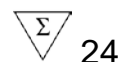


Příručka k soupravě *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit

Verze 1



IVD

Pro diagnostiku in vitro

K použití s přístrojem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4 **MAT** 1063321CS



Technologie QIAGEN pro zpracování a analýzu vzorků

Společnost QIAGEN je předním dodavatelem inovativních technologií pro zpracování a analýzu vzorků, které umožňují izolaci a detekci složek libovolného biologického vzorku. Naše vyspělé, vysoce kvalitní produkty a služby vám zajistí úspěšný průběh od odběru vzorku až po výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:

- purifikaci DNA, RNA a proteinů;
- rozbory nukleových kyselin a proteinů;
- výzkum microRNA a RNAi;
- automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich rozbory.

Naším cílem je poskytovat co nejnovější technologie, které vám zaručí spolehlivé výsledky a dosažení významného pokroku. Více informací naleznete na stránkách www.qiagen.com.

Obsah

Zamýšlený účel použití	5
Shrnutí a vysvětlení	5
Princip postupu	6
Dodávané materiály	9
Obsah soupravy	9
Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy	10
Upozornění a bezpečnostní opatření	11
Bezpečnostní informace	11
Obecná ustanovení	11
Skladování činidel a manipulace s nimi	12
Manipulace se vzorkem a jeho skladování	13
Postup	13
Stanovení množství nádorových buněk potřebných pro analýzu EGFR	13
Izolace DNA	14
Protokoly	
■ Stanovení vzorku	14
■ Detekce mutací EGFR	17
■ Nastavení přístroje Rotor-Gene Q EGFR	20
Interpretace výsledků	29
Analýza dat hodnocení vzorku	29
Analýza dat mutací EGFR	32
Návod na řešení potíží	41
Kontrola kvality	42
Omezení	42
Charakteristiky funkčních vlastností analýz	43
Hraniční hodnoty	43
Limit detekce (LOD)	43
Přesnost	44
Reprodukovatelnost	45
Účinky vstupní koncentrace DNA	45
Interferující látky	45
Odkazy	45

Symboly	46
Kontaktní údaje	46
Příloha: Podrobné informace o mutacích	46
Informace pro objednávky	49

Zamýšlený účel použití

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit je určena k in vitro detekci 29 somatických mutací s rakovinou spojeného genu EGFR a umožňuje kvalitativní hodnocení stavu mutací.

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit je určena k použití kvalifikovanými odborníky v profesionálních laboratořích. Používá vzorky DNA extrahované ze tkáně nemalobuněčných plicních karcinomů NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) fixované formalinem zalité v parafinu. Výsledky jsou určeny jako pomůcka pro klinické pracovníky při identifikaci pacientů s NSCLC, kteří by mohli mít prospěch z léčby tyrozinkinázovými inhibitory.

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit překročila datum expirace.

Shrnutí a vysvětlení

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit představuje soupravu k okamžitému použití k detekci 29 somatických mutací s rakovinou souvisejícího genu EGFR pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR = Polymerase Chain Reaction) na přístroji Rotor-Gene Q.

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit umožňuje detekci následujících mutací vůči pozadí genomové DNA „divokého“ typu za využití technologií Scorpions® a ARMS®.

- 19 delecí v exonu 19 (detekuje přítomnost kterékoli z 19 delecí, ale jednotlivé delece od sebe nerozlišuje)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (detekuje přítomnost mutací G719S, G719A nebo G719C, ale jednotlivé mutace od sebe nerozlišuje)
- S768I
- 3 inserce v exonu 20 (detekuje přítomnost jakékoli ze 3 inzercí, ale jednotlivé inserce od sebe nerozlišuje)

Použité metody jsou vysoce selektivní a v závislosti na celkovém množství přítomné DNA dokáže souprava detekovat nízké procento mutované DNA na pozadí genomové DNA divokého typu. Tato selektivita a detekční limity převyšují jiné technologie, jako je sekvenování se značenými terminátory.

Princip postupu

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit využívá k detekci mutací kombinaci dvou technologií – ARMS a Scorpions při PCR v reálném čase.

ARMS

Ke specifické amplifikaci alely nebo mutace pomocí metody ARMS (Amplification Refractory Mutation System). *Taq* DNA polymeráza (*Taq*) je mimořádně účinná při rozlišování mezi shodou a neshodou na 3'-konci PCR primeru. Specifické mutované sekvence lze selektivně amplifikovat, dokonce i v případech, kdy většina sekvencí mutaci neobsahuje. Pokud se primer zcela shoduje, zesílení pokračuje s plnou účinností. Pokud se 3'-báze neshoduje, probíhá pouze nesespecifická zesílení na nízké úrovni v pozadí reakce.

Scorpions

Detekce zesílení se provádí pomocí detekčních sond Scorpions. Sonda Scorpions jsou bifunkční molekuly obsahující PCR primer kovalentně vázaný na sondu. Fluorofor na sondě interaguje se zhášecím, který je inkorporovaný k sondě a snižuje fluorescenci. Během PCR reakce, kdy se sonda naváže na amplikon, se fluorofor a zhášec od sebe oddělí. Tím dojde k nárůstu intenzity fluorescence v reakční zkumavce.

Formát soupravy

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit obsahuje osm analýz:

- Jedna kontrolní analýza (Ctrl)
- Sedm analýz mutací

Všechny reakční jsou duplexní a obsahují reakční činidla k detekci cílů označených pomocí FAM™ a interní kontrolu analýzy označenou HEX™. Interní kontrolní analýza umožňuje detekovat přítomnost inhibitorů, které mohou vést k falešně negativním výsledkům. Zesílení FAM může nahradit zesílení interní kontroly a účelem této interní kontroly je jednoduše ukázat, že zde není žádné zesílení FAM, jedná se o skutečně negativní výsledek a nikoli o selhání PCR reakce.

Postup

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit zahrnuje postup o dvou krocích. V prvním kroku se provádí kontrolní analýza ke stanovení celkového množství DNA ve vzorku. Druhým krokem je provedení analýzy mutace a kontrolní analýzy ke stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti mutované DNA.

Analýzy:

Kontrolní analýza

Kontrolní analýza, značená FAM, se používá ke stanovení celkového množství DNA ve vzorku. Tato analýza amplifikuje oblast exonu 2 genu EGFR. Primer a sonda jsou navrženy tak, aby se vyhnuly všem známým polymorfismům genu EGFR.

Pro stanovení celkové DNA ve vzorku důrazně doporučujeme používat kontrolní reakční směs (CTRL) dodanou v soupravě *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Tato kontrolní analýza amplifikuje oblast exonu 2 genu EGFR. Vzorky doporučujeme stanovit pouze pomocí této kontrolní analýzy za použití pozitivní kontroly EGFR (PC) jako pozitivní kontroly a vody bez obsahu nukleázy (H₂O) jako kontroly bez templátu.

Poznámka: Vyhodnocení DNA by mělo vycházet z PCR a může se lišit od kvantitativního vyjádření na základě výsledků absorbance. Součástí dodávky je i doplňková kontrolní reakční směs (Ctrl) ke stanovení kvality a kvantity DNA ve vzorcích ještě před zahájením analýzy soupravou *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Analýza mutací

Každá analýza mutace zahrnuje sondu Scorpion označenou FAM a primer ARMS pro rozlišení mezi přirozenou DNA divokého typu a specifickou mutovanou DNA.

Kontroly

Poznámka: Všechna zpracovní experimentů musí zahrnovat kontroly.

Pozitivní kontrola

Každé zpracování musí obsahovat pozitivní kontrolu ve zkumavkách 1–8. Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR obsahuje pozitivní kontrolu EGFR (PC), která se používá jako templát při pozitivní kontrolní reakci. Výsledky pozitivní kontroly budou vyhodnoceny, aby se zajistilo, že souprava pracuje v rámci stanovených kritérií přijatelnosti.

Negativní kontrola

Každé zpracování musí obsahovat negativní kontrolu („kontrolu bez templátu“) ve zkumavkách 9–16. NTC se skládá z vody bez obsahu nukleázy (H₂O), která se používá jako „templát“ pro kontrolu bez templátu (NTC). Kontrola bez templátu se používá k vyhodnocení potenciálního znečištění v průběhu nastavení zpracování a k vyhodnocení výkonu reakce interní kontroly.

Hodnocení reakce interní kontroly

Každá reakční směs obsahuje vedle cílové reakce navíc i interní kontrolní reakci. Selhání indikuje, že buď jsou přítomny inhibitory, které mohou způsobit falešné negativní výsledky, nebo pro danou zkumavku došlo k chybě operátora při její přípravě.

Jestliže k selhání interní kontroly dojde v důsledku PCR inhibice, zředění vzorku může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění cílové DNA. Zesílení FAM může nahradit amplifikaci interní kontroly, takže získaná hodnota IC C_T (HEX) bude spadat mimo zadaný rozsah. Výsledky FAM jsou pro tyto vzorky nadále platné.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit			(24)
Katalogové č.			870111
Počet reakcí			24
Červená	Control Reaction Mix (Kontrolní reakční směs)	Ctrl	2 x 600 µl
Fialová	T790M Reaction Mix (Reakční směs pro T790M)	T790M	600 µl
Oranžová	Deletions Reaction Mix (Reakční směs pro delece)	Del	600 µl
Růžová	L858R Reaction Mix (Reakční směs pro L858R)	L858R	600 µl
Zelená	L861Q Reaction Mix (Reakční směs pro L861Q)	L861Q	600 µl
Žlutá	G719X Reaction Mix (Reakční směs pro G719X)	G719X	600 µl
Šedá	S768I Reaction Mix (Reakční směs pro S768I)	S768I	600 µl
Modrá	Insertions Reaction Mix (Reakční směs pro inzerce)	Ins	600 µl
Hnědá	EGFR Positive Control (Pozitivní kontrola EGFR)	PC	300 µl
Tyrkysová	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA polymeráza)	<i>Taq</i>	138 µl
Bílá	Nuclease-Free Water (Voda bez nukleázy)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
<i>therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook</i> (příručka v angličtině)			1

Další potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

- Souprava na izolaci DNA (viz „Izolace DNA“, strana 14)
- Xylen
- Etanol (96–100 %)*
- Zkumavky do mikrocentrifugy o objemu 1,5 ml nebo 2 ml (pro postup lýzy)
- Zkumavky do mikrocentrifugy o objemu 1,5 ml (pro postup eluce) (k dodání od společnosti Brinkmann [Safe-Lock, kat. č. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat. č. 0030 120.086] nebo Sarstedt [Safety Cap, kat. č. 72.690])[†]
- Pipety[‡] (nastavitelné), vyhrazené k přípravě vzorku
- Pipety[‡] (nastavitelné), určené výhradně k přípravě master mixu PCR
- Pipety[‡] (nastavitelné), určené výhradně k dávkování templátu DNA*
- Sterilní hroty pipet DNAsy, RNAsy a bez DNA s filtry (aby se předešlo křížové kontaminaci, doporučujeme pipety s aerosolovými bariérami)
- Tepelná míchačka, vyhřívaný orbitální inkubátor, topný blok nebo vodní lázeň s možností inkubace při teplotě 90 °C[‡]
- Stolní centrifuga[‡] s rotorem na reakční 2ml zkumavky
- Vortex
- Přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM^{‡§} s fluorescenčními kanály „Cycling Green“ a „Cycling Yellow“ (detekce FAM a HEX v uvedeném pořadí)
- Software přístroje Rotor-Gene Q, verze 2.0.2 nebo vyšší
- Stripy zkumavek a víčka 0,1 ml, použití s rotorem o 72 jamkách (katalogové číslo 981103 nebo 981106)

* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.

[†] Nejedná se o kompletní seznam dodavatelů.

[‡] Zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a zkalibrovány podle doporučení výrobce.

[§] Popř. přístroj Rotor-Gene Q 5plex HRM.

V některých zemích se používá i označení Rotor-Gene Q MDx.

- Zkumavky s DNAsou, RNAsou a bez DNA do mikrocentrifugy k přípravě master mixů
- Nakládací blok zkumavek 72 x 0,1 ml, hliníkový blok k ruční přípravě reakce pomocí jednokanálové pipety (QIAGEN, kat. č. 9018901)

Upozornění a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro.

Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech souprav a součástí souprav QIAGEN.

Nepřetržité poskytování informací v naléhavých případech

Chemickou nouzovou asistenci nebo asistenci při nehodě poskytuje 24 hodin denně společnost:

CHEMTREC

USA a Kanada ■ Tel: 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanadu ■ Tel: +1-703-527-3887 (hovory na účet volaného jsou přijímány)

Obecná ustanovení

Uživatel by měl vždy věnovat pozornost dodržování následujících pravidel.

- Používejte pipetovací špičky s DNAsou, RNAsou a bez DNA s filtry a zajistěte, aby pipeta byla kalibrována v souladu s návodem výrobce.
- Pozitivní materiály (vzorky a pozitivní kontroly) skladujte a extrahujte odděleně od všech ostatních činidel. Do reakční směsi je přidávejte v odděleném prostoru.
- Před zahájením analýzy důkladně rozmrazte všechny složky na pokojovou teplotu (15 až 25 °C).
- Po rozmrazení všechny složky promíchejte (převrácením každé zkumavky 10krát) a krátce odstředte.

Poznámka: Věnujte maximální pozornost tomu, aby nedošlo ke kontaminaci PCR syntetickým kontrolním materiálem. K přípravě reakčních směsí a přidávání templátu DNA se doporučuje používat vyhrazené pipety. Příprava a dávkování reakčních směsí musí být prováděny v prostoru odděleném od

místa, kde se provádí dávkování templátu. Zkumavky přístroje Rotor-Gene Q po dokončení zpracování PCR nikdy neotevírejte. Předejdete tak laboratorní kontaminaci produkty vzniklými po PCR.

Poznámka: Činidla jsou ověřena pro manuální nastavení. Pokud se používá automatická metoda, může to snížit počet možných reakcí v důsledku množství činidla požadovaného pro zaplnění „mrtvých objemů“ v těchto přístrojích.

Poznámka: Všechny reagenty v soupravě *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit mají složení připravené specificky pro dané testy. Všechna činidla dodávaná v soupravě *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit jsou určena k použití výhradně s ostatními činidly ve stejné soupravě *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Má-li být zachován optimální výkon testu, nelze se soupravou používat žádná náhradní činidla.

Poznámka: Používejte výhradně *Taq* DNA polymerázu (*Taq*), která se dodává v soupravě. Nenahrazujte ji *Taq* DNA polymerázou dodávanou jako součást jiné soupravy stejného nebo jiného typu, ani ji nezaměňujte za *Taq* DNA polymerázu od jiného dodavatele.

Poznámka: Činidla v soupravě *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit jsou optimálně naředěna. Další ředění činidel se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu. Použití menších reakčních objemů než 25 µl se nedoporučuje, neboť tím narůstá riziko výskytu falešně negativních výsledků.

Skladování činidel a manipulace s nimi

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se dodává v suchém ledu a při dodání musí být stále zmrzlý. Pokud není souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit při dodání zmrzlá, během přepravy došlo k otevření vnějšího obalu nebo zásilka neobsahuje balicí list, manuál nebo činidla, obraťte se na oddělení technických služeb QIAGEN Technical Service Department nebo místní prodejce (viz zadní obálka nebo navštivte stránky www.qiagen.com).

Soupravu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit uložte po dodání bez prodlení do mrazničky a skladujte v temnu při konstantní teplotě –15 °C až –25 °C. Při skladování za doporučených podmínek a v původním balení je obsah soupravy stabilní až do data expirace uvedeného na štítku. Je třeba zamezit opakovanému zmrazování a rozmrazování. Doporučujeme nejvýše 7 cyklů zmrazení - rozmrazení.

Poznámka: V zájmu zajištění optimální aktivity a účinnosti je třeba sondy Scorpions (stejně jako všechny fluorescencí značené molekuly) chránit před světlem, aby nedošlo k jejich optickému vyblednutí.

Poznámka: Pro optimální využití činidel soupravy *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit je vhodné zpracovávat vzorky v dávkách. Při jednotlivém testování vzorků se spotřebuje více činidel a sníží se tím počet vzorků, které lze pomocí soupravy *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit testovat.

Manipulace se vzorkem a jeho skladování

Poznámka: Všechny vzorky jsou potenciálně infekční a podle toho se s nimi musí zacházet.

Materiál vzorků musí být lidská genomová DNA extrahovaná ze vzorků tkání nemalobuněčného plicního nádoru, fixovaných formalinem zalitých v parafinu (FFPE). Vzorky musí být dopravovány v souladu se standardní patologickou metodologií, aby byla zajištěna kvalita vzorku.

Vzorky nádorů nejsou homogenní a naměřené výsledky ze vzorku nádoru se nemusí shodovat s výsledky z jiných řezů téhož nádoru. Vzorky nádoru mohou také obsahovat nenádorovou tkáň. U DNA z nenádorové tkáně se neočekává přítomnost mutací EGFR, které detekuje souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Postup

Stanovení množství nádorových buněk potřebných pro analýzu EGFR

Tkáň používaná pro analýzu EGFR je vzorek tkáně nemalobuněčného karcinomu plic fixovaného formalinem zalitým v parafinu (FFPE). Extrahovaná DNA z buněk v nádorové tkáni může být divokého typu s ohledem na mutace EGFR nebo může přenášet jednu nebo více mutací.

Tkáň FFPE NSCLC používaná pro tuto extrakci může také obsahovat normální, nenádorovou tkáň, která bude divokého typu s ohledem na mutace EGFR. DNA divokého typu z této tkáně může zředit mutantní DNA, potenciálně až na úroveň, kde není nadále snadno detekovatelná. Doporučuje se však, aby byly testovány rovné vzorky s nízkým obsahem nádoru, protože existuje možnost vysoké úrovně mutací, které budou detekovány a rozhodnutí o léčbě týkající se pacienta.

Pro maximalizaci šance na detekci mutací pokračujte následujícím způsobem.

- Hematoxylin a eosin (H&E) barví nejméně jedno sklíčko z každého vzorku pacienta.
- Zajistěte, že patolog prozkoumá obarvené sklíčko na přítomnost nádoru.
- Pokud je možné, měl by patolog přezkoumat několik sklíček napříč bloku FFPE.
- Všechny vzorky s přítomným nádorem mohou být testovány sadou *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Izolace DNA

Izolace DNA se musí provést pomocí soupravy QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit.

Purifikaci DNA proveďte podle návodu v příručce k soupravě QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) s následujícími změnami.

- Řezy FFPE položte na podložní sklíčka.
- Nadbytečný parafin seškrábněte z okolí tkáňového řezu nepoužitým sterilním skalpelem.
- Materiál tkáňového řezu seškrábejte do zkumavek mikrocentrifugy. Pro každý vzorek k extrakci použijte dosud nepoužitý sterilní skalpel.
- Rozklad vzorku pomocí proteinázy K by měl probíhat 1 hodinu.
- Purifikovaná genomová DNA musí být eluována ve 200 µl pufru ATE (je součástí soupravy QIAamp DNA FFPE Tissue).
- Purifikovanou genomovou DNA skladujte při teplotě –15 °C až –30 °C.
- Pokud jsou informace dostupné, je třeba použít sklíčka vedle obarveného sklíčka H&E s nejvyšší obsahem nádoru.

Poznámka: Při všech analýzách pomocí soupravy *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit se vytvářejí krátké produkty PCR. Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit však nebude fungovat se vzorky silně fragmentované DNA.

Protokol: Stanovení vzorku

Tento protokol je určen ke zjištění celkového amplifikovatelného obsahu DNA ve vzorcích.

Důležité body před zahájením

- Před zahájením postupu si přečtěte část „Obecná ustanovení“, stránka 11.
- Před zahájením protokolu věnujte dostatek času seznámení s přístrojem Rotor-Gene Q. Viz uživatelská příručka přístroje.
- Neprotřepávejte *Taq* DNA polymerázu (*Taq*) ani žádnou směs obsahující *Taq* DNA polymerázu, neboť by mohlo dojít k inaktivaci enzymu.
- *Taq* DNA polymerázu (*Taq*) pipetujte tak, že špičku pipety ponoříte těsně pod hladinu kapaliny, aby na vnějším povrchu špičky neulpělo nadměrné množství enzymu.

Úkony před zahájením

- Před každým použitím musí být všechna činidla zcela rozmrazená na pokojovou teplotu (15–25 °C), promíchaná (převrácením každé zkumavky 10krát) a krátce odstředěná, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- Umožněte, aby *Taq* polymeráza DNA (*Taq*) byla před každým použitím temperována na pokojovou teplotu (15–25 °C). Zkumavku krátce odstředěte, aby se veškerý enzym shromáždil na dně zkumavky.

Postup

1. **Rozmrazte kontrolní reakční směs (CTRL), vodu bez obsahu nukleázy pro kontrolu bez templátu (NTC) a pozitivní kontrolu EGFR (PC) temperujte na laboratorní teplotu (15–25 °C). Po rozmrazení reakční směsi tyto přípravky promíchejte převrácením každé zkumavky (opakovaným 10krát), aby nedošlo k lokální koncentraci solí, a poté je krátce odstředěte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.**
2. **Připravte dostatek master mixů pro vzorky DNA, jednu pozitivní kontrolní reakci a jednu kontrolu bez templátu podle objemů uvedených v Tabulka 1. Zahrňte činidla pro 1 vzorek navíc (n+1), představující dostatečný přebytek pro nastavení PCR.**

Master mix obsahuje všechny složky nutné pro provedení PCR kromě vzorku.

Tabulka 1. Příprava kontrolního master mixu analýzy*

Složka	Objem na reakci (μl)
Kontrolní reakční směs (CTRL)	19,5
<i>Taq</i> DNA polymeráza (<i>Taq</i>)	0,5
Celkový objem	20,0

* Při přípravě master mixu připravte dostatek směsi pro 1 vzorek navíc.

3. **Master mixy důkladně promíchejte opatrným pipetováním 10krát nahoru a dolů. Ihned přidejte 20 μl master mixu do zkumavky PCR strip (není součástí dodávky).**
Poznámka: Pro stanovení vzorku je třeba přidat master mix kontrolní analýzy do jedné z pozitivních kontrolních zkumavek, do jedné negativní kontrolní zkumavky a do jedné zkumavky pro každý vzorek.
4. **Ihned přidejte 5 μl vody bez obsahu nukleázy (H₂O) do zkumavky na kontrolu bez templátu (zkumavka PCR číslo 9) a tuto zkumavku uzavřete víčkem. Do zkumavek se vzorky DNA přidejte po 5 μl ke každému vzorku a zkumavky uzavřete víčky. Přidejte 5 μl pozitivní**

kontroly EGFR (PC) do zkumavky na pozitivní kontrolu (zkumavka PCR 1) a zkumavku uzavřete víčkem.

5. Stripové zkumavky PCR umístěte do příslušných pozic v rotoru a vizuálně zkontrolujte, že všechny zkumavky obsahují stejný objem.
Poznámka: Ověřte, že nedojde k převrácení stripů zkumavek při jejich přenosu do rotoru.
6. Pokud není rotor plný, zaplňte zbývající prostor prázdnými zavíčkovanými zkumavkami.
7. Rotor se 72 jamkami ihned umístěte do přístroje Rotor-Gene Q 5plex HRM. Ujistěte se, že pojistný kroužek (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) je umístěn v horní části rotoru, aby zajistil zkumavky během zpracování.
8. Viz Nastavení přístroje Rotor-Gene Q (viz „Protokol: Nastavení přístroje Rotor-Gene Q EGFR“, strana 20) pro vytvoření teplotního profilu a spuštění analýzy.

Tabulka 2. Parametry cyklování

Cykly	Teplota	Čas	Pořizování dat
1	95 °C	15 minut	Žádné
40	95 °C	30 sekund	Žádné
	60 °C	60 sekund	Zelená a žlutá

9. Po dokončení zpracování data analyzujte, „Analýza dat hodnocení vzorku“, strana 29.

Protokol: Detekce mutací EGFR

Tento protokol platí pro detekce mutací EGFR. Jakmile vzorek projde stanovením, lze ho testovat pomocí analýz mutací EGFR.

Důležité body před zahájením

- Před zahájením postupu si přečtěte část „Obecná ustanovení“, stránka 11.
- Před zahájením protokolu věnujte dostatek času seznámení s přístrojem Rotor-Gene Q. Viz uživatelská příručka přístroje.
- Neprotřepávejte *Taq* DNA polymerázu (*Taq*) ani žádnou směs obsahující *Taq* DNA polymerázu, neboť by mohlo dojít k inaktivaci enzymu.
- Pro efektivní použití soupravy *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit je nutné vzorky uspořádat do sad po 7 k naplnění jednoho rotoru s 72 jamkami. V případě menších dávek bude možné soupravou *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit testovat méně vzorků.
- *Taq* pipetujte tak, že špičku pipety ponoříte těsně pod hladinu kapaliny, aby na vnějším povrchu špičky neulpělo nadměrné množství enzymu.
- Pro každý vzorek DNA je třeba provést kontrolní analýzu a analýzu přítomnosti mutace ve stejném zpracování PCR reakce, aby byly vyloučeny rozdíly mezi jednotlivými zpracováními testu.

Úkony před zahájením

- Před každým použitím musí být všechna činidla zcela rozmrazená na pokojovou teplotu (15–25 °C), promíchaná (převrácením každé zkumavky 10krát) a krátce odstředěná, aby se obsah usadil na dně zkumavky.
- Zajistěte, aby *Taq* byla před každým použitím temperována na pokojovou teplotu (15–25 °C). Zkumavku krátce odstředěte, aby se veškerý enzym shromáždil na dně zkumavky.

Postup

1. Rozmrazte reakční směs, vodu bez obsahu nukleázy pro kontrolu bez templátu (NTC) a pozitivní kontrolu EGFR (PC) temperujte na laboratorní teplotu (15–25 °C). Po rozmražení reakční směsi tyto přípravky promíchejte převrácením každé zkumavky (opakovaným 10krát), aby nedošlo k lokální koncentraci solí, a poté je krátce odstředěte, aby se obsah usadil na dně zkumavky.

2. **Připravte dostatek master mixů pro vzorky DNA, jednu pozitivní kontrolní reakci a jednu kontrolu bez templátu podle objemů uvedených v Tabulka 3. Zahrňte činidla pro 1 vzorek navíc (n+1), představující dostatečný přebytek pro nastavení PCR.**

Master mix obsahuje všechny složky nutné pro provedení PCR kromě vzorku.

Tabulka 3. Příprava směsí master mixu*

Složka	Objem na reakci (μl)
Reakční směs	19,5
<i>Taq</i> DNA polymeráza (<i>Taq</i>)	0,5
Celkový objem	20,0

* Při přípravě master mixu připravte dostatek směsi pro 1 vzorek navíc.

3. **Každý master mix důkladně promíchejte opatrným pipetováním 10krát nahoru a dolů. Ihned přidejte 20 μl master mixu do každé zkumavky PCR strip (není součástí dodávky).**
4. **Ihned přidejte 5 μl vody bez obsahu nukleázy (H₂O) do stripových zkumavek PCR ke kontrole bez templátu (zkumavky PCR č. 9–16) a zkumavky uzavřete víčky. Do zkumavek se vzorky (zkumavky PCR 17–72) přidejte 5 μl každého vzorku a zkumavky uzavřete víčky. Přidejte 5 μl pozitivní kontroly EGFR (PC) do zkumavky na pozitivní kontrolu (zkumavka PCR 1-8). Každý vzorek DNA se musí testovat pomocí obou analýz – kontrolní i všech mutací. Uvedené rozvržení je zobrazeno Tabulka 4.**

Tabulka 4. Rozvržení kontroly a analýzy mutací

Analýza	Kontroly		Číslo vzorku						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Delece	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
Inzerce	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. **Stripové zkušavky PCR umístěte do příslušných pozic v rotoru a vizuálně zkontrolujte, že všechny zkušavky obsahují stejný objem.**
Poznámka: Ověřte, že nedojde k převrácení stripů zkušavek při jejich přenosu do rotoru.
6. **Pokud není rotor plný, zaplňte zbývající prostor prázdnými zavíčkovanými zkušavkami.**
7. **Rotor ihned umístěte do přístroje Rotor-Gene Q 5plex HRM. Ujistěte se, že pojistný kroužek (příslušenství přístroje Rotor-Gene Q) je umístěn v horní části rotoru, aby zajistil zkušavky během zpracování.**
8. **Viz Nastavení přístroje Rotor-Gene Q (viz „Nastavení přístroje Rotor-Gene Q EGFR“, strana 20) pro vytvoření teplotního profilu a spuštění analýzy.**

Tabulka 5. Parametry cyklování

Cykly	Teplota	Čas	Požizování dat
1	95 °C	15 minut	Žádné
40	95 °C	30 sekund	Žádné
	60 °C	60 sekund	Zelená a žlutá

9. **Po dokončení zpracování data analyzujte, „Analýza dat mutací EGFR“, strana 32. ■**

Protokol: Nastavení přístroje Rotor-Gene Q EGFR

Na tento protokol odkazuje část „Protokol: Stanovení vzorku“, strana 14, a „Detekce mutací EGFR“, strana 17.

Postup

1. Následujícím postupem vytvořte teplotní profil.

Nastavení obecných parametrů analýzy	Obrázky 1–3
Počáteční aktivace enzymu s horkým startem	Obrázek 4
Zesílení DNA	Obrázky 5–7
Nastavení fluorescenčních kanálů	Obrázky 8–12
Spuštění zpracování	Obrázek 13

Parametry cyklování jsou souhrnně následující.

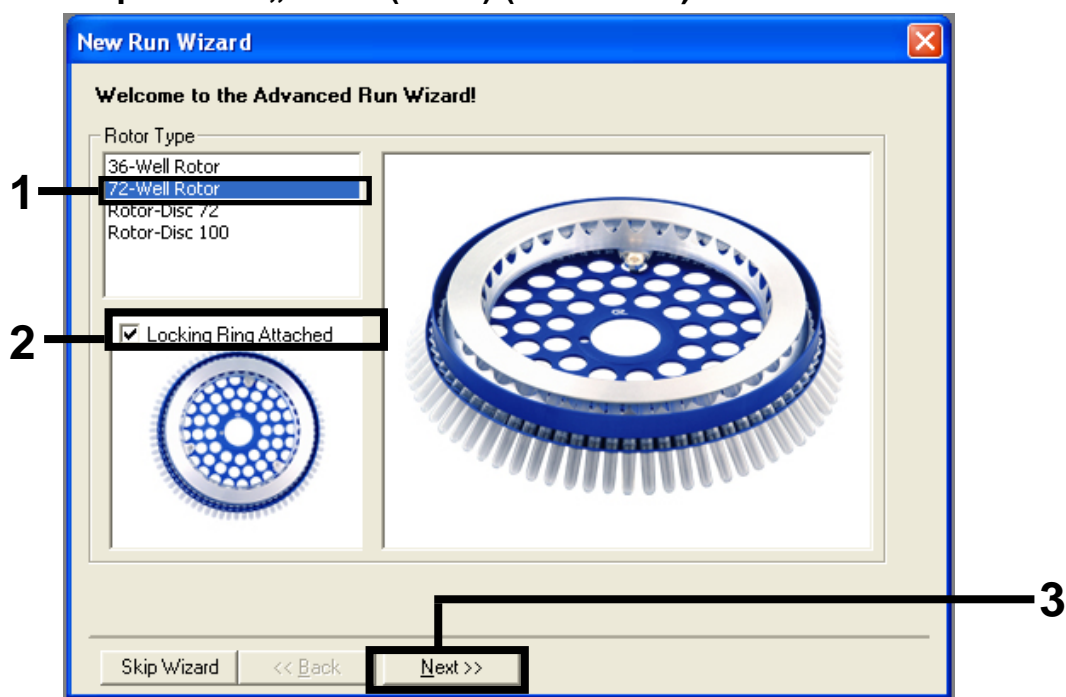
Tabulka 6. Parametry cyklování

Cykly	Teplota	Čas	Pořizování dat
1	95 °C	15 minut	Žádné
40	95 °C	30 sekund	Žádné
	60 °C	60 sekund	Zelená a žlutá

Všechny specifikace viz software přístroje Rotor-Gene Q, verze 2.0.2. Další informace o programování přístrojů Rotor-Gene Q jsou uvedeny v uživatelské příručce přístroje. Na obrázku jsou tato nastavení orámována silnou černou čarou.

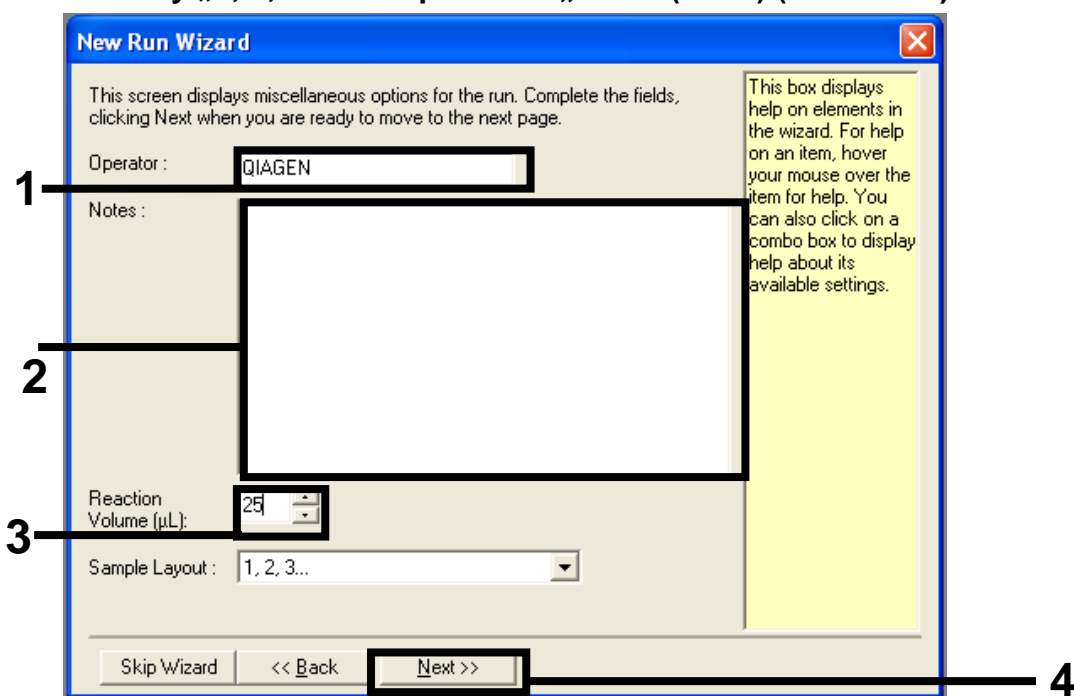
- Poklepejte na ikonu aplikace Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 na pracovní ploše laptopu připojeného k přístroji Rotor-Gene Q 5plex HRM. V dialogu „New Run“ (Nové zpracování), který se zobrazí, vyberte kartu „Advanced“ (Pokročilé).**
- Chcete-li vytvořit novou šablonu, vyberte možnost „Empty Run“ (Prázdné zpracování) a poté klikněte na tlačítko „New“ (Nový), čímž vyvoláte průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým zpracováním).**
- Jako typ rotoru vyberte 72-Well Rotor (Rotor se 72 jamkami). Zkontrolujte, zda je správně nasazen pojistný kroužek, a zaškrtněte**

políčko „Locking Ring Attached“ (Pojistný kroužek nasazen). Klepněte na „Next“ (Další) (Obrázek 1).



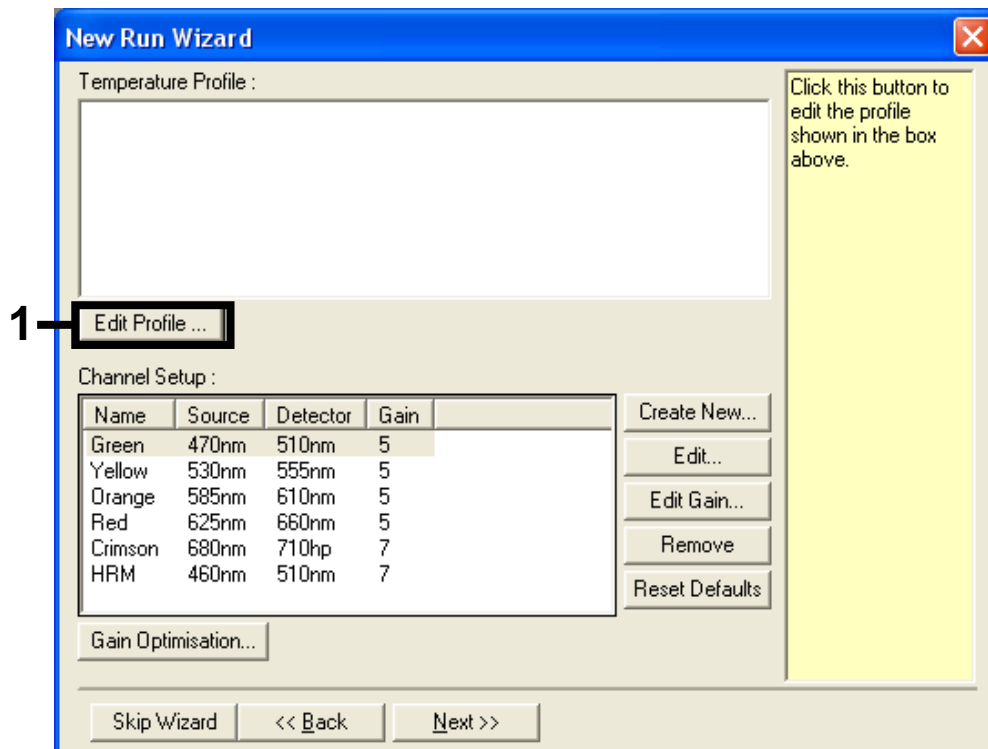
Obrázek 1. Dialogové okno průvodce „New Run Wizard“ (Průvodce novým zpracováním).

5. Zadejte jméno operátora. Zadejte poznámky a reakční objem jako 25. Zkontrolujte, zda pole „Sample Layout“ (Rozvržení vzorků) obsahuje hodnoty „1, 2, 3...“. Klepněte na „Next“ (Další) (Obrázek 2).



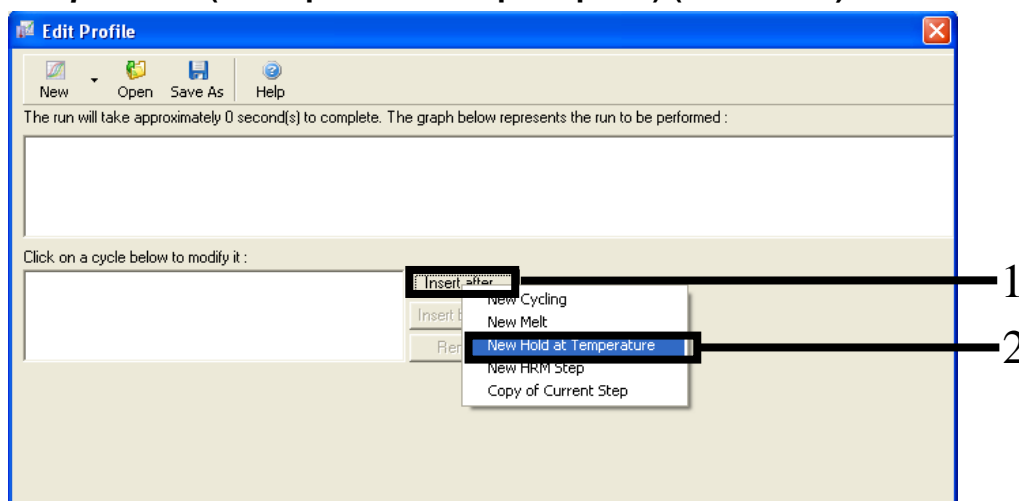
Obrázek 2. Nastavení obecných parametrů analýzy.

6. Klikněte na tlačítko „Edit Profile“ (Upravit profil) v dalším dialogovém okně „New Run Wizard“ (Průvodce novým zpracováním) (Obrázek 3) a naprogramujte teplotní profil podle informací v následujících krocích.



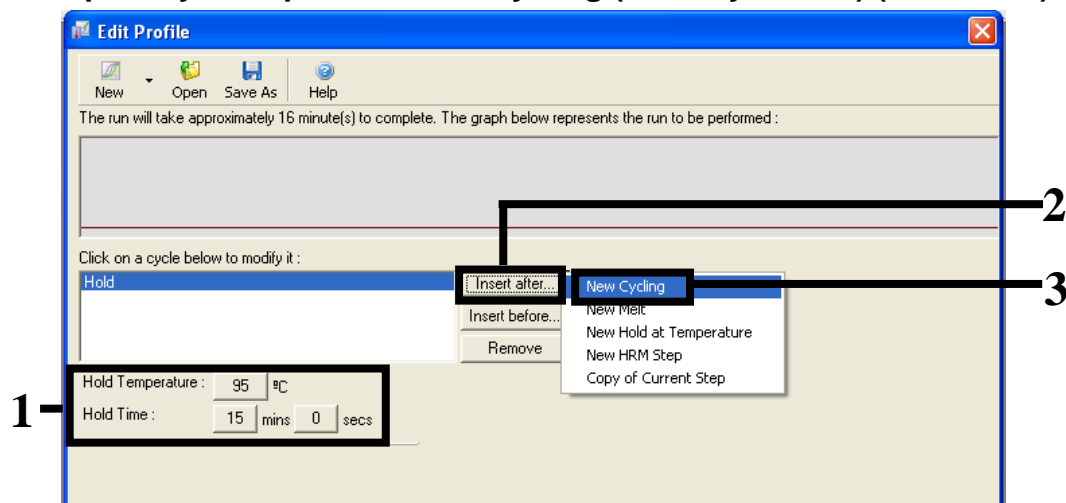
Obrázek 3. Úprava profilu.

7. Klikněte na tlačítko „Insert after“ (Vložit za) a vyberte možnost *New Hold at Temperature* (Nové pozastavení při teplotě) (Obrázek 4).



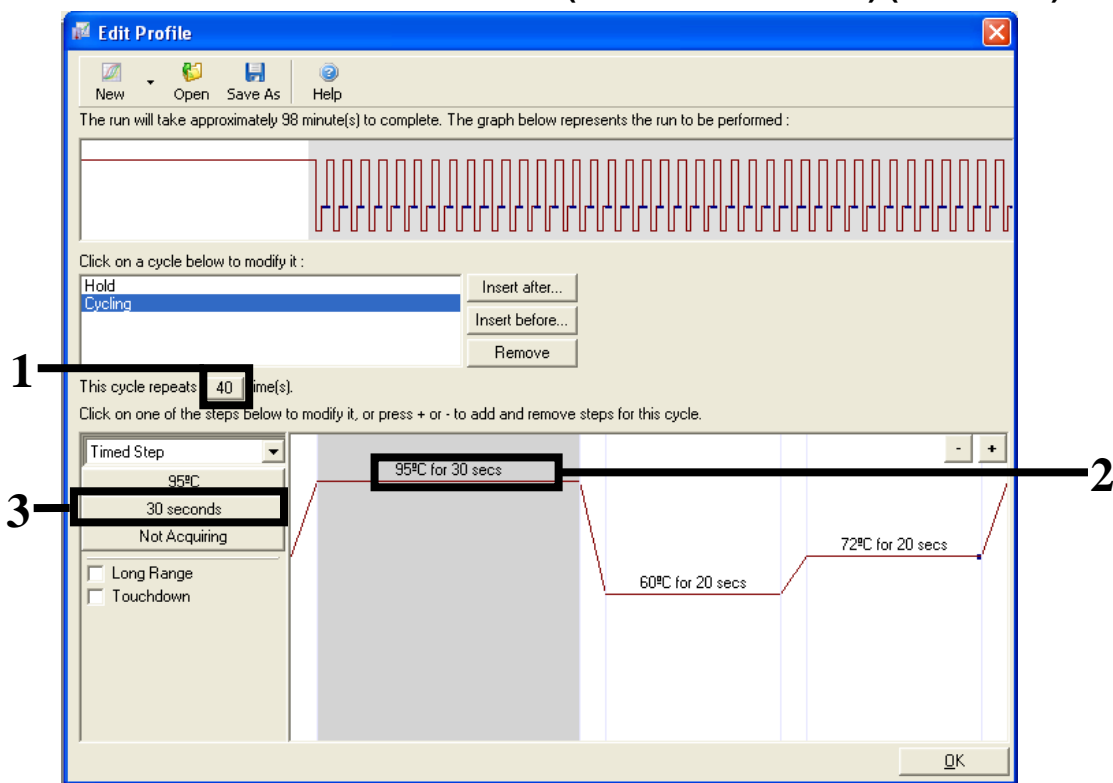
Obrázek 4. Krok počáteční inkubace při 95 °C.

8. Změňte „Hold Temperature“ (Teplota pozastavení) na 95 °C a „Hold Time“ (Doba pozastavení) na 15 min. Klikněte na tlačítko „Insert after“ (Vložit za) a poté vyberte položku New Cycling (Nové cyklování) (Obrázek 5).



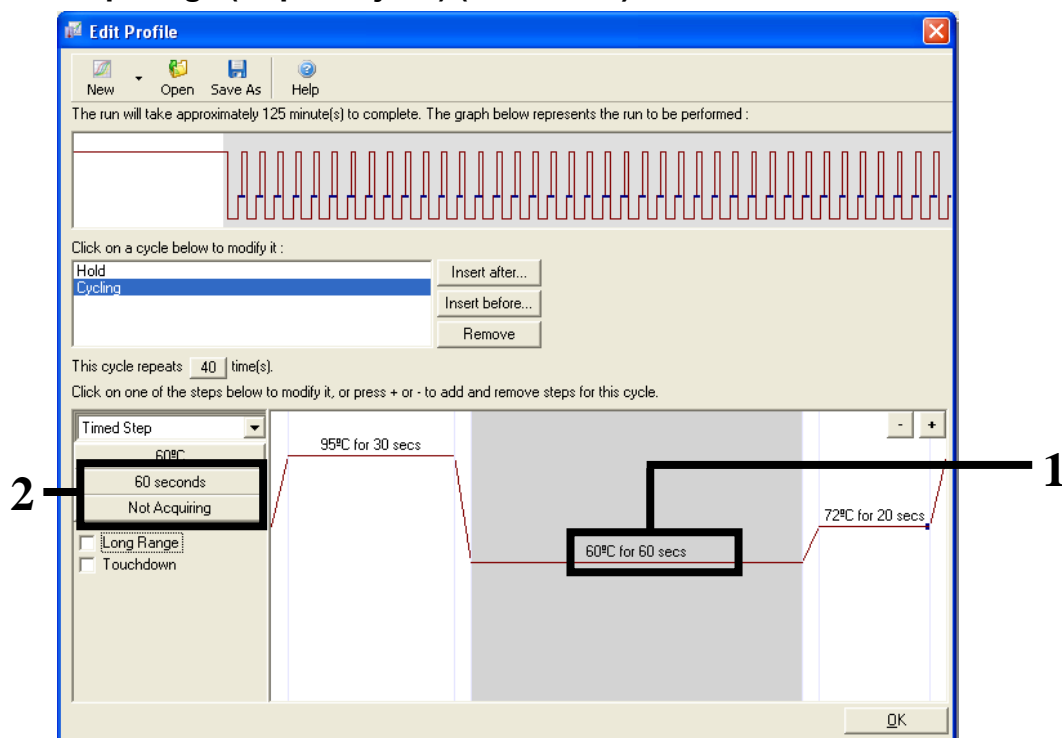
Obrázek 5. Krok počáteční inkubace při 95 °C.

9. Kliknutím na číslo nastavte počet opakování cyklů na 40. Vyberte první krok a nastavte 95 °C for 30 secs (95 °C na 30 sekund) (Obrázek 6).



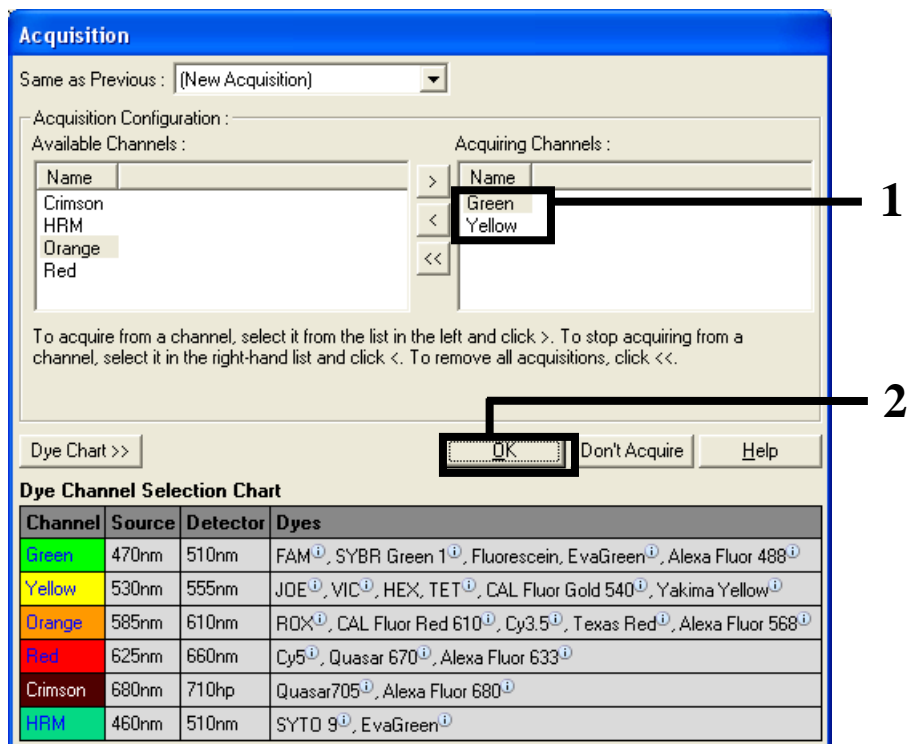
Obrázek 6. Krok cyklu při 95 °C.

10. Zvýrazněte druhý krok a nastavte na **60°C for 60 secs** (60 °C na 60 sekund). Aktivujte pořizování dat v průběhu tohoto kroku stiskem tlačítka „Not Acquiring“ (Nepořizují se) (Obrázek 7).



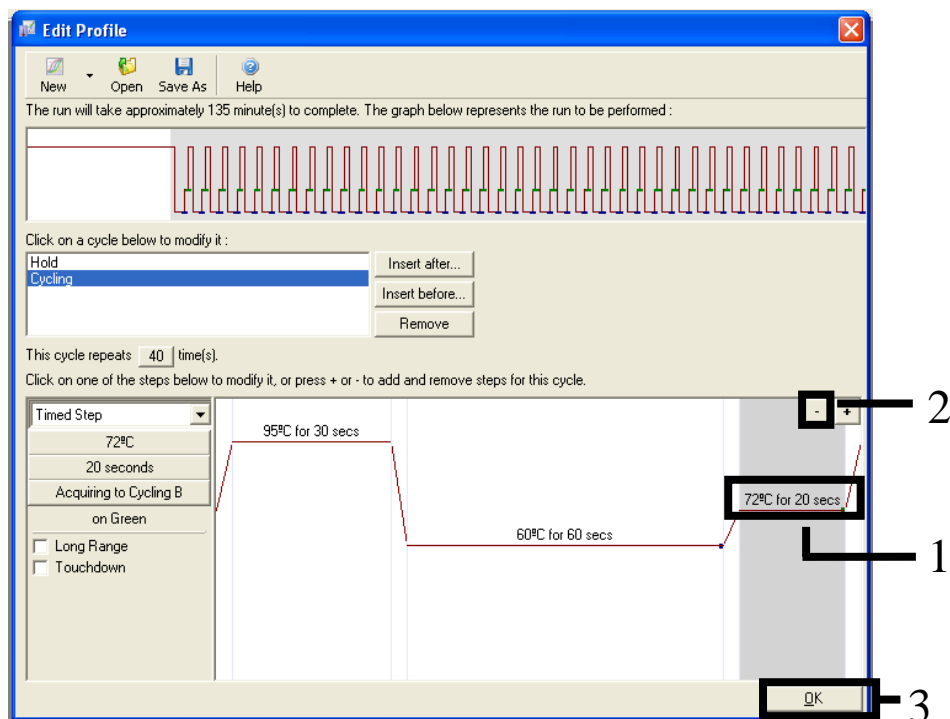
Obrázek 7. Krok cyklu při 60 °C.

11. Nastavte **Green (Zelený)** a **Yellow (Žlutý)** jako pořizující kanály stisknutím tlačítka „>“ a přeneste je ze seznamu „Available Channels“ (Dostupné kanály). Klepněte na „OK“ (Obrázek 8).



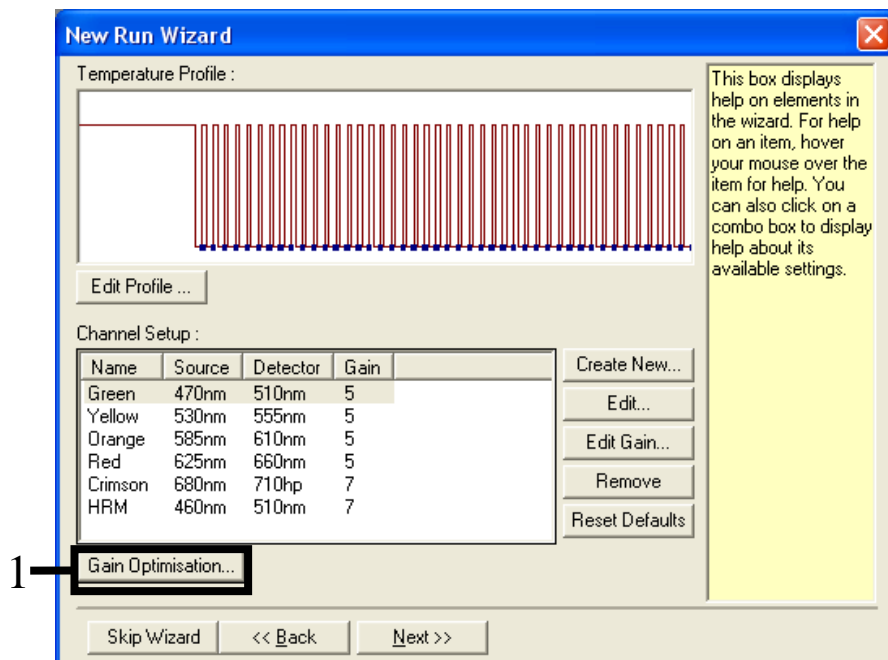
Obrázek 8. Pořizování při kroku cyklu 60 °C.

12. Zvýrazněte třetí krok a proveďte smazání kliknutím na tlačítko „-“. Klepněte na „OK“ (Obrázek 9).



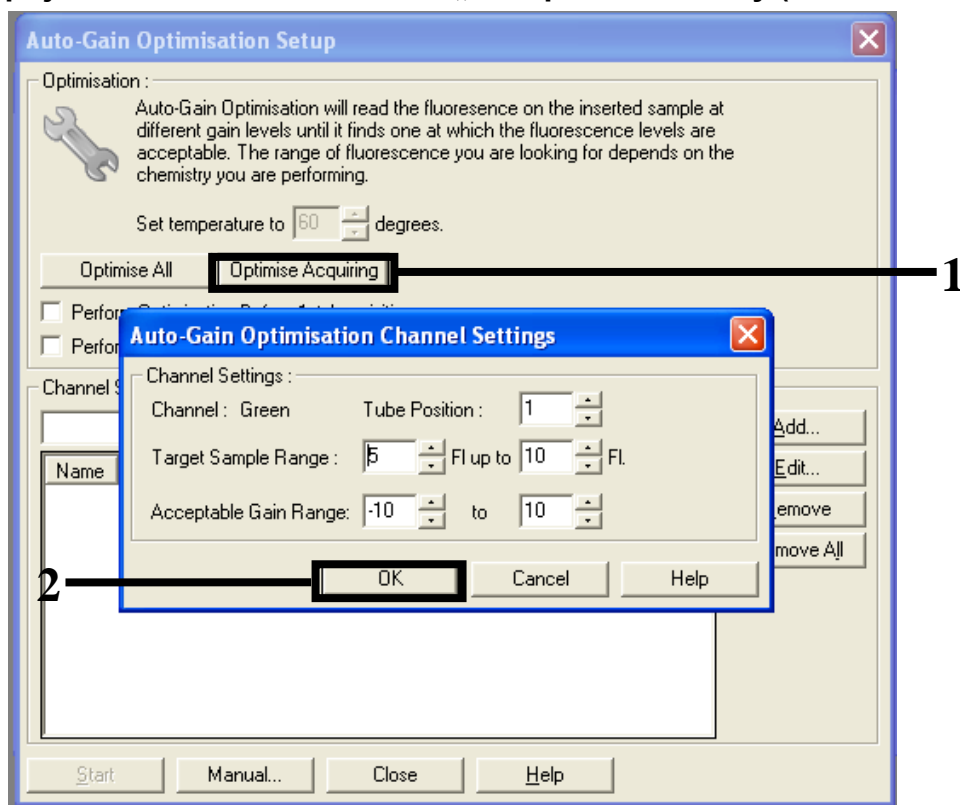
Obrázek 9. Odstranění rozšiřujícího kroku.

13. V dalším dialogovém okně klikněte na tlačítko „Gain Optimisation“ (Optimalizace zisku) (Obrázek 10).



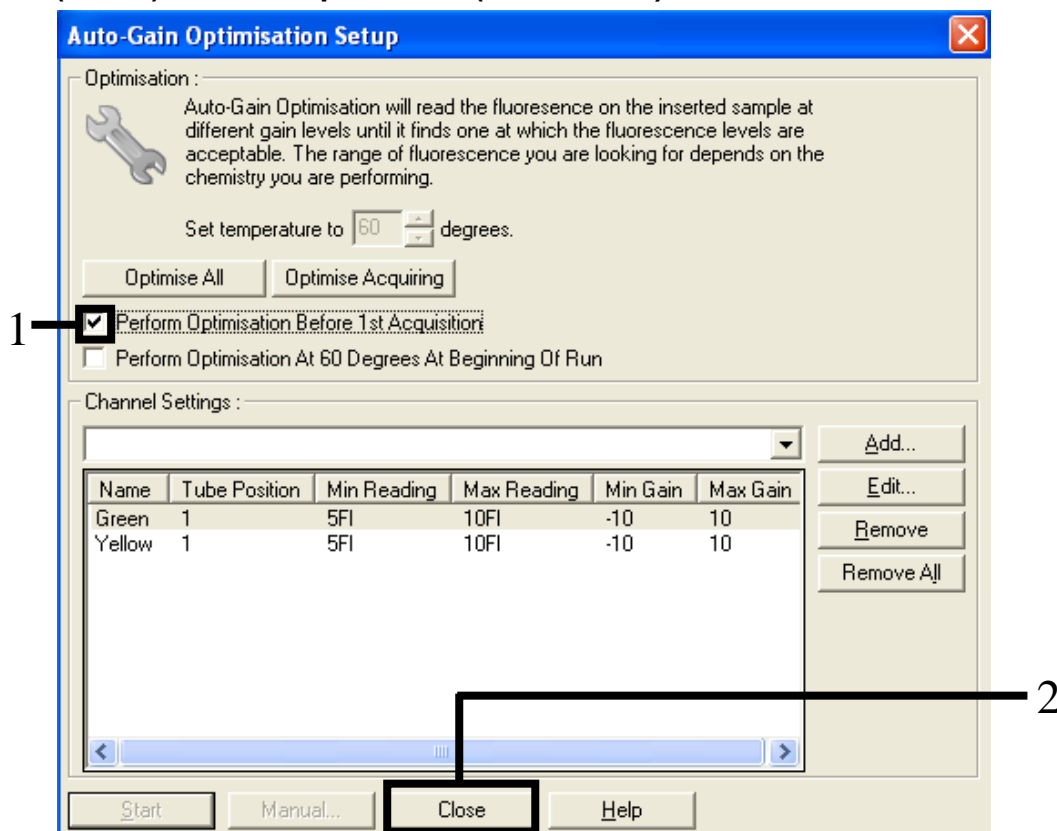
Obrázek 10. Optimalizace zisku.

14. Klikněte na tlačítko „Optimise Acquiring“ (Optimalizovat pořizování). Pro každý kanál se potom zobrazí jeho nastavení. Tyto výchozí hodnoty přijměte kliknutím na tlačítko „OK“ pro oba kanály (Obrázek 11).



Obrázek 11. Optimalizace automatického zvyšování citlivosti pro zelený kanál.

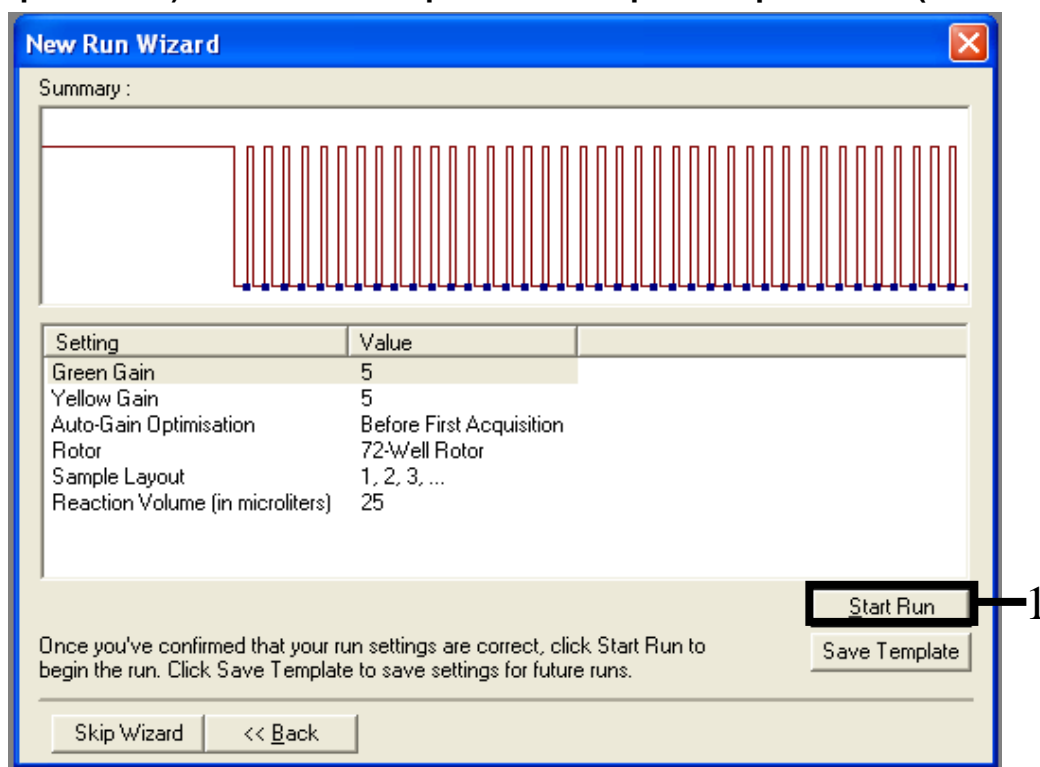
15. Zaškrtněte políčko „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Provést optimalizaci před 1. pořízením) a poté se kliknutím na tlačítko „Close“ (Zavřít) vraťte do průvodce (Obrázek 12).



Obrázek 12. Výběr zeleného a žlutého kanálu.

16. Kliknutím na tlačítko „Next“ (Další) uložte templát do příslušného místa výběrem možnosti „Save Template“ (Uložit templát).

17. Zkontrolujte souhrn a poté kliknutím na tlačítko „Start Run“ (Spustit zpracování) uložte soubor zpracování a spusťte zpracování (Obrázek 13).



Obrázek 13. Spuštění zpracování.

18. Po spuštění zpracování se zobrazí nové okno, ve kterém lze zadat názvy vzorků nebo kliknout na tlačítko „Finish“ (Dokončit) a zadat je později výběrem tlačítka „Sample“ (Vzorek) v průběhu zpracování nebo po jeho skončení.
19. Po dokončení zpracování data analyzujte podle příslušného protokolu.
- Stanovení vzorku viz „Analýza dat hodnocení vzorku“, strana 29.
 - Analýza mutace viz „Analýza dat mutací EGFR“, strana 32.

Interpretace výsledků

Metoda analýzy ΔC_T

Analýza v reálném čase se sondami Scorpions je založena na počtu cyklů PCR potřebných k detekci fluorescenčního signálu převyšujícího úroveň signálu pozadí, jako míry cílových molekul přítomných na začátku reakce. Bod, při kterém dojde k detekci signálu převyšujícího fluorescenci pozadí, se nazývá „práh cyklu“ (C_T).

Hodnoty ΔC_T vzorku se počítají jako rozdíl mezi C_T analýzou mutací a C_T kontrolní analýzou u stejného vzorku:

$$\Delta C_T = \text{mutace } C_T - \text{kontroly } C_T$$

Poznámka: Vzorky jsou hodnoceny jako pozitivní z hlediska mutace, pokud vykazují hodnoty ΔC_T menší než hraniční hodnota ΔC_T pro danou analýzu. Nad touto hodnotou může vzorek obsahovat méně než danou procentuální hodnotu mutace, kterou lze detekovat soupravou (mimo limit analýzy), nebo je vzorek z hlediska dané mutace negativní.

Poznámka: Mutace C_T u vzorků s mutací o hodnotě 40 nebo vyšší se hodnotí jako negativní nebo pod detekčními limity soupravy.

Při použití primerů ARMS může docházet k neúčinnému primingu, který se projeví velmi pozdním C_T pozadí u DNA neobsahující mutaci. Všechny hodnoty ΔC_T vypočtené ze zesílení pozadí budou vyšší než hraniční hodnota ΔC_T . Takový vzorek je hodnocen z hlediska dané mutace jako negativní.

Analýza dat hodnocení vzorku

Po dokončení zpracování analyzujte data následujícím postupem.

Nastavení softwarové analýzy

1. Otevřete odpovídající soubor pomocí softwaru přístroje Rotor-Gene Q (verze 2.0.2) a vyšší.
2. Zkontrolujte označení vzorků.
3. Na stránce hrubého kanálu pro jednotlivé detektory/kanály klikněte na „Options“ (Možnosti) a zadejte *Crop start cycles* (Smazat cykly startu). Na stránce „Remove data before cycle“ (Odebrat data před cyklem) zadejte 15 a klikněte na „OK“.
4. Klikněte na „Analysis“ (Analýza). Na straně analýzy klikněte na „Cycling A (from 15), Yellow“ (Cyklování A (z 15), Žlutá) a zkontrolujte kanál HEX.
5. Musí být zvýrazněna položka „dynamic tube“ (dynamická zkumavka). Klikněte na „Slope correct“ (Směrnice správně) a „Linear scale“ (Lineární stupnice).
6. Nastavte prahovou hodnotu na 0,02 a zkontrolujte hodnoty HEX C_T .
7. Na straně analýzy klikněte na „Cycling A (from 15), Green“ (Cyklování A (z 15), Zelená) pro zobrazení kanálu FAM.
8. Dynamická zkumavka musí být zvýrazněna. Klikněte na „Slope correct“ (Směrnice správně) a „Linear scale“ (Lineární stupnice).
9. Nastavte prahovou hodnotu na 0,075 a zkontrolujte hodnoty FAM C_T .

Po dokončení zpracování analyzujte data následovně.

- **Negativní kontrola:** Aby nedošlo ke kontaminaci templátu, žádná z kontrol templátu nesmí generovat hodnotu C_T v zeleném kanálu (FAM) nižší než 40. Viz „Poznámky pro data interpretace“ na straně 37, kde jsou důležité informace pro analýzu diagramů kontroly bez templátu (NTC). Aby bylo zajištěno správné nastavení analýzy, nesmí kontrola bez templátu (NTC) zobrazovat zesílení v rozsahu 31–37 ve žlutém (HEX) kanálu.

Jestliže je v zeleném kanálu pozitivní zesílení a/nebo je zesílení mimo rozsah 31–37, výsledek vzorku se musí vyřadit.
- **Pozitivní kontrola:** Pozitivní kontrola EGFR (PC) musí vykazovat hodnotu C_T (kanál FAM) kontrolní analýzy v rozsahu mezi 26,26 a 30,95. Hodnota C_T mimo tento rozsah indikuje problém s nastavením analýzy a znamená tedy selhání stanovení. Pokud pozitivní kontrola C_T je 26,26–30,95 (exon 2, FAM), ale interní kontrola C_T (HEX) je mimo rozsah 31–37, pokračujte v analýze.

Poznámka: Data vzorku nelze použít, jestliže kterákoliv z těchto dvou kontrol zpracování selhala.

Za předpokladu, že oba výsledky kontrolních zpracování jsou platné, všechny hodnoty vzorků C_T musí být v rozsahu 23–30,69 v zeleném (FAM) kanálu. Je-li vzorek mimo tento rozsah, platí následující pokyn.

- **Kontrolní analýza vzorku C_T je <23:** Vzorky vykazující u kontroly hodnotu C_T <23 nadměrně zatěžují analýzy mutace a musí se proto zředit. Aby bylo možné zachytit každou mutaci při nízké úrovni, nadměrně koncentrované vzorky musí být ředěny tak, aby spadaly do výše uvedeného rozsahu za předpokladu, že rozředění vzorku o polovinu zvýší hodnotu C_T o 1.
- **Kontrolní analýza vzorku C_T v hodnotě 30,69 – 37:** Výsledek interpretujte opatrně, protože mutace s nízkou hladinou nemusí být detekovány.
- **Kontrolní analýza vzorku C_T v hodnotě 37 – 40:** Výsledek interpretujte opatrně, protože detekovány budou pouze mutace s velmi vysokou hladinou.
- **Kontrolní analýza vzorku C_T je >40:** Vzorek neobsahuje dostatečné množství DNA pro provedení analýzy.

Poznámka: Pokud vzorek negeneruje C_T (tj., C_T >40), může to být v důsledku přítomnosti inhibitoru, chyby v nastavení analýzy nebo nepřítomnosti amplifikovatelné EGFR DNA.

- **Hodnota interní kontroly C_T je 31–37:** Neexistuje zde žádná amplifikovatelná EGFR DNA.
- **Hodnota interní kontroly C_T je mimo rozsah 31–37:** Může to indikovat chybu při nastavení analýzy nebo přítomnost inhibitoru. Zředění vzorku může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění DNA.



Analýza dat mutací EGFR

Po dokončení zpracování analyzujte data následujícím postupem.

Nastavení softwarové analýzy

1. Otevřete odpovídající soubor pomocí softwaru přístroje Rotor-Gene Q (verze 2.0.2) a vyšší.
2. Zkontrolujte, zda jsou vzorky označeny.
3. Na stránce hrubého kanálu pro jednotlivé detektory/kanály klikněte na „Options“ (Možnosti) a zadejte *Crop start cycles* (Smazat cykly startu). Na stránce „Remove data before cycle“ (Odebrat data před cyklem) zadejte 15 a klikněte na „OK“.
4. Klikněte na „Analysis“ (Analýza). Na straně analýzy klikněte na „Cycling A (from 15), Yellow“ (Cyklování A (z 15), Žlutá) pro zobrazení kanálu HEX.
5. Musí být zvýrazněna položka „dynamic tube“ (dynamická zkumavka). Klikněte na „Slope correct“ (Směrnice správně) a „Linear scale“ (Lineární stupnice).
6. Nastavte prahovou hodnotu na 0,02 a zkontrolujte hodnoty HEX C_T.
7. Na straně analýzy klikněte na „Cycling A (from 15), Green“ (Cyklování A (z 15), Zelená) pro zobrazení kanálu FAM.
8. Musí být zvýrazněna položka „dynamic tube“ (dynamická zkumavka). Klikněte na „Slope correct“ (Směrnice správně) a „Linear scale“ (Lineární stupnice).
9. Nastavte prahovou hodnotu na 0,075 a zkontrolujte hodnoty FAM C_T.

Analýza kontrol zpracování:

Viz schematické znázornění analýzy kontroly zpracování, viz Obrázek 15.

- **Negativní kontrola:** Aby nedošlo ke kontaminaci templátu, žádná z kontrol templátu (NTC) nesmí generovat hodnotu C_T v zeleném (FAM) kanálu nižší než 40. Viz „Poznámky pro data interpretace“ na straně 37, kde jsou důležité informace pro analýzu diagramů kontroly bez templátu (NTC). Aby bylo zajištěno správné nastavení analýzy, nesmí kontrola bez templátu (NTC) zobrazovat zesílení v rozsahu C_T 31–37 ve žlutém kanálu.

Jestliže je v zeleném kanálu pozitivní zesílení a/nebo je zesílení mimo rozsah 31–37, výsledek vzorku se musí vyřadit.

- **Pozitivní kontrola:** Pozitivní kontrola EGFR (PC) musí vykazovat hodnotu C_T kontrolní analýzy v rozsahu 26,26–30,95 v zeleném kanálu. Hodnota C_T mimo tento rozsah indikuje problém s nastavením analýzy a znamená tedy selhání stanovení. Pokud pozitivní kontrola C_T je 26,26–30,95 (exon 2, FAM), ale interní kontrola C_T (HEX) je mimo rozsah 31–37, pokračujte v analýze.

Následujícím postupem vypočítejte hodnotu C_T každé analýzy mutací a zajistěte, aby hodnoty mutace a kontrolní hodnoty C_T pocházely ze stejného vzorku.

$$\Delta C_T = \text{mutace } C_T - \text{kontroly } C_T$$

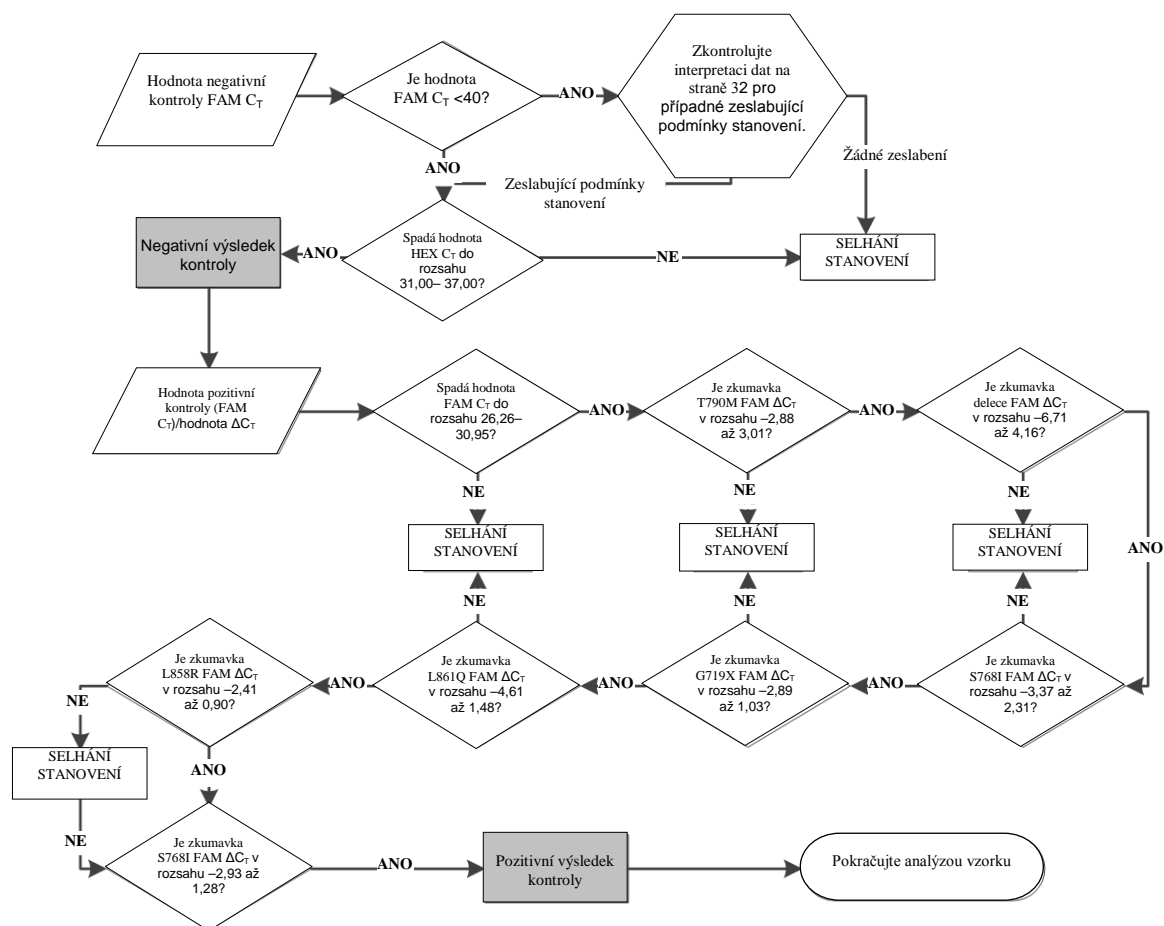
Pozitivní kontrola EGFR (PC) hodnot C_T musí vykazovat hodnoty v rozsahu, který uvádí Tabulka 7.

Tabulka 7. Očekávané pozitivní kontrolní hodnoty ΔC_T *

Analýza	Pozitivní kontrolní hodnota ΔC_T
T790M	–2,88 až 3,01
Delece	–6,71 až 4,16
L858R	–2,41 až 0,90
L861Q	–4,61 až 1,48
G719X	–2,89 až 1,03
S768I	–3,37 až 2,31
Inzerce	–2,93 až 1,28

* Software přístroje Rotor-Gene Q (2.0.2)

Poznámka: Data vzorku nelze použít, jestliže pozitivní nebo negativní kontrola zpracování selhala.



Obrázek 15. Analýza kontrol zpracování.

Analýza vzorků:

Hodnota kontroly vzorku FAM C_T

Za předpokladu, že jsou oba výsledky kontrolních zpracování platné, se musí všechny hodnoty C_T každého vzorku pohybovat v rozsahu 23–30,69 v zeleném kanálu. Viz schematické znázornění analýzy vzorků, Obrázek 16.

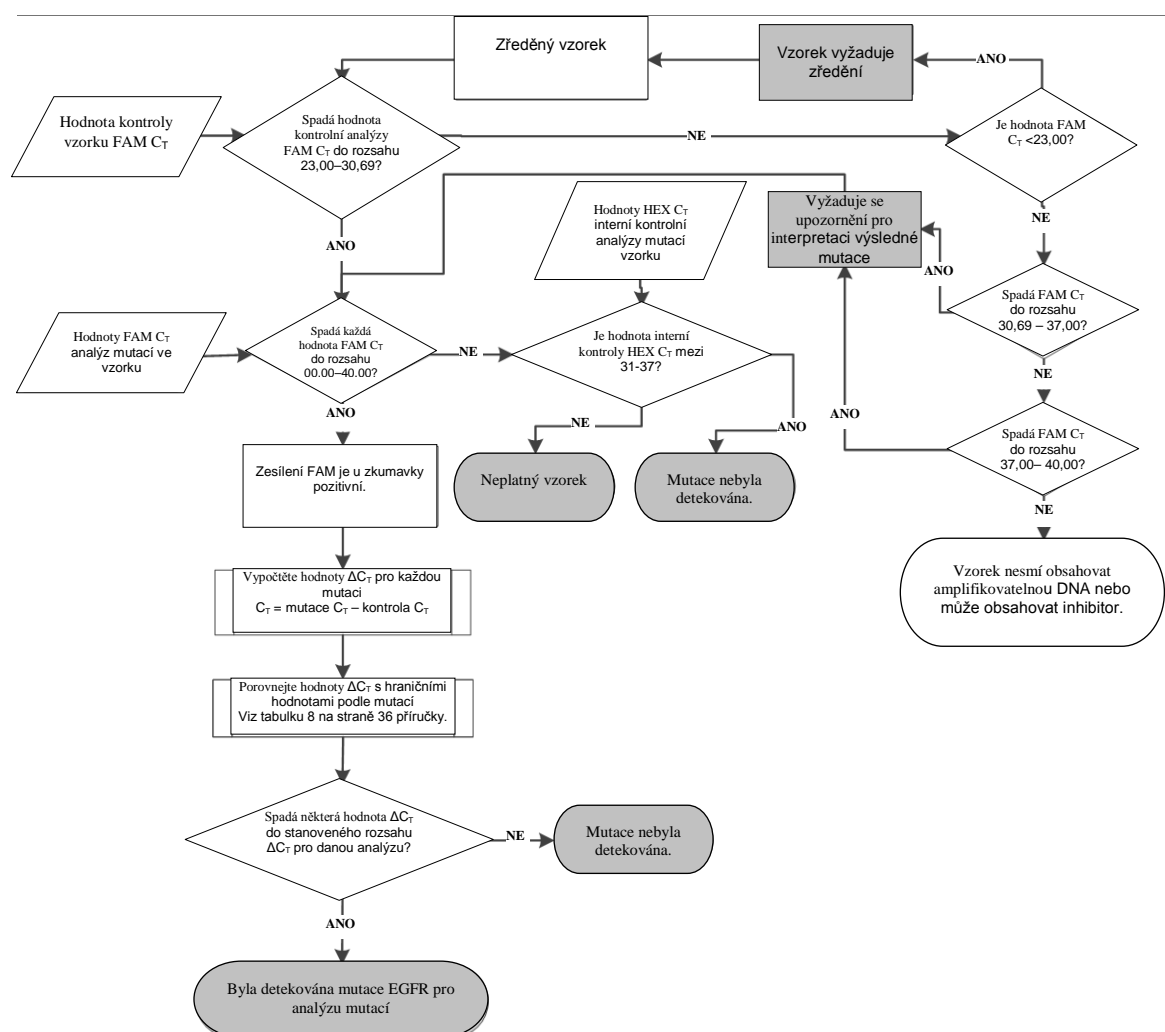
- **Kontrolní analýza vzorku C_T je <23:** Vzorky vykazující u kontroly hodnotu C_T <23 nadměrně zatěžují analýzy mutace a musí se proto zředit. Aby bylo možné zachytit každou mutaci při nízké úrovni, nadměrně koncentrované vzorky musí být ředěny tak, aby spadaly do výše uvedeného rozsahu za předpokladu, že rozředění vzorku o polovinu zvýší hodnotu C_T o 1.
- **Kontrolní analýza vzorku C_T v rozsahu 30,69–37:** Výsledek interpretujte opatrně, protože mutace s nízkou hladinou nemusí být detekovány.
- **Kontrolní analýza vzorku C_T v rozsahu 37–40:** Výsledek interpretujte opatrně, protože detekovány budou pouze mutace s velmi vysokou hladinou.
- **Kontrolní analýza vzorku C_T je >40:** Vzorek neobsahuje dostatečné množství DNA pro provedení analýzy.

Poznámka: Pokud je hodnota vzorku FAM C_T mezi 23 a <37, není žádná potřeba hodnotit interní kontrolu.

Poznámka: Pokud vzorek negeneruje C_T (tj., $C_T > 40$), může to být v důsledku přítomnosti inhibitoru, chyby v nastavení analýzy nebo nepřítomnosti amplifikovatelné EGFR DNA.

- **Hodnota interní kontroly C_T je 31–37:** Stanovení funguje správně, ale neexistuje zde žádná amplifikovatelná EGFR DNA.
- **Hodnota interní kontroly C_T je mimo rozsah 31–37:** Může to indikovat chybu při nastavení analýzy nebo přítomnost inhibitoru. Zředění vzorku může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění DNA.

Poznámka: Pokud reakce FAM mutace nevedla k hodnotě C_T a interní kontrolní reakce poskytly C_T mimo rozsah 31–37, musí se naměřená data vyřadit, neboť to může svědčit o přítomnosti inhibitorů, což by mohlo vést k falešně negativním výsledkům. Zředění vzorku může snížit vliv inhibitorů; je však třeba vést v patrnosti, že by došlo i ke zředění DNA.



Obrázek 16. Vývojový diagram analýzy dat mutací.

Hodnota FAM C_T analýz mutace vzorků

Hodnoty FAM všech sedmi reakčních směsí je třeba zkontrolovat s využitím hodnot uvedených, které uvádí Tabulka 8.

Tabulka 8. Přijatelné hodnoty reakce mutací vzorků (FAM)*

Analýza	Přijatelný rozsah C_T	Mezní hodnota ΔC_T
T790M	15,00–40,00	6,38
Delece	15,00–40,00	9,06
L858R	15,00–40,00	8,58
L861Q	15,00–40,00	9,26
G719X	15,00–40,00	9,31
S768I	15,00–40,00	9,26
Inzerce	15,00–40,00	7,91

* Přijatelné hodnoty jsou v mezích uvedených hodnot včetně mezních hodnot.

- Jestliže hodnota FAM C_T spadá do stanoveného rozsahu 15,00-40,00, je zesílení FAM pozitivní.
- Jestliže hodnota FAM C_T přesahuje uvedený rozsah nebo nedošlo k žádnému zesílení, je zesílení FAM negativní.

Následujícím postupem vypočítejte hodnotu C_T jednotlivých vzorků s mutacemi, které indikují kladnou hodnotu zesílení; zajistěte, aby hodnoty mutace a kontrolní hodnoty C_T pocházely ze stejného vzorku.

$$\Delta C_T = \text{mutace } C_T - \text{kontroly } C_T$$

Porovnejte hodnotu C_T vzorku s hraniční hodnotou pro zkoumanou analýzu (Tabulka 8) a zkontrolujte, že se pro každou analýzu používá správná hraniční hodnota analýzy.

Hraniční hodnota je bod, nad kterým může docházet k pozitivnímu signálu v důsledku signálu pozadí primeru ARMS na DNA „divokého“ typu. Je-li hodnota C_T vzorku vyšší než hraniční hodnota, vyhodnotí se jako „mutace nedetekována“ nebo ležící pod detekčními limity soupravy. Pokud je hodnota vzorku nižší než hraniční hodnota, je vzorek považován za pozitivní z hlediska mutace detekované touto analýzou.

Poznámka: Pro vzorky nevykazující žádnou FAM mutaci C_T je vyžadováno posouzení interní kontroly (HEX) C_T pro určení, zda nejsou mutace zjištěny nebo je analýza neplatná. Pokud je hodnota HEX C_T mezi 31 a 37, žádná mutace není detekována. Pokud je hodnota HEX C_T mimo rozsah 31–37, vzorek je neplatný.

Souhrnně, pro všechny vzorky musí být na základě následujících kritérií každá reakce mutace vyhodnocena jako detekovaná mutace, nedetekovaná mutace nebo neplatná.

- **Detekovaná mutace:** Pozitivní zesílení FAM a hodnota C_T odpovídají hraniční hodnotě nebo jsou nižší. Pokud je zjištěno více mutací, mohou být vykázány všechny.
- **Mutace nebyla detekována:**
Pozitivní zesílení FAM a hodnota C_T jsou nad hraniční hodnotou.
Zesílení FAM je negativní a zesílení HEX (interní kontrola) je pozitivní.
- **Neplatné:**
Zesílení FAM je negativní a zesílení HEX je mimo specifikace.

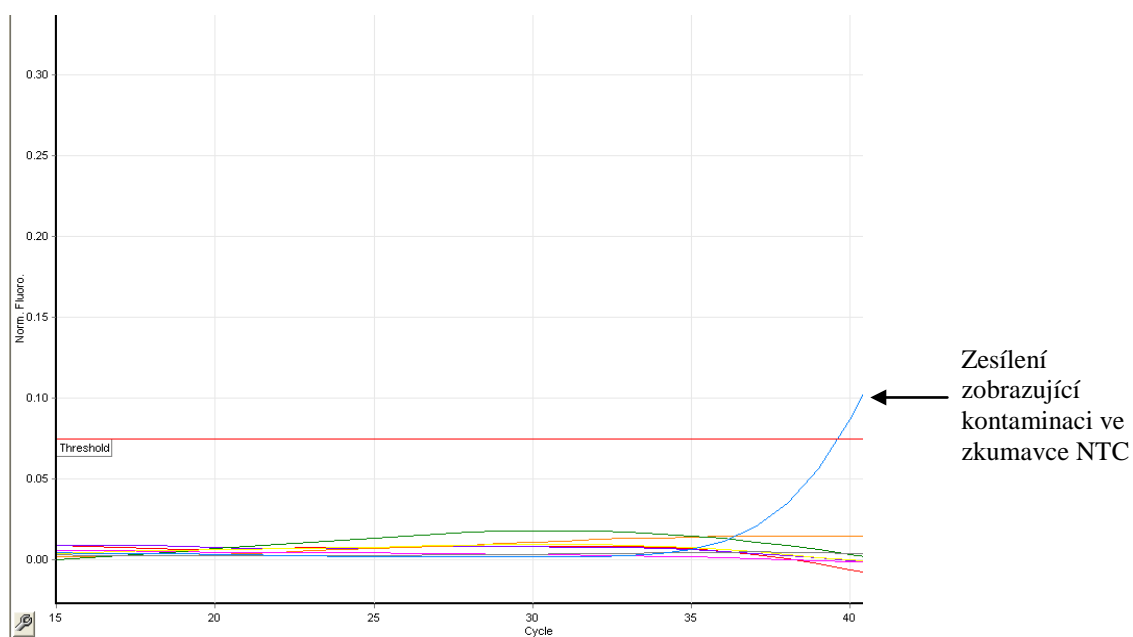
Poznámky pro data interpretace

Lineární zesílení

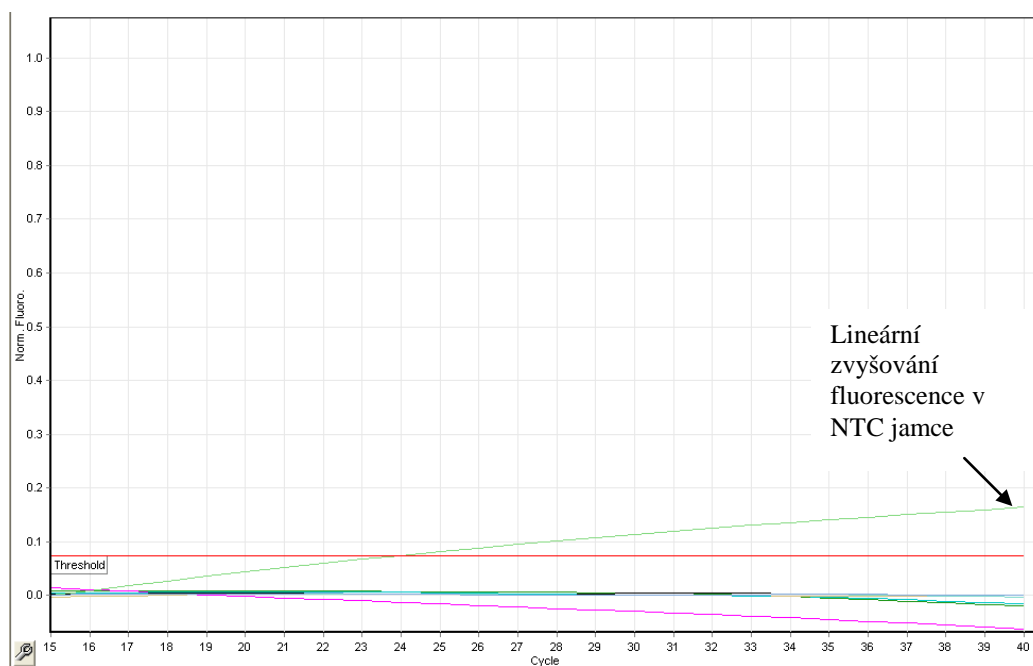
Zkontrolujte výstupy Rotor-Gene Q ze všech reakcí. Občas může být pozorovatelný růst signálu fluorescence v NTC a u negativních vzorků. Jestliže tento případ nastane a dojde k naměření hodnoty C_T , uživatel musí rozlišovat mezi skutečnou událostí zesílení, která by znamenala kontaminaci v NTC, a lineárním nárůstem fluorescence, který může vzniknout v důsledku fluorescenčního artefaktu.

Analýza NTC

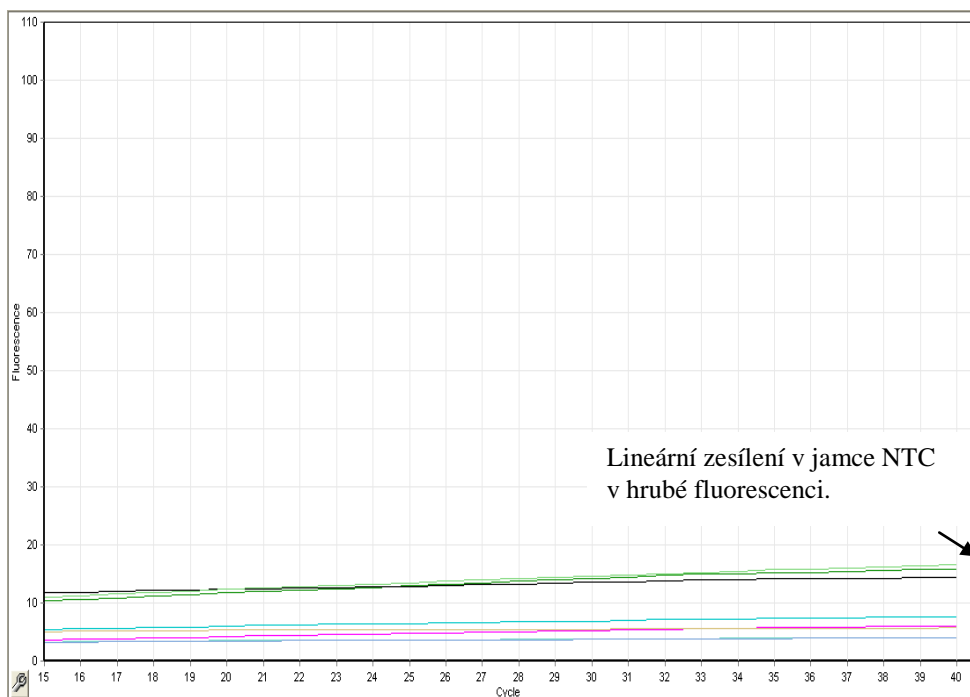
Obrázky 17–18 ukazují dva příklady chování NTC vzorků. Obrázek 17 znázorňuje nelineární, tzn. skutečnou amplifikaci v důsledku kontaminace vzorku: Toto zpracování je třeba vyřadit a vzorky otestovat znovu. Obrázek 18 zobrazuje lineární amplifikaci v NTC. Za těchto okolností je třeba prověřit hrubou fluorescenci. Odpovídající výstup hrubé fluorescence zobrazuje Obrázek 19; indikuje lineární zvýšení fluorescence, ne skutečnou událost zesílení. Data z tohoto zpracování lze použít za předpokladu splnění podmínek pozitivní a interní kontroly. Pro srovnání s příkladem, který znázorňuje Obrázek 19, Obrázek 20 znázorňuje data hrubé fluorescence, kde proběhlo skutečné zesílení. Za těchto okolností musí být data vyřazena a vzorky znovu otestovány, protože tento nález znamená, že došlo ke znečištění.



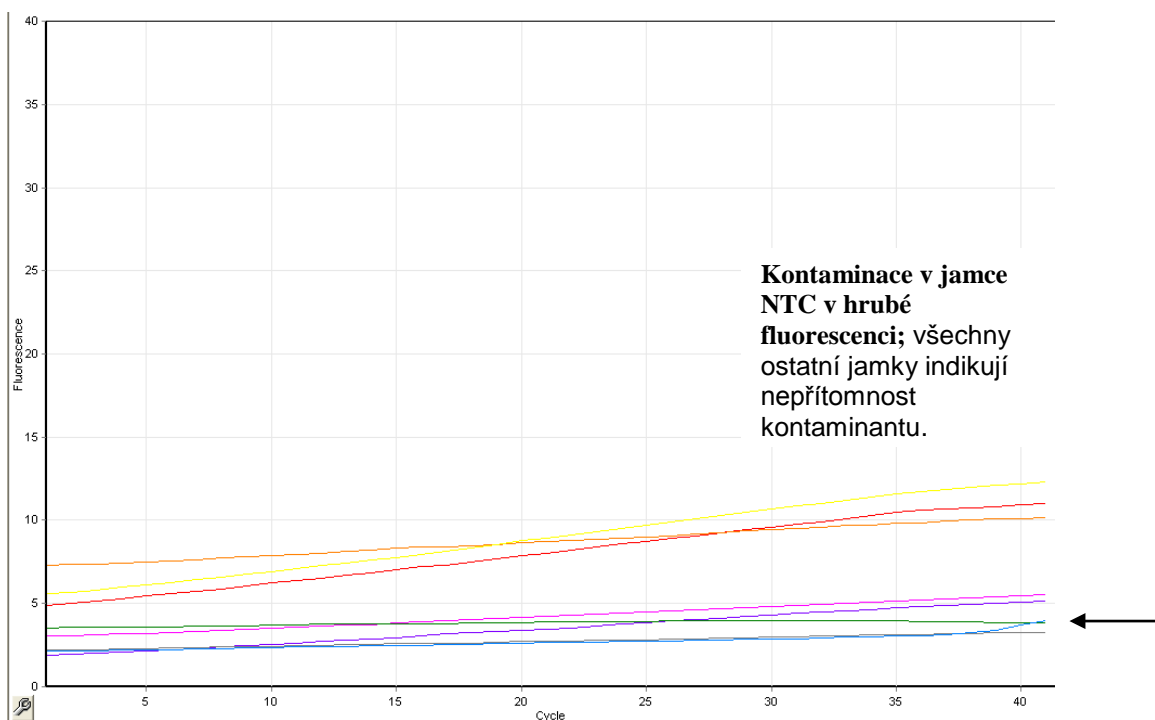
Obrázek 17. Kontaminace NTC analýzy v analyzovaném zpracování.



Obrázek 18. Příklad lineárního zvyšování fluorescence v NTC jamce.



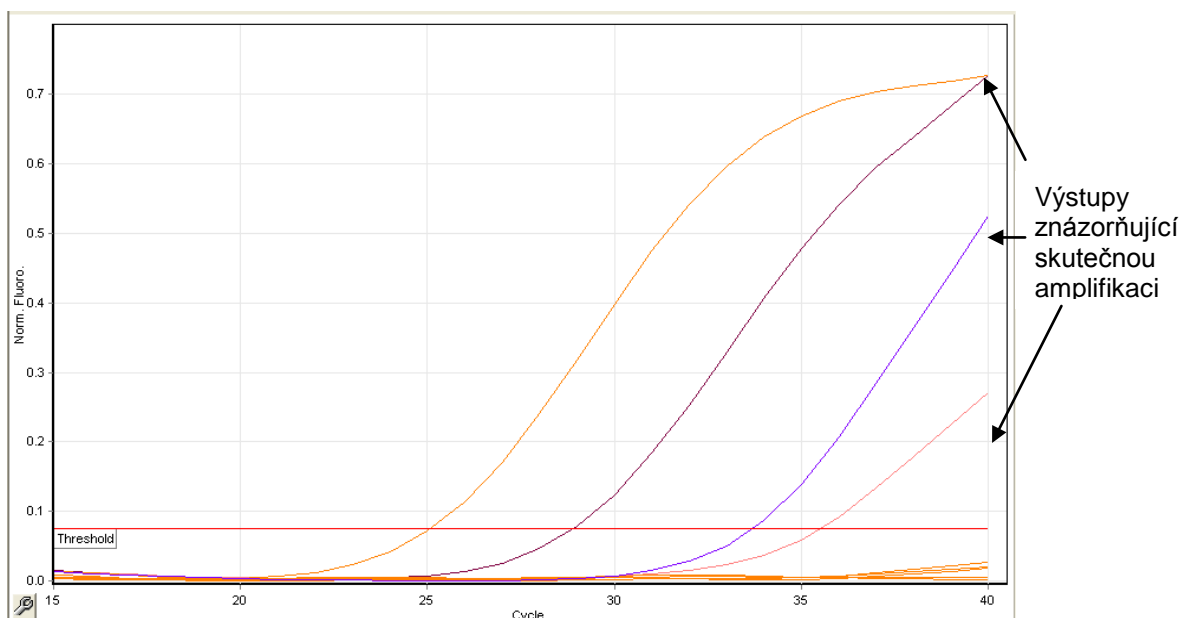
Obrázek 19. Hrubá fluorescence Obrázek 18.



Obrázek 20. Data hrubé fluorescence zobrazují jamku NTC se skutečnou událostí zesílení.

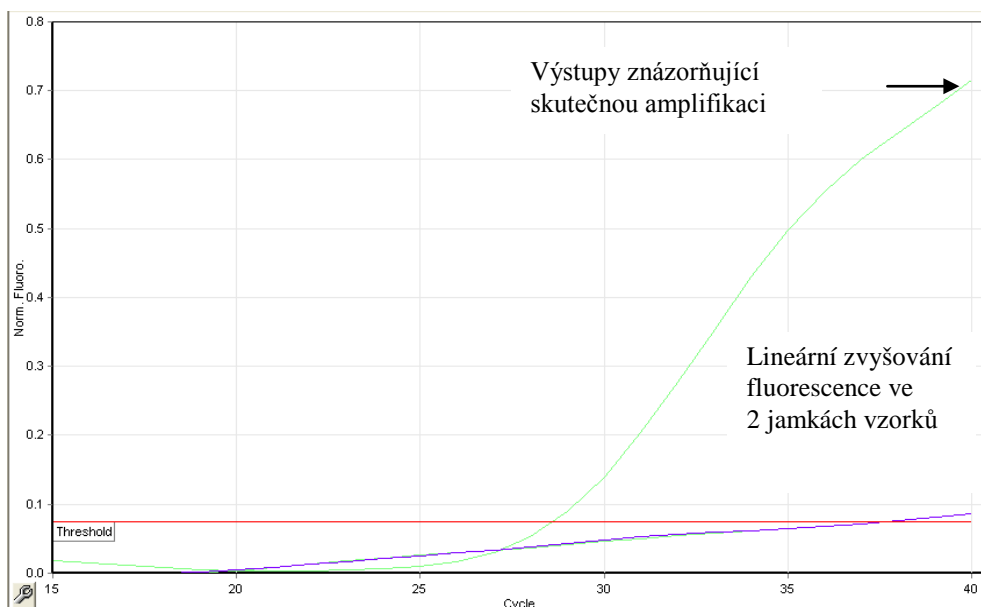
Analýza vzorků

Obrázky 21–22 ukazují dva příklady zesílení reakce vzorků. Příklad skutečného zesílení v jamce vzorku v analyzovaném zpracování, jak znázorňuje Obrázek 21. Jestliže zpracování ukáže tento typ esovitě křivky zesílení, jde o skutečné zesílení a data z daného zpracování lze použít za předpokladu splnění podmínek pozitivní a interní kontroly.

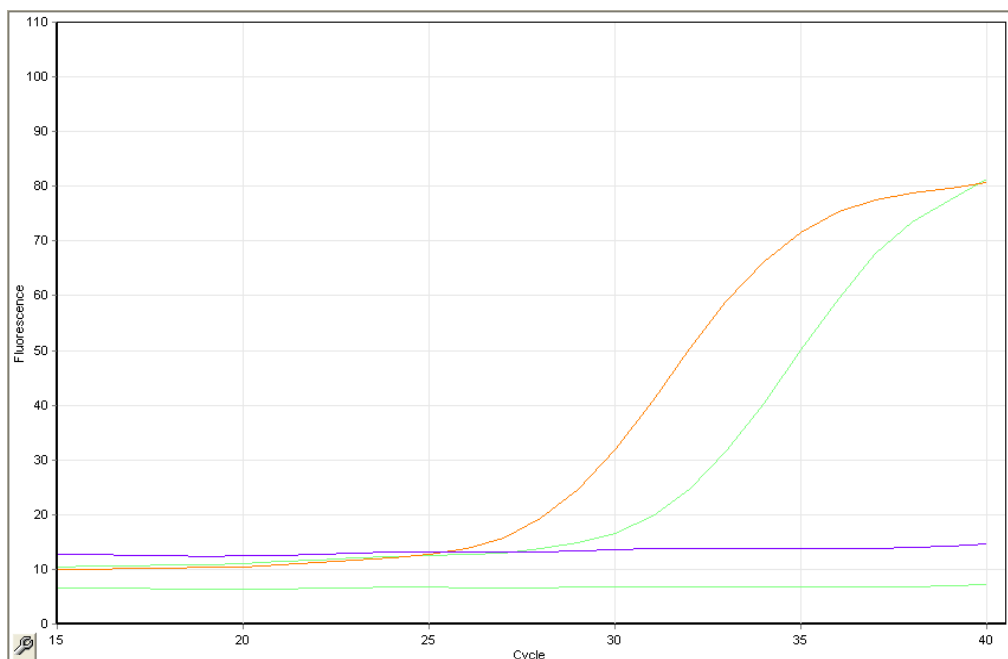


Obrázek 21. Skutečné zesílení v jamce vzorku v analyzovaném zpracování.

Obrázek 22 znázorňuje lineární zesílení v reakci vzorku. Za těchto okolností je třeba prověřit data hrubé fluorescence. Odpovídající výstup hrubé fluorescence (Obrázek 23); indikuje, že lineární zvýšení, Obrázek 22, odpovídá lineárnímu zvýšení hrubé fluorescence. V těchto zpracováních lze získat výsledky vzorku za předpokladu splnění podmínek pozitivní a interní kontroly, přičemž je třeba postupovat opatrně; takové lineární zesílení se označuje jako „no C_T“.



Obrázek 22. Příklad lineárního zvyšování fluorescence ve dvou jamkách vzorků.



Obrázek 23. Hrubá fluorescence Obrázek 22.

Návod na řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědečtí pracovníci, kteří pracují v technických službách společnosti QIAGEN, vám vždy ochotně odpoví na jakékoli dotazy týkající se informací či protokolů v této příručce nebo technologii přípravy vzorků či zpracování analýz (kontaktní informace najdete na zadní straně obálky nebo na stránkách www.qiagen.com).

Komentáře a návrhy

Žádný signál s EGFR pozitivní kontrolou (PC) ve fluorescenčním kanálu Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) Vybraný fluorescenční kanál pro analýzu dat PCR neodpovídá protokolu | Pro analýzu dat vyberte fluorescenční kanál Cycling Green pro analytické EGFR PCR a fluorescenční kanál Cycling Yellow pro interní kontroly PCR. |
| b) Nesprávné naprogramování teplotního profilu přístroje Rotor-Gene | Porovnejte teplotní profil s protokolem; je-li nesprávný, potom daný zpracování zopakujte. |
| c) Nesprávná konfigurace PCR | Zkontrolujte své pracovní kroky podle schématu pipetování, případně PCR zopakujte. |

Komentáře a návrhy

- | | |
|--|--|
| d) Skladovací podmínky jedné nebo několika součástí soupravy neodpovídaly instrukcím v části „Skladování činidel a manipulace s nimi“ (na straně 12) | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek soupravy) reakčních činidel a v případě potřeby použijte novou soupravu. |
| e) Souprava <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit překročila datum expirace | Zkontrolujte skladovací podmínky a datum expirace (viz štítek soupravy) reakčních činidel a v případě potřeby použijte novou soupravu. |

Signály s negativními kontrolami ve fluorescenčním kanálu Cycling Green analytického PCR

- | | |
|--|--|
| a) Během přípravy PCR došlo ke kontaminaci | <p>Zopakujte PCR s novými reakčními činidly v replikátech.</p> <p>Je-li to možné, zavřete zkumavky PCR přímo po přidání testovaného vzorku.</p> <p>Zkontrolujte, zda jsou přístroje a pracoviště pravidelně dekontaminovány.</p> |
| b) Během extrakce došlo ke kontaminaci. | <p>Zopakujte extrakci a PCR testovaného vzorku; používejte nová činidla.</p> <p>Zkontrolujte, zda jsou přístroje a pracoviště pravidelně dekontaminovány.</p> |

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN, certifikovaným podle ISO, je každá výrobní šarže souprav *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

Omezení

Výsledky získané pomocí produktu musí být interpretovány v kontextu všech relevantních klinických a laboratorních nálezů a nejsou určeny k použití samostatně jen pro diagnostiku.

Produkt je určen k použití personálem speciálně instruovaným a vyškoleným v postupech diagnostiky *in vitro* a v použití přístroje Rotor-Gene Q.

Analytické validační studie zahrnovaly lidskou DNA, extrahované ze vzorků tkáně tumorů, které byly fixované formalinem a zalité v parafinu.

Produkt je určen k použití pouze s cyklerem pro PCR v reálném čase Rotor-Gene Q, řady 5plex HRM.

Pro získávání optimálních výsledků je nutné přísně dodržovat pokyny uvedené v *příručce k soupravě theascreen EGFR RGQ PCR Kit*. Jiné ředění činidel než to, které je popsáno v této příručce, se nedoporučuje a může mít za následek zhoršení kvality provedení testu.

Důležité je, aby množství a kvalita DNA ve vzorku byly vyhodnoceny ještě před provedením analýzy vzorku pomocí soupravy *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*. Další kontrolní reakční směs (Ctrl) je k dispozici za účelem stanovení, zda je hodnota C_T pro danou analýzu přijatelná. Zjištěné hodnoty vstřebatelnosti se nesmí používat, protože nekorelují s hodnotami C_T ve fragmentovaných vzorcích DNA.

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti s prošlou dobou expirace ani nesprávně skladované součásti.

Charakteristiky funkčních vlastností analýz

Hraniční hodnoty

171 vzorků FFPE bylo otestováno metodou, která odpovídá směrnicím v NCCLS EP17-A (2004). Pro určení hraniční hodnoty byla použita data z 159 vzorků. Rozsah hodnot C_T kontrolní reakce byl stanoven na 23,00 až 30,69 C_T . Hraniční hodnoty byly zavedeny a odpovídají tabulce 8.

Limit detekce (LOD)

Pro určení LOD pro *theascreen EGFR RGQ PCR Kit*, byla připravena sada vzorků smíšením syntetické mutantní DNA z genomické DNA divokého typu pro simulaci rozsahu procenta mutací pro každou z 29 mutací. LOD pro každé stanovení je definováno jako procento mutace, při kterém 95 % replikací budu *theascreen EGFR PCR RGQ Kit* určeno pozitivně. Hodnoty LOD jsou uvedeny v Tabulka 9. Pro multiplexní analýzy, které zjišťují více mutací (G719X, delece a inserce), je uvedena hodnota pro reakci, která dala nejvyšší LOD.

Tabulka 9. LOD pro každé ze sedmi stanovení mutací EGFR

Mutace	Detekovatelné procento mutace (%)
T790M	7,02
Delece	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Inzerce	2,03

Přesnost

Pro určení přesnosti *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit byla připravena sada vzorků smíšením syntetické mutantní DNA z genomické DNA divokého typu pro simulaci rozsahu procenta mutací pro každou ze sedmi analýz mutací. Přesnost byla posouzena zkoušením vzorků na jednom pracovišti pomocí více šarží souprav, operátorů a během několika dní se dvěma replikacemi každého vzorku. Pozorovaná variace, v pojmu odhadované směrodatné odchylky získané analýzou složky variance, byla menší než 1 ΔC_T a může být použita pro odhad přesnosti (Tabulka 10).

Tabulka 10. Výsledky testů v rámci laboratoře*

Analýza	Procento pozitivního zkoušení mutace	Odhad směrodatné odchylky (ΔC_T)
T790M	100%	0,33
Delece	100%	0,40
L858R	100%	0,45
L861Q	100%	0,49
G719X	97,9%	0,59
S768I	97,9%	0,31
Inzerce	97,9%	0,38

* 93 replikátů bylo zkoumáno pro každou mutaci.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla posouzena zkoušením vzorků s vysokou hladinou mutací na pozadí genomické DNA divokého typu na třech pracovištích pomocí více šarží souprav, operátorů a během několika dní se dvěma replikacemi každého vzorku. Pro všech sedm analýz mutace bylo 96,1 – 100 % vzorků s mutantní DNA testováno pozitivně. Testované vzorky divokého typu byly negativní ve všech analýzách na všech pracovištích.

Účinky vstupní koncentrace DNA

Pro určení účinku změny vstupní koncentrace DNA na výsledky získané pomocí *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit v blízkosti LOD byla připravena sada vzorků pro všech 29 mutací smícháním syntetické mutantní DNA s genomickou DNA divokého typu při nízkých, středních a vysokých celkových vstupních hladinách DNA.

Vysoké a nízké hladiny vstupní DNA byly sledovány pro zastoupení kontrolního rozsahu hodnoty C_T (23,50 až 29,50).

Posouzení datového souboru vstupní DNA (29 mutací v koncentracích blízko LOD a při třech různých hladinách vstupní DNA) odhalily 95,44% pozitivní míru mutace.

Tato data indikují, že změna úrovně vstupní DNA v pracovním rozsahu stanovení, nemá vliv na ΔC_T nebo falešné detekci mutace ve vzorku.

Interferující látky

Byl posouzen vliv na výkon soupravy složek, které mohou být potenciálně přeneseny z QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit během zpracování vzorků FFPE.

Formalin, parafinový vosk, xylén, etanol, pufr ATL, proteináza K, pufr AL, promývací pufr AW1 a promývací pufr AW2 byly použity při nejvyšší („nejhorší případ“) očekávané koncentraci (za předpokladu, že každý krok promývání nebo čištění v protokolu extrakce vede ke snížení koncentrace složky o 1 log).

Ve studii byly použity vzorky s trojnásobkem LOD místo vzorků s mnohem vyšší úrovní mutací pro zajištění, že bude možné zjistit možné rušení.

Rozdíl $\Delta C_T \geq 3$ směrodatné odchylky (převzato ze studie přesnosti) mezi „testem“ a „kontrolou“ (tj. bez rušivé složky) byl považován za indikaci možného rušení.

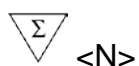
Žádná z možných hodnocených rušících látek nezpůsobila změnu $\Delta C_T \geq 1$ směrodatnou odchylku ve srovnání s kontrolami.

Odkazy

Společnost QIAGEN udržuje velkou aktuální online databázi vědeckých publikací využívajících produkty QIAGEN. Přehledné možnosti vyhledávání umožňují najít požadované články jednoduchým hledáním podle klíčových slov nebo určením aplikace, oblasti výzkumu, názvu atd.

Kompletní seznam odkazů na literaturu najdete v online referenční databázi QIAGEN na stránkách www.qiagen.com/RefDB/search.asp nebo se můžete obrátit na technické služby společnosti QIAGEN nebo místního dodavatele.

Symbols



Obsahuje činidla pro <N> testů



Datum použitelnosti



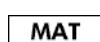
Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Číslo materiálu



Součásti



Obsahuje



Číslo



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití

Kontaktní údaje

Technickou pomoc a další informace si vyhledejte v našem centru technické podpory na stránkách www.qiagen.com/Support, nebo se obraťte telefonicky na telefonní číslo 00800-22-44-6000, nebo kontaktujte některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN Technical Service Departments nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte stránky www.qiagen.com).

Příloha: Podrobné informace o mutacích

Kódy mutací (COSMIC ID) vycházejí z Katalogu somatických mutací při nádorových onemocněních (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*)
<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.

Tabulka 11. Přehled mutací a katalogu COSMIC ID.

Mutace	Exon	Změna báze	COSMIC ID
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Inzerce	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delece	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (komplexní)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (komplexní)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (komplexní)	12422
		2238_2252>GCA (komplexní)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

Tabulka 11. Přehled mutací a katalogu COSMIC ID (pokračování)

Mutace	Exon	Změna báze	COSMIC ID
Delece	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (komplexní)	12382
		2239_2258>CA (komplexní)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (komplexní)	12383

Informace pro objednávky

Výrobek	Obsah	Kat. č.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Použití pro 24 reakcí: 1 kontrolní analýza, 7 analýz mutací, pozitivní kontrola, <i>Taq</i> DNA polymeráza	870111
Přístroj Rotor-Gene Q a příslušenství		
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty.	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty.	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty.	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Cykler pro PCR v reálném čase a analyzátor Melt s vysokým rozlišením s 5 kanály (zeleným, žlutým, oranžovým, červeným, karmínovým) plus HRM kanálem, přenosný počítač, software, příslušenství, roční záruka na všechny části a provedení; instalace a školení nejsou zahrnuty.	9001580

Výrobek	Obsah	Kat. č.
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Hliníkový blok k ruční přípravě reakce pomocí jednokanálové pipety ve zkumavkách 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 stripů po 4 zkumavkách a víčka na 1000 reakcí	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 stripů po 4 zkumavkách a víčka na 10 000 reakcí	981106

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušný manuál soupravy QIAGEN nebo uživatelská příručka. Manuály souprav QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná

Koupě tohoto produktu opravňuje kupujícího k použití produktu pro provádění diagnostických služeb pro lidskou diagnostiku in vitro. Tímto není udělen žádný všeobecný patent ani jiná licence jakéhokoliv druhu, s výjimkou tohoto specifického práva k použití po koupi.

Ochranné známky: QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Limited); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

Souprava *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit je diagnostická souprava s označením CE v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. Není k dispozici ve všech zemích.

Omezená licenční smlouva pro soupravu *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Používáním tohoto produktu vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel soupravy svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daná souprava nebo její užívání neporučuje práva třetích stran.
3. Tato souprava a její součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoliv jiné licence, výslovně nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel soupravy se zavazuje, že nepodnikne a ani jiné osobě nedovolí podniknout jakékoliv kroky, které by mohly umožnit kterýkoliv čin zakázaný výše. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti se soupravou nebo jejími součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

© 2012–2013 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

