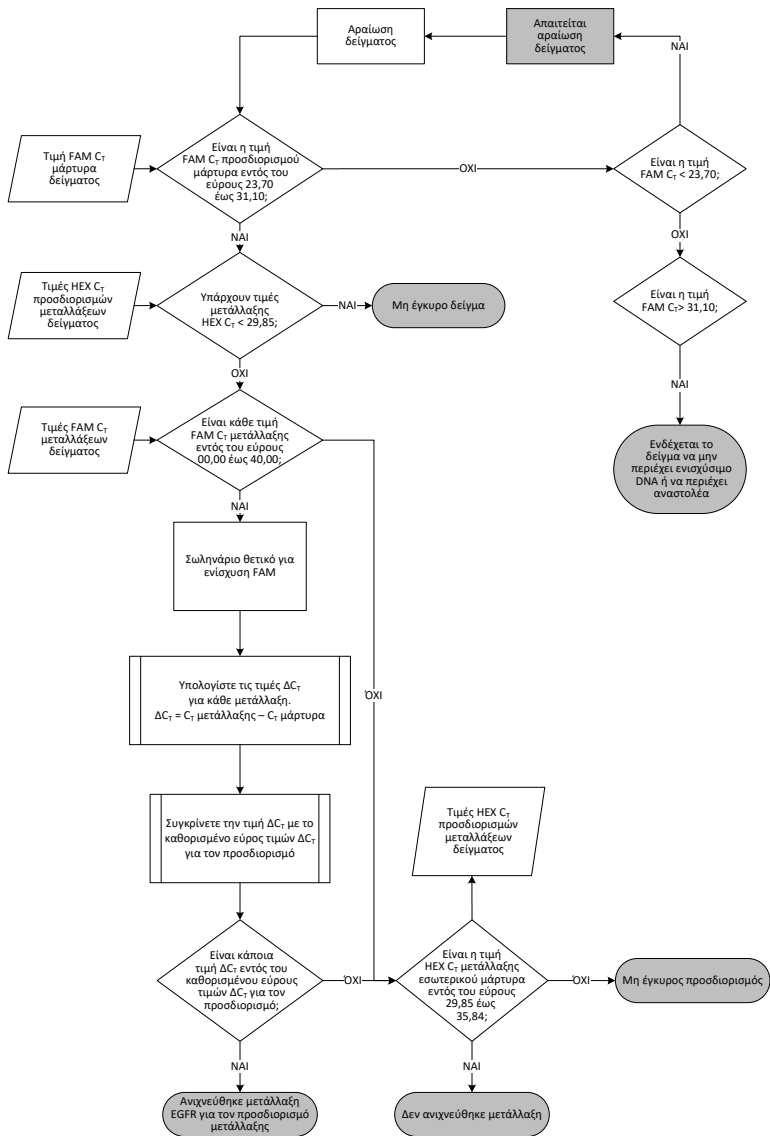
**Πίνακας 7. Αποδεκτές τιμές δειγμάτων αντίδρασης μετάλλαξης**

Αντίδραση	Μείγμα αντίδρασης	Κανάλι	Εύρος C <sub>T</sub>
Αντίδραση μετάλλαξης	T790M	Green (FAM)	0,00–40,00
	Ελλείψεις	Green (FAM)	0,00–40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00–40,00
	Και οι τρεις μεταλλάξεις	Yellow (HEX)	29,85–35,84

---

**Σημείωση:** Εάν κάποιο δείγμα δεν δώσει τιμή  $C_T$  (δηλαδή  $C_T > 40$ ), αυτό ενδέχεται να οφείλεται στην παρουσία αναστολέα, σε σφάλμα στην προετοιμασία του προσδιορισμού ή στην απουσία ενισχύσιμου EGFR DNA.

- **Τιμή  $C_T$  εσωτερικού μάρτυρα 29,85–35,84:** Δεν υπάρχει ενισχύσιμο EGFR DNA.
- **Τιμή  $C_T$  εσωτερικού μάρτυρα εκτός του εύρους τιμών 29,85–35,84:** Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη σφάλματος στην προετοιμασία του προσδιορισμού ή την παρουσία αναστολέα. Μπορείτε να μειώσετε τη δράση του αναστολέα αραιώνοντας το δείγμα. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή θα αραιωθεί και το DNA.



Εικόνα 15. Διάγραμμα ροής εργασιών ανάλυσης μετάλλαξης.

## Τιμή FAM C<sub>T</sub> προσδιορισμών μεταλλάξεων δείγματος

Οι τιμές FAM και για τα τρία μείγματα αντίδρασης μετάλλαξης πρέπει να ελέγχονται σε σχέση με τις τιμές που παρατίθενται στον Πίνακα 8.

Υπολογίστε την οριακή τιμή αποκοπής ΔC<sub>T</sub> για κάθε δείγμα μετάλλαξης που εμφανίζει θετική ενίσχυση όπως υποδεικνύεται παρακάτω, διασφαλίζοντας ότι οι τιμές μετάλλαξης και μάρτυρα C<sub>T</sub> προέρχονται από το ίδιο δείγμα.

$$\Delta C_T = C_T \text{ μετάλλαξης} - C_T \text{ μάρτυρα}$$

Συγκρίνετε την τιμή ΔC<sub>T</sub> για το δείγμα με το εύρος οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub> για τον συγκεκριμένο προσδιορισμό (Πίνακα 8), διασφαλίζοντας ότι εφαρμόζεται το σωστό όριο αποκοπής για κάθε προσδιορισμό.

**Πίνακας 8. Εύρος οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub> του προσδιορισμού μετάλλαξης**

Προσδιορισμός μετάλλαξης	Εύρος οριακών τιμών αποκοπής ΔC <sub>T</sub>
T790M	-10,00 ≥ έως ≤ 7,40
Ελλείψεις	-10,00 ≥ έως ≤ 8,00
L858R	-10,00 ≥ έως ≤ 8,90

Το ανώτατο όριο του εύρους οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub> είναι το σημείο πάνω από το οποίο ένα θετικό σήμα θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται στο σήμα υποβάθρου από έναν εκκινητή ARMS στο DNA άγριου τύπου. Εάν η τιμή ΔC<sub>T</sub> του δείγματος είναι υψηλότερη από το ανώτατο σημείο του εύρους οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub>, τότε χαρακτηρίζεται ως «Mutation not detected» (Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη) ή δείγμα εκτός των ορίων ανίχνευσης του kit. Εάν η τιμή του δείγματος είναι εντός των οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub>, το δείγμα θεωρείται θετικό για μετάλλαξη που ανιχνεύεται με τον συγκεκριμένο προσδιορισμό. Εάν η τιμή του δείγματος είναι κάτω από το χαμηλότερο όριο του εύρους οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub>, αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται σε πλασματικά ευρήματα φθορισμού.

**Σημείωση:** Για δείγματα που δεν εμφανίζουν τιμή μετάλλαξης FAM C<sub>T</sub>, απαιτείται αξιολόγηση της τιμής εσωτερικού μάρτυρα (HEX) C<sub>T</sub> προκειμένου να προσδιοριστεί εάν δεν ανιχνεύεται μετάλλαξη ή εάν ο προσδιορισμός είναι μη έγκυρος. Εάν η τιμή HEX C<sub>T</sub> βρίσκεται μεταξύ 29,85 και 35,84, τότε δεν ανιχνεύεται μετάλλαξη. Εάν η οριακή τιμή αποκοπής HEX ΔC<sub>T</sub> είναι εκτός αυτού του εύρους, το δείγμα είναι μη έγκυρο.

Συνοψίζοντας, σε κάθε αντίδραση μετάλλαξης για κάθε δείγμα, θα αποδίδεται ο χαρακτηρισμός «ανιχνεύθηκε μετάλλαξη», «δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη» ή «μη έγκυρο» χρησιμοποιώντας τα παρακάτω κριτήρια.

- **Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη:** Θετικό για ενίσχυση FAM και η τιμή ΔC<sub>T</sub> είναι εντός του εύρους της οριακής τιμής αποκοπής ΔC<sub>T</sub>. Εάν ανιχνευθούν πολλαπλές μεταλλάξεις, μπορούν να αναφερθούν όλες.
- **Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη:**
  - Η θετική τιμή FAM για την ενίσχυση και η οριακή τιμή αποκοπής ΔC<sub>T</sub> είναι άνω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub> και η τιμή HEX (εσωτερικός μάρτυρας) είναι εντός του εύρους 29,85–35,84.
  - Αρνητικό για ενίσχυση FAM και η τιμή HEX (εσωτερικός μάρτυρας) είναι εντός του εύρους 29,85–35,84.
- **Μη έγκυρη:** Αρνητικό για ενίσχυση FAM και η ενίσχυση HEX είναι εκτός προδιαγραφής.
  - Η υπολογισμένη τιμή ΔC<sub>T</sub> είναι κάτω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής ΔC<sub>T</sub> και η τιμή HEX (εσωτερικός μάρτυρας) είναι εντός του αναμενόμενου εύρους. Μια τιμή ΔC<sub>T</sub> χαμηλότερη από –10,00 υποδεικνύει ότι ίσως υπάρχουν πλασματικά ευρήματα φθορισμού.

# Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα «Συχνές ερωτήσεις» (Frequently Asked Questions, FAQ) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφτείτε τον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Παρατηρήσεις και προτάσεις

### **Δεν ανιχνεύεται σήμα με τον θετικό μάρτυρα (Positive Control, PC) EGFR στο κανάλι φθορισμού Cycling Green**

- |  |  |
|--|--|
| α) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για την ανάλυση των δεδομένων της PCR δεν συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο.  | Για ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού Cycling Green για την ανάλυση PCR του EGFR και το κανάλι φθορισμού Cycling Yellow για την PCR εσωτερικού μάρτυρα. |
| β) Εσφαλμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM  | Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο και αν είναι εσφαλμένο επαναλάβετε την εκτέλεση.  |
| γ) Εσφαλμένη διαμόρφωση της PCR  | Ελέγξτε τα βήματα εργασίας σας με χρήση του πλάνου διανομής με πιπέτα και, εάν χρειάζεται, επαναλάβετε την PCR.  |
| δ) Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα συστατικά του κιτ δεν ήταν σύμφωνες με τις οδηγίες της ενότητας «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων» (σελίδα 13) | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο κιτ, εάν χρειαστεί.  |
| ε) Η ημερομηνία λήξης του <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit έχει παρέλθει   | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούργιο κιτ, εάν χρειαστεί.  |

## Παρατηρήσεις και προτάσεις

---

### Σήματα με τους αρνητικούς μάρτυρες στο κανάλι φθορισμού *Cycling Green* της ανάλυσης PCR

Πρόέκυψε επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR

Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια σε θυγατρικούς κλώνους.

Εάν είναι εφικτό, κλείστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που θα υποβληθεί σε έλεγχο.

Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

### Πολλαπλή διασταύρωση κατωφλίου ή **Δτιμή C<sub>T</sub>** κάτω του εύρους οριακών τιμών αποκοπής

Εσφαλμένη ανάμειξη κατά τη ρύθμιση προσδιορισμού

Επαναλάβετε την PCR εάν επηρεαστεί μάρτυρας ή επαναλάβετε τη δοκιμασία στο δείγμα που απέτυχε.

Ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης, προσέχοντας ιδιαίτερα τα στάδια ανάμειξης.

# Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο με ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* ελέγχεται ως προς τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση της ομοιογενούς ποιότητας των προϊόντων.

## Περιορισμοί

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων του προϊόντος αυτό πρέπει να πραγματοποιείται στο πλαίσιο όλων των σχετικών κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αυτόνομα για διαγνωστικούς σκοπούς.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση αποκλειστικά από προσωπικό ειδικά καταρτισμένο και εκπαιδευμένο σε *in vitro* διαγνωστικές διαδικασίες και σε συνδυασμό με το όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Στις αναλυτικές μελέτες επικύρωσης συμπεριλήφθηκε ανθρώπινο DNA που έχει εκχυλιστεί από δείγματα πλάσματος.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση αποκλειστικά στον κυκλοποιητή *real-time PCR* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο του *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται η αραίωση των αντιδραστηρίων με τρόπο που δεν προβλέπεται από το παρόν εγχειρίδιο, καθώς ενδέχεται να προκληθεί υποβάθμιση των επιδόσεων.



---

Εφιστάται η προσοχή στις ημερομηνίες λήξης και τις συνθήκες αποθήκευσης που αναγράφονται στα κουτιά και τις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε το περιεχόμενο της συσκευασίας εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης ή δεν έχουν ληφθεί τα σωστά μέτρα αποθήκευσης.

Οι εκκινητές του μείγματος αντίδρασης ελλείψεων EGFR έχουν σχεδιαστεί ώστε να στοχεύουν πολλαπλές ελλείψεις εξονίου 19, καλύπτοντας τα νουκλεοτίδια 55174772 έως 55174795 (GRCh38 chr7), δηλ. εύρος 23 bp.

Παρόλο που ο προσδιορισμός ελλείψεων εξονίου 19 έχει επικυρωθεί αναλυτικά και έχει αποδειχθεί ότι ανιχνεύει συγκεκριμένες ελλείψεις στο εξόνιο 19 (βλ. Πίνακα 13 του παρόντος εγχειριδίου), είναι δυνατό να ενισχυθούν επιπλέον μεταλλάξεις (συμπεριλαμβανομένων, ενδεικτικά, επιπλέον ελλείψεων εξονίου 19, προσθηκών εξονίου 19 και της μετάλλαξης L747P) από το μείγμα αντίδρασης ελλείψεων.

Εάν υπάρχουν, οι εν λόγω επιπλέον μεταλλάξεις θα οδηγήσουν σε αποτέλεσμα «Deletions Detected» (Ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις) για ένα συγκεκριμένο δείγμα ασθενούς.

Επιπλέον, είναι δυνατό να ανιχνευθεί η μετάλλαξη L858Q από το μείγμα αντίδρασης L858R. Συνεπώς, εάν σε ένα δείγμα ασθενούς, υπάρχει μετάλλαξη L858Q, μπορεί να προκύψει αποτέλεσμα «L858R Mutation Detected» (Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη L858R).

# Χαρακτηριστικά απόδοσης

## Αναλυτική ευαισθησία – όριο τυφλού (Limit of Blank, LOB)

Για την αξιολόγηση της απόδοσης του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit απουσία μήτρας και για να διασφαλιστεί ότι ένα τυφλό δείγμα ή ένα δείγμα με DNA άγριου τύπου δεν παράγει αναλυτικό σήμα που ενδέχεται να υποδεικνύει χαμηλή συγκέντρωση μετάλλαξης, αξιολογήθηκε το EGFR DNA άγριου τύπου από 59 διαφορετικά δείγματα πλάσματος ασθενών με NSCLC. Τα κριτήρια αποδοχής της μελέτης (τουλάχιστον 95% των δειγμάτων άγριου τύπου πρέπει να έχουν οριακή τιμή αποκοπής  $\Delta C_T$  άνω της αντίστοιχης αποκοπής) εκπληρώθηκαν.

## Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)

Το LOD είναι το ελάχιστο ποσοστό μεταλλαγμένου DNA που μπορεί να ανιχνευθεί σε υπόβαθρο DNA άγριου τύπου όταν το συνολικό ενισχύσιμο DNA (εντός του εύρους εισαγωγής) έδινε σωστούς προσδιορισμούς μεταλλάξεων σε ποσοστό 95% για κάθε δείγμα θετικό για μετάλλαξη (C95). Το εύρος εργασίας εισαγόμενου DNA για τον προσδιορισμό ορίζεται με βάση την τιμή  $C_T$  μάρτυρα, με προκαθορισμένο εύρος από 23,70 έως 31,10.

Το LOD προσδιορίστηκε στα χαμηλά επίπεδα εισαγόμενου DNA ( $C_T$  μάρτυρα περίπου 30,10) με τη χρήση DNA προερχόμενου από ιστό FFPE για το *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Το LOD προσδιορίστηκε με τη χρήση κλινικών δοκιμών FFPE και κυτταρικής σειράς FFPE στα χαμηλά επίπεδα εισαγόμενου DNA για τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις EGFR.

Οι τιμές LOD που καθορίστηκαν με τη χρήση ιστού FFPE επαληθεύτηκαν για το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit με DNA προερχόμενο από τεχνητά δείγματα πλάσματος θετικά για μετάλλαξη.

Οι τελικές τιμές LOD που παρατίθενται στον Πίνακα 9 της επόμενης σελίδας υποδεικνύουν το ποσοστό μετάλλαξης που έδωσε μια πιθανότητα σωστών προσδιορισμών 95% για καθεμία από τις μεταλλάξεις.

**Πίνακας 9. Όρια LOD για καθεμία από τους προσδιορισμούς μετάλλαξης του EGFR**

Εξόνιο	Μετάλλαξη	COSMIC ID*	Τιμή 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	Ελλείψεις	12678	10,40†
		12367	4,39†
		12384	7,54†
		6225	6,5*
		6220	2,7*
		6255	0,81*
		12382	1,45*
		12383	4,58*
		12387	4,91†
12369	4,94*		
21	L858R	6224	5,94*

\* Τιμές LOD επαληθευμένες σε πλάσμα στο πλαίσιο της μελέτης επιβεβαίωσης LOD του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

† Οι μεταλλάξεις αυτές δεν επιβεβαιώθηκαν σε πλάσμα.

## Αναλυτική ευαισθησία — Οριακές τιμές αποκοπής $\Delta C_T$ και εύρος οριακών τιμών αποκοπής $\Delta C_T$

Κατά τον καθορισμό των οριακών τιμών αποκοπής των προσδιορισμών, υιοθετήθηκε μια προσέγγιση με βάση τον κίνδυνο για τα ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και οι εκτιμώμενες τιμές LOB χρησιμοποιήθηκαν ως ένα από τα στοιχεία ανάπτυξης οριακών τιμών αποκοπής.

Τα αντίστοιχα εύρη οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  που έχουν τεκμηριωθεί για κάθε προσδιορισμό μετάλλαξης στο *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit περιλαμβάνει ο Πίνακας 10.

**Πίνακας 10.** Εύρη οριακών τιμών αποκοπής  $\Delta C_T$  του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Προσδιορισμός μετάλλαξης	Εύρος οριακών τιμών αποκοπής $\Delta C_T$
T790M	-10,00 $\geq$ έως $\leq$ 7,40
Έλλειψη	-10,00 $\geq$ έως $\leq$ 8,00
L858R	-10,00 $\geq$ έως $\leq$ 8,90

## Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα αξιολογήθηκαν μέσω της εξέτασης ενός επιπέδου μετάλλαξης που αντιστοιχούσε στο τριπλάσιο του LOD, σε υπόβαθρο γονιδιωματικού DNA άγριου τύπου, σε 3 κέντρα δοκιμασίας, με τη χρήση πολλαπλών παρτίδων κιτ, χειριστών και εκτελέσεων και σε διαφορετικές ημέρες, με 2 θυγατρικούς κλώνους για κάθε δείγμα. Και στους 3 προσδιορισμούς μετάλλαξης, τα δείγματα μεταλλαγμένου DNA βρέθηκαν θετικά για μετάλλαξη σε ποσοστό 100%. Τα δείγματα άγριου τύπου ήταν αρνητικά για μετάλλαξη σε όλους τους προσδιορισμούς σε όλα τα κέντρα.

## Επίδραση του εισαγόμενου DNA στις τιμές C<sub>T</sub>

Το επίπεδο εισαγόμενου DNA ορίζεται ως η συνολική ποσότητα ενισχύσιμου EGFR DNA σε ένα δείγμα, η οποία καθορίζεται από τις τιμές C<sub>T</sub> της αντίδρασης του μάρτυρα. Για να καταδειχθεί ότι η απόδοση του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit είναι σταθερή σε ολόκληρο το εύρος τιμών C<sub>T</sub> αντίδρασης μάρτυρα (23,70–31,10), εξετάστηκαν και οι 3 προσδιορισμοί μετάλλαξης EGFR έναντι μιας σειράς αραιώσεων έξι σημείων σε αναλογία 1 προς 3 (DNA που εκχυλίστηκε από κυτταρικές σειρές FFPE). Η τιμή-στόχος C<sub>T</sub> για την αραιώση 1, για κάθε μετάλλαξη, ήταν περίπου 24,70. Η τελική αραιώση έδωσε C<sub>T</sub> περίπου 32–33, που ήταν εκτός του εύρους τιμών C<sub>T</sub> για την αντίδραση μάρτυρα. Συνολικά, οι οριακές τιμές αποκοπής ΔC<sub>T</sub> που μετρήθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα εισαγωγής ολικού DNA ήταν σταθερές σε ολόκληρο το εύρος εργασίας του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

## Παρεμβαλλόμενες ουσίες

### Ενδογενείς παρεμβαλλόμενες ουσίες

Οι δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες προστέθηκαν εξωγενώς σε τεχνητά δείγματα πλάσματος θετικά για μετάλλαξη, 3 φορές το LOD. Τα δείγματα υποβλήθηκαν, στη συνέχεια, σε δοκιμασία με το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Τα δείγματα που περιείχαν τις δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες συγκρίθηκαν με τεχνητά δείγματα πλάσματος θετικά για μετάλλαξη, 3 φορές το LOD, τα οποία δεν περιείχαν καμία εξωγενώς προστεθείσα παρεμβαλλόμενη ουσία. Κάθε παρεμβαλλόμενη ουσία υποβλήθηκε σε δοκιμασία με 4 θυγατρικούς κλώνους.

Μια διαφορά στην τιμή ΔC<sub>T</sub> > 2 φορές την τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) (που λήφθηκε από τη μελέτη ακρίβειας) μεταξύ της «δοκιμασίας» και του «μάρτυρα» (δηλαδή του δείγματος χωρίς παρεμβαλλόμενη ουσία) θεωρήθηκε ένδειξη πιθανής παρεμβολής. Στις περιπτώσεις αυτές, παρέχεται η παρατηρηθείσα διαφορά στην τιμή ΔC<sub>T</sub>.

Οι συγκεντρώσεις δοκιμασίας που παρατίθενται στον Πίνακα 11 επιλέχθηκαν βάσει της καθοδήγησης που παρέχεται από την κατευθυντήρια οδηγία EP07-A2 του CLSI και είναι αντιπροσωπευτικές των μέγιστων συγκεντρώσεων που αναμένεται να παρατηρηθούν σε ένα κλινικό δείγμα.

**Σημείωση:** Αυτές οι ενδογενείς ουσίες προστέθηκαν εξωγενώς σε τεχνητά δείγματα πλάσματος θετικά για μετάλλαξη τα οποία περιελάμβαναν πλάσμα από υγιείς δότες. Επομένως, αυτές οι ενδογενείς ενώσεις θα υπήρχαν ήδη σε άγνωστες συγκεντρώσεις στα δείγματα πριν από την προσθήκη. Η τελική συγκέντρωση κάθε δυνητικά παρεμβαλλόμενης ενδογενούς ουσίας που δοκιμάστηκε θα ήταν κατά πάσα πιθανότητα μεγαλύτερη από την δοκιμαζόμενη συγκέντρωση.

**Πίνακας 11. Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ενδογενείς ουσίες**

Δυνητικά παρεμβαλλόμενη ουσία (Interfering Substance, IS)	Συγκέντρωση δοκιμασίας
Μη συζευγμένη χολερυθρίνη	150 mg/dl
Αιμοσφαιρίνη (ανθρώπινη)	0,2 g/dl
Τριγλυκερίδια	3 g/dl

## Προσδιορισμός T790M

Οι ακόλουθες ενδογενείς ενώσεις στις συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 11 αποδείχθηκε ότι έχουν επίδραση > 2 φορές την SD (0,40  $\Delta C_T$ ) στην απόδοση του προσδιορισμού T790M:

- Τριγλυκερίδια, διαφορά 1,37  $\Delta C_T$

## Προσδιορισμός ελλείψεων

Οι ακόλουθες ενδογενείς ενώσεις στις συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 11 αποδείχθηκε ότι έχουν επίδραση > 2 φορές την SD (0,71  $\Delta C_T$ ) στην απόδοση του προσδιορισμού ελλείψεων:

- Αιμοσφαιρίνη, διαφορά 0,80  $\Delta C_T$

## Προσδιορισμός L858R

Οι ακόλουθες ενδογενείς ενώσεις στις συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 11 αποδείχθηκε ότι έχουν επίδραση > 2 φορές την SD (0,56  $\Delta C_T$ ) στην απόδοση του προσδιορισμού L858R:

- Χολερυθρίνη, διαφορά 1,13  $\Delta C_T$
- Τριγλυκερίδια, διαφορά 1,53  $\Delta C_T$

## Εξωγενείς παρεμβαλλόμενες ουσίες

Οι δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες προστέθηκαν εξωγενώς σε τεχνητά δείγματα πλάσματος θετικά για μετάλλαξη, 3 φορές το LOD. Τα δείγματα υποβλήθηκαν, στη συνέχεια, σε δοκιμασία με το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Τα δείγματα που περιείχαν τις δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες συγκρίθηκαν με τεχνητά δείγματα πλάσματος θετικά για μετάλλαξη, 3 φορές το LOD, τα οποία δεν περιείχαν καμία εξωγενώς προστεθείσα παρεμβαλλόμενη ουσία. Κάθε παρεμβαλλόμενη ουσία υποβλήθηκε σε δοκιμασία με 4 θυγατρικούς κλώνους.

Μια διαφορά > 2 φορές την τυπική απόκλιση (που λήφθηκε από τη μελέτη ακρίβειας) μεταξύ της τιμής  $\Delta C_T$  της «δοκιμασίας» και της τιμής  $\Delta C_T$  του «μάρτυρα» (δηλαδή του δείγματος χωρίς παρεμβαλλόμενη ουσία) θεωρήθηκε ένδειξη πιθανής παρεμβολής. Στις περιπτώσεις αυτές, παρέχεται η παρατηρηθείσα διαφορά στην τιμή  $\Delta C_T$ .

Οι συγκεντρώσεις δοκιμασίας που παρατίθενται στον Πίνακα 12 έχουν επιλεγεί βάσει της καθοδήγησης που παρέχεται από την κατευθυντήρια οδηγία EP07-A2 του CLSI και υπερβαίνουν τη θεραπευτική συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις.

**Πίνακας 12. Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ενδογενείς ουσίες**

<b>Δυνητικά παρεμβαλλόμενη ουσία (Interfering Substance, IS)</b>	<b>Συγκέντρωση δοκιμασίας (μg/ml)</b>
Υδροβρωμική σπυλοπράμη	0,75
Ημιυδρική υδροχλωρική παροξετίνη	1,14
Υδροχλωρική σετραλίνη	0,67
Υδροχλωρική φλουοξετίνη	3,87
Ακεταμινοφαίνη	200,7
K <sub>2</sub> EDTA	3600

### **Προσδιορισμός T790M**

Οι ακόλουθες εξωγενείς ενώσεις στις συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 12 αποδείχθηκε ότι έχουν επίδραση > 2 φορές την SD (0,40 ΔC<sub>T</sub>) στην απόδοση του προσδιορισμού T790M:

- Υδροβρωμική σπυλοπράμη, διαφορά 0,52 ΔC<sub>T</sub>
- Υδροχλωρική σετραλίνη, διαφορά 0,47 ΔC<sub>T</sub>
- Υδροχλωρική φλουοξετίνη, διαφορά 0,48 ΔC<sub>T</sub>

### **Προσδιορισμός ελλείψεων**

Οι ακόλουθες εξωγενείς ενώσεις στις συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 12 αποδείχθηκε ότι έχουν επίδραση > 2 φορές την SD (0,71 ΔC<sub>T</sub>) στην απόδοση του προσδιορισμού ελλείψεων:

- Φλουοξετίνη, διαφορά 0,73 ΔC<sub>T</sub>



## Προσδιορισμός L858R

Οι ακόλουθες εξωγενείς ενώσεις στις συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 12 αποδείχθηκε ότι έχουν επίδραση > 2 φορές την SD (0,56  $\Delta C_T$ ) στην απόδοση του προσδιορισμού L858R:

- Υδροβρωμική σπταλοπράμη, διαφορά 0,72  $\Delta C_T$
- Ημιυδρική υδροχλωρική παροξετίνη, διαφορά 0,92  $\Delta C_T$
- Υδροχλωρική σετραλίνη, διαφορά 0,82  $\Delta C_T$
- Υδροχλωρική φλουοξετίνη, διαφορά 0,98  $\Delta C_T$
- Ακεταμινοφαίνη, διαφορά 0,81  $\Delta C_T$
- K<sub>2</sub> EDTA, διαφορά 0,57  $\Delta C_T$

## Κλινική απόδοση

Η κλινική δοκιμή NCT01203917 ήταν μια ανοικτή μελέτη φάσης IV, ενός σκέλους, για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας/ανεκτικότητας της γεφινίμπης ως θεραπείας πρώτης γραμμής σε Καυκάσιους ασθενείς με NSCLC σταδίου IIIA/B/IV, θετικό σε μετάλλαξη του EGFR.

Η επιλεξιμότητα των ασθενών για εγγραφή στην κλινική δοκιμή NCT01203917 καθορίστηκε από την παρουσία μεταλλάξεων ευαισθητοποίησης του EGFR. Η κατάσταση μετάλλαξης του EGFR στους ασθενείς με NSCLC αξιολογήθηκε με τη χρήση του προσδιορισμού κλινικής δοκιμής (Clinical Trial Assay, CTA), με DNA από αντίστοιχα δείγματα ιστού και πλάσματος. Η μελέτη περιελάμβανε έναν προκαθορισμένο στόχο διερεύνησης βιοδεικτών με σκοπό να εξακριβωθεί εάν μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα πλάσματος για ανάλυση μεταλλάξεων σε περίπτωση που δεν υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα ιστού. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν υψηλά ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των αντίστοιχων δειγμάτων ιστού και πλάσματος, της τάξης του 94,3%, με ειδικότητα προσδιορισμού 99,8% και ευαισθησία 65,7%.

Πραγματοποιήθηκε αναδρομική δοκιμασία δοκιμών πλάσματος από ασθενείς υποψήφιους για συμμετοχή στην κλινική δοκιμή NCT01203917, με τη χρήση του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Διεξήχθη μια συγκριτική μελέτη για την αξιολόγηση της συμφωνίας του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit με τη CTA που χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή ασθενών για την κλινική δοκιμή NCT01203917. Διαπιστώθηκε ισοδυναμία μεταξύ της CTA και του *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

---

## Βιβλιογραφία















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

## Στοιχεία επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), καλέστε το 00800-22-44-6000 ή επικοινωνήστε με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους της QIAGEN (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση:

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
	Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις
	Ημερομηνία λήξης
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός υλικού
	Συστατικά
	Περιεχόμενα
	Αριθμός
	Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Κατασκευαστής
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Προσοχή

## Παράρτημα Α: Λεπτομέρειες μετάλλαξης

Ο πίνακας 13 δείχνει τους αριθμούς COSMIC ID που προέρχονται από τον κατάλογο Catalogue of Somatic Mutations in Cancer ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

Πίνακας 13. Κατάλογος μεταλλάξεων και COSMIC ID.

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

# Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<b>therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit – για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο EGFR</b>		
therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: 1 προσδιορισμός μάρτυρα, 3 προσδιορισμοί μετάλλαξης, θετικός μάρτυρας, Taq DNA πολυμεράση	870311
<b>Rotor-Gene Q MDx και παρελκόμενα</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Melt, HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνεται εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής real-time PCR και αναλυτής τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Melt, HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Τεμάχιο αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία αντίδρασης με μονοκάναλη πιπέτα σε σωληνάρια 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 σειρές των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 1000 αντιδράσεις	981103

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 σειρές των 4 σωληναρίων και πωμάτων για 10.000 αντιδράσεις	981106
<b>Σχετικά προϊόντα</b>		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Για 50 παρασκευές: Στήλες QIAamp Mini, επεκτάσεις σωληναρίων (20 ml), QIAGEN Proteinase K, Carrier RNA, ρυθμιστικά διαλύματα, VacConnectors και Collection Tubes (1,5 ml και 2 ml)	55114

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο kit QIAGEN ή εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια των kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ή μπορείτε να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN ή τον διανομέα της περιοχής σας.

# Ιστορικό αναθεώρησης εγγράφου

Έγγραφο	Αλλαγές
R3, Ιανουάριος 2019	Προσθήκη εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου (στο εξώφυλλο). Ενημέρωση ενότητας «Σύμβολα».
R4, Οκτώβριος 2019	Αλλαγή νόμιμου κατασκευαστή (εξώφυλλο) Προσαρμογή ονόματος οργάνου από Rotor-Gene Q MDx σε Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, ώστε να ευθυγραμμιστεί με το όνομα της επικέτας του οργάνου Διόρθωση οδηγιών αποθήκευσης αντιδραστηρίων από 90 ημέρες σε 12 μήνες ή μέχρι την ημερομηνία λήξης Ενημέρωση της ενότητας «Περιορισμοί» με πληροφορίες σχετικά με τον προσδιορισμό ελλείψεων εξονίου 19 και τον προσδιορισμό L858R Αναθεώρηση του Πίνακα 9 για την αντικατάσταση του διπλού L858R εξονίου 21 με τις ελλείψεις εξονίου 19 Αφαίρεση συμβόλου EC + REP από το εξώφυλλο και την ενότητα «Σύμβολα»
R5, Ιούνιος 2020	Ενημέρωση των παραπομπών στην έκδοση λογισμικού RGQ από 2.3 σε 2.3.5 ή μεταγενέστερη Ενημέρωση του Πίνακα 8 και 10 για την εφαρμογή του νέου εύρους οριακών πμών αποκοπής ΔC <sub>T</sub> και προσαρμογή όλων των σχετικών περιγραφών αντίστοιχα σε όλο το εγχειρίδιο Ενημέρωση όλων των κεφαλαίων πρωτοκόλλου ώστε να περιλαμβάνονται πληροφορίες για τη σπουδαιότητα της ανάμειξης στις ενότητες με τίτλο «Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη» και επισήμανση των λεπτομερειών ανάμειξης σε όλα τα στάδια Προσθήκη σταδίου ανάμειξης στην ενότητα «Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR» Ενημέρωση της ενότητας «Αντιμετώπιση προβλημάτων» και προσθήκη λύσης για την πολλαπλή διασταύρωση κατωφλίου



---

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

---

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

### Σύμβαση περιορισμένης άδειας χρήσης για το *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

1. Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:
2. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο παρόν εγχειρίδιο και μόνο με τα εξαρτήματα που περιλαμβάνονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Ορισμένα από αυτά τα επιπλέον πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Εκτός από τις άδειες χρήσης που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit και/ή η χρήση/οι χρήσεις του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
4. Αυτό το kit και τα συστατικά του παρέχονται με άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή τους.
5. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.
6. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το kit και/ή τα εξαρτήματά του.

Για τους εννημερωμένους όρους της άδειας, βλ. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *therascreen*®, Rotor-Gene®, Scorpions® (QIAGEN Group), FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.), IRESSA® (AstraZeneca Group). Οι κατατεθείσες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και αν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.

1121934 06-2020 HB-1898-006 © 2020 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος

