

Juni 2020

# Buku Pegangan *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit



Versi 2



Untuk penggunaan diagnostik in vitro

Untuk digunakan dengan instrumen Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM



874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden, JERMAN



1121935ID

---

# Isi

Penggunaan yang Ditujukan .....	5
Ringkasan dan Penjelasan .....	6
Prinsip Prosedur.....	9
Bahan yang Disediakan .....	13
Isi kit.....	13
Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia .....	14
Peringatan dan Pencegahan .....	16
Tindakan pencegahan umum .....	16
Penyimpanan dan Penanganan Reagen .....	18
Kondisi pengiriman .....	18
Kondisi penyimpanan .....	18
Penanganan dan Penyimpanan Spesimen .....	20
Prosedur .....	21
Penyiapan dan ekstraksi DNA .....	21
Protokol: Penilaian sampel.....	22
Protokol: Deteksi mutasi EGFR.....	35
Interpretasi Hasil (Otomatis).....	48
Tanda Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package .....	50
Panduan Pemecahan Masalah .....	54
Kontrol Kualitas .....	55
Batasan.....	55

---

Karakteristik Kinerja .....	57
Kinerja analitikal .....	57
Batasan kosong (Limit of Blank, LOB), rentang kerja, nilai cutoff, dan rentang cutoff $\Delta C_T$ .....	57
Pengaruh input DNA terhadap nilai $\Delta C_T$ .....	58
Reaktivitas silang .....	59
Akurasi: Perbandingan terhadap metode referensi analitikal .....	59
Nilai batas deteksi (Limit of Detection, LOD) .....	60
Gangguan .....	62
Reproduksibilitas .....	63
Kinerja Klinis .....	67
Data hasil klinis: GIOTRIF® .....	67
Data hasil klinis: IRESSA® .....	69
Referensi .....	71
Simbol .....	73
Lampiran A: Protokol Panduan <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit .....	74
Informasi umum .....	74
Protokol: Membuat profil suhu .....	74
Prosedur (Manual) .....	85
Protokol: Penilaian sampel (manual) .....	85
Protokol: Deteksi mutasi EGFR (manual) .....	85
Protokol: Pengaturan <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q .....	86
Interpretasi Hasil (Manual) .....	91
Pengaturan analisis perangkat lunak .....	91

---

Analisis data penilaian sampel .....	93
Analisis data deteksi mutasi EGFR .....	94
Lampiran B: Pemasangan <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package.....	103
Informasi Kontak.....	106
Informasi Pemesanan .....	107
Riwayat Revisi Dokumen.....	109

---

# Penggunaan yang Ditujukan

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit adalah pengujian diagnostik in vitro untuk deteksi 29 mutasi somatis dalam gen EGFR. Kit ini memberikan penilaian kualitatif pada status mutasi dalam sampel tumor dari pasien kanker paru bukan-sel kecil (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Hasilnya ditujukan untuk membantu dokter dalam mengidentifikasi pasien dengan NSCLC yang mungkin mendapat manfaat dari perawatan dengan inhibitor tirosin kinase EGFR.

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit akan menguji sampel DNA yang diekstrak dari jaringan tumor formalin-tetap, parafin sematan (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) dari pasien NSCLC, dan berfungsi dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Kit ini digunakan oleh personel terlatih dalam lingkungan laboratorium profesional.

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

# Ringkasan dan Penjelasan

Mutasi dalam onkogen EGFR ditemukan dalam kanker manusia (1, 2). Adanya mutasi ini berkaitan dengan respons terhadap terapi inhibitor tirosin kinase (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) dalam pasien dengan NSCLC (3–8). Mutasi tersebut dalam onkogen EGFR terdapat dalam populasi umum pasien dengan NSCLC pada frekuensi sekitar 10% pasien dari AS, Eropa, atau Australia dan hingga 30% pada pasien dari Jepang dan Taiwan (1, 2, 9).

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit adalah kit yang siap digunakan untuk deteksi 29 mutasi dalam gen terkait kanker EGFR menggunakan reaksi rantai polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Dengan teknologi Scorpions® (10) dan ARMS (Sistem Mutasi Refraktori Amplifikasi) (11), *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit memungkinkan deteksi 29 mutasi dalam ekson 18, 19, 20, dan 21 pada onkogen EGFR terhadap latar belakang DNA genomik tipe liar (Tabel 1). Secara ringkas:

- 19 penghapusan dalam ekson 19 (mendeteksi adanya salah satu dari 19 penghapusan tetapi tidak membedakannya)
- Tiga sisipan dalam ekson 20 (mendeteksi adanya salah satu dari tiga sisipan tetapi tidak membedakannya)
- G719X (mendeteksi adanya G719S, G719A, atau G719C tetapi tidak membedakannya)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

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

**Tabel 1. Daftar mutasi dan identitas COSMIC**

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

\* COSMIC: Katalog mutasi somatis dalam kanker (Catalogue of somatic mutations in cancer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

**Tabel 1. Daftar mutasi dan identitas COSMIC**

Ekson	Mutasi	ID COSMIC*	Perubahan dasar
20	S768I	6241	2303G>T
	Sisipan	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

\* COSMIC: Katalog mutasi somatis dalam kanker (Catalogue of somatic mutations in cancer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

\*\* Hasil mutasi COSM6254 (2239\_2253del15) dan COSM12369(2240\_2254del15) dalam penghapusan 15 pasangan dasar dari sekuens EGFR. Sekuens akhir yang sama dihasilkan oleh kedua mutasi dan mutasi tersebut tidak dapat dibedakan antara satu sama lain. Sehingga, mutasi COSM6254 (2239\_2253del15) telah dihapus dari versi terbaru COSMIC (v83) dan kedua mutasi tersebut kini diwakilkan oleh COSM12369 (2240\_2254del15). Hal ini mengikuti panduan HGVS untuk mewakili sebagian besar penghapusan 3'. Pengujian *therascreen* EGFR tidak membedakan antara 19 mutasi penghapusan mana pun dan setiap penghapusan positif disebut "Deletions" (Penghapusan). Perubahan ini hanya memengaruhi dokumentasi dan tidak memengaruhi kit atau kemampuannya dalam mendeteksi setiap mutasi individual.

---

# Prinsip Prosedur

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit terdiri dari delapan campuran reaksi amplifikasi PCR terpisah: tujuh reaksi spesifik mutasi dalam ekson 18, 19, 20, dan 21 dari onkogen EGFR, dan satu kontrol tipe liar dalam ekson 2. Komponen utama kit dijelaskan di bawah.

## ARMS

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

## Scorpions

Deteksi amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Scorpions. Scorpions adalah molekul dwifungsi yang mengandung primer PCR yang secara kovalen terkait dengan kuar. Fluorofor dalam kuar berinteraksi dengan pemadam, yang juga termasuk dalam kuar, yang mengurangi fluoresens. Selama PCR, saat kuar terikat pada ampikon, fluorofor, dan pemadam menjadi terpisah sehingga menyebabkan peningkatan yang dapat dideteksi dalam fluoresens.

## Format kit

Delapan uji kadar tersedia dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit:

- Satu uji kadar kontrol (CTRL)
- Tujuh uji kadar mutasi

---

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

## Uji Kadar

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit terdiri dari prosedur dengan dua tahap. Di tahap pertama, uji kadar kontrol dilakukan untuk menilai total kemampuan DNA EGFR yang dapat diperkuat dalam sampel. Di tahap kedua, uji kadar kontrol dan mutasi dilakukan untuk menentukan ada atau tidak adanya DNA mutan.

### Uji kadar kontrol

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

### Uji kadar mutasi

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

## Kontrol

Catatan: Semua proses eksperimen harus mengandung kontrol positif dan negatif.

---

## Kontrol positif

Setiap proses harus mengandung kontrol positif dalam tabung 1–8. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit berisi Kontrol Positif (PC) EGFR untuk digunakan sebagai templat dalam reaksi kontrol positif. Hasil kontrol positif akan dinilai untuk memastikan bahwa kit berkinerja dalam kriteria penerimaan yang ditetapkan.

## Kontrol negatif

Setiap proses harus mengandung kontrol negatif dalam tabung (“kontrol tanpa templat”: NTC) dalam tabung 9–16. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit mengandung air untuk NTC untuk digunakan sebagai “templat” untuk kontrol tanpa templat. Kontrol tanpa templat digunakan untuk menilai adanya potensi kontaminasi selama pengaturan proses dan untuk menilai kinerja reaksi kontrol internal.

## Penilaian reaksi kontrol internal

Tiap campuran reaksi mengandung kontrol internal (IC) selain reaksi target. Kegagalan menunjukkan bahwa mungkin terdapat inhibitor yang dapat menyebabkan hasil tidak akurat atau kesalahan pengaturan operator yang terjadi untuk tabung tersebut. IC ini menggunakan sekuens target oligonukleotida yang tidak terkait EGFR, primer tanpa label, dan primer Scorpions berlabel HEX untuk membedakannya dari Scorpions berlabel FAM dalam campuran reaksi mutasi dan kontrol. Amplifikasi FAM dapat bersaing dengan amplifikasi IC sehingga nilai IC  $C_T$  (HEX) yang dihasilkan dapat berada di luar rentang yang ditetapkan. Hasil FAM tetap valid untuk sampel ini.

## Penilaian sampel

Kami sangat menyarankan penggunaan Campuran Reaksi Kontrol (tabung CTRL) yang disertakan dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit untuk menilai total DNA EGFR yang dapat diperkuat dalam sampel. Uji kadar kontrol memperkuat wilayah ekson 2 dari gen EGFR. Kami menyarankan untuk menyiapkan sampel hanya dengan uji kadar kontrol menggunakan PC EGFR sebagai kontrol positif dan air untuk “templat” sebagai kontrol tanpa templat.

---

Catatan: Penilaian DNA harus didasarkan pada PCR dan mungkin berbeda dari kuantifikasi berdasarkan pembacaan daya serap. Campuran Reaksi Kontrol (tabung CTRL) tambahan tersedia untuk memungkinkan penilaian kualitas dan kuantitas DNA dalam sampel sebelum analisis menggunakan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Platform dan perangkat lunak

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dirancang khusus untuk digunakan dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM terprogram untuk parameter siklus yang berbeda, atau "proses", dengan *therascreen* EGFR CE Assay Package.

*therascreen* EGFR CE Assay Package terdiri dari dua templat: "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (Templat Terkunci Proses Kontrol *therascreen* EGFR CE) (untuk penilaian sampel) dan "therascreen EGFR CE Locked Template" (Templat Terkunci *therascreen* EGFR CE) (untuk deteksi mutasi EGFR). Templat ini berisi parameter proses PCR dan menghitung hasilnya.

Dimungkinkan juga untuk menggunakan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dengan versi perangkat lunak Rotor-Gene Q 2.3 dalam mode terbuka (yakni, tanpa menggunakan Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Untuk detailnya, lihat Lampiran A: *Protokol* Panduan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

# Bahan yang Disediakan

## Isi kit

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				(24)
No. Katalog				874111
Jumlah reaksi				24
Warna	Identitas	ID Tabung		Volume
Merah	Control Reaction Mix (Campuran Reaksi Kontrol)	1	CTRL	2 x 600 µl
Ungu	T790M Reaction Mix (Campuran Reaksi T790M)	2	T790M	600 µl
Jingga	Deletions Reaction Mix (Campuran Reaksi Penghapusan)	3	Del	600 µl
Merah Muda	L858R Reaction Mix (Campuran Reaksi L858R)	4	L858R	600 µl
Hijau	L861Q Reaction Mix (Campuran Reaksi L861Q)	5	L861Q	600 µl
Kuning	G719X Reaction Mix (Campuran Reaksi G719X)	6	G719X	600 µl
Abu-abu	S768I Reaction Mix (Campuran Reaksi S768I)	7	S768I	600 µl
Biru	Insertions Reaction Mix (Campuran Reaksi Sisipan)	8	Ins	600 µl
Krem	EGFR Positive Control (Kontrol Positif EGFR)	9	PC	300 µl
Mint	<i>Taq</i> DNA Polymerase (Polimerase DNA <i>Taq</i> )	<i>Taq</i>	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Putih	Nuclease-free water for No Template Control (Air bebas nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Putih	Nuclease-free water for Dilution (Air bebas nuklease untuk Pengenceran)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
<i>Buku Pegangan theascreen EGFR RGQ PCR Kit</i>				1

# Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia

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

## Reagen

- Kit ekstraksi DNA (lihat Penyiapan dan ekstraksi DNA)

## Bahan habis pakai dan peralatan laboratorium umum

- Pipet khusus\* (dapat disesuaikan) untuk penyiapan sampel
- Pipet khusus\* (dapat disesuaikan) untuk penyiapan campuran master PCR
- Pipet khusus\* (dapat disesuaikan) untuk penyaluran DNA templat
- Ujung pipet dengan DNase, RNase, dan Bebas DNA dengan filter (untuk menghindari kontaminasi silang, disarankan menggunakan ujung pipet dengan penghalang aerosol)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, untuk digunakan dengan 72-well rotor (no. kat. 981103 atau 981106)
- Tabung mikro sentrifugasi DNase, RNase, dan Bebas DNA untuk penyiapan campuran master
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, blok aluminium untuk pengaturan reaksi manual dengan pipet saluran tunggal (no. kat. 9018901)
- Thermomixer\*, inkubator orbital berpemanas\*, blok pemanas\* atau penangas air\* yang mampu melakukan inkubasi pada suhu 90 °C
- Sentrifugasi atas meja\* dengan rotor untuk tabung reaksi 2 ml
- Mikser vorteks\*

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

---

## Peralatan untuk PCR

- Instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM saluran fluoresens untuk Cycling Green dan Cycling Yellow (masing-masing deteksi FAM dan HEX) \* †
- Perangkat lunak Rotor-Gene Q versi 2.3.5 atau lebih baru
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package, versi 3.0.6 (tersedia untuk diunduh dari halaman produk *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Versi 2 di [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Masuk ke Product Resources (Sumber Daya Produk) > Supplementary Protocols (Protokol Tambahan) untuk mengunduh paket uji kadar.)

Catatan: Perangkat lunak Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package membutuhkan perangkat lunak Rotor-Gene Q versi 2.3.5 atau yang lebih baru.

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

† Di beberapa negara, jika sesuai, instrumen Rotor-Gene Q 5plex HRM dengan tanggal produksi Mei 2011 atau yang lebih baru dapat digunakan. Tanggal produksi dapat diperoleh dari nomor seri pada sisi belakang instrumen. Nomor seri memiliki format "mmyyynn" di mana "mm" menunjukkan bulan produksi dalam digit, "yy" menunjukkan dua digit terakhir tahun pembuatan, dan "ynn" menunjukkan pengenal instrumen unik.

---

# Peringatan dan Pencegahan

Untuk penggunaan diagnostik in vitro

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

Untuk informasi keselamatan terkait instrumen Rotor-Gene Q, lihat panduan pengguna yang tersedia dengan instrumen tersebut.

Buang limbah sampel dan uji kadar sesuai dengan peraturan keselamatan setempat.

## Tindakan pencegahan umum

Selalu perhatikan hal-hal berikut.

- Pengujian ini untuk digunakan dengan spesimen jaringan NSCLC FFPE.
- Simpan dan ekstrak bahan positif (kontrol positif dan spesimen) secara terpisah dari semua reagen lain lalu tambahkan ke campuran reaksi dalam fasilitas di ruang yang terpisah.
- Beri perhatian ekstrem untuk mencegah kontaminasi PCR dengan bahan kontrol sintetis. Kami menyarankan untuk menggunakan pipet khusus yang terpisah untuk menyiapkan campuran reaksi dan menambahkan templat DNA. Penyiapan dan penyaluran campuran reaksi harus dilakukan dalam area terpisah pada penambahan templat. Tabung Rotor-Gene Q tidak boleh dibuka setelah proses PCR telah selesai. Hal ini untuk mencegah kontaminasi laboratorium dengan produk pasca-PCR.
- Semua bahan biologis dan kimia berpotensi bahaya. Spesimen dan sampel berpotensi menginfeksi dan wajib diperlakukan sebagai bahan bahaya biologi.

- 
- Reagen untuk *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit telah diencerkan secara optimal. Jangan mengencerkan reagen lebih lanjut karena hal ini dapat menyebabkan hilangnya kinerja. Jangan menggunakan volume reaksi (campuran reaksi ditambah sampel) kurang dari 25 µl karena hal ini akan meningkatkan risiko negatif palsu.
  - Semua reagen yang disediakan dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ditujukan untuk digunakan hanya dengan reagen lain yang tersedia dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit yang sama. Jangan melakukan substitusi reagen dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit atau antara *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, karena hal ini dapat memengaruhi kinerja.
  - Hanya gunakan polimerase DNA *Taq* (tabung *Taq*) yang disediakan dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Jangan melakukan substitusi dengan polimerase DNA *Taq* dari kit lain pada tipe yang sama atau yang lain atau dengan polimerase DNA *Taq* dari pemasok lain.
  - Jangan gunakan komponen yang disimpan dengan tidak benar atau kedaluwarsa.

Catatan: Perhatikan dengan cermat untuk memastikan pengujian sampel yang tepat dengan menekankan pada eliminasi entri sampel yang salah, kesalahan pemuatan, dan kesalahan pemipetan.

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

---

# Penyimpanan dan Penanganan Reagen

## Kondisi pengiriman

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dikirimkan dengan es kering dan harus dibekukan saat kedatangan. Jika *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit tidak beku saat kedatangan, jika kemasan luar telah terbuka selama transit, atau pengiriman tidak berisi nota pengemasan, buku pegangan, atau reagen lain, silakan hubungi salah satu Layanan Teknis QIAGEN atau distributor setempat (lihat sampul belakang atau kunjungi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kondisi penyimpanan

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit harus disimpan segera setelah diterima pada suhu  $-30$  hingga  $-15$  °C dalam lemari pembeku dengan suhu konstan dan terlindung dari cahaya. Scorpions (seperti dengan semua molekul berlabel) harus terlindung dari cahaya untuk menghindari pemutihan foto dan kehilangan kinerja. Jika disimpan dalam kondisi penyimpanan yang disarankan pada kemasan asli, kit akan stabil hingga tanggal kedaluwarsa yang tercantum pada label.

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

Reagen harus dicairkan pada suhu sekitar ( $15$ – $25$  °C) selama minimal 1 jam dan maksimal 4,5 jam. Setelah reagen siap digunakan, reaksi PCR dapat disiapkan dan tabung Rotor-Gene Q yang mengandung campuran master dan sampel DNA harus segera dimuat dalam instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Total waktu sejak dimulainya pengaturan PCR hingga dimulainya operasi tidak boleh lebih dari:

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

Catatan: Untuk memastikan kinerja dan aktivitas yang optimal, Scorpions (seperti dengan semua molekul berlabel) harus terlindung dari cahaya untuk menghindari pemutihan foto.

Catatan: Untuk mendapatkan penggunaan optimal reagen dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, sampel harus dikelompokkan dalam batch. Pengujian sampel secara terpisah, hal ini akan menghabiskan lebih banyak reagen dan mengurangi jumlah sampel yang dapat diuji dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

---

# Penanganan dan Penyimpanan Spesimen

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

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

Sampel tumor bersifat non-homogen dan data dari sampel tumor mungkin tidak sesuai dengan bagian lain dari tumor yang sama. Sampel tumor juga dapat mengandung jaringan non-tumor. DNA dari jaringan non-tumor tidak akan diharapkan mengandung mutasi yang terdeteksi oleh *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Untuk menyiapkan sampel jaringan untuk ekstraksi DNA:

- Dengan metode dan bahan standar, masukkan spesimen jaringan dalam 10% formalin berdapar netral (Neutral Buffered Formalin, NBF), dan lekatkan spesimen jaringan dalam parafin. Dengan mikrotom, potong 5 µm bagian serial dari blok parafin dan pasang pada kaca mikroskop.
- Tunjuk individu terlatih (misal ahli patologi) harus menilai bagian yang mengandung Hematoksilin & Eosin (H&E) untuk memastikan adanya tumor.
- Bagian yang mengandung zat tersebut tidak boleh digunakan untuk ekstraksi DNA.
- Simpan semua blok FFPE dan kaca mikroskop pada suhu ruang (15–25 °C). Kaca mikroskop dapat disimpan pada suhu sekitar hingga 1 bulan sebelum ekstraksi DNA.

# Prosedur

## Penyiapan dan ekstraksi DNA

Karakteristik kinerja untuk kit ini telah diperoleh menggunakan DNA yang diekstrak dengan QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (no. kat. 60404). Kit ini harus digunakan untuk penyiapan DNA, jika tersedia di negara Anda. Jika menggunakan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit yang memiliki fungsi setara (no. kat. 56404), lakukan ekstraksi DNA sesuai dengan petunjuk dalam buku pegangan yang menyatakan hal-hal berikut:

- Jangan gunakan QIAGEN Deparaffinization Solution. Hanya gunakan metode xilena/etanol untuk deparafinisasi yang dijelaskan dalam *Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Pastikan untuk menggunakan etanol tingkat biologi molekuler\* untuk semua tahapan yang diperlukan.
- Kikis seluruh area jaringan dari dua bagian ke dalam tabung mikrosentrifugasi berlabel menggunakan pisau bedah baru untuk masing-masing sampel.
- Pencernaan Proteinase K (tahap 11 dalam *Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) harus dilakukan selama 1 jam ± 5 menit pada suhu 56 °C ± 3 °C.
- Pencernaan Proteinase K (tahap 12 dalam *Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) harus dilakukan selama 1 jam ± 5 menit pada suhu 90 °C ± 3 °C.
- Jangan gunakan tahap RNase yang dijelaskan dalam *Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Sampel harus dielusi dengan 120 µl dapar elusi (ATE) dari QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (tahap 20 dalam *Buku Pegangan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*).
- DNA genomik dapat disimpan pada suhu 2–8 °C selama 1 minggu pasca ekstraksi, atau pada suhu –30 hingga –15 °C sampai 8 minggu sebelum digunakan.

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

\* Jangan gunakan alkohol denaturasi, yang mengandung bahan lain seperti metanol atau metiletiketon.

## Protokol: Penilaian sampel

Protokol ini digunakan untuk menilai total DNA yang dapat diperkuat dalam sampel menggunakan “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” dari Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package untuk penilaian sampel otomatis.

Catatan: Untuk penilaian sampel DNA manual lihat Lampiran A: Protokol Panduan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

### Poin penting sebelum memulai

- Untuk mendapatkan hasil yang tepat, pastikan prosedur pencampuran yang dijelaskan dilakukan di setiap tahap pencampuran proses pengaturan uji kadar.
- Maksimal 24 sampel yang dapat dinilai menggunakan campuran reaksi kontrol yang tersedia.
- Sebelum memulai prosedur, baca bagian Tindakan pencegahan umum.
- Luangkan waktu untuk membiasakan diri dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sebelum memulai protokol. Lihat manual pengguna instrumen.
- Jangan melakukan proses vorteks polimerase DNA *Taq* (tabung *Taq*) atau campuran apa pun yang mengandung polimerase DNA *Taq*, karena hal ini dapat menonaktifkan enzim.
- Masukkan *Taq* dengan meletakkan ujung pipet di bawah permukaan cairan agar ujungnya tidak terlapsi lebih enzim.
- Gunakan campuran reaksi kontrol (tabung CTRL) untuk menilai DNA sebelum pengujian.  
Catatan: Penting untuk menggunakan campuran reaksi kontrol seperti yang dijelaskan di bawah untuk penilaian ini dan bukan spektrofotometri atau metode alternatif lain. DNA yang menurun drastis tidak dapat diperkuat meski primer menghasilkan fragmen DNA pendek.
- Untuk penggunaan reagen yang efisien dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, tetapkan batch sampel DNA sejauh mungkin untuk menciptakan proses lengkap. Pengujian sampel secara individu atau dalam jumlah kecil menghabiskan lebih banyak reagen dan mengurangi jumlah keseluruhan sampel yang dapat diuji dengan satu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Hal yang harus dilakukan sebelum memulai

- Pastikan bahwa perangkat lunak *therascreen* EGFR CE Assay Package terpasang sebelum pertama kali menggunakan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (lihat Lampiran B: Pemasangan *therascreen* EGFR CE Assay Package).
- Sebelum setiap penggunaan, semua reagen harus dicairkan sepenuhnya selama minimal 1 jam dan maksimal 4,5 jam pada suhu ruang (15–25 °C), dicampurkan dengan membalikkan 10 kali, dan sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi di bagian dasar tabung.
- Pastikan bahwa *Taq* dalam suhu ruang (15–25 °C) sebelum tiap penggunaan. Sentrifugasi tabung sekejap untuk mengumpulkan enzim di bagian dasar tabung.
- Campurkan semua sampel dengan membalikkan 10 kali, lalu sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi di bagian dasar tabung.

## Prosedur

1. Cairkan Campuran Reaksi Kontrol (CTRL), air bebas-nuklease untuk Kontrol Tanpa Templat (NTC), dan Kontrol Positif (PC) EGFR pada suhu sekitar (15–25 °C) selama minimal 1 jam dan maksimal 4,5 jam.

Waktu pencairan reagen, pengaturan PCR, dan penyimpanan sebelum memulai proses ditunjukkan dalam Tabel 2.

**Tabel 2. Waktu pencairan, waktu pengaturan PCR, dan suhu penyimpanan**

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

Catatan: Pengaturan PCR dilakukan pada suhu sekitar (15–25 °C). Istilah “penyimpanan” merujuk pada waktu antara selesainya pengaturan PCR dan dimulainya proses PCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

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

2. Jika reagen telah dicairkan, campurkan dengan membalik masing-masing tabung 10 kali untuk menghindari konsentrasi garam yang terlokalisasi, lalu sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi pada bagian dasar tabung.
3. Siapkan campuran master Kontrol yang (Campuran Reaksi Kontrol [CTRL] ditambah *Taq*) secukupnya untuk sampel DNA, reaksi PC EGFR, dan reaksi NTC sesuai dengan volume dalam Tabel 3. Sertakan reagen untuk satu sampel tambahan untuk membiarkan lebih dari yang memadai untuk pengaturan PCR.

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

**Tabel 3. Penyiapan campuran master uji kadar Kontrol**

Komponen	Volume
Campuran Reaksi Kontrol (CTRL)	19,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)^*$
Polimerase DNA <i>Taq</i> ( <i>Taq</i> )	0,5 $\mu\text{l} \times (n + 1)$
Total volume	20 $\mu\text{l}$ /reaksi

\* n = jumlah reaksi (sampel ditambah kontrol). Siapkan campuran master secukupnya untuk satu sampel tambahan (n + 1) untuk membiarkan adanya cakupan yang memadai untuk pengaturan PCR. Nilai n tidak boleh lebih dari 26 (24 sampel, dan 2 kontrol).

Catatan: Saat menyiapkan campuran master, volume yang diperlukan untuk Campuran Reaksi Kontrol ditambahkan ke tabung yang relevan terlebih dahulu kemudian *Taq* ditambahkan terakhir.

4. Campurkan campuran master hingga rata dengan memipetkan naik turun 10 kali secara perlahan. Letakkan sejumlah tabung strip dalam blok pemuatan sesuai dengan tata letak dalam Tabel 4. Segera tambahkan 20 µl campuran master ke setiap tabung strip PCR.

Tutup sisanya dalam wadah plastik hingga dibutuhkan. Untuk penilaian sampel DNA, campuran master uji kadar Kontrol ditambahkan ke satu tabung PC, satu tabung NTC, dan satu tabung untuk masing-masing sampel.

**Tabel 4. Tata letak uji kadar penilaian sampel DNA dalam blok pemuatan. Angka menunjukkan posisi dalam blok pemuatan dan menunjukkan posisi akhir rotor.**

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

5. Segera tambahkan 5 µl air untuk NTC ke tabung dalam posisi 2 lalu tutup tabungnya.

6. Tambahkan 5 µl dari setiap sampel ke tabung sampel (posisi tabung 3–26) lalu tutup tabungnya.

7. Tambahkan 5 µl PC EGFR ke tabung dalam posisi 1 lalu tutup tabungnya.

Catatan: Berhati-hatilah untuk menghindari kesalahan pemipetan atau pemuatan guna memastikan penambahan NTC, sampel, dan PC yang tepat ke tabung yang benar. Tandai tutup tabung untuk menunjukkan arah pemuatan tabung ke dalam instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Setelah semua tabung PCR ditutup, lakukan pemeriksaan visual pada tingkat pengisian tabung sampel guna memastikan sampel telah ditambahkan ke semua tabung.

9. Balikkan semua tabung PCR 4 kali untuk mencampurkan sampel dan campuran reaksi.

10. Letakkan tabung strip PCR ke posisi yang sesuai pada 72-well rotor sesuai dengan tata letak dalam Tabel 4.

Jika rotor tidak terisi penuh, isi semua posisi kosong pada rotor dengan tabung kosong tertutup.

11. Segera letakkan 72-well rotor ke dalam instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Pastikan bahwa ring penguncian (aksesori instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) diletakkan di atas rotor untuk mengamankan tabung selama proses berlangsung.

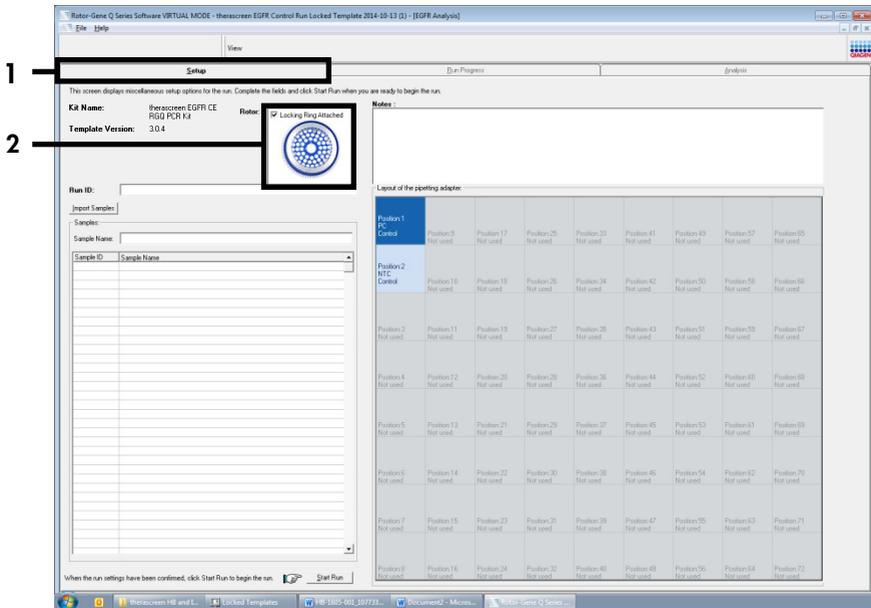
Catatan: Jika menggunakan penilaian sampel manual, lihat Lampiran A: *Protokol Panduan theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.

12. Klik dua kali ikon *theascreen* EGFR CE Control Run Locked Template (Templat Terkunci Kontrol Proses *theascreen* EGFR CE) di desktop komputer yang terhubung pada instrumen Rotor-Gene Q MDx untuk memulai perangkat lunak Rotor-Gene Q (Gambar 1).



**Gambar 1.** Ikon Templat Terkunci EGFR CE untuk kontrol proses (penilaian sampel).

13. Tab "Setup" (Pengaturan) akan terbuka sebagai default (Gambar 2). Pastikan bahwa ring penguncian terpasang dengan benar, kemudian centang kotak Locking Ring Attached (Ring Penguncian Terpasang). Tutup penutup instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.



Gambar 2. Tab “Setup” (Pengaturan) (1) dan kotak “Locking Ring Attached” (Ring Penguncian Terpasang) (2).

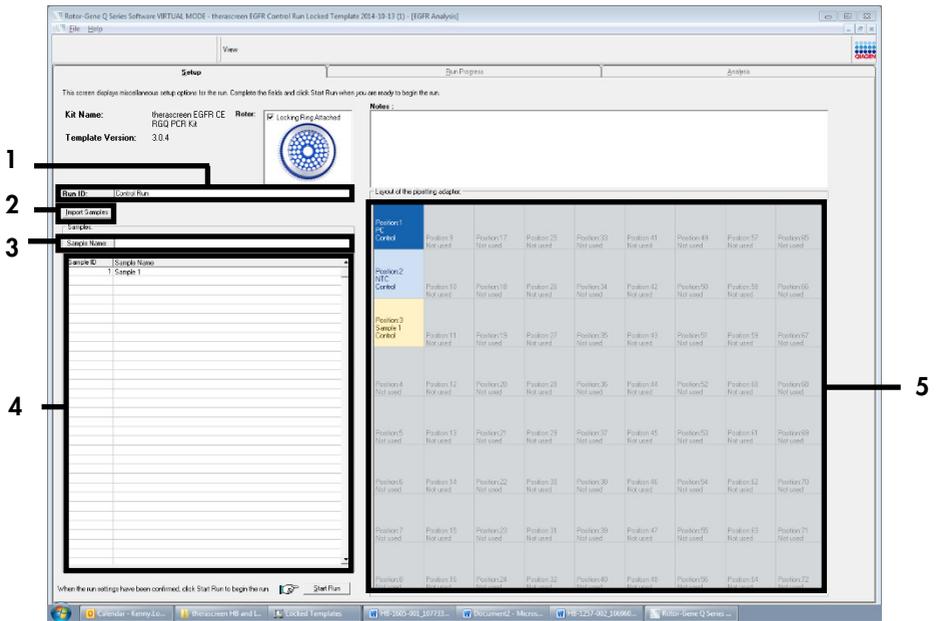
14. Masukkan ID proses dalam bidang Run ID (ID Proses) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda. Masukkan nama sampel dalam bidang Sample Name (Nama Sampel) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda lalu tekan tombol Return (Kembali).

Ini menambahkan nama sampel ke daftar sampel di bawah dan menetapkan “Sample ID” (ID Sampel) untuk sampel (1, 2, 3, dst.). Selain itu, panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet) di sebelah kanan diperbarui untuk menyertakan nama sampel (Gambar 3).

Catatan: Selain itu, nama sampel yang disimpan dalam format \*.smp (file sampel Rotor-Gene Q) atau \*.csv (comma separated values (nilai yang dipisahkan koma)) dapat diimpor menggunakan fitur Import Samples (Impor Sampel). Nama sampel terisi otomatis menggunakan metode ini.

Catatan: Dalam panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet), periksa bahwa tambahan nama sampel tersoroti dengan adanya perubahan warna dan nama sampel berada dalam posisi sampel (Gambar 3).

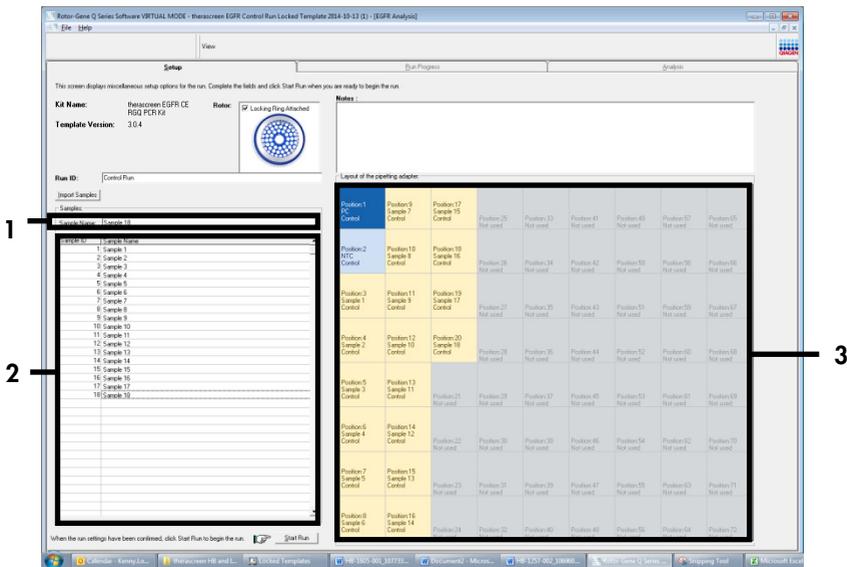
Catatan: Nama sampel yang mengandung lebih dari 8 karakter mungkin tidak ditampilkan penuh dalam panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet).



**Gambar 3.** Memasukkan “Run ID” (ID Proses) dan “Sample Name” (Nama Sampel). 1 = Bidang dialog “Run ID” (ID Proses); 2 = Panel “Import Samples” (Impor Sampel); 3 = Bidang dialog “Sample Name” (Nama Sampel); 4 = “Sample List” (Daftar Sampel); 5 = Panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet).

15. Ulangi tahap 14 untuk memasukkan nama semua sampel tambahan (Gambar 4).

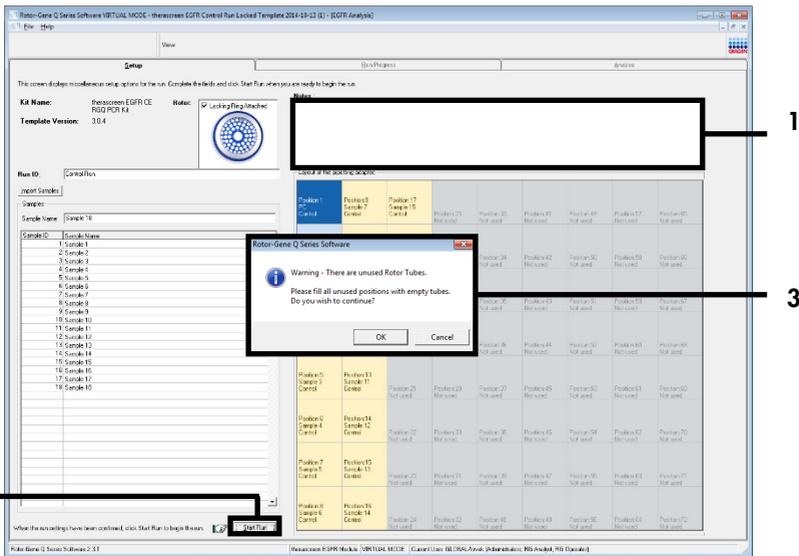
Catatan: Untuk mengedit nama sampel, klik Sample Name (Nama Sampel) dalam daftar sampel lalu sampel yang terpilih akan muncul dalam bidang Sample Name (Nama Sampel) di atas. Edit nama sampel sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda lalu tekan tombol Return (Kembali) untuk memperbarui nama.



**Gambar 4.** Memasukkan nama sampel tambahan dalam bidang “Sample Name” (Nama Sampel). 1 = Bidang dialog “Sample Name” (Nama Sampel); 2 = “Sample List” (Daftar Sampel); 3 = Panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet).

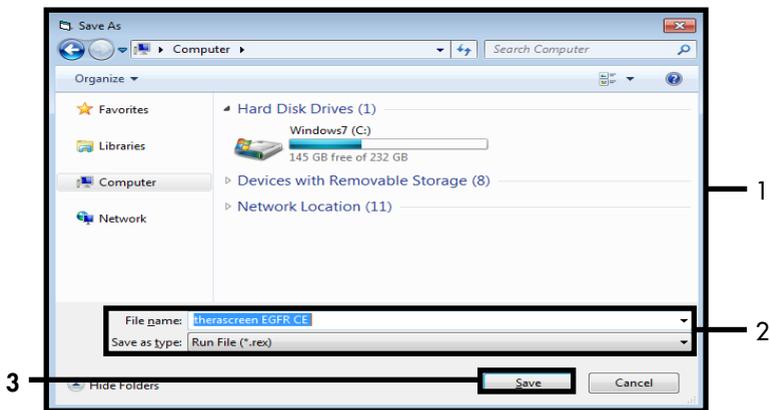
16. Jika semua nama sampel dimasukkan, periksa apakah sudah benar. Tambahkan informasi lain dalam bidang Notes (Catatan) bila perlu, lalu klik Start Run (Mulai Proses) (Gambar 5).

Catatan: Jika ada posisi rotor yang tidak digunakan, "Warning" (Peringatan) akan muncul (Gambar 5) untuk mengingatkan pengguna bahwa semua posisi yang tidak digunakan pada rotor harus diisi dengan tabung kosong tertutup. Periksa bahwa semua posisi rotor yang tidak digunakan terisi dengan tabung kosong tertutup lalu klik OK (Oke) untuk memproses. Jendela "Save As" (Simpan Sebagai) akan terbuka.



Gambar 5. Bidang "Notes" (Catatan) (1), tombol "Start Run" (Mulai Proses) (2), dan "Warning" (Peringatan) posisi rotor yang tidak digunakan (3).

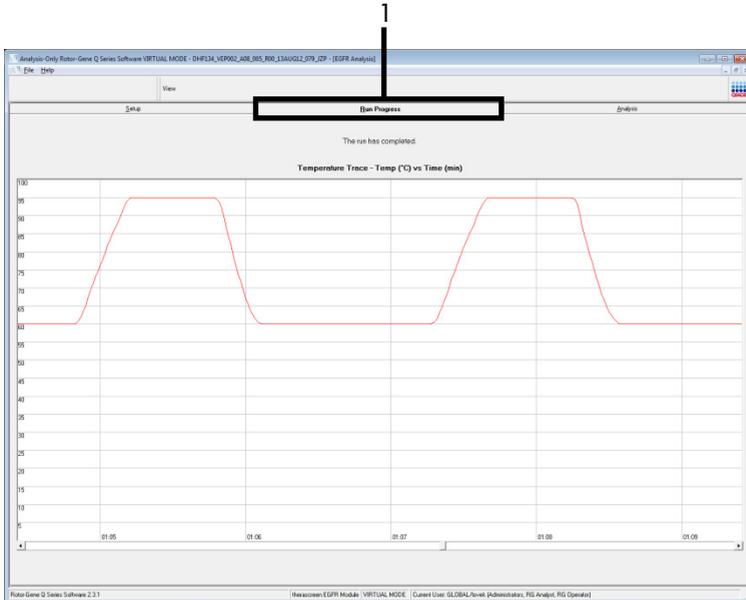
17. Pilih nama file yang sesuai lalu simpan proses PCR sebagai file proses \*.rex pada lokasi yang dipilih. Klik Save (Simpan) (Gambar 6).



**Gambar 6.** Jendela "Save As" (Simpan Sebagai) (1). 2 = Bidang "File Name" (Nama File) dan "Save as type" (Simpan sebagai tipe); 3 = "Save" (Simpan).

Proses PCR dimulai.

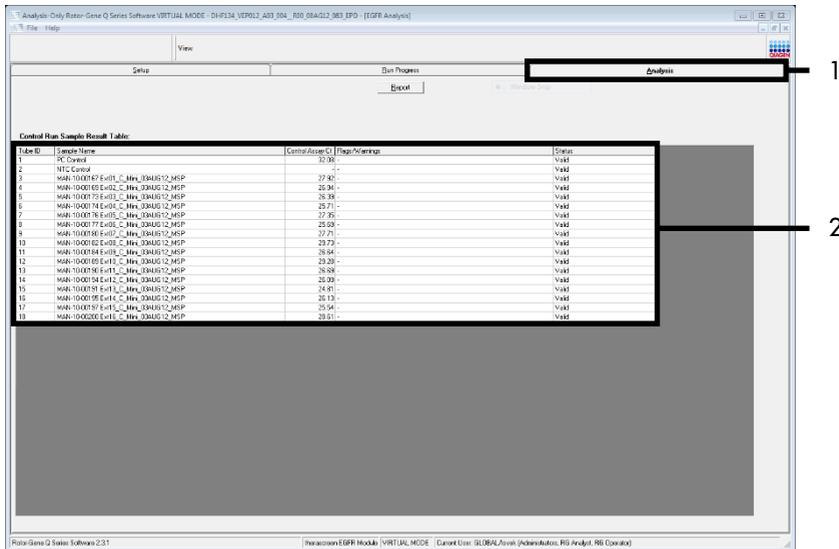
Catatan: Saat proses berjalan, tab “Run Progress” (Proses Operasi) terbuka untuk menampilkan jejak suhu dan sisa waktu proses (Gambar 7).



**Gambar 7. Tab Run Progress (Proses Operasi) (1).**

Catatan: Setelah proses selesai, tab “Analysis” (Analisis) terbuka. Jika tab Analysis (Analisis) gagal terbuka, klik tab Analysis (Analisis) (Gambar 8).

Catatan: Penjelasan metode perhitungan disajikan dalam bab “Interpretasi Hasil (Otomatis)”.



Gambar 8. "Tab "Analysis" (Analisis) (1) dan pelaporan hasil (2 = "Control Run Sample Result Table" (Tabel Hasil Sampel Proses Kontrol)).

Hasil kontrol dilaporkan sebagai berikut dalam "Control Run Sample Result Table" (Tabel Hasil Sampel Proses Kontrol) (Gambar 8).

Kontrol proses (PC dan NTC, tabung posisi 1 dan 2, masing-masing). Jika hasil berada dalam rentang yang dapat diterima, masing-masing ditampilkan sebagai "Valid". Jika tidak, hasil "Invalid" (Tidak Valid) muncul.

$C_T$  reaksi kontrol sampel  $>31,10$ ; ditampilkan sebagai "Invalid" (Tidak Valid). Jumlah DNA tidak memadai untuk analisis mutasi. Uji ulang sampel. Jika jumlah DNA masih belum memadai, ekstrak beberapa jaringan tumor jika tersedia.

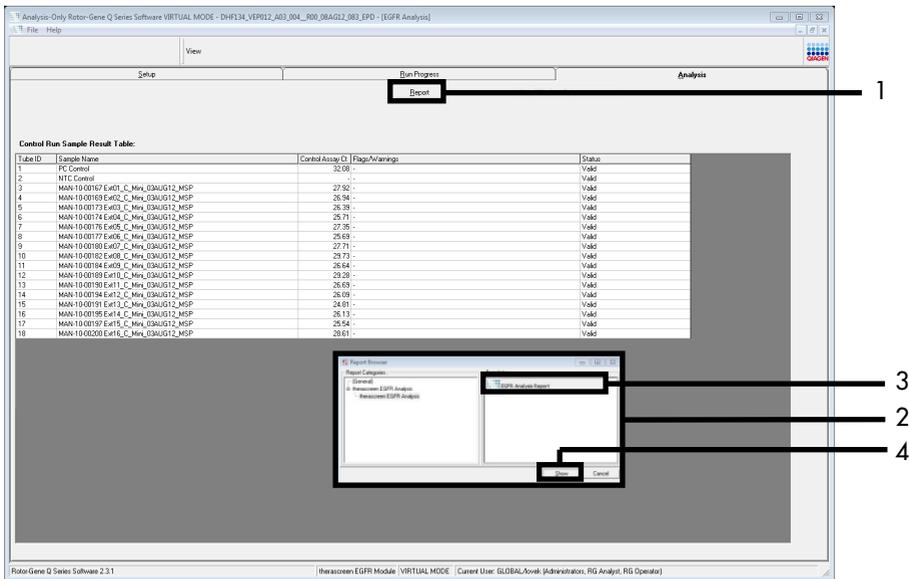
$C_T$  reaksi kontrol sampel  $<23,70$ ; ditampilkan sebagai "Invalid" (Tidak Valid). Konsentrasi DNA terlalu tinggi untuk analisis mutasi. Encerkan dengan Air Bebas-Nuklease untuk Pengenceran (Dil.) lalu uji ulang. Encerkan menjadi  $C_T$  sebesar 23,70–31,10. Pengenceran dengan rasio 1:1 meningkatkan nilai  $C_T$  sebesar kurang lebih 1,0.

$C_T$  reaksi kontrol sampel sebesar 23,70–31,10 ( $23,70 \leq C_T \text{ Kontrol} \leq 31,10$ ); ditampilkan sebagai "Valid". Konsentrasi DNA sesuai untuk analisis mutasi.

Catatan: Jika diperlukan pengenceran atau ekstraksi ulang, ulangi reaksi kontrol untuk memastikan bahwa konsentrasi DNA sesuai untuk digunakan.

18. Klik Report (Laporan) untuk memproduksi file laporan. Jendela "Report Browser" (Browser Laporan) terbuka. Pilih EGFR CE Analysis Report (Laporan Analisis CE EGFR) pada "Templates" (Templat), lalu klik Show (Tampilkan) (Gambar 9).

Catatan: Untuk menyimpan laporan di lokasi alternatif dalam format Arsip Web, klik Save As (Simpan Sebagai) di sudut kiri atas laporan masing-masing.



**Gambar 9. Memilih "EGFR CE Analysis Report" (Laporan Analisis CE EGFR).** 1 = "Report" (Laporan); 2 = jendela "Report Browser" (Browser Laporan); 3 = pilihan "EGFR Analysis Report" (Laporan Analisis EGFR); 4 = "Show" (Tampilkan).

---

## Protokol: Deteksi mutasi EGFR

Protokol ini adalah untuk deteksi mutasi EGFR. Jika sampel telah lolos penilaian sampel DNA, sampel dapat diuji dengan uji kadar mutasi EGFR menggunakan perangkat lunak otomatis.

Catatan: Untuk deteksi mutasi manual, lihat Lampiran A: *Protokol Panduan theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.

### Poin penting sebelum memulai

- Untuk mendapatkan hasil yang tepat, pastikan prosedur pencampuran yang dijelaskan dilakukan di setiap tahap pencampuran proses pengaturan uji kadar.
- Sebelum memulai prosedur, baca bagian Tindakan pencegahan umum.
- Luangkan waktu untuk membiasakan diri dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sebelum memulai protokol. Lihat manual pengguna instrumen.
- Sampel dapat diuji menggunakan uji kadar mutasi EGFR jika lolos penilaian sampel DNA.
- Untuk penggunaan *theascreen EGFR RGQ PCR Kit* yang efisien, sampel harus dikelompokkan ke dalam batch yang masing-masing berisi tujuh. Ukuran batch yang lebih kecil berarti sampel yang lebih sedikit dapat diuji dengan *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.
- Sampel harus diuji menggunakan semua campuran reaksi yang disediakan dalam *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*.
- Jangan melakukan proses vorteks *Taq* atau campuran apa pun yang mengandung *Taq*, karena hal ini dapat menonaktifkan enzim.
- Masukkan *Taq* secara hati-hati dengan meletakkan ujung pipet di bawah permukaan cairan agar ujungnya tidak terlapisi lebih enzim.

### Hal yang harus dilakukan sebelum memulai

- Pastikan bahwa perangkat lunak *theascreen EGFR CE Assay Package* terpasang sebelum pertama kali menggunakan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (lihat Lampiran B: Pemasangan *theascreen EGFR CE Assay Package*).

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

## Prosedur

1. Cairkan semua tabung campuran reaksi, air untuk NTC, dan PC EGFR pada suhu sekitar (15–25 °C) selama minimal 1 jam dan maksimal 4,5 jam.

Waktu pencairan reagen, pengaturan PCR, dan penyimpanan sebelum memulai proses ditunjukkan dalam Tabel 5.

**Tabel 5. Waktu pencairan, waktu pengaturan PCR, dan suhu penyimpanan**

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

Catatan: Pengaturan PCR dilakukan pada suhu sekitar (15–25 °C). Penyimpanan merujuk pada waktu antara selesainya pengaturan PCR dan dimulainya proses PCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

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

2. Jika reagen telah dicairkan, campurkan dengan membalik masing-masing tabung 10 kali untuk menghindari konsentrasi garam yang terlokalisasi, lalu sentrifugasi sekejap untuk mengumpulkan isi pada bagian dasar tabung.

3. Siapkan campuran master uji kadar (campuran reaksi uji kadar ditambah *Taq*) secukupnya untuk sampel DNA, PC EGFR, dan reaksi NTC sesuai dengan volume dalam Tabel 6. Sertakan reagen untuk satu sampel tambahan untuk membiarkan lebihan yang memadai untuk pengaturan PCR.

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

**Tabel 6. Penyiapan campuran master uji kadar**

Uji Kadar	Tabung campuran reaksi	Volume campuran reaksi	Volume polimerase DNA <i>Taq</i> (tabung <i>Taq</i> )
Kontrol	CTRL	19,5 µl x (n+1)*	0,5 µl x (n+1)*
T790M	T790M	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
Penghapusan	Del	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
L858R	L858R	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
L861Q	L861Q	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
G719X	G719X	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
S768I	S768I	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
Sisipan	Ins	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)

\* n = jumlah reaksi (sampel ditambah kontrol). Siapkan campuran master secukupnya untuk satu sampel tambahan (n + 1) untuk membiarkan adanya lebihan yang memadai untuk pengaturan PCR. Nilai n tidak boleh melebihi tujuh (ditambah kontrol) karena tujuh adalah jumlah maksimal sampel yang dapat disertakan dalam satu proses.

4. Campurkan campuran master uji kadar hingga rata dengan memipetkan naik turun 10 kali secara perlahan. Letakkan sejumlah tabung strip dalam blok pemuatan sesuai dengan tata letak dalam Tabel 7. Segera tambahkan 20 µl campuran master uji kadar master secukupnya ke setiap tabung strip PCR.

Tutup sisanya dalam wadah plastik hingga dibutuhkan.

**Tabel 7. Tata letak uji kadar mutasi dan kontrol dalam blok pemuatan. Angka menunjukkan posisi dalam blok pemuatan dan menunjukkan posisi akhir rotor.**

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

5. Segera tambahkan 5 µl air untuk NTC ke tabung dalam posisi 9–16 lalu tutup tabungnya.

6. Tambahkan 5 µl dari setiap sampel ke tabung sampel (posisi tabung 17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64, dan 65–72) lalu tutup tabungnya.

7. Tambahkan 5 µl PC EGFR ke tabung dalam posisi 1–8 lalu tutup tabungnya.

Berhati-hatilah untuk menghindari kesalahan pipetkan atau pemuatan guna memastikan penambahan NTC, sampel, dan PC EGFR yang tepat ke tabung yang benar.

Tiap tabung harus berisi total volume reaksi sebanyak 25 µl (20 µl campuran master uji kadar yang disiapkan dalam tahap 3 (Tabel 6) ditambah 5 µl NTC/sampel/PC). Angka menunjukkan posisi dalam blok pemuatan dan menunjukkan posisi akhir rotor.

Tandai tutup tabung untuk menunjukkan arah pemuatan tabung ke dalam instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. Setelah semua tabung PCR ditutup, lakukan pemeriksaan visual pada tingkat pengisian tabung sampel guna memastikan sampel telah ditambahkan ke semua tabung.
9. Balikkan semua tabung PCR 4 kali untuk mencampurkan sampel dan campuran reaksi.
10. Letakkan tabung strip PCR ke posisi yang sesuai pada 72-well rotor sesuai dengan tata letak dalam Tabel 7.

Maksimal 7 sampel dapat disertakan dalam setiap proses PCR. Jika rotor tidak terisi penuh, isi semua posisi kosong pada rotor dengan tabung kosong tertutup.

11. Segera letakkan 72-well rotor ke dalam instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Pastikan bahwa ring penguncian (aksesori instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) diletakkan di atas rotor untuk mengamankan tabung selama proses berlangsung.

Catatan: Jika menggunakan deteksi mutasi EGFR manual, lihat Lampiran A: Protokol Panduan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

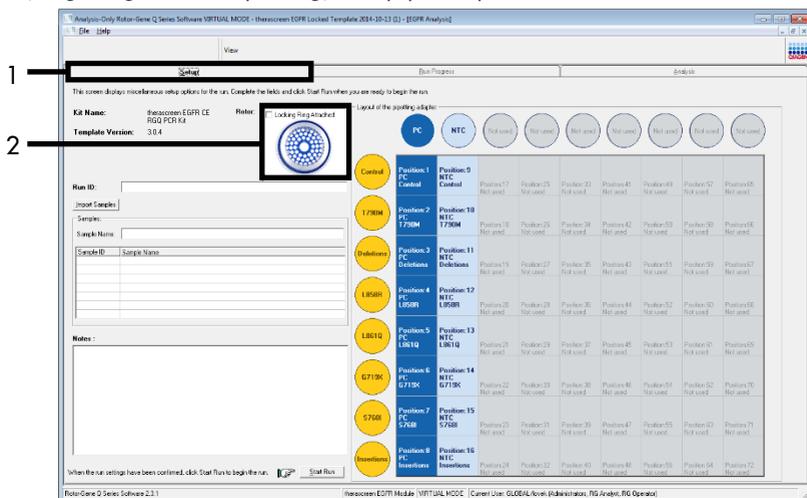
12. Klik dua kali ikon *therascreen* EGFR CE Locked Template (Templat Terkunci *therascreen* EGFR CE) di desktop laptop yang terhubung pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM untuk memulai perangkat lunak Rotor-Gene Q (Gambar 10).



therascreen EGFR CE  
Locked Template

**Gambar 10. Ikon EGFR CE Locked Template (Templat Terkunci EGFR CE) (Deteksi mutasi EGFR).**

13. Tab “Setup” (Pengaturan) akan terbuka sebagai default (Gambar 11). Pastikan bahwa ring penguncian terpasang dengan benar kemudian centang kotak **Locking Ring Attached** (Ring Penguncian Terpasang). Tutup penutup instrumen Rotor-Gene Q MDx 5 plex HRM.



Gambar 11. Tab “Setup” (Pengaturan) (1) dan kotak “Locking Ring Attached” (Ring Penguncian Terpasang) (2).

14. Masukkan ID proses dalam bidang Run ID (ID Proses) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda. Masukkan nama sampel dalam bidang Sample Name (Nama Sampel) sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda lalu tekan tombol Return (Kembali).

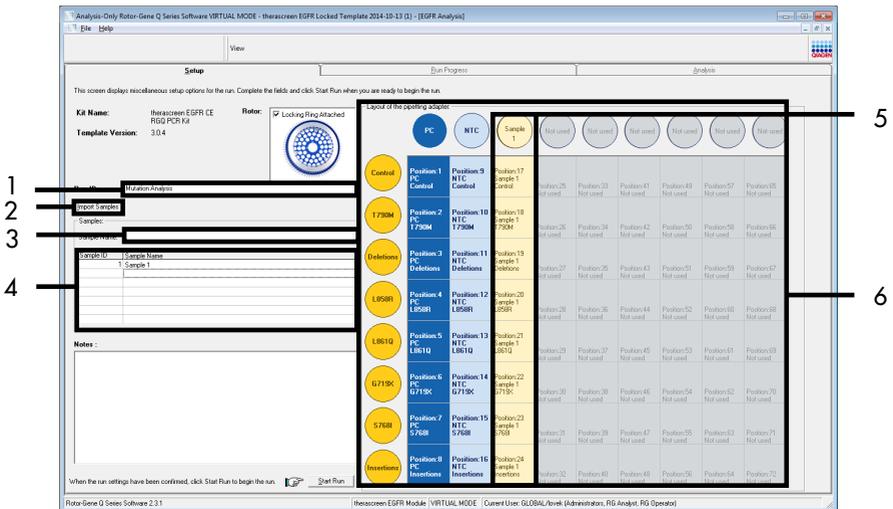
Ini menambahkan nama sampel ke daftar sampel di bawah dan menetapkan “Sample ID” (ID Sampel) untuk sampel (1, 2, 3, dst.). Selain itu, panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet) di sebelah kanan diperbarui untuk menyertakan nama sampel (Gambar 12).

Catatan: Selain itu, nama sampel yang disimpan dalam format \*.smp (file sampel Rotor-Gene Q) atau \*.csv (comma separated values (nilai yang dipisahkan koma)) dapat diimpor menggunakan tombol Import Samples (Impor Sampel). Nama sampel terisi otomatis menggunakan metode ini.

Catatan: Dalam panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet), periksa bahwa tambahan nama sampel tersoroti dengan adanya perubahan warna dan nama sampel berada dalam posisi sampel (Gambar 12).

Catatan: Maksimum 7 sampel dapat ditambahkan. ID sampel (dalam lingkaran sampel) secara otomatis ditetapkan mulai 1 hingga 7.

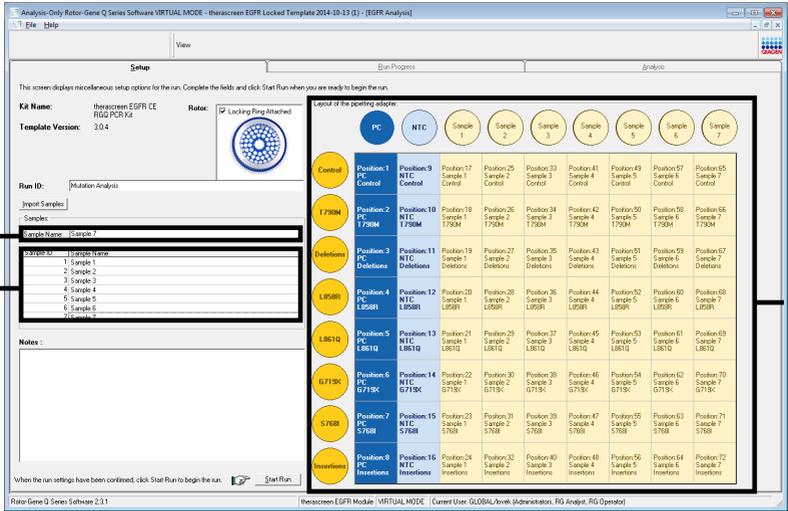
Catatan: Nama sampel yang mengandung lebih dari 8 karakter mungkin tidak ditampilkan penuh dalam panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet).



**Gambar 12.** Memasukkan “Run ID” (ID Proses) dan “Sample Name” (Nama Sampel). 1 = Bidang “Run ID” (ID Proses); 2 = Tombol “Import Samples” (Impor Sampel); 3 = Bidang “Sample Name” (Nama Sampel); 4 = “Sample List” (Daftar Sampel); 5 = Panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet); 6 = Lingkaran sampel yang disoroti dan kolom 8 uji kadar di bawahnya.

15. Ulangi tahap 14 untuk memasukkan nama semua sampel tambahan (Gambar 13).

Catatan: Untuk mengedit nama sampel, klik Sample Name (Nama Sampel) dalam daftar sampel lalu sampel yang terpilih muncul dalam bidang Sample Name (Nama Sampel) di atas. Edit nama sampel sesuai dengan konvensi penamaan lokal Anda lalu tekan tombol Return (Kembali) untuk memperbarui nama.



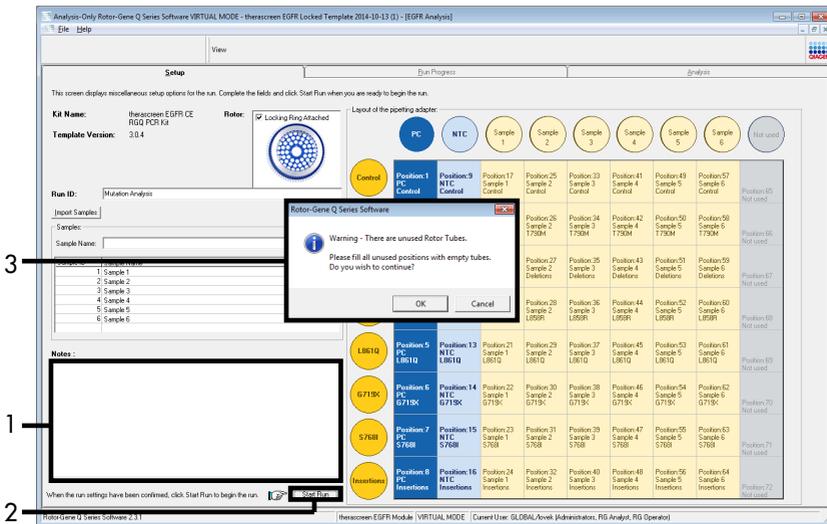
1  
2

3

**Gambar 13.** Memasukkan nama sampel tambahan dalam bidang “Sample Name” (Nama Sampel). 1 = Bidang “Sample Name” (Nama Sampel); 2 = “Sample List” (Daftar Sampel); 3 = Panel “Layout of the pipetting adapter” (Tata letak adaptor pipet).

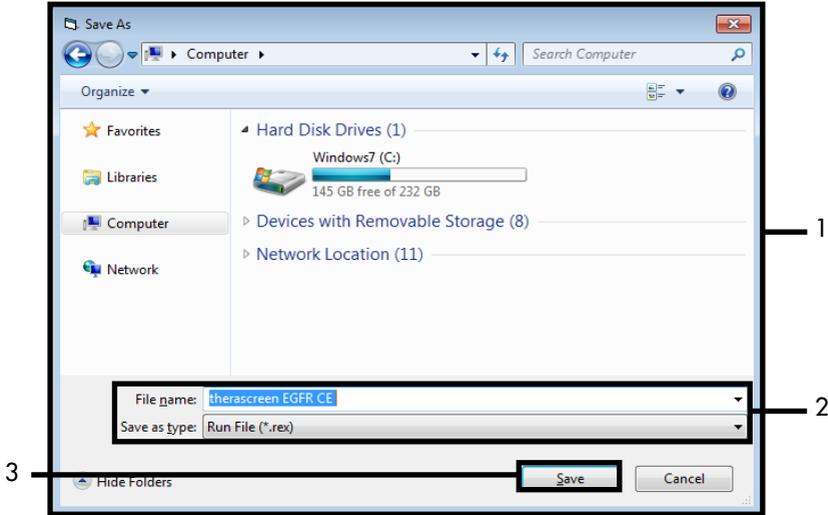
16. Jika semua nama sampel dimasukkan, periksa apakah sudah benar. Tambahkan informasi lain dalam bidang Notes (Catatan) bila perlu, lalu klik Start Run (Mulai Proses) (Gambar 14).

Catatan: Jika ada posisi rotor yang tidak digunakan, “Warning” (Peringatan) akan muncul (Gambar 14) untuk mengingatkan pengguna bahwa semua posisi yang tidak digunakan pada rotor harus diisi dengan tabung kosong tertutup. Periksa bahwa semua posisi rotor yang tidak digunakan terisi dengan tabung kosong tertutup lalu klik OK (Oke) untuk memproses.



Gambar 14. Bidang “Notes” (Catatan) (1), tombol “Start Run” (Mulai Proses) (2), dan “Warning” (Peringatan) posisi rotor yang tidak digunakan (3).

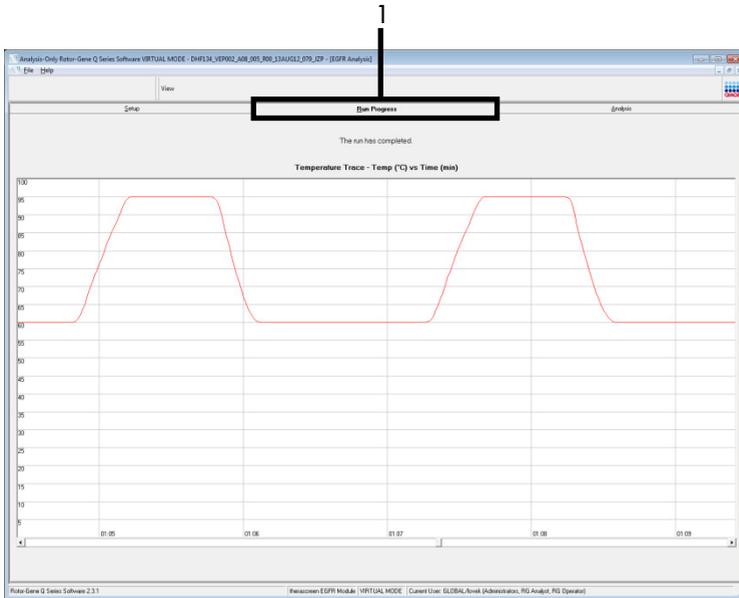
17. Jendela “Save As” (Simpan Sebagai) terbuka. Masukkan nama file yang sesuai lalu simpan proses PCR sebagai file proses \*.rex pada lokasi yang dipilih. Klik Save (Simpan) (Gambar 15).



**Gambar 15. Jendela “Save As” (Simpan Sebagai) (1).** 2 = Bidang “File Name” (Nama File) dan “Save as type” (Simpan sebagai tipe); 3 = “Save” (Simpan).

Proses PCR dimulai.

Catatan: Saat proses berjalan, tab “Run Progress” (Proses Operasi) terbuka untuk menampilkan jejak suhu dan sisa waktu proses (Gambar 16).

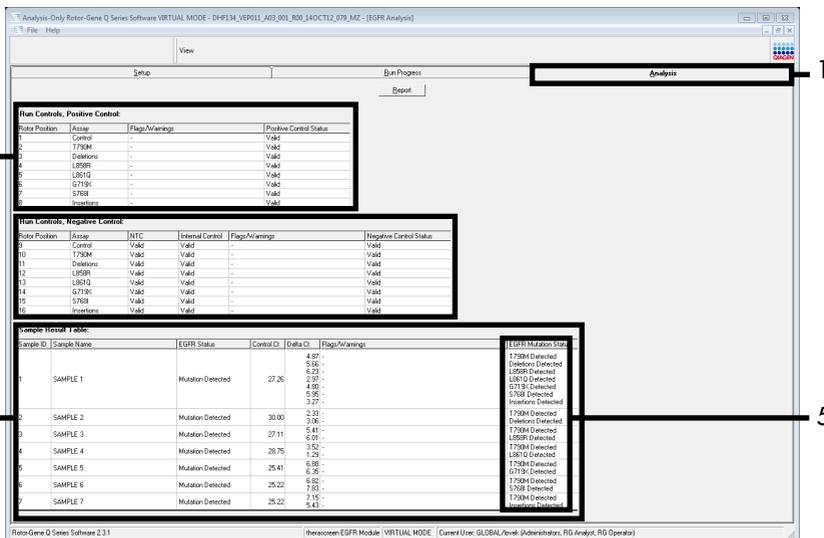


**Gambar 16. Tab “Run Progress” (Proses Operasi).**

Setelah proses selesai, tab “Analysis” (Analisis) terbuka.

Catatan: Jika tab “Analysis” (Analisis) gagal terbuka, klik tab “Analysis” (Analisis) (Gambar 17).

Catatan: Penjelasan metode perhitungan disajikan dalam bab “Interpretasi Hasil (Otomatis)”.



**Gambar 17. Tab “Analysis” (Analisis) (1) dan pelaporan hasil.** 2 = Panel “Run Controls, Positive Control” (Kontrol Proses, Kontrol Positif); 3 = Panel “Run Controls, Negative Control” (Kontrol Proses, Kontrol Negatif); 4 = “Sample Result Table” (Tabel Hasil Sampel); 5 = Panel “Mutation Status” (Status Mutasi).

Hasil uji kadar dilaporkan sebagai berikut (Gambar 18).

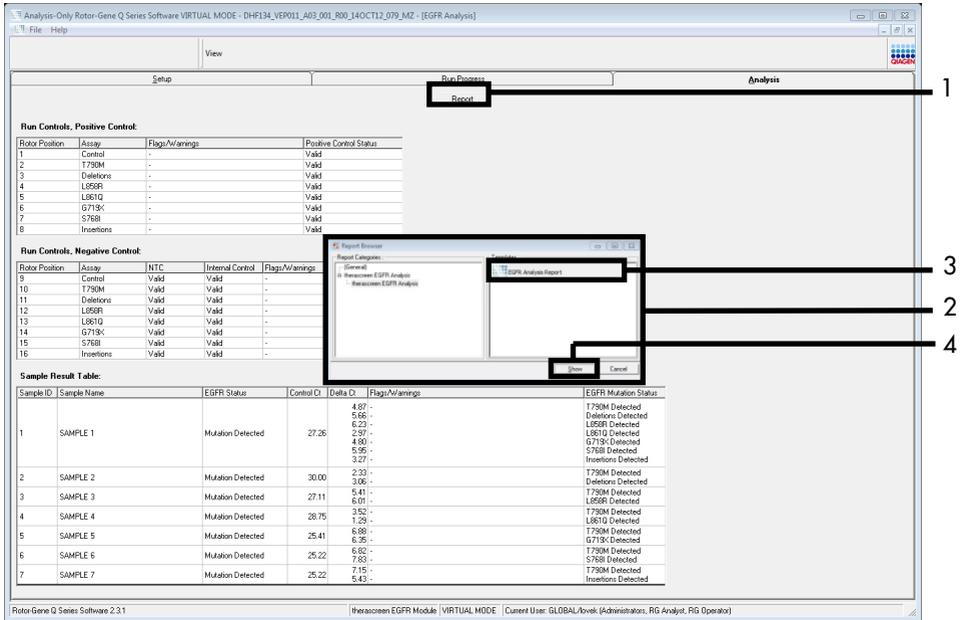
Run Controls, Positive Control (Kontrol Proses, Kontrol Positif): Jika hasil berada dalam rentang yang dapat diterima, “Positive Control Status” (Status Kontrol Positif) akan menampilkan “Valid”, dan jika tidak maka hasil “Invalid” (Tidak Valid) akan muncul.

Run Controls, Negative Control (Kontrol Proses, Kontrol Negatif): Jika hasil “NTC” dan “Internal Control” (Kontrol Internal) berada dalam rentang yang dapat diterima, “Negative Control Status” (Status Kontrol Negatif) akan menampilkan “Valid”, dan jika tidak maka hasil “Invalid” (Tidak Valid) akan muncul.

Sample Result Table (Tabel Hasil Sampel): Mutasi spesifik dilaporkan untuk sampel Positif Mutasi dalam kolom “EGFR Mutation Status” (Status Mutasi EGFR).

18. Klik Report (Laporan) untuk memproduksi file laporan. Jendela “Report Browser” (Browser Laporan) terbuka. Pilih EGFR CE Analysis Report (Laporan Analisis CE EGFR) pada Templates (Templat), lalu klik Show (Tampilkan) (Gambar 18).

Catatan: Untuk menyimpan laporan di lokasi alternatif dalam format Arsip Web, klik Save As (Simpan Sebagai) di sudut kiri atas laporan masing-masing.



**Gambar 18. Memilih “EGFR CE Analysis Report” (Laporan Analisis CE EGFR).** 1 = “Report” (Laporan); 2 = Panel “Report Browser” (Browser Laporan); 3 = “EGFR CE Analysis Report” (Laporan Analisis CE EGFR); 4 = “Show” (Tampilkan).

# Interpretasi Hasil (Otomatis)

Panggilan mutasi dan analisis dilakukan secara otomatis oleh *therascreen* EGFR Assay Package jika proses selesai. Informasi berikut menjelaskan cara *therascreen* EGFR Assay Package membuat panggilan mutasi dan analisis.

Catatan: Untuk analisis manual hasil, baca bagian Interpretasi Hasil (Manual).

Siklus PCR di mana fluoresens dari reaksi tertentu melintang terhadap nilai ambang batas ditetapkan sebagai nilai  $C_T$ . Nilai  $C_T$  menunjukkan jumlah DNA input tertentu. Nilai  $C_T$  yang rendah menunjukkan tingkat DNA input yang lebih tinggi, sedangkan nilai  $C_T$  yang tinggi menunjukkan tingkat DNA input yang rendah. Reaksi dengan nilai  $C_T$  tergolong sebagai amplifikasi positif.

Perangkat lunak Rotor-Gene Q menginterpolasi sinyal fluoresens antara dua nilai yang tercatat. Dengan demikian, nilai  $C_T$  dapat berupa bilangan nyata (tidak terbatas bilangan bulat) dalam rentang 0 hingga 40. Untuk *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, nilai ambang batas diatur pada 0,075 unit fluoresens relatif untuk saluran hijau (FAM) dan 0,02 untuk saluran kuning (HEX). Nilai ini secara otomatis terkonfigurasi dalam *therascreen* EGFR Assay Package. Kontrol proses (PC, NTC, dan IC) dinilai untuk memastikan bahwa nilai  $C_T$  yang dapat diterima telah terpenuhi, dan reaksi berjalan dengan benar.

Nilai  $\Delta C_T$  dihitung, untuk setiap uji kadar mutasi menggunakan persamaan:

$$\Delta C_T = [\text{nilai } C_T \text{ uji kadar mutasi}] - [\text{nilai } C_T \text{ uji kadar kontrol}]$$

Sampel digolongkan sebagai positif mutasi jika sampel memberi  $\Delta C_T$  dalam rentang cutoff  $\Delta C_T$  untuk uji kadar tersebut. Di atas rentang cutoff  $\Delta C_T$ , sampel dapat mengandung kurang dari persentase mutasi yang dapat dideteksi oleh *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (di luar batasan uji kadar), atau sampel negatif mutasi dan dilaporkan sebagai "No Mutation Detected" (Mutasi Tidak Terdeteksi). Di bawah rentang cutoff  $\Delta C_T$ , sampel akan dilaporkan sebagai "Invalid" (Tidak Valid).

---

Tidak adanya amplifikasi dalam reaksi mutasi dinilai sebagai “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi). Nilai  $\Delta C_T$  yang dihitung dari amplifikasi latar belakang diharapkan lebih besar dari batas atas cutoff dari rentang cutoff  $\Delta C_T$ , dan sampel digolongkan sebagai “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi).

Hasil uji kadar ditampilkan sebagai “Mutation Detected” (Mutasi Terdeteksi), “No Mutation Detected” (Mutasi Tidak Terdeteksi), “Invalid” (Tidak Valid), atau jika kontrol proses gagal, “Run Control Failed” (Kontrol Proses Gagal). Untuk sampel positif mutasi, mutasi spesifik akan dilaporkan. Tumor dapat mengandung lebih dari satu mutasi. Dalam hal tersebut, lebih dari satu mutasi akan dilaporkan.

---

## Tanda Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package

Tabel 8 (halaman berikutnya) mencantumkan kemungkinan tanda yang mungkin dibuat oleh Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package, artinya, dan tindakan yang perlu dilakukan.

Nama tanda dibuat untuk memberi informasi tentang komponen yang terpengaruh pada kit, sampel, atau kontrol yang terpengaruh dan mode kegagalan.

Sebagai contoh:

- PC\_CTRL\_ASSAY\_FAIL = Kontrol Positif (PC), Uji Kadar Kontrol (CTRL\_ASSAY) telah gagal (FAIL)
- NTC\_INT\_CTRL\_FAIL = Kontrol Tanpa Templat (NTC), Kontrol Internal (INT\_CTRL) telah gagal (FAIL)
- SAMPLE\_CTRL\_HIGH\_CONC = Sampel (SAMPLE), Uji Kadar Kontrol (CTRL) memiliki Konsentrasi Tinggi (HIGH\_CONC).

**Tabel 8. Tanda, arti dan tindakan yang perlu dilakukan**

Tanda	Arti	Tindakan
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Proses PCR tidak valid — C <sub>T</sub> FAM di luar rentang untuk kontrol positif dalam reaksi kontrol.	Ulangi seluruh proses PCR.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Proses PCR tidak valid — C <sub>T</sub> FAM di luar rentang untuk satu atau beberapa reaksi kontrol mutasi.	Ulangi seluruh proses PCR.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Proses PCR tidak valid — data fluoresens dalam kontrol positif (Campuran Reaksi Kontrol) tidak dapat diinterpretasikan.	Ulangi seluruh proses PCR dengan memperhatikan secara cermat tahapan pencampuran.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Proses PCR tidak valid — data fluoresens dalam kontrol positif (campuran reaksi mutasi) tidak dapat diinterpretasikan.	Ulangi seluruh proses PCR dengan memperhatikan secara cermat tahapan pencampuran.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Proses PCR tidak valid — kontrol internal di atas rentang untuk kontrol negatif.	Ulangi seluruh proses PCR.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Proses PCR tidak valid — kontrol internal di bawah rentang untuk kontrol negatif.	Ulangi seluruh proses PCR.
NTC_INVALID_CT	Proses PCR tidak valid — FAM tidak valid (lebih kecil dari batas) untuk kontrol negatif.	Ulangi seluruh proses PCR dengan memperhatikan secara cermat tahapan pencampuran.
NTC_INVALID_DATA	Proses PCR tidak valid — data fluoresens dalam kontrol negatif tidak dapat diinterpretasikan.	Ulangi seluruh proses PCR dengan memperhatikan secara cermat tahapan pencampuran.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Sampel tidak valid — data fluoresens dalam kontrol sampel tidak dapat diinterpretasikan.	Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel yang relevan dengan memperhatikan secara cermat tahapan pencampuran.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Sample Tidak Valid — C <sub>T</sub> FAM terlalu rendah dalam kontrol sampel.	Encerkan sampel untuk meningkatkan nilai C <sub>T</sub> kontrol. Pengenceran ini harus dihitung dengan asumsi bahwa mengencerkan 1:1 dengan air yang tersedia dalam kit akan meningkatkan C <sub>T</sub> sebesar 1,0; setelah sampel diencerkan, atur proses penilaian mutasi baru untuk mengulangi sampel. Atau jika sampel telah diencerkan dengan mengikuti proses penilaian sampel DNA, lanjutkan langsung ke proses deteksi mutasi EGFR dengan sampel yang telah diencerkan.

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

Tanda	Arti	Tindakan
SAMPLE_CTRL_FAIL	Sample tidak valid – $C_T$ FAM terlalu tinggi dalam reaksi kontrol sampel.	Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel. Jika sampel tidak valid pada proses pengulangan PCR, dan jika jumlah DNA masih belum sesuai, ekstrak 2 bagian jaringan FFPE lanjutan jika tersedia. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi ini. Jika sampel tidak valid, ulangi proses PCR pada ekstraksi kedua. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	$C_T$ terlalu tinggi (atau tidak ada $C_T$ ) untuk kontrol internal (HEX), negatif-mutasi saluran FAM.	<p>Untuk sampel yang menghasilkan tanda SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID dengan mutasi terdeteksi (atau tidak terdeteksi) dalam campuran reaksi mutasi yang relevan secara klinis – hasil laporan, tidak diperlukan pengujian lebih lanjut.</p> <p>Encerkan sampel dengan air yang tersedia dalam kit menggunakan asumsi bahwa mengencerkan dengan rasio 1:1 akan meningkatkan <math>C_T</math> kontrol reaksi sebesar 1,0, dengan memastikan volume akhir adalah &gt;40 <math>\mu</math>l (misalnya, 40 <math>\mu</math>l DNA dan 40 <math>\mu</math>l air dari tabung bertanda DIL).</p> <p>Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel. Jika tidak valid tetap terjadi pada proses PCR, ekstrak sampel dari dua bagian FFPE lanjutan. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi ini. Jika ekstraksi kedua tidak valid, encerkan seperti uraian di atas.</p> <p>Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Tabung mutasi tidak valid – $C_T$ HEX terlalu rendah untuk sampel (kontrol internal)	<p>Untuk sampel yang menghasilkan tanda SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID dengan mutasi terdeteksi (atau tidak terdeteksi) dalam campuran reaksi mutasi yang relevan secara klinis – hasil laporan, tidak diperlukan pengujian lebih lanjut.</p> <p>Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel. Jika tidak valid pada pengulangan proses PCR, ekstrak 2 bagian jaringan FFPE lanjutan jika tersedia. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi ini. Jika tidak valid, ulangi proses PCR pada ekstraksi kedua. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p>

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

Tanda	Arti	Tindakan
SAMPLE_INVALID_DATA	Tabung mutasi tidak valid — data fluoresens dalam kontrol internal tidak dapat diinterpretasikan.	<p>Untuk sampel yang menghasilkan tanda SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID dengan mutasi terdeteksi (atau tidak terdeteksi) dalam campuran reaksi mutasi yang relevan secara klinis – hasil laporan; tidak diperlukan pengujian lebih lanjut.</p> <p>Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel. Jika tidak valid pada pengulangan proses PCR, ekstrak 2 bagian jaringan FFPE lanjutan jika tersedia. Atur proses PCR baru untuk menguji ekstraksi ini. Jika tidak valid, ulangi proses PCR pada ekstraksi kedua. Jika sampel tidak memberikan hasil yang valid setelah proses ini, sampel diberi status mutasi tidak pasti dan tidak boleh dilakukan pengujian lebih lanjut.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Satu atau beberapa mutasi untuk satu sampel bersifat positif; di saat yang sama, satu atau beberapa mutasi untuk sampel yang sama tidak valid.	<p>Untuk sampel yang menghasilkan tanda SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID dengan mutasi terdeteksi (atau tidak terdeteksi) dalam campuran reaksi mutasi yang relevan secara klinis – hasil laporan, tidak diperlukan pengujian lebih lanjut.</p> <p>Untuk sampel yang menghasilkan tanda SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID dengan hasil INVALID (TIDAK VALID) yang diperoleh dalam campuran reaksi mutasi yang relevan secara klinis, uji ulang sampel dengan semua campuran reaksi dengan mengikuti tindakan tanda tidak valid spesifik.</p> <p>Jika tanda SAMPLE_INT_CTRL_FAIL dihasilkan dalam kombinasi dengan tanda lain untuk sampel yang terpengaruh, maka tindakan pengenceran sampel dari tanda SAMPLE_INT_CTRL_FAIL harus diikuti. Atur proses PCR baru dan uji ulang sampel.</p> <p>Untuk sampel yang menghasilkan tanda SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID dengan hasil INVALID (TIDAK VALID) yang diperoleh dalam campuran reaksi mutasi yang relevan secara klinis pada pengulangan proses PCR, ekstrak sampel dari 2 bagian FFPE lanjutan. Atur proses PCR baru dengan semua campuran reaksi untuk menguji ekstraksi ini.</p> <p>Jika sampel ini kembali memunculkan hasil tidak valid untuk campuran reaksi mutasi yang relevan secara klinis, ulangi sampel dengan semua campuran reaksi dengan mengikuti tindakan tanda tidak valid spesifik. Jika SAMPLE_INT_CTRL_FAIL dihasilkan dalam kombinasi dengan tanda lain untuk sampel yang terpengaruh, maka tindakan pengenceran sampel dari tanda SAMPLE_INT_CTRL_FAIL harus diikuti. Atur proses PCR baru dan uji ulang sampel ini.</p> <p>Jika tanda SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ditemukan pada pengulangan ini, sampel diberi status mutasi belum ditentukan.</p>

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

Tanda	Arti	Tindakan
MUTATION_EARLY_CT	Sampel tidak valid — $\Delta C_T$ terlalu rendah atau $C_T$ di bawah rentang cutoff	Atur proses PCR baru untuk mengulangi sampel dengan memperhatikan secara cermat tahapan pencampuran.

## Panduan Pemecahan Masalah

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

### Komentar dan saran

#### Sampel NTC menunjukkan hasil positif dalam saluran FAM Green

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

#### Tidak ada sinyal dengan kontrol Positif EGFR

- |  |  |
|--|--|
| a) Saluran fluoresens yang dipilih untuk analisis data PCR tidak sesuai dengan protokol. | Untuk analisis data saluran fluoresens Cycling Green untuk PCR EGFR analitis dan saluran fluoresens Cycling Yellow untuk PCR kontrol internal. |
| b) Pemrograman yang tidak benar untuk profil instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM        | Bandingkan profil suhu dengan protokol. Jika tidak benar, ulangi proses.   |

### Komentar dan saran

---

- |    |   |   |
|----|---|---|
| c) | Konfigurasi PCR tidak benar   | Periksa tahapan kerja Anda dengan skema pemipetan lalu ulangi PCR, bila perlu.                                      |
| d) | Kondisi penyimpanan untuk satu atau beberapa komponen kit tidak sesuai dengan instruksi yang diberikan dalam “Penyimpanan dan Penanganan Reagen” (halaman 18) | Periksa kondisi penyimpanan dan tanggal kedaluwarsa (lihat label kit) dari reagen dan gunakan kit baru, bila perlu. |
| e) | <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit sudah kedaluwarsa   | Periksa kondisi penyimpanan dan tanggal kedaluwarsa (lihat label kit) dari reagen dan gunakan kit baru, bila perlu. |

## Kontrol Kualitas

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

## Batasan

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

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

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

---

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

Penting bagi jumlah dan kualitas DNA dalam sampel untuk dinilai sebelum melakukan analisis sampel menggunakan *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*. Campuran Reaksi Kontrol tambahan disediakan untuk menentukan bahwa nilai  $C_T$  dapat diterima untuk uji kadar. Pembacaan daya serap tidak boleh digunakan karena tidak berkorelasi dengan nilai  $C_T$  dalam sampel DNA yang terfragmentasi.

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

Meski uji kadar penghapusan Ekson 19 telah tervalidasi secara analitik dan ditunjukkan untuk mendeteksi 14 penghapusan tertentu dalam Ekson 19 (lihat daftar dalam Tabel 1 dalam buku pegangan ini), akan tetapi, kemungkinan terjadi bagi mutasi tambahan (termasuk, namun tidak terbatas pada, tambahan penghapusan Ekson 19, penyisipan Ekson 19, dan mutasi L747P) untuk diperkuat oleh set primer Penghapusan.

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

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

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

# Karakteristik Kinerja

## Kinerja analitikal

Karakteristik kinerja tertentu dari *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ditentukan oleh studi yang menggunakan spesimen jaringan FFPE yang dikumpulkan dari pasien NSCLC dan lini sel FFPE manusia (lini sel FFPE). Lini sel FFPE dihasilkan menggunakan lini sel karsinoma paru (A549) untuk memproduksi lini sel yang menyembunyikan mutasi EGFR spesifik yang diinginkan. Jika lini sel atau spesimen jaringan tidak tersedia, DNA plasmid yang digunakan.

Batasan kosong (Limit of Blank, LOB), rentang kerja, nilai cutoff, dan rentang cutoff  $\Delta C_T$

Sebanyak 417 sampel FFPE diuji dalam studi yang mengikuti panduan dalam NCCLS EP17-A (2004) (12) untuk menentukan LOB dan nilai cutoff  $\Delta C_T$  untuk setiap uji kadar mutasi. Selain itu, rentang kerja juga ditentukan. Rentang cutoff  $\Delta C_T$  ditunjukkan dalam Tabel 9.

**Tabel 9. Rentang cutoff  $\Delta C_T$  yang ditetapkan untuk setiap uji kadar mutasi**

Uji Kadar	Rentang $C_T$	Rentang cutoff $\Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ )
T790M	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 7,40
Penghapusan	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,00
L858R	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
L861Q	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
G719X	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
S768I	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
Sisipan	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,00

---

Rentang  $C_T$  kontrol reaksi ditetapkan sebagai  $C_T$  23,70 sampai 31,10.

Rentang kerja dan cutoff uji kadar diverifikasi menggunakan standar dan sampel FFPE lanjutan. Selama verifikasi, cutoff dinilai atas kemampuannya untuk membedakan mutasi yang tepat dalam latar belakang DNA tipe liar dengan menilai setiap uji kadar dengan DNA genomik input tinggi dan DNA mutasi input tinggi (lihat Reaktivitas silang). Pengaruh DNA input pada panggilan mutasi juga dinilai (lihat Pengaruh input DNA terhadap nilai  $\Delta C_T$ ). Batas bawah terhadap rentang tersebut dimasukkan untuk mengeluarkan artefak fluoresens PCR.

Untuk menilai kinerja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit pada tidak adanya templat dan untuk memastikan bahwa sampel kosong atau sampel dengan DNA tipe liar tidak menghasilkan sinyal analitik yang dapat mengindikasikan konsentrasi mutasi yang rendah, sampel tanpa templat, dan DNA tipe liar EGFR NSCLC dievaluasi. Hasilnya menunjukkan tidak ada panggilan mutasi positif untuk sampel NTC dan untuk sampel tipe liar FFPE.

## Pengaruh input DNA terhadap nilai $\Delta C_T$

Tingkat input DNA ditetapkan sebagai total jumlah DNA EGFR yang dapat diperkuat dalam sampel seperti yang ditentukan oleh nilai  $C_T$  dari reaksi kontrol. Untuk menunjukkan bahwa kinerja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit konsisten di seluruh rentang  $C_T$  reaksi kontrol (23,70–31,10), 7 uji kadar mutasi EGFR diuji terhadap seri pengenceran 1-in-3, 6-titik (DNA yang diekstrak dari lini sel FFPE).  $C_T$  target untuk pengenceran 1 untuk tiap mutasi adalah sekitar 24,70. Pengenceran akhir, yang menunjukkan  $C_T$  sekitar 32–33, berada di luar rentang  $C_T$  reaksi kontrol. Secara keseluruhan, nilai  $\Delta C_T$  yang diukur di berbagai tingkat total input DNA konsisten di seluruh rentang kerja *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Reaktivitas silang

DNA EGFR tipe liar pada input DNA tinggi diuji untuk menilai amplifikasi non-spesifik. Hasilnya menunjukkan bahwa nilai  $\Delta C_T$  terendah melampaui cutoff yang ditetapkan, yang menunjukkan tidak adanya amplifikasi non-spesifik.

Lini sel FFPE pada input DNA tinggi diuji terhadap semua campuran reaksi untuk menilai potensi reaktivitas silang. Hasilnya menunjukkan tidak ada dampak karena reaktivitas silang antara reaksi mutan. Nilai  $\Delta C_T$  minimal seluruhnya lebih tinggi daripada nilai cutoff uji kadar masing-masing untuk semua campuran reaksi yang tidak cocok dan sampel DNA.

## Akurasi: Perbandingan terhadap metode referensi analitik

Sebuah studi menunjukkan kesesuaian dalam deteksi mutasi *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit relatif terhadap pembentukan sekuens Sanger dwi-arah. Dalam studi ini, sebanyak 360 sampel FFPE diuji.

Sampel dengan hasil valid Sanger dan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dianalisis untuk menilai Persentase Kesesuaian Positif (Positive Percent Agreement, PPA), Persentase Kesesuaian Negatif (Negative Percent Agreement, NPA), dan Keseluruhan Persentase Kesesuaian (Overall Percent Agreement, OPA). Persentase ini, bersama dengan interval kepercayaan (Confidence Interval, CI) 95% dua sisi terkait, diringkas dalam Tabel 10.

**Tabel 10. Analisis kesesuaian**

Ukuran	Kesepakatan persen (N)	95% CI
Persentase Kesesuaian Positif	99,4% (157/158)	96,5%–100,0%
Persentase Kesesuaian Negatif	86,6% (175/202)	81,2%–91,0%
Keseluruhan Persentase Kesesuaian	92,2% (332/360)	89,0%–94,8%

Untuk 28 hasil Keseluruhan Persentase Kesesuaian yang tidak sesuai:

- 1 (3,6%) sampel merupakan tipe liar (yaitu, mutasi tidak terdeteksi) oleh *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit tetapi hasil mutasi terdeteksi oleh pembentukan sekuens Sanger.
- 27 (96,4%) sampel adalah mutasi terdeteksi oleh *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit tetapi hasil tipe liar oleh pembentukan sekuens Sanger.

## Nilai batas deteksi (Limit of Detection, LOD)

Suatu studi dilakukan untuk menentukan LOD masing-masing dari 29 mutasi EGFR. LOD ditentukan sebagai jumlah terendah DNA mutan dalam latar belakang DNA tipe liar di mana sampel mutan akan memberikan hasil positif mutasi dalam 95% dari hasil pengujian ( $C_{95}$ ).

Untuk menentukan LOD setiap mutasi, sampel dengan persentase mutasi yang berbeda disiapkan pada konsentrasi DNA input rendah dan tinggi lalu diuji dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (Tabel 11). LOD untuk setiap uji kadar diuji dengan regresi logistik. Untuk memastikan LOD, sampel mutasi pada LOD yang ditentukan diuji dan tingkat pengujian positif diverifikasi.

**Tabel 11. LOD yang ditentukan menggunakan spesimen klinis FFPE input DNA rendah dan tinggi, lini sel FFPE atau plasmid**

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

Tabel dilanjutkan di halaman berikutnya

Tabel dilanjutkan dari halaman sebelumnya

Eksan	Mutasi	ID COSMIC*	Perubahan dasar	LOD (% mutan)	
				Rendah	Tinggi
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 <sup>†</sup>	2,18 <sup>†</sup>
	Sisipan	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 <sup>†</sup>	– <sup>‡</sup>
		12378	2310_2311insGGT	4,91 <sup>†</sup>	1,31 <sup>†</sup>
		12377	2319_2320insCAC	2,40 <sup>†</sup>	0,65 <sup>†</sup>
	T790M	6240	2369C>T	9,72 <sup>†</sup>	5,09 <sup>†</sup>
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 <sup>†</sup>	1,13 <sup>†</sup>
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 <sup>†</sup>	0,66 <sup>†</sup>

\* COSMIC: Katalog mutasi somatis dalam kanker (Catalogue of somatic mutations in cancer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

<sup>†</sup> Nilai LOD ditetapkan menggunakan lini sel

<sup>‡</sup> Nilai LOD ditetapkan menggunakan plasmid

<sup>§</sup> Nilai LOD ditetapkan menggunakan sampel klinis

<sup>†</sup> Tidak dinilai

## Gangguan

### Pengaruh jaringan nekrosis

Spesimen klinis FFPE NSCLC dengan kandungan jaringan nekrosis hingga 50% untuk spesimen mutan EGFR dan tipe liar tidak mengganggu hasil panggilan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Zat eksogen

Zat yang berpotensi mengganggu yang ada dalam proses ekstraksi DNA diuji dalam sampel mutan dan tipe liar pada konsentrasi 10x: lilin parafin, xilena, etanol, dan Proteinase K. Hasilnya menunjukkan bahwa zat ini tidak mengganggu hasil panggilan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Reproduksibilitas

### Reproduksibilitas lot-ke-lot

Sistem pengujian *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit menggunakan dua kit terpisah: QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit atau QIAamp DNA FFPE Tissue Kit untuk isolasi DNA, dan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit untuk amplifikasi DNA dan deteksi status mutasi EGFR. Daya tukar dan reproduksibilitas lot-ke-lot ditunjukkan menggunakan 3 lot QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit dan 3 lot *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Keseluruhan persentase panggilan tepat di seluruh lot untuk uji kadar mutasi EGFR adalah 97,8% (317/324) dan untuk sampel tipe liar adalah 100% (379/379).

### Penanganan spesimen

Reproduksibilitas QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit diperiksa menggunakan bagian yang diambil dari tiga blok spesimen FFPE, khususnya mutasi penghapusan ekson 19 (2235-2249 del15), mutasi L858R ekson 21, dan satu tipe liar. Untuk masing-masing spesimen, ekstraksi dilakukan dalam duplikat di 3 lokasi dan diuji dalam 3 hari tidak berturut-turut selama periode 6 hari, yang menghasilkan total 18 titik data per spesimen. Di setiap lokasi, 2 operator melakukan pengujian menggunakan 1 lot QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 lot per lokasi, total 3 lot) dan digabungkan dengan lot reagen *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit yang sama di seluruh lokasi. Semua hasil spesimen mutan dan tipe liar valid dan menunjukkan hasil panggilan yang diharapkan (panggilan tepat = 100%, 18/18 untuk masing-masing spesimen), yang mendukung reproduksibilitas dan pengulangan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit pada tahap pra-analisis isolasi DNA.

---

## Presisi dan reproduksibilitas

Presisi dan reproduksibilitas *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit diperiksa melalui pengujian DNA yang diekstrak dari spesimen klinis FFPE NSCLC atau lini sel FFPE, yang mewakili ketujuh uji kadar mutasi dalam *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Spesimen klinis FFPE tipe liar NSCLC juga disertakan dalam studi (Tabel 12).

Desain studi matriks diterapkan untuk menilai reproduksibilitas uji kadar dengan menguji sampel di 3 laboratorium (lokasi) dengan 3 lot *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 di seluruh 3 lokasi) dengan 2 operator per lokasi dan 2 instrumen per lokasi, dengan tiap sampel (yang disiapkan pada tingkat dekat dengan LOD) diuji dalam duplikat selama total 16 hari. Reproduksibilitas untuk tiap mutasi individu dilakukan dalam hari tidak berturut-turut di tiap lokasi. Proporsi panggilan tepat ditunjukkan dalam Tabel 12, halaman berikutnya.

**Tabel 12. Reprodusibilitas uji kadar – proporsi panggilan tepat untuk mutasi EGFR yang diuji**

Ekson	Mutasi	ID COSMIC*	Panggilan		% Benar
			Benar/total	% Benar	Satu sisi bawah CI 95%
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Penghapusan	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
		Sisipan	12376	92/92	100
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Tipe liar	—	—	77/78	98,72	94,06

\* COSMIC: Katalog mutasi somatis dalam kanker (Catalogue of somatic mutations in cancer); <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

---

Analisis komponen ragam digunakan untuk memperkirakan simpangan baku dan interval kepercayaan 95% untuk keragaman dalam-proses, antar-proses, antar-hari, antar-lot, dan antar-lokasi. Di seluruh komponen ragam, total koefisien variasi (Coefficient of Variation, CV) sebesar  $\leq 14,11\%$  untuk semua mutasi EGFR yang diuji. Di seluruh bagian panel mutan, persentase CV adalah sebesar  $\leq 8,33\%$  untuk antar-lot, antar-hari, dan antar-proses. Persentase CV untuk keragaman dalam-proses (pengulangan/repetisi) berkisar antara 5,99% hingga 13,49%.

---

# Kinerja Klinis

Data hasil klinis: GIOTRIF®

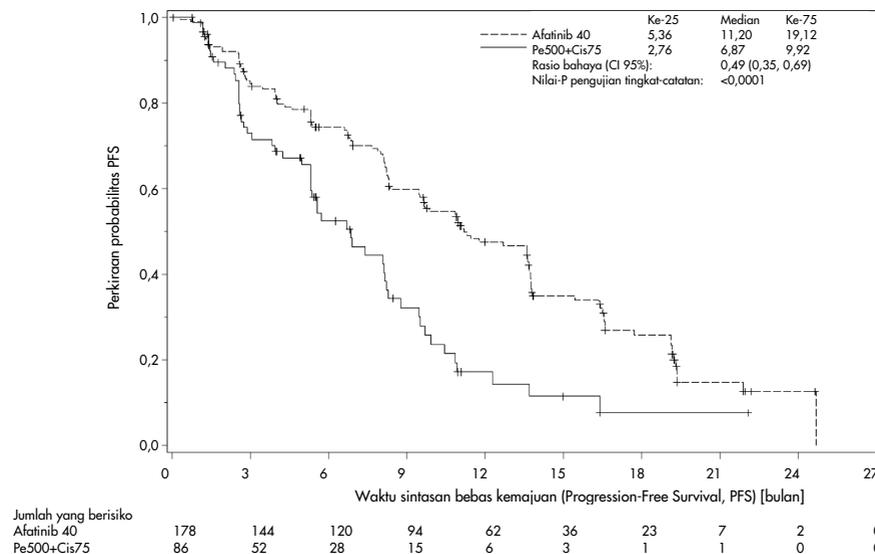
Uji klinis LUX-Lung 3 adalah percobaan Fase 3 yang acak, berlabel terbuka, multisentra dan internasional pada afatinib versus kemoterapi sebagai perawatan lini pertama untuk pasien dengan adenokarsinoma paru stadium IIIB atau IV yang menyembunyikan mutasi pengaktifan EGFR (ClinicalTrials.gov nomor NCT00949650). Kelayakan pasien untuk pendaftaran percobaan ditentukan dengan menguji status mutasi EGFR pasien menggunakan Uji Kadar Uji Klinis (Clinical Trial Assay, CTA). Pengujian retrospektif spesimen jaringan dilakukan menggunakan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Studi yang menjembatani dilakukan untuk menilai kesesuaian antara *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dan CTA.

Berdasarkan hasil pengujian CTA, 345 pasien berada dalam set acak (afatinib: 230 pasien; kemoterapi: 115 pasien). Hasil efisiensi primer merupakan sintasan bebas kemajuan (Progression-Free Survival, PFS) sebagaimana yang dinilai oleh komite peninjauan independen (Independent Review Committee, IRC). Di antara 345 pasien acak, sampel timor dari 264 pasien (afatinib: 178 pasien; kemoterapi: 86 pasien) diuji secara retrospektif menggunakan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Peningkatan signifikan secara statistik dalam PFS seperti yang ditentukan oleh IRC ditunjukkan untuk pasien yang diacak terhadap afatinib dibandingkan dengan yang diajak terhadap kemoterapi, dalam keseluruhan populasi CTA+ dan populasi *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+. Keseluruhan hasil efisiensi dirangkum dalam Tabel 13 dan Gambar 19.

Tabel 13. Manfaat klinis pasien yang diuji dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dalam populasi uji klinis LUX-Lung 3

Parameter	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/ Populasi CTA+ n = 264		Populasi CTA+, n = 345	
	Kemoterapi n = 86	Afatinib n = 178	Kemoterapi n = 115	Afatinib n = 230
Sintasan Bebas Kemajuan (Progression-Free Survival, PFS) Jumlah kematian atau progresi, N (%)	53 (61,6%)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
Median PFS (bulan)	6,9	11,2	6,9	11,1
Median PFS CI 95%	5,3, 8,2	9,7, 13,7	5,4, 8,2	9,6, 13,6
Rasio bahaya	0,49		0,58	
Rasio bahaya CI 95%	0,35, 0,69		0,43, 0,78	
Nilai-p (pengujian tingkat-catatan terstratifikasi)*	<0,0001		<0,001	

\* Distratifikasi berdasarkan status mutasi EGFR dan ras.



Gambar 19. Kurva Kaplan-Meier Sintasan Bebas Kemajuan (Progression-Free Survival, PFS) oleh tinjauan independen berdasarkan grup perawatan (populasi *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+).

Analisis subset *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ (n = 264) mengungkapkan bahwa pasien yang dirawat dengan afatinib memiliki peningkatan yang signifikan dalam waktu PFS (median PFS 11,2 versus 6,9 bulan) dan cenderung tidak memiliki peristiwa penyakit progresif atau kematian (HR = 0,49, 95% CI [0,35; 0,69], p<0,0001) dibandingkan dengan pasien yang dirawat dengan kemoterapi. Manfaat klinis yang diamati dalam subset pasien yang diuji dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sebanding dengan yang diamati dalam populasi studi penuh (n = 345).

## Data hasil klinis: IRESSA®

Uji Ukuran Tindak Lanjut IRESSA (IRESSA Follow-up Measure, IFUM) merupakan studi Fase-4, berlabel terbuka, dan lengan tunggal (NCT01203917) untuk mengkarakterisasi efisiensi dan keselamatan/tolerabilitas gefitinib lini pertama dalam pasien Kaukasian dengan NSCLC metastatis atau positif mutasi EGFR tingkat lanjut secara lokal, stadium IIIA/B/IV. Studi IFUM didesain untuk mengevaluasi tingkat respons tujuan dengan kriteria RECIST dalam pasien Kaukasian NSCLC mutan EGFR yang dipilih secara prospektif.

Pasien yang memenuhi syarat harus memiliki penghapusan dalam mutasi substitusi EGFR ekson 19, L858R, L861Q, atau G719X dan tidak ada mutasi T790M atau S768I atau penyisipan ekson 20 dalam spesimen tumor sebagaimana yang ditetapkan secara prospektif oleh CTA. Pengujian retrospektif spesimen dari pasien yang disaring untuk uji klinis IFUM dilakukan menggunakan diagnostik pendamping *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Studi yang menjembatani dilakukan untuk menilai kesesuaian *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dengan CTA yang digunakan untuk memilih pasien untuk uji klinis IFUM. Kesesuaian keseluruhan antara kedua uji kadar untuk mendeteksi penghapusan EGFR ekson 19 dan mutasi L858R adalah sebesar 98,2% (n = 700/713; 95% CI: 96,9%, 99,0%) dengan PPA sebesar 88,2% (n = 90/102; 95% CI: 80,4%, 93,8% dan NPA sebesar 99,8% (n = 610/611; 95% CI: 99,1%, 100,0%).

Hasil pengujian CTA diperoleh untuk 859 pasien yang disaring, yang mana sebanyak 106 pasien memenuhi syarat untuk perawatan dengan gefitinib. Dari 859 sampel dengan hasil CTA, 765 sampel tersedia untuk pengujian secara retrospektif dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, termasuk 87 sampel yang merupakan positif mutasi EGFR dengan CTA dan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Hasil efisiensi utamanya adalah tingkat respons tujuan (Objective Response Rate, ORR) sebagaimana yang dinilai oleh Tinjauan pusat independen buta (Blinded Independent Central Review, BICR) dan penyidik. Manfaat klinis yang diamati dalam subset pasien yang diuji dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sebanding dengan yang diamati dalam populasi studi penuh.

Keseluruhan hasil efisiensi dirangkum dalam Tabel 14.

**Tabel 14. Manfaat klinis pasien yang diuji dengan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dalam populasi uji klinis IFUM**

Parameter	Populasi <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+, n = 87	Populasi CTA+, n = 106
Tingkat respons tujuan (Objective Response Rate, ORR) oleh BICR		
Jumlah respons (N)	42	53
ORR, % (95% CI)	48,3 (38,1–58,6)	50,0 (40,6–59,4)
Median durasi respons (bulan)	6,9 (5,6–11,4)	6,0 (5,6–11,1)
Tingkat respons tujuan (Objective Response Rate, ORR) dengan penyidik		
Jumlah respons (N)	62	74
ORR, % (95% CI)	71,3 (61,0–79,7)	69,8 (60,5–77,7)
Median durasi respons (bulan)	8,3 (7,2–11,3)	8,3 (7,6–11,3)

BICR: Tinjauan pusat independen buta (Blinded independent central review); CI: Interval kepercayaan (Confidence interval); CTA: Uji kadar uji klinis (Clinical trial assay).

Catatan: Kit + adalah positif hasil untuk ekson 19 penghapusan/L8585R/L861Q/G719X.

Mengingat bahwa *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit tidak digunakan untuk memilih pasien untuk uji klinis IFUM, analisis efisiensi tambahan dilakukan untuk mempertimbangkan pasien yang tidak disertakan dalam percobaan karena pasien teruji negatif oleh CTA namun mungkin teruji positif oleh *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (yaitu, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), serta pasien yang terdaftar dalam percobaan namun tidak memiliki hasil pengujian ulang yang valid dari *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (yaitu, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit tidak diketahui /CTA+). Hasil dari semua analisis hipotesis secara umum serupa dengan hasil dari analisis efisiensi primer.

---

# Referensi

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

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

# Simbol

Simbol berikut ini mungkin terdapat di kemasan dan label:

Simbol	Definisi simbol
	Berisi reagen yang cukup untuk reaksi <N>
	Gunakan sebelum
	Perangkat medis diagnostik in vitro
	Nomor katalog
	Nomor lot
	Nomor materi
	Lindungi dari cahaya
	Nomor Item Perdagangan Global
Rn	R adalah untuk revisi Instruksi Penggunaan (Panduan), dan n adalah nomor revisi
	Batas suhu
	Produsen
	Baca petunjuk penggunaan
	Perhatian

# Lampiran A: Protokol Panduan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Bagian ini berisi petunjuk untuk menggunakan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dengan versi perangkat lunak Rotor-Gene Q 2.3.5 atau yang lebih baru dalam mode terbuka (yakni, tanpa menggunakan Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

## Informasi umum

- Untuk daftar bahan yang diperlukan, baca Bahan yang Diperlukan tetapi Tidak Tersedia.
- Untuk petunjuk lengkap tentang penyiapan sampel dan tata letak sampel, baca Protokol: Penilaian sampel dan Protokol: Deteksi mutasi EGFR.
- Pastikan parameter siklus sudah tepat sebelum memulai tiap proses.

## Protokol: Membuat profil suhu

Sebelum memulai, buat profil suhu untuk analisis *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Parameter siklus sama untuk penilaian sampel DNA dan deteksi mutasi EGFR.

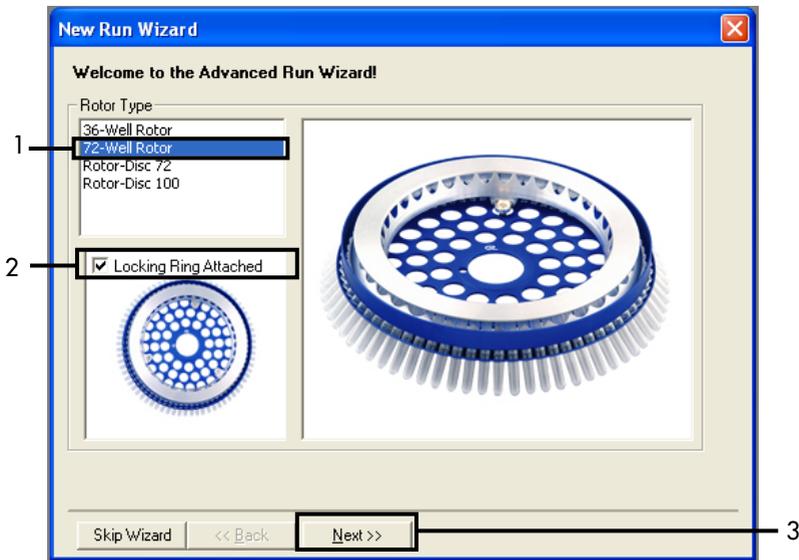
## Prosedur

Ringkasan parameter siklus ditunjukkan dalam Tabel 15.

**Tabel 15. Profil suhu**

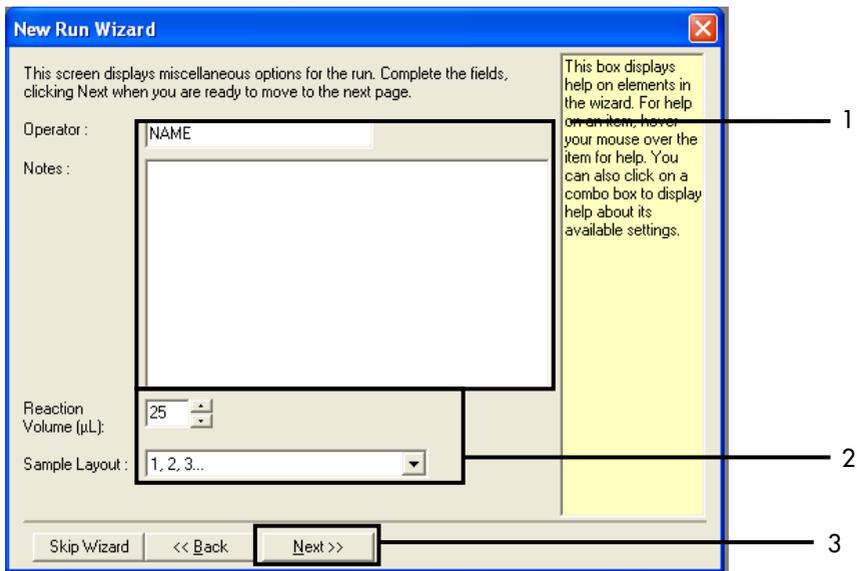
Siklus	Suhu	Waktu	Pemerolehan data
1	95 °C	15 menit	Tidak ada
40	95 °C	30 detik	Tidak ada
	60 °C	60 detik	Hijau dan Kuning

1. Klik dua kali ikon Rotor-Gene Q Series Software 2.3 (Perangkat Lunak Seri Rotor-Gene Q 2.3) pada desktop komputer yang terhubung dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
2. Untuk membuat templat baru, pilih Empty Run (Proses Kosong), lalu klik New (Baru) untuk memasukkan "New Run Wizard" (Wizard Proses Baru).
3. Pilih 72-well rotor (rotor 72-sumuran) sebagai tipe rotor. Pastikan bahwa ring penguncian terpasang lalu centang kotak Locking Ring Attached (Ring Penguncian Terpasang). Klik Next (Berikutnya) (Gambar 20).



**Gambar 20.** Kotak dialog "New Run Wizard" (Wizard Proses Baru). 1 = "Rotor type" (Tipe rotor); 2 = Kotak "Locking Ring Attached" (Ring Penguncian Terpasang); 3 = "Next" (Berikutnya).

4. Masukkan nama operator. Tambahkan catatan apa pun lalu masukkan volume reaksi sebagai 25. Pastikan 1, 2, 3... telah ditentukan dalam bidang Sample Layout (Tata Letak Sampel). Klik Next (Berikutnya) (Gambar 21).



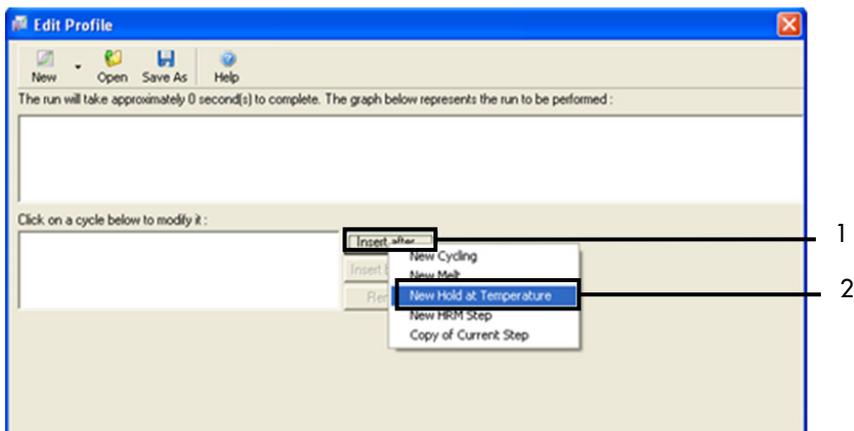
**Gambar 21. Memasukkan nama operator dan volume reaksi.** 1 = Bidang dialog "Operator" dan bidang dialog "Notes" (Catatan); 2 = Bidang "Reaction Volume" (Volume Reaksi) dan bidang "Sample Layout" (Tata Letak Sampel); 3 = "Next" (Berikutnya).

5. Klik Edit Profile (Edit Profil) dalam kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) (Gambar 22) dan periksa parameter proses sesuai dengan tahap berikut.



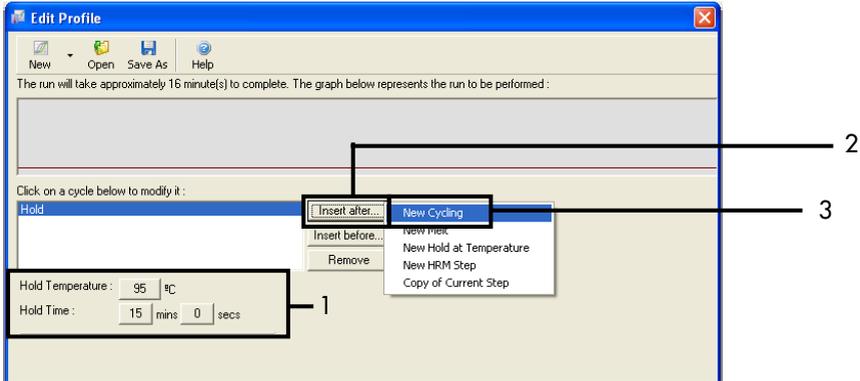
Gambar 22. “Edit Profile” (Edit Profil) dalam “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru).

6. Klik Insert after (Sisipkan setelah) lalu pilih New Hold at Temperature (Jaga pada Suhu Baru) (Gambar 23).



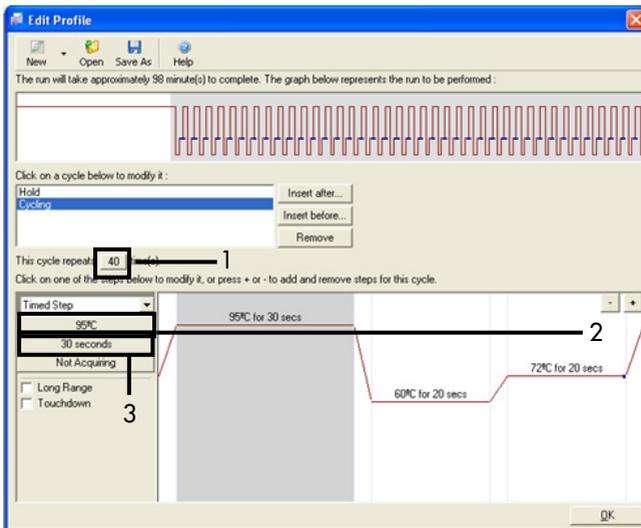
Gambar 23. Menyisipkan tahap inkubasi awal. 1 = “Insert after” (Sisipkan setelah); 2 = “New Hold at Temperature” (Jaga pada Suhu Baru).

7. Atur nilai dalam bidang Hold Temperature (Jaga Suhu) 95°C dan nilai dalam bidang Hold Time (Jaga Waktu) menjadi 15 mins 0 secs (15 menit 0 detik). Klik Insert After (Sisipkan Setelah), lalu pilih New Cycling (Siklus Baru) (Gambar 24).



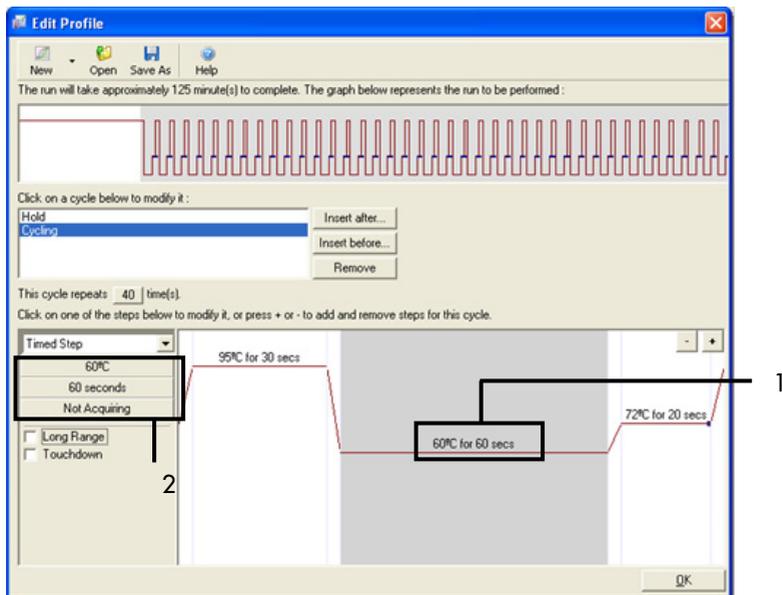
**Gambar 24.** Tahap inkubasi awal pada suhu 95 °C. 1 = "Hold Temperature and Hold Time" (Jaga Suhu dan Jaga Waktu); 2 = "Insert after" (Sisipkan setelah); 3 = "New Cycling" (Siklus Baru).

8. Atur jumlah pengulangan siklus menjadi 40. Pilih tahap pertama dan atur menjadi 95 °C selama 30 detik (Gambar 25).



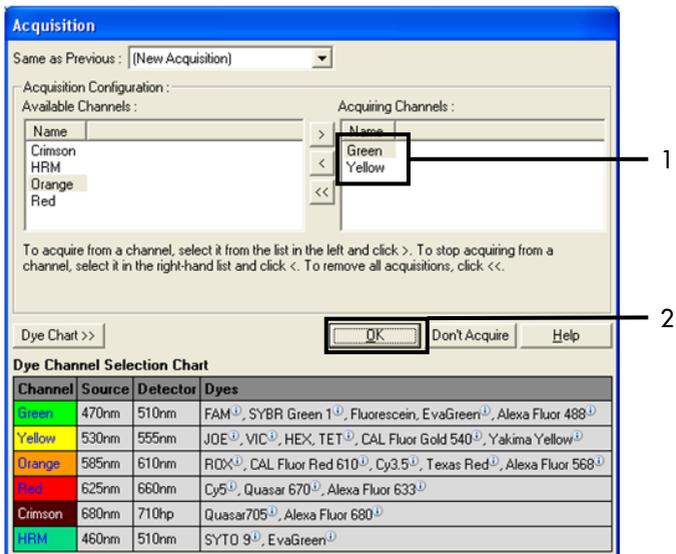
**Gambar 25.** Tahap siklus pada suhu 95 °C. 1 = Kotak "Cycle repeats" (Pengulangan siklus); 2 = Tahap satu: pengaturan suhu; 3 = Tahap satu: pengaturan waktu.

9. Soroti tahap kedua dan atur menjadi 60 °C selama 60 detik. Klik Not Acquiring (Tidak Memperoleh) untuk mengaktifkan pemerolehan data selama tahap ini (Gambar 26).



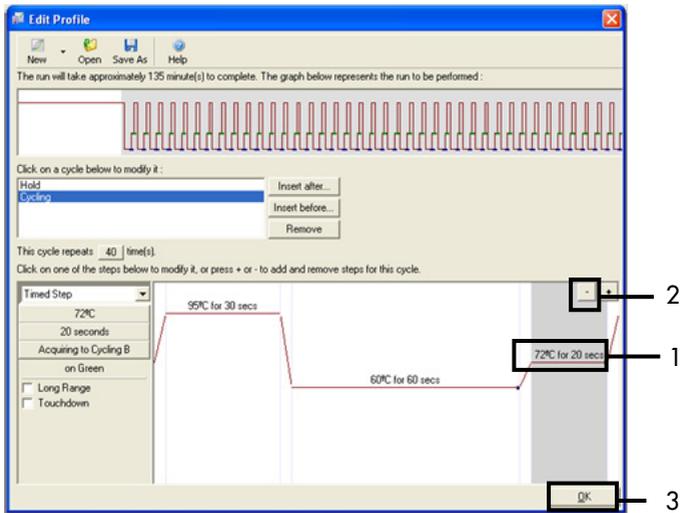
**Gambar 26.** Tahap siklus pada suhu 60 °C. 1 = Tahap dua: pengaturan waktu dan suhu; 2 = “Not Acquiring” (Tidak Memperoleh).

10. Pilih Green dan Yellow sebagai saluran pemerolehan. Klik > untuk mentransfer saluran ini dari daftar Available Channels (Saluran yang Tersedia) ke bagian Acquiring Channels (Saluran Pemerolehan). Klik OK (Oke) (Gambar 27).



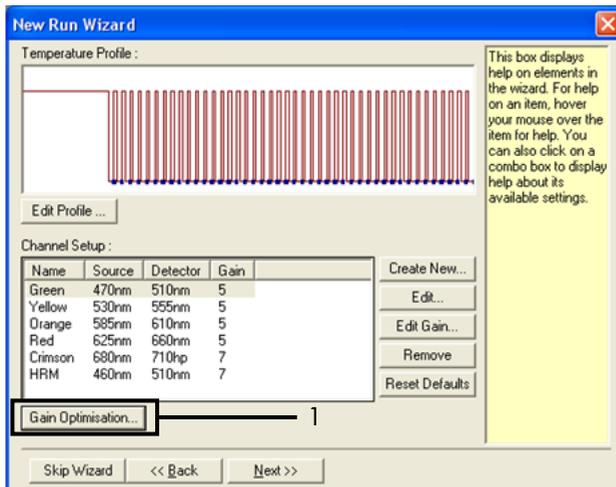
Gambar 27. Pemerolehan pada tahap siklus dalam suhu 60°C. 1 = Saluran yang dipilih; 2 = "OK" (Oke).

11. Soroti tahap ketiga lalu klik - untuk menghapus. Klik OK (Oke) (Gambar 28).



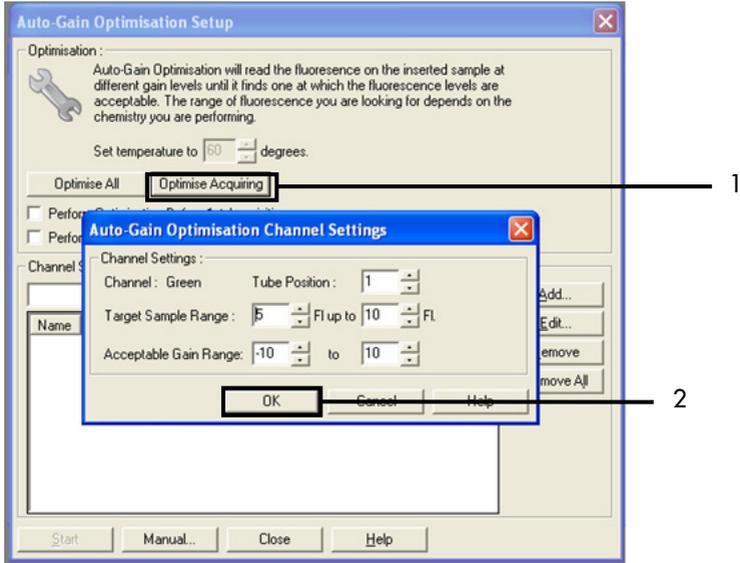
Gambar 28. Tahap penghapusan ekstensi. 1 = Tahap ketiga; 2 = Hapus; 3 = "OK" (Oke).

12. Di kotak dialog berikutnya, klik Gain Optimisation (Dapatkan Optimasi) (Gambar 29).



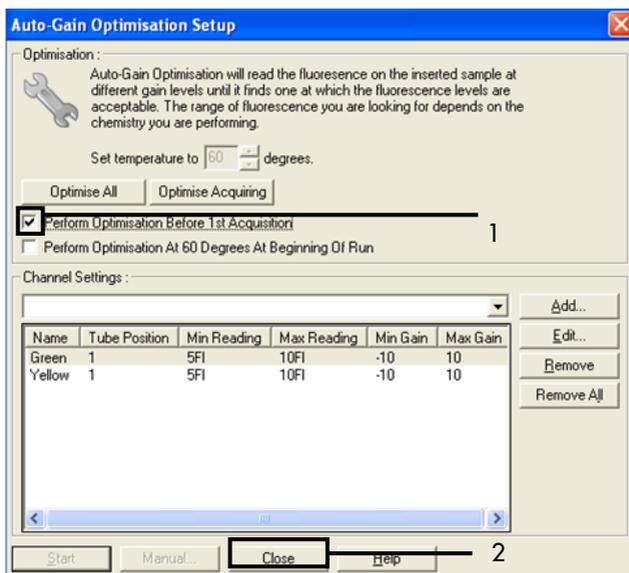
Gambar 29. Gain optimisation (Dapatkan optimasi) (1).

13. Klik Optimise Acquiring (Optimalkan Pemerolehan). Pengaturan saluran ditampilkan untuk tiap saluran. Klik OK (Oke) untuk menerima nilai default kedua saluran (Gambar 30).



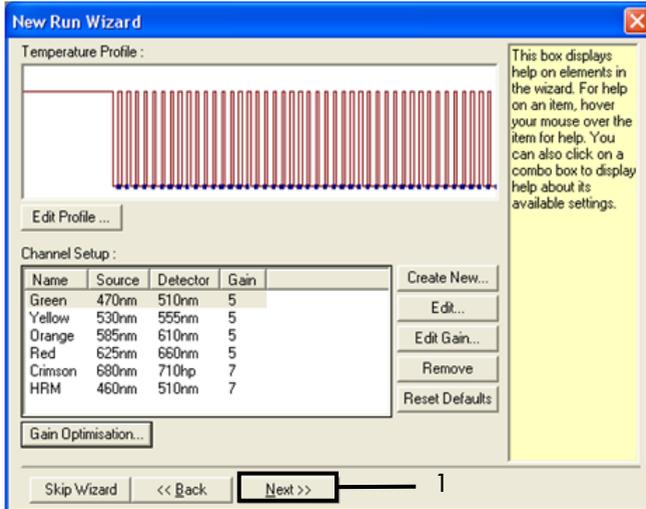
**Gambar 30.** Auto-gain optimisation (Dapatkan optimasi otomatis) untuk saluran Green. 1 = "Optimise Acquiring" (Optimalkan Pemerolehan); 2 = "OK" (Oke).

14. Centang kotak Perform Optimisation before 1st Acquisition (Lakukan Optimasi sebelum Pemerolehan Pertama), lalu klik Close (Tutup) untuk kembali ke wizard (Gambar 31).



**Gambar 31. Pemilihan saluran Green dan Yellow.** 1 = Kotak centang "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Lakukan Optimasi Sebelum Pemerolehan ke-1); 2 = "Close" (Tutup).

15. Klik Next (Berikutnya) (Gambar 32). Klik Save Template (Simpan Templat) untuk menyimpan templat *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (file \*.ret) di lokasi yang sesuai.



Gambar 32. "Next" (Berikutnya) (1).

---

# Prosedur (Manual)

## Protokol: Penilaian sampel (manual)

Protokol ini digunakan untuk menilai total DNA yang dapat diperkuat dalam sampel dan harus dilakukan sebelum analisis mutasi EGFR.

- Siapkan sampel seperti yang diuraikan di bagian Protokol: Penilaian sampel, hingga tahap 11.
- Atur proses PCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM seperti yang diuraikan di bagian Protokol: *Pengaturan theascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q*.
- Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan petunjuk dalam bab Analisis data penilaian sampel.

## Protokol: Deteksi mutasi EGFR (manual)

- Setelah sampel lolos penilaian sampel, sampel dapat diuji untuk mendeteksi mutasi EGFR.
- Siapkan sampel seperti yang diuraikan di bagian Protokol: Deteksi mutasi EGFR, hingga tahap 11.
- Atur proses PCR pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM seperti yang diuraikan di bagian Protokol: *Pengaturan theascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q*.
- Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan petunjuk dalam bab Analisis data deteksi mutasi EGFR.

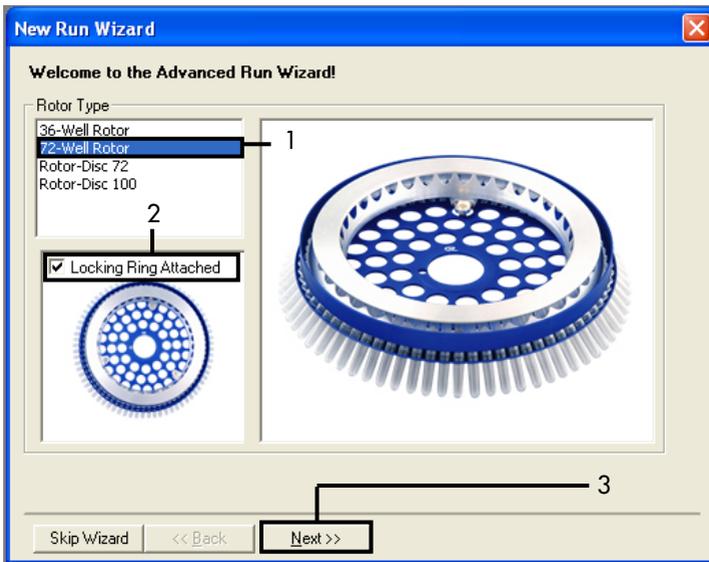
## Protokol: Pengaturan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q

### Prosedur

1. Buka perangkat lunak Rotor-Gene Q series versi 2.3.5 atau yang lebih baru lalu buka profil suhu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit yang sesuai (file \*.ret).

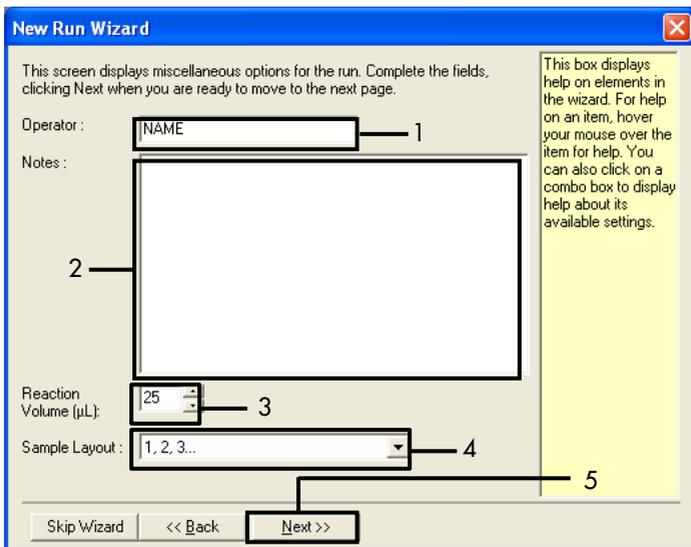
Untuk petunjuk tentang pembuatan profil suhu dan pemeriksaan parameter proses, lihat Protokol: Membuat profil suhu.

2. Pastikan bahwa rotor yang benar telah dipilih, lalu centang kotak Locking Ring Attached (Ring Penguncian Terpasang). Klik Next (Berikutnya) (Gambar 33).



**Gambar 33.** Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) dan layar selamat datang. 1 = “Rotor type” (Tipe rotor); 2 = Kotak “Locking Ring Attached” (Ring Penguncian Terpasang); 3 = “Next” (Berikutnya).

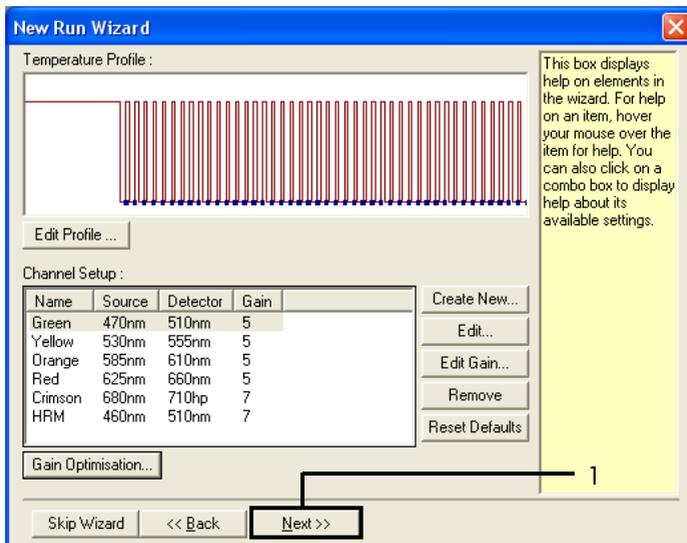
3. Masukkan nama operator. Tambahkan catatan, periksa bahwa volume reaksi diatur ke 25 dan bidang Sample Layout (Tata Letak Sampel) berisi nilai 1, 2, 3.... Klik Next (Berikutnya) (Gambar 34).



**Gambar 34.** Layar opsi “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru). 1 = “Operator”; 2 = Bidang “Notes” (Catatan); 3 = “Reaction Volume” (Volume Reaksi); 4 = Bidang “Sample Layout” (Tata Letak Sampel); 5 = “Next” (Berikutnya).

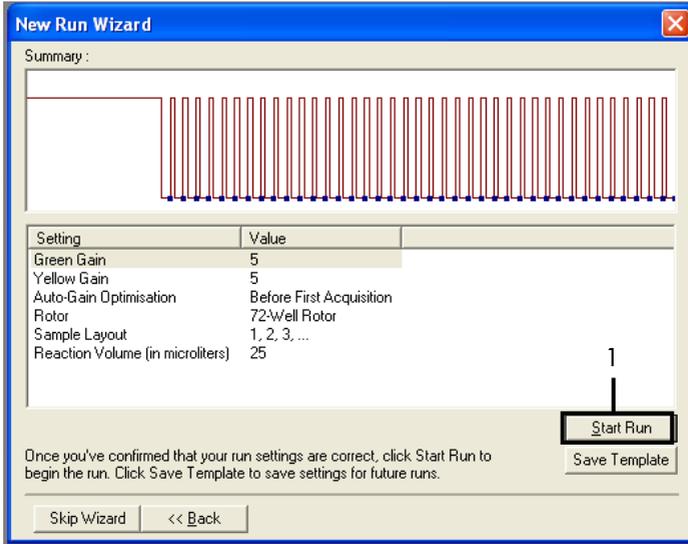
Catatan: Jendela berikutnya memungkinkan pengeditan profil suhu. (Proses edit tidak diperlukan karena profil suhu dibuat sesuai dengan petunjuk dalam Protokol: Membuat profil suhu)

4. Klik Next (Berikutnya) (Gambar 35).



Gambar 35. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) dan layar edit suhu (1 = “Next” (Berikutnya)).

5. Periksa ringkasan lalu klik Start Run (Mulai Proses) untuk menyimpan file proses dan memulai proses (Gambar 36).



Gambar 36. Kotak dialog “New Run Wizard” (Wizard Proses Baru) dan layar ringkasan (1 = “Start Run” (Mulai Proses)).

6. Lakukan salah satu dari tahapan berikut di jendela baru yang muncul setelah proses dimulai:

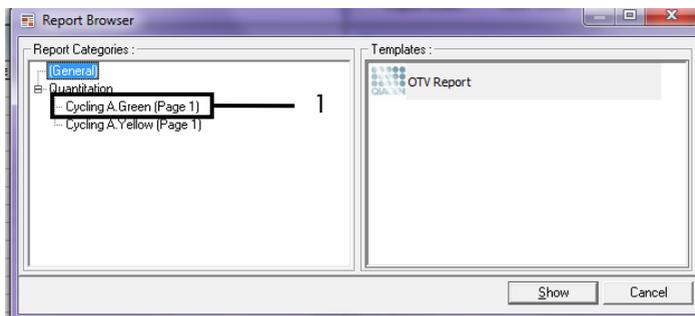
- Masukkan nama sampel.
- Klik Finish (Selesai) lalu masukkan nama sampel nanti. Untuk melakukannya, pilih Sample (Sampel) selama proses atau setelah proses selesai.

Penting: Jika Anda mengklik Finish and Lock Samples (Selesai dan Kunci Sampel), Anda tidak lagi dapat mengedit nama sampel. Anda harus sangat berhati-hati saat memasukkan nama sampel guna memastikan pengujian dan analisis sampel yang tepat.

Catatan: Saat memberi nama sampel, bidang untuk tabung yang kosong harus dibiarkan kosong dalam kolom “Name” (Nama).

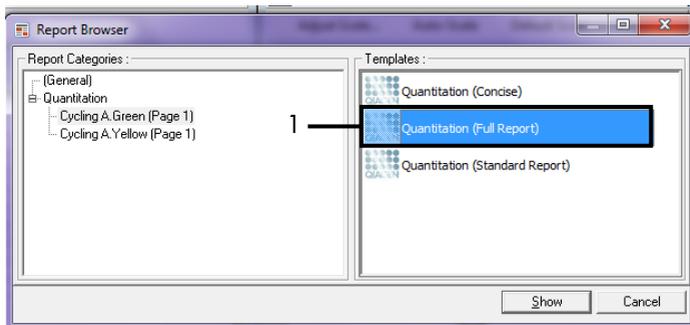
7. Setelah proses selesai, analisis data sesuai dengan petunjuk dalam bagian Analisis data penilaian sampel, atau Analisis data deteksi mutasi EGFR, mana pun yang sesuai.

8. Jika laporan kuantitas diperlukan, klik ikon Reports (Laporan) pada toolbar dalam file proses Rotor-Gene Q.
9. Di browser laporan, klik Cycling A Green (page 1) (Cycling A Green [halaman 1]) pada "Report Categories" (Kategori Laporan) (Gambar 37).



**Gambar 37. Browser laporan (1 = "Cycling A. Green [Page 1]" (Cycling A. Green [Halaman 1])).**

10. Pilih Quantitation (Full Report) (Kuantitas (Laporan Lengkap)) pada "Templates" (Templat) (Gambar 38).



**Gambar 38. Laporan Kuantitas (Laporan Lengkap) (1).**

11. Untuk menghasilkan laporan, klik Show (Tampilkan).
12. Klik Save As (Simpan Sebagai) untuk menyimpan versi elektronik.
13. Ulangi untuk Cycling A Yellow (Page 1) (Cycling A Yellow [Halaman 1]).

# Interpretasi Hasil (Manual)

Setelah proses *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (untuk penilaian sampel DNA atau analisis mutasi EGFR) selesai, analisis data sesuai dengan prosedur berikut:

- Pengaturan perangkat lunak untuk analisis
- Analisis penilaian sampel DNA (manual)  
Catatan: Lihat Tabel 4 untuk tata letak tabung.
- Analisis deteksi mutasi EGFR (manual)  
Catatan: Lihat Tabel 7 untuk tata letak tabung.

## Pengaturan analisis perangkat lunak

1. Buka file proses (\*.rex) yang sesuai menggunakan perangkat lunak Rotor-Gene Q series versi 2.3.5 atau yang lebih baru.
2. Jika sampel belum diberi nama sebelum melakukan proses, klik Edit Samples (Edit Sampel).
3. Masukkan nama sampel dalam kolom Name (Nama).  
Catatan: Kosongkan nama setiap tabung kosong.
4. Klik Analysis (Analisis). Di halaman analisis, klik Cycling A Yellow untuk memeriksa saluran Yellow (HEX).
5. Klik Named On (Beri Nama).  
Catatan: Ini dilakukan untuk memastikan agar tabung yang kosong tidak disertakan dalam analisis.
6. Pilih Dynamic tube (Tabung dinamis).
7. Pilih Slope correct (Koreksi kemiringan).
8. Pilih Linear scale (Skala linear).

- 
9. Pilih Take Off Adj (Tanggalkan Adj) lalu masukkan nilai 15.01 di kotak atas ("If take off point was calculated before cycle" (Jika titik penanggalan dihitung sebelum siklus)) 20.01 dalam kotak bawah ("then use the following cycle and take off point" (lalu gunakan siklus berikut dan titik penanggalan)).
  10. Atur ambang batas menjadi 0.02 lalu periksa nilai  $C_T$  saluran Yellow (HEX).
  11. Di halaman analisis, klik Cycling A Green untuk menampilkan saluran Green (FAM).
  12. Pilih Named On (Beri Nama).
  13. Pilih Dynamic tube (Tabung dinamis).
  14. Pilih Slope correct (Koreksi kemiringan).
  15. Pilih Linear scale (Skala linear).
  16. Pilih Take Off Adj (Tanggalkan Adj) lalu masukkan 15.01 di kotak atas ("If take off point was calculated before cycle" (Jika titik penanggalan dihitung sebelum siklus)) 20.01 dalam kotak bawah ("then use the following cycle and take off point" (lalu gunakan siklus berikut dan titik penanggalan)).
  17. Atur ambang batas menjadi 0.075 lalu periksa nilai  $C_T$  saluran Green (FAM).

---

## Analisis data penilaian sampel

Setelah proses penilaian sampel DNA selesai, baca bagian Pengaturan analisis perangkat lunak lalu analisis data sebagai berikut. (Lihat Tabel 4, halaman 25, untuk tata letak tabung.)

### Analisis kontrol proses

#### **Kontrol negatif**

Untuk memastikan bahwa tidak terjadi kontaminasi templat, NTC tidak boleh menghasilkan nilai  $C_T$  di bawah 40 dalam saluran Green (FAM).

Untuk memastikan bahwa proses telah diatur dengan benar, NTC harus menampilkan amplifikasi dalam rentang 29,85 hingga 35,84 dalam saluran Yellow (HEX). Nilai yang ditentukan berada dalam dan termasuk nilai tersebut.

#### **Kontrol positif**

PC EGFR harus memberikan nilai  $C_T$  dalam saluran Green (FAM) dalam rentang 28,13 hingga 34,59. Nilai di luar rentang ini menunjukkan adanya masalah pengaturan uji kadar. Proses gagal.

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

### Analisis sampel

Jika kontrol proses penilaian sampel DNA valid, maka analisis dapat dilanjutkan. Nilai  $C_T$  kontrol untuk sampel harus berada dalam rentang 23,70 hingga 31,10 dalam saluran Green (FAM). Jika  $C_T$  sampel berada di luar rentang ini, diberikan panduan berikut.

- $C_T$  uji kadar kontrol sampel  $<23,70$

Sampel dengan  $C_T$  kontrol sebesar  $<23,70$  (konsentrasi DNA tinggi) akan melebihi muatan uji kadar mutasi dan harus diencerkan. Untuk mendeteksi setiap mutasi di tingkat rendah, sampel dengan konsentrasi berlebih diencerkan agar jatuh dalam rentang  $C_T$  23,70 hingga 31,10. Pengenceran DNA sampel meningkatkan  $C_T$  (pengenceran dengan rasio 1:1 meningkatkan nilai  $C_T$  sebesar kurang lebih 1,0). Encerkan sampel menggunakan air yang disediakan dalam kit (Air untuk Pengenceran [Dil.]).

- $C_T$  uji kadar kontrol sampel  $>31,10$

Disarankan untuk melakukan ekstraksi ulang sampel dalam  $C_T$  kontrol  $>31,10$  dalam saluran Green (FAM). Templat DNA awalan yang tidak memadai ada untuk mendeteksi semua mutasi EGFR pada nilai cutoff yang ditetapkan untuk uji kadar.

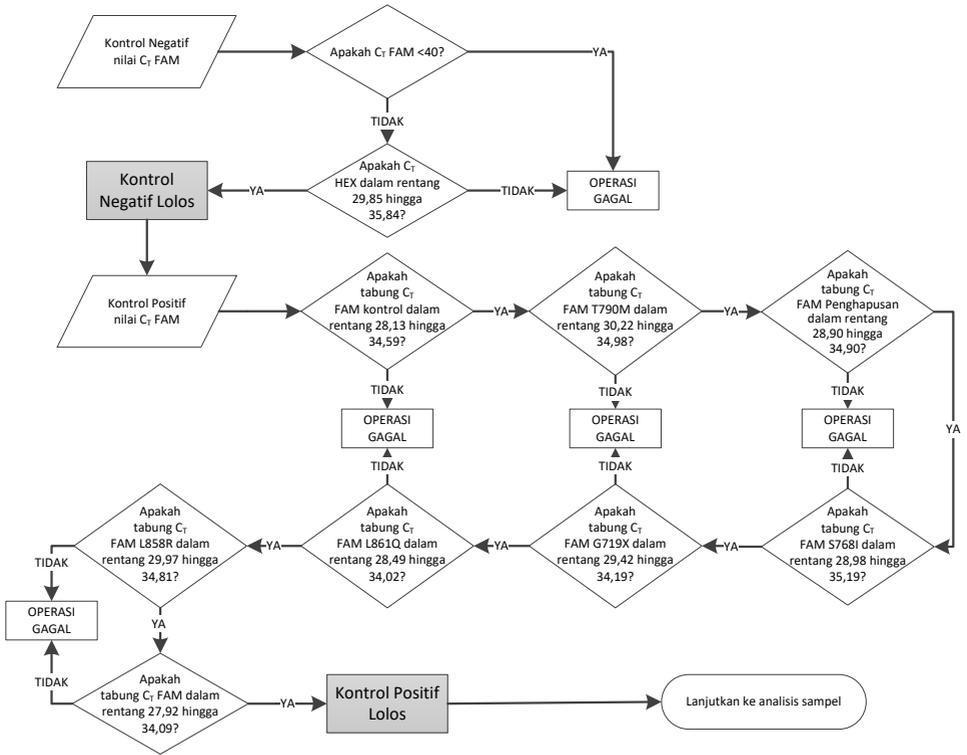
## Analisis data deteksi mutasi EGFR

Suatu sampel harus lolos penilaian sampel DNA sebelum dapat diuji untuk mendeteksi mutasi EGFR (lihat Analisis data penilaian sampel).

Setelah proses deteksi mutasi EGFR selesai, baca bagian Pengaturan analisis perangkat lunak lalu analisis data sebagai berikut. (Lihat Tabel 7 untuk tata letak tabung.)

### Analisis kontrol proses

Lihat bagan alir analisis kontrol proses pada Gambar 39.



Gambar 39. Bagan alir analisis kontrol proses untuk deteksi mutasi EGFR.

### Kontrol negatif

Untuk memastikan bahwa tidak terjadi kontaminasi templat, NTC untuk setiap uji kadar mutasi EGFR tidak boleh menghasilkan nilai  $C_T$  di bawah 40 dalam saluran Green (FAM).

Untuk memastikan bahwa proses telah diatur dengan benar, NTC harus menampilkan amplifikasi dalam rentang 29,85 hingga 35,84 dalam saluran Yellow (HEX). Nilai yang ditentukan berada dalam dan termasuk nilai tersebut.

## Kontrol positif

Untuk setiap uji kadar mutasi EGFR, PC EGFR harus memberikan nilai  $C_T$  dalam saluran Green (FAM) dalam rentang yang ditunjukkan dalam Tabel 16. Nilai di luar rentang ini menunjukkan adanya masalah pengaturan uji kadar. Proses gagal.

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

**Tabel 16. Rentang  $C_T$  yang dapat diterima untuk kontrol positif reaksi (uji kadar deteksi mutasi EGFR)**

Campuran reaksi	Sampel	Saluran	Rentang cutoff $\Delta C_T$
Kontrol	PC	Green	28,13 hingga 34,59
T790M	PC	Green	30,22 hingga 34,98
Penghapusan	PC	Green	28,90 hingga 34,90
L858R	PC	Green	29,97 hingga 34,81
L861Q	PC	Green	28,49 hingga 34,02
G719X	PC	Green	29,42 hingga 34,19
S768I	PC	Green	28,98 hingga 35,19
Sisipan	PC	Green	27,92 hingga 34,09

## Analisis sampel – nilai $C_T$ saluran Green (FAM) kontrol sampel

Jika kontrol positif dan negatif untuk proses deteksi mutasi EGFR valid, deteksi mutasi EGFR dalam sampel dapat dilanjutkan.

Nilai  $C_T$  kontrol untuk sampel dalam saluran Green (FAM) harus berada dalam rentang 23,70 hingga 31,10. (Lihat Tabel 7 untuk tata letak tabung.)

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

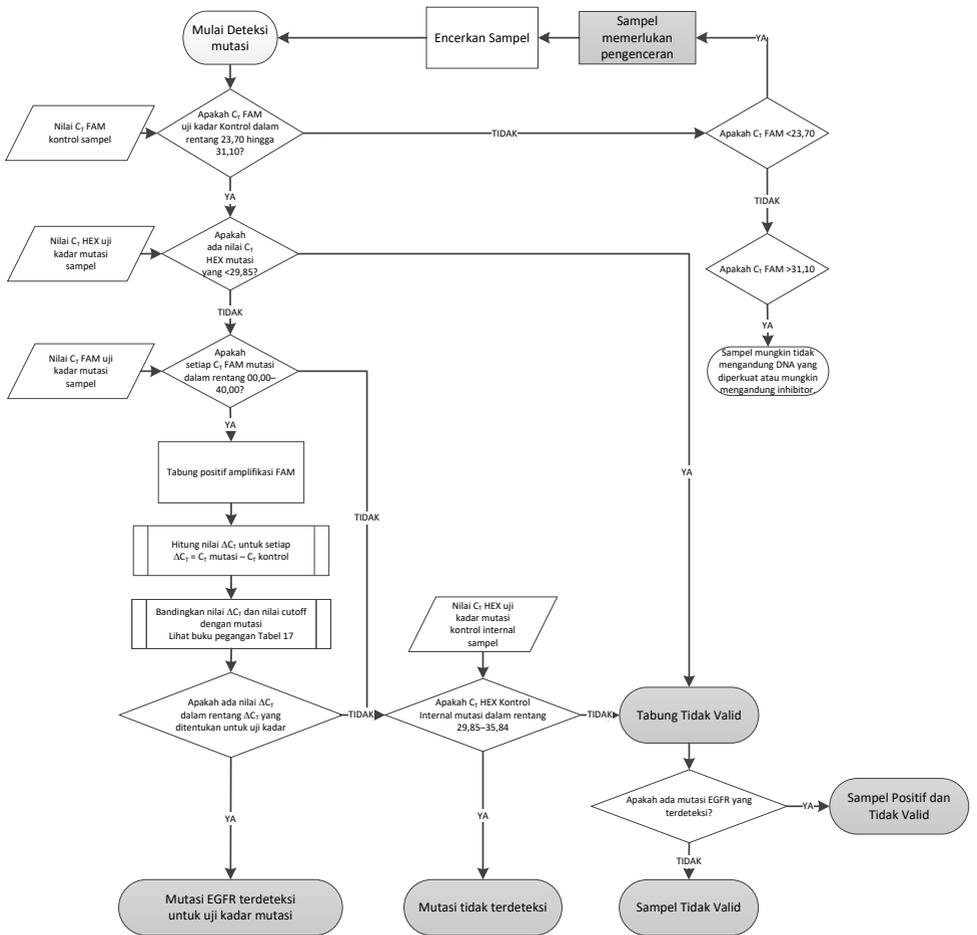
- $C_T$  uji kadar kontrol sampel  $<23,70$

Sampel dengan  $C_T$  kontrol sebesar  $<23,70$  (konsentrasi DNA tinggi) akan melebihi muatan uji kadar mutasi dan harus diencerkan. Untuk mendeteksi setiap mutasi di tingkat rendah, sampel dengan konsentrasi berlebih diencerkan agar jatuh dalam rentang  $C_T$  23,70 hingga 31,10. Pengenceran DNA sampel meningkatkan  $C_T$  (pengenceran dengan rasio 1:1 meningkatkan nilai  $C_T$  sebesar kurang lebih 1,0). Encerkan sampel menggunakan air yang disediakan dalam kit (Air untuk Pengenceran [Dil.]).

- $C_T$  uji kadar kontrol sampel  $>31,10$

Disarankan untuk melakukan ekstraksi ulang sampel dalam  $C_T$  kontrol  $>31,10$  dalam saluran hijau (FAM). Templat DNA awalan yang tidak memadai ada untuk mendeteksi semua mutasi EGFR pada nilai cutoff yang ditetapkan untuk uji kadar.

Lihat bagan alir analisis sampel untuk deteksi mutasi EGFR dalam Gambar 40.



Gambar 40. Bagan alir analisis sampel untuk deteksi mutasi EGFR.

## Analisis sampel – nilai $C_T$ saluran Yellow (HEX) kontrol internal sampel

Catatan: Lihat bagan alir analisis sampel untuk deteksi mutasi EGFR dalam Gambar 40.

Semua tabung dari tiap sampel harus dianalisis. Periksa bahwa masing-masing tabung menghasilkan sinyal HEX dalam rentang 29,85 hingga 35,84 dari kontrol internal dalam saluran Yellow (HEX). Terdapat 3 kemungkinan hasil.

- Jika  $C_T$  kontrol internal di bawah rentang yang ditetapkan ( $<29,85$ ) untuk setiap uji kadar mutasi, maka hasilnya tidak valid untuk amplifikasi saluran Yellow (HEX). Amplifikasi saluran Yellow (HEX) untuk tabung tersebut tidak valid.
- Jika  $C_T$  kontrol internal jatuh dalam rentang yang ditetapkan (29,85 hingga 35,84), maka hasilnya positif untuk amplifikasi saluran Yellow (HEX). Amplifikasi saluran Yellow (HEX) untuk tabung tersebut valid.
- Jika  $C_T$  kontrol internal di atas rentang yang ditetapkan ( $>35,84$ ), maka hasilnya negatif untuk amplifikasi saluran Yellow (HEX).

Jika terdapat amplifikasi dalam saluran Green (FAM), dan  $\Delta C_T$  untuk reaksi tersebut lebih rendah dari atau sama dengan cut-off uji kadar untuk tabung tersebut, amplifikasi saluran Yellow (HEX) valid. Jika tidak ada amplifikasi dalam saluran Green (FAM) untuk tabung tersebut atau nilai  $\Delta C_T$  lebih tinggi dari cut-off uji kadar, amplifikasi saluran Yellow (HEX) tidak valid.

Amplifikasi kontrol internal dalam saluran Yellow (HEX) mungkin gagal karena inhibisi PCR. Pengenceran sampel dapat mengurangi pengaruh inhibitor. Perlu dicatat bahwa tindakan ini juga mengencerkan DNA target dalam sampel. Encerkan sampel menggunakan air yang disediakan dalam kit (Air untuk Pengenceran [Dil.]).

## Analisis sampel – nilai $C_T$ saluran Green (FAM) uji kadar mutasi sampel

Nilai saluran Green (FAM) untuk ketujuh campuran reaksi mutasi EGFR harus diperiksa dengan nilai yang tercantum dalam Tabel 17. Nilai yang ditentukan berada dalam dan termasuk nilai yang ditunjukkan. (Lihat Tabel 7 untuk tata letak tabung.)

**Tabel 17. Nilai yang dapat diterima untuk reaksi mutasi EGFR sampel dalam saluran Green (FAM) (uji kadar deteksi mutasi EGFR)**

Uji Kadar	Rentang $C_T$	Rentang cutoff $\Delta C_T$
T790M	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 7,40
Penghapusan	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,00
L858R	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
L861Q	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
G719X	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
S768I	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,90
Sisipan	0,00 hingga 40,00	-10,00 $\geq$ hingga $\leq$ 8,00

- Jika  $C_T$  saluran Green (FAM) untuk sampel jatuh dalam rentang yang ditentukan, artinya positif amplifikasi FAM.
- Jika  $C_T$  saluran Green (FAM) untuk sampel jatuh di atas rentang yang ditentukan, atau tidak ada amplifikasi, artinya negatif amplifikasi FAM.

Hitung nilai  $\Delta C_T$  untuk setiap tabung deteksi mutasi EGFR yang positif amplifikasi FAM seperti berikut ini, dengan memastikan bahwa nilai  $C_T$  kontrol dan mutasi berasal dari sampel yang sama. (Lihat Tabel 7 untuk tata letak tabung.)

$$\Delta C_T = [\text{nilai } C_T \text{ uji kadar mutasi}] - [\text{nilai } C_T \text{ uji kadar kontrol}]$$

Bandingkan nilai  $\Delta C_T$  untuk sampel dengan rentang cutoff  $\Delta C_T$  untuk uji kadar terkait (Tabel 17). Pastikan bahwa rentang cutoff  $\Delta C_T$  yang tepat telah diterapkan.

Titik atas rentang cutoff  $\Delta C_T$  adalah titik di atas di mana sinyal positif untuk uji kadar kemungkinan dapat disebabkan karena sinyal latar belakang primer ARMS pada DNA tipe liar. Jika nilai  $\Delta C_T$  sampel lebih tinggi dari rentang cutoff  $\Delta C_T$  untuk uji kadar, sampel digolongkan sebagai negatif atau di luar batas deteksi kit untuk uji kadar tersebut. Jika nilai sampel di bawah batas bawah rentang cutoff  $\Delta C_T$ , hal ini mungkin berpotensi karena artefak fluoresens.

---

Status masing-masing reaksi mutasi untuk setiap sampel dapat berupa salah satu dari berikut ini:

- Mutasi terdeteksi
- Mutasi tidak terdeteksi
- Tidak valid

### **Mutasi terdeteksi**

Amplifikasi saluran Green (FAM) positif dan nilai  $\Delta C_T$  berada dalam rentang cutoff  $\Delta C_T$ . Jika beberapa mutasi terdeteksi untuk suatu sampel, seluruhnya dapat dilaporkan.

### **Mutasi tidak terdeteksi**

Amplifikasi saluran Green (FAM) positif dan nilai  $\Delta C_T$  berada di atas rentang cutoff  $\Delta C_T$ .

Amplifikasi saluran Green (FAM) negatif dan amplifikasi saluran Yellow (HEX) (kontrol internal) positif.

---

## Tidak valid

Amplifikasi saluran Yellow (HEX) (kontrol internal) tidak valid.

Amplifikasi saluran Green (FAM) negatif dan amplifikasi saluran Yellow (HEX) (kontrol internal) negatif.

Catatan: Sampel mungkin negatif amplifikasi saluran Yellow (HEX) di satu tabung, namun positif amplifikasi saluran Green (FAM) di tabung kedua. Pada kasus tersebut, hasil "mutation detected" (mutasi terdeteksi) pada tabung kedua dapat dianggap valid namun mutasi tertentu yang teridentifikasi mungkin bukan satu-satunya kemungkinan mutasi dalam sampel tersebut.

$\Delta C_T$  yang dihitung berada di bawah rentang cutoff  $\Delta C_T$  dan amplifikasi saluran Yellow (HEX) (kontrol internal) berada dalam rentang yang diharapkan.

# Lampiran B: Pemasangan *therascreen* EGFR CE Assay Package

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit dirancang untuk digunakan dengan instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dan 72-well rotor. *therascreen* EGFR CE Assay Package tersedia untuk diunduh dari halaman web produk *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit di [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Masuk ke Product Resources (Sumber Daya Produk) > Supplementary Protocols (Protokol Tambahan) untuk mengunduh paket uji kadar. Paket uji kadar tersebut meliputi “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” dan “*therascreen* EGFR CE Locked Template.”

Catatan: *therascreen* EGFR CE Assay Package hanya kompatibel dengan perangkat lunak Rotor-Gene Q versi 2.3.5 atau yang lebih baru. Pastikan bahwa versi perangkat lunak Rotor-Gene Q yang tepat telah terpasang sebelum melanjutkan pemasangan *therascreen* EGFR CE Assay Package. Jika instrumen Rotor-Gene Q MDx dikirimkan dengan versi perangkat lunak yang lebih lama, tingkatkan dengan mengunduh perangkat lunak Rotor-Gene Q versi 2.3.5 atau yang lebih baru dari halaman produk Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (di bagian “Product Resources” (Sumber Daya Produk) pada “Operating Software” (Perangkat Lunak Pengoperasian); lihat [www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources)).

## Prosedur

1. Unduh *therascreen* EGFR CE Assay Package dari [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) lalu transfer ke perangkat penyimpanan USB bebas virus.

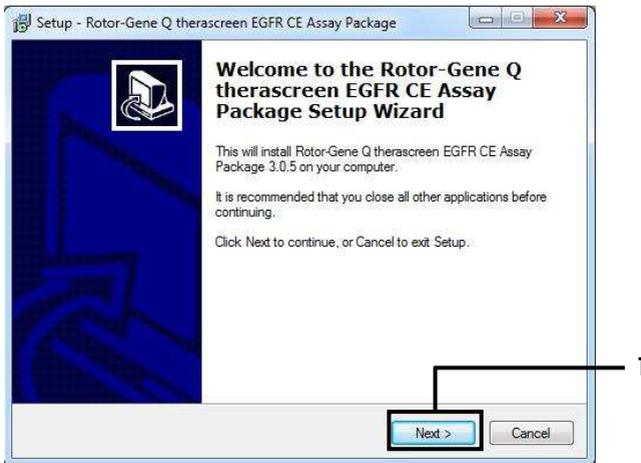
Catatan: Paket uji kadar tersedia dalam halaman web produk *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Versi 2. Buka Product Resources (Sumber Daya Produk) > Supplementary Protocols (Protokol Tambahan) untuk mengunduh paket uji kadar.

2. Masukkan perangkat penyimpanan USB ke dalam komputer yang terhubung pada instrumen Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Temukan file *therascreen* EGFR CE Assay Package.

4. Klik kanan *therascreen* EGFR CE Assay Package, lalu pilih Extract all (Ekstrak semua) untuk melakukan unzip pada file.
5. Klik dua kali *therascreen\_EGFR\_CE\_Assay\_Package\_3.0.6.exe* untuk memulai pemasangan.  
Atau, temukan dan mulai file yang dapat dieksekusi ini menggunakan browser file pada komputer yang terhubung.

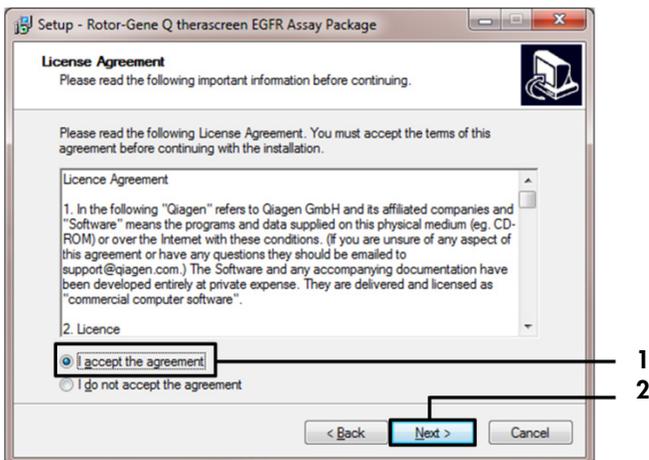
Wizard pengaturan *therascreen* EGFR CE Assay Package terbuka.

6. Klik Next (Berikutnya) untuk melanjutkan (Gambar 41).



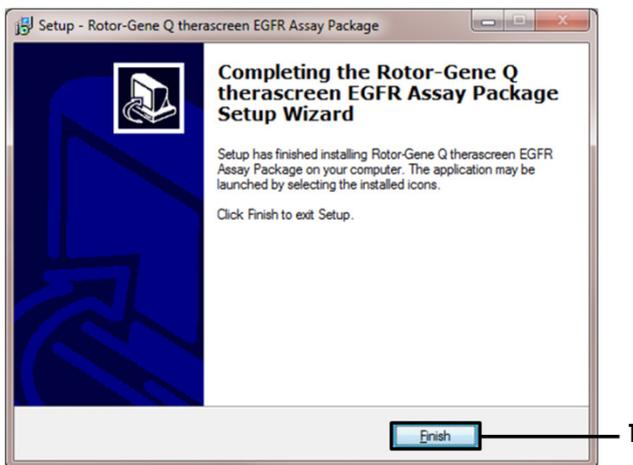
Gambar 41. Kotak dialog "Setup Wizard" (Wizard Pengaturan) (1 = "Next" (Berikutnya)).

7. Baca Perjanjian Lisensi dalam kotak dialog lalu centang kotak I accept the agreement (Saya menyetujui perjanjian ini). Klik Next (Berikutnya) untuk melanjutkan (Gambar 42). Pengaturan dimulai secara otomatis.



**Gambar 42.** Kotak dialog “License Agreement” (Perjanjian Lisensi). 1 = “I accept the agreement” (Saya menyetujui perjanjian ini); 2 = “Next” (Berikutnya).

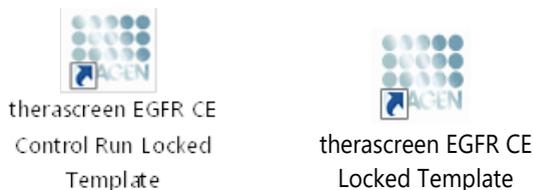
8. Setelah pemasangan selesai, klik Finish (Selesai) dalam kotak dialog wizard Setup (Pengaturan) (Gambar 43).



**Gambar 43.** Menyelesaikan wizard pengaturan (1 = “Finish” (Selesai)).

9. Mulai ulang komputer.

Pintasan ke “*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template” (Templat Terkunci Kontrol Proses *therascreen* EGFR CE) dan “*therascreen* EGFR CE Locked Template” (Templat Terkunci *therascreen* EGFR CE) secara otomatis dihasilkan dan muncul pada desktop (Gambar 44).



**Gambar 44.** Ikon EGFR CE Control Run Locked Template (Templat Terkunci Kontrol Proses EGFR CE) dan EGFR CE Locked Template (Templat Terkunci EGFR CE).

## Informasi Kontak

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

# Informasi Pemesanan

Produk	Isi	No. Kat.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Untuk 24 reaksi: Uji Kadar Kontrol, 7 Uji Kadar Mutasi, Kontrol Positif, Polimerase DNA <i>Taq</i> , Air untuk NTC, dan Air untuk Pengenceran Sampel	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package	Paket protokol perangkat lunak untuk digunakan dengan <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit dan instrumen QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Unduh
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit</b>		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Untuk 50 penyiapan DNA: Kolom QIAamp MinElute®, Proteinase K, Dapar, dan Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Untuk 50 penyiapan: 50 Kolom QIAamp MinElute, Proteinase K, Dapar, dan Collection Tubes (2 ml)	56404
<b>Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM dan aksesoris</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cycler real-time PCR dan penganalisis Pelelehan Resolusi Tinggi dengan 5 saluran (hijau, kuning, jingga, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, komputer laptop, perangkat lunak, aksesoris, 1-tahun garansi suku cadang dan tenaga kerja, pemasangan, dan pelatihan	9002033

<b>Produk</b>	<b>Isi</b>	<b>No. Kat.</b>
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cycler real-time PCR dan penganalisis Pelelehan Resolusi Tinggi dengan 5 saluran (hijau, kuning, jingga, merah, merah tua) ditambah saluran HRM, komputer laptop, perangkat lunak, aksesoris, termasuk 1-tahun garansi suku cadang dan tenaga kerja, tidak termasuk pemasangan dan pelatihan	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Blok aluminium untuk pengaturan reaksi manual dengan pipet bersaluran tunggal dalam tabung 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 strip 4 tabung dan penutup untuk 1000 reaksi	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 strip 4 tabung dan penutup untuk 10.000 reaksi	981106

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

# Riwayat Revisi Dokumen

Tanggal	Perubahan
R5, Januari 2019	Tambahan Perwakilan Resmi (sampul depan). Bab "Simbol" diperbarui.
R6, Oktober 2019	Perubahan produsen legal (halaman sampul) Adaptasi nama instrumen dari Rotor-Gene Q MDx menjadi Rotor-Gene Q MDx Splex HRM agar selaras dengan nama pada label instrumen Penambahan kondisi penyimpanan reagen dalam bagian Penyimpanan dan Penanganan Reagen Pembaruan Tabel 1 untuk menambahkan catatan tentang penghapusan COSM6254 dari basis data COSMIC Pembaruan bagian Batasan dengan informasi sehubungan dengan uji kadar penghapusan ekson 19 dan uji kadar L858R Simbol EC + REP dihapus dari halaman depan dan bab Simbol
R7, Juni 2020	Nomor versi EGFR Assay Package diperbarui dari 3.0.5 menjadi 3.0.6 Pembaruan referensi pada versi perangkat lunak RGQ dari 2.3 menjadi 2.3.5 atau yang lebih baru Pembaruan Tabel 9 dan 17 untuk menerapkan rentang cutoff yang baru dan menyesuaikan semua deskripsi terkait yang sesuai (di seluruh buku pegangan) Pembaruan semua bab Protokol untuk menyertakan informasi tentang pentingnya pencampuran dalam bagian Poin penting sebelum memulai; menyoroti detail pencampuran di semua tahapan pencampuran; Penambahan tahap pencampuran bila diperlukan Penambahan tanda MUTATION_EARLY_CT di Tabel 8 Penghapusan semua rujukan ke CD dan diganti dengan informasi unduhan

Perjanjian Lisensi Terbatas untuk *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Penggunaan produk ini menyatakan perjanjian pembeli atau pengguna produk dengan ketentuan berikut:

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

Untuk ketentuan lisensi yang diperbarui, lihat [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

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

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit adalah kit diagnostik bertanda CE sesuai dengan European In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC. Tidak tersedia di semua negara.

1121935 06-2020 HB-1909-007 © 2020 QIAGEN, hak cipta dilindungi undang-undang.

