

Εγχειρίδιο κιτ *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR

Έκδοση 1

Σ 24

IVD

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με το όργανο Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4 **MAT** 1063321EL



Τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης της QIAGEN

Η QIAGEN είναι ο κορυφαίος προμηθευτής καινοτόμων τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης για την απομόνωση και την ανίχνευση του περιεχομένου βιολογικών δειγμάτων οποιουδήποτε τύπου. Τα προηγμένα και υψηλής ποιότητας προϊόντα και υπηρεσίες μας εξασφαλίζουν την επιτυχία, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στις αναλύσεις νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση της επιτυχίας σας και της επίτευξης καινοτόμων ανακαλύψεων. Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com.

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση	5
Αρχή της διαδικασίας	6
Υλικά που παρέχονται	9
Περιεχόμενα του κιτ	9
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	11
Πληροφορίες ασφαλείας	11
Γενικές προφυλάξεις	11
Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων	12
Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων	13
Διαδικασία	13
Προσδιορισμός του επιπέδου νεοπλασματικών κυττάρων που απαιτείται για εκτέλεση της ανάλυσης EGFR	13
Απομόνωση DNA	14
Πρωτόκολλα	
■ Αξιολόγηση δείγματος	15
■ Ανίχνευση μεταλλάξεων του EGFR	18
■ Ρύθμιση Rotor-Gene Q EGFR	21
Ερμηνεία αποτελεσμάτων	31
Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων	31
Ανάλυση δεδομένων μετάλλαξης του EGFR	34
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	45
Ποιοτικός έλεγχος	47
Περιορισμοί	47
Χαρακτηριστικά απόδοσης	48
Τιμές ορίου ευαισθησίας	48
Όριο ανίχνευσης (LOD)	48
Ακρίβεια	49
Αναπαραγωγικότητα	50
Επίδραση της συγκέντρωσης εισαγόμενου DNA	50
Παρεμβαλλόμενες ουσίες	51

Βιβλιογραφία	51
Σύμβολα	52
Πληροφορίες επικοινωνίας	52
Παράρτημα: Λεπτομέρειες μετάλλαξης	53
Πληροφορίες παραγγελίας	55

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR είναι μια in vitro διαγνωστική εξέταση για την ανίχνευση 29 σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου EGFR, που σχετίζεται με τον καρκίνο, και επιτρέπει την ποιοτική αξιολόγηση της κατάστασης μετάλλαξης.

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR θα πρέπει να χρησιμοποιείται από εκπαιδευμένο προσωπικό σε επαγγελματικό εργαστηριακό περιβάλλον, με δείγματα DNA που έχουν εξαχθεί από μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη ιστό από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Τα αποτελέσματα προορίζονται για την υποστήριξη του κλινικού ιατρού στον προσδιορισμό ασθενών με NSCLC, που ενδέχεται να επωφεληθούν από τη θεραπεία με αναστολείς κινάσης τυροσίνης.

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR προορίζεται για in-vitro διαγνωστική χρήση.

Σύνοψη και επεξήγηση

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR είναι ένα έτοιμο για χρήση προϊόν για την ανίχνευση 29 σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο EGFR, που σχετίζεται με τον καρκίνο, με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στο όργανο Rotor-Gene Q.

Ο συνδυασμός των τεχνολογιών Scorpions® και ARMS®, καθιστά δυνατή την ανίχνευση με το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR των παρακάτω μεταλλάξεων έναντι ενός υποβάθρου γενωμικού DNA άγριου τύπου (wild-type).

- 19 ελλείψεις στο εξόνιο 19 (ανιχνεύει την παρουσία οποιασδήποτε από τις 19 ελλείψεις, αλλά δεν τις διακρίνει)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (ανιχνεύει την παρουσία των G719S, G719A ή G719C, αλλά δεν τα διακρίνει)
- S768I
- 3 προσθήκες στο εξόνιο 20 (ανιχνεύει την παρουσία οποιασδήποτε από τις 3 προσθήκες, αλλά δεν τις διακρίνει).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι εξαιρετικά επιλεκτικές και, ανάλογα με τη συνολική ποσότητα του παρόντος DNA, μπορούν να ανιχνεύσουν μία χαμηλού ποσοστού μετάλλαξη σε υπόβαθρο γενωμικού DNA άγριου τύπου (wild-type). Η επιλεκτικότητα καθώς και τα όρια ανίχνευσης είναι ανώτερα σε σχέση με άλλες τεχνολογίες, όπως η μέθοδος ανίχνευσης αλληλουχίας τερματισμού με ενζυμική μέθοδο (Sanger).

Αρχή της διαδικασίας

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR χρησιμοποιεί δύο τεχνολογίες — ARMS και Scorpions — για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου.

ARMS

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

Scorpions

Η ανίχνευση ενίσχυσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Scorpions. Η τεχνολογία Scorpions συνίσταται σε διλειτουργικά μόρια που περιέχουν έναν εκκινητή PCR ομοιοπολικά συνδεδεμένο με έναν ιχνηθέτη. Το φθορισμοφόρο στον ιχνηθέτη αυτό αλληλεπιδρά με έναν παρεμποδιστή, που περιλαμβάνεται επίσης στον ιχνηθέτη, ο οποίος μειώνει το φθορισμό. Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR, όταν ο ιχνηθέτης δεσμεύεται στον κλώνο (amplicon), το φθορισμοφόρο και ο παρεμποδιστής διαχωρίζονται. Το αποτέλεσμα είναι μια αύξηση στο φθορισμό από το σωληνάριο αντίδρασης.

Μορφή kit

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR περιλαμβάνει οκτώ αναλύσεις:

- Μία ανάλυση ορού ελέγχου (Ctrl)
- Επτά αναλύσεις μετάλλαξης

Όλα τα μείγματα αντίδρασης περιλαμβάνουν αντιδραστήρια για την ανίχνευση στόχων επισημασμένων με FAM™, καθώς και μια ανάλυση εσωτερικού προτύπου ελέγχου επισημασμένη με HEX™. Η ανάλυση εσωτερικού προτύπου ελέγχου ανιχνεύει την παρουσία αναστολέων που ενδέχεται να

οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Η ενίσχυση FAM μπορεί να υπερσχύσει της ενίσχυσης εσωτερικού προτύπου ελέγχου. Συνεπώς, το εσωτερικό πρότυπο ελέγχου χρησιμοποιείται για να υποδείξει απλά ότι όταν δεν εκτελείται ενίσχυση FAM πρόκειται για αληθώς αρνητικό αποτέλεσμα κι όχι για μη επιτυχή αντίδραση PCR.

Διαδικασία

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR περιλαμβάνει μία διαδικασία δύο βημάτων. Στο πρώτο βήμα εκτελείται η ανάλυση ορού ελέγχου για την αξιολόγηση του ολικού DNA ενός δείγματος. Στο δεύτερο βήμα εκτελούνται τόσο οι αναλύσεις μετάλλαξης όσο και η ανάλυση ορού ελέγχου για προσδιορισμό της παρουσίας ή απουσίας μεταλλαγμένου DNA.

Αναλύσεις:

Ανάλυση ορού ελέγχου

Η ανάλυση ορού ελέγχου, που είναι επισημασμένη με FAM, χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού DNA σε ένα δείγμα. Η παρούσα ανάλυση ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 2 του γονιδίου EGFR. Ο εκκινητής και ο ιχνηθέτης έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποφεύγονται τυχόν γνωστοί πολυμορφισμοί του EGFR.

Συνιστάται έντονα η χρήση του μείγματος αντίδρασης ορού ελέγχου (Ctrl) που παρέχεται με το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR για την αξιολόγηση του ολικού DNA σε ένα δείγμα. Η ανάλυση ορού ελέγχου ενισχύει μια περιοχή του εξονίου 2 του γονιδίου EGFR. Συνιστάται η προετοιμασία των δειγμάτων μόνο με την ανάλυση ορού ελέγχου χρησιμοποιώντας το θετικό ορό ελέγχου (PC) EGFR ως θετικό ορό ελέγχου και το νερό χωρίς νουκλεάση (H₂O) ως ορό ελέγχου χωρίς πρότυπο.

Σημείωση: Η αξιολόγηση του DNA θα πρέπει να βασίζεται στην PCR και ενδέχεται να διαφέρει από την ποσοτικοποίηση βάσει των μετρήσεων απορρόφησης. Παρέχεται πρόσθετο μείγμα αντίδρασης ορού ελέγχου (Ctrl) για αξιολόγηση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA σε δείγματα πριν από την ανάλυση με το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Αναλύσεις μετάλλαξης

Κάθε ανάλυση μετάλλαξης περιέχει έναν ιχνηθέτη Scorpion επισημασμένο με FAM και έναν εκκινητή ARMS για το διαχωρισμό μεταξύ του DNA άγριου τύπου (wild-type) και ενός ειδικού μεταλλαγμένου DNA.

Οροί ελέγχου

Σημείωση: Όλες οι αναλύσεις του πειράματος πρέπει να περιέχουν τους παρακάτω ορούς ελέγχου.

Θετικός ορός ελέγχου

Κάθε ανάλυση πρέπει να περιέχει ένα θετικό ορό ελέγχου στα σωληνάρια 1–8. Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR περιέχει θετικό ορό ελέγχου (PC) EGFR για χρήση ως πρότυπο στην αντίδραση θετικού ορού ελέγχου. Τα αποτελέσματα θετικού ορού ελέγχου θα αξιολογηθούν, για να διασφαλιστεί ότι η απόδοση του kit βρίσκεται εντός των καθορισμένων κριτηρίων αποδοχής.

Αρνητικός ορός ελέγχου

Κάθε ανάλυση πρέπει να περιέχει ένα αρνητικό ορό ελέγχου («ορός ελέγχου χωρίς πρότυπο», NTC) στα σωληνάρια 9–16. Ο ορός ελέγχου NTC αποτελείται από νερό χωρίς νουκλεάση (H₂O), που χρησιμοποιείται ως «πρότυπο» για τον ορό ελέγχου χωρίς πρότυπο. Ο ορός ελέγχου χωρίς πρότυπο χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση πιθανής μόλυνσης κατά τη διάρκεια ρύθμισης του κύκλου ανάλυσης και της απόδοσης της αντίδρασης εσωτερικού προτύπου ελέγχου.

Αξιολόγηση αντίδρασης εσωτερικού προτύπου ελέγχου

Κάθε μείγμα αντίδρασης περιέχει ένα εσωτερικό πρότυπο ελέγχου, πέρα από την αντίδραση-στόχο. Η μη επιτυχής έκβαση υποδεικνύει είτε την ύπαρξη αναστολέων, που ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, είτε την ύπαρξη σφάλματος ρύθμισης της ανάλυσης από το χειριστή για το συγκεκριμένο σωληνάριο.

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

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του κιτ

Κιτ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR			(24)
Αρ. καταλόγου			870111
Αριθμός αντιδράσεων			24
Κόκκινο	Control Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης ορού ελέγχου)	Ctrl	2 x 600 µl
Πορφυρό	T790M Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης T790M)	T790M	600 µl
Πορτοκαλί	Deletions Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης ελλείψεων)	Del	600 µl
Ροζ	L858R Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης L858R)	L858R	600 µl
Πράσινο	L861Q Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης L861Q)	L861Q	600 µl
Κίτρινο	G719X Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης G719X)	G719X	600 µl
Γκρι	S768I Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης S768I)	S768I	600 µl
Μπλε	Insertions Reaction Mix (Μείγμα αντίδρασης προσθήκης)	Ins	600 µl
Καφέ	EGFR Positive Control (Θετικός ορός ελέγχου EGFR)	PC	300 µl
Τιρκουάζ	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA πολυμεράση)	<i>Taq</i>	138 µl
Λευκό	Nuclease-Free Water (Νερό χωρίς νουκλεάση)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
therascreen <i>EGFR RGQ PCR Kit Handbook</i> (Εγχειρίδιο στα αγγλικά)			1

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS), τα οποία διατίθενται από τον προμηθευτή του προϊόντος.

- Κιτ απομόνωσης DNA (βλ. «Απομόνωση DNA», σελίδα 14)
- Ξυλένιο
- Αιθανόλη (96–100%)*
- Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου 1,5 ml ή 2 ml (για την εκτέλεση των βημάτων λύσης)
- Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου 1,5 ml (για την εκτέλεση των βημάτων έκλουσης) (διατίθενται από την Brinkmann [Safe-Lock, αρ. κατ. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, αρ. κατ. 0030 120.086] ή την Sarstedt [Safety Cap, αρ. κατ. 72.690])[†]
- Ειδικές πιπέτες[‡] (ρυθμιζόμενες) για προετοιμασία δειγμάτων
- Ειδικές πιπέτες[‡] (ρυθμιζόμενες) για την προετοιμασία του κύριου μείγματος PCR
- Ειδικές πιπέτες[‡] (ρυθμιζόμενες) για τη διοχέτευση του προτύπου DNA*
- Ρύγχη πιπέτας χωρίς δεοξυριβονουκλεάση, ριβονουκλεάση και DNA, με φίλτρα (για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης, συνιστάται η χρήση ρυγχών πιπέτας με φραγή αερολυμάτων)
- Συσκευή θέρμανσης και ανακίνησης (thermomixer), θερμαινόμενος επωαστήρας τροχιακής κίνησης, θερμαντικό μπλοκ ή λουτρό νερού με δυνατότητα επώασης στους 90°C[‡]
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος[‡] με ρότορα για σωληνάρια αντίδρασης 2 ml
- Αναδευτήρας τύπου vortex
- Όργανο Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM[§] με κανάλια φθορισμού για Cycling Green και Cycling Yellow (ανίχνευση FAM και HEX, αντίστοιχα)
- Λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.0.2 ή νεότερη

* Μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη που περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη.

[†] Στο παρόν, δεν αναφέρονται όλοι οι προμηθευτές.

[‡] Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

[§] Όργανο Rotor-Gene Q 5plex HRM, αν χρησιμοποιείται.
Γνωστό και ως Rotor-Gene Q MDx σε ορισμένες χώρες.

- Σειρές σωληναρίων και πώματα, 0,1 ml, για χρήση σε ρότορα 72 βυθισμάτων (αρ. κατ. 981103 ή 981106)
- Σωληνάρια μικροφυγόκεντρου χωρίς δεοξυριβονουκλεάση, ριβονουκλεάση και DNA, για την προετοιμασία κύριων μειγμάτων
- Μπλοκ φόρτωσης για 72 x 0,1 ml σωληνάρια, μονάδα αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία αντίδρασης με μονοκάναλη πιπέτα (QIAGEN, αρ. κατ. 9018901)

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Πληροφορίες ασφαλείας

Κατά την εργασία με χημικά, φοράτε πάντα προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Διατίθενται στο Διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να εμφανίσετε και να εκτυπώσετε τα SDS για όλα τα kit της QIAGEN καθώς και για τα συστατικά τους.

Πληροφορίες επείγουσας ανάγκης 24ωρης διαθεσιμότητας

Επείγουσα βοήθεια για ατυχήματα ή άλλα θέματα σχετικά με χημικές ουσίες προσφέρεται όλο το 24ωρο από:

CHEMTREC

ΗΠΑ και Καναδάς ■ Τηλ.: 1-800-424-9300

Εκτός ΗΠΑ και Καναδά ■ Τηλ.: +1-703-527-3887 (δεκτές και κλήσεις με χρέωση του καλούμενου)

Γενικές προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει να λαμβάνει πάντα υπόψη τα εξής.

- Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπέτας χωρίς δεοξυριβονουκλεάση, ριβονουκλεάση και DNA, με φίλτρα, και βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες έχουν βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Αποθηκεύετε και εξάγετε τα θετικά υλικά (δείγματα και θετικούς ορούς ελέγχου) ξεχωριστά από όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και προσθέτετέ τα στο μείγμα αντίδρασης σε μία ξεχωριστή χωροταξική διάταξη.
- Αποψύχετε πλήρως όλα τα συστατικά σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από την έναρξη μιας ανάλυσης.

- Όταν τα συστατικά έχουν αποψυχθεί, αναμειγνύετέ τα, ανακινώντας κάθε σωληνάριο 10 φορές, και εκτελείτε φυγοκέντρωση για σύντομο χρονικό διάστημα.

Σημείωση: Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή της μόλυνσης των αντιδράσεων PCR με συνθετικό υλικό ελέγχου. Συνιστάται η χρήση ξεχωριστών, ειδικών πιπετών για την προετοιμασία των μειγμάτων αντίδρασης και την προσθήκη του προτύπου DNA. Η προετοιμασία και η διοχέτευση των μειγμάτων αντίδρασης θα πρέπει να πραγματοποιείται σε ξεχωριστό χώρο από εκείνον στον οποίο πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του προτύπου. Τα σωληνάρια Rotor-Gene Q δεν πρέπει να ανοίγονται μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης PCR. Αυτό αποσκοπεί στην αποτροπή τυχόν εργαστηριακής λοίμωξης από προϊόντα που προκύπτουν μετά την ανάλυση PCR.

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

Σημείωση: Όλα τα αντιδραστήρια του kit *therascreen* EGFR RGQ PCR έχουν παρασκευαστεί ειδικά για χρήση με τις εξετάσεις που αναφέρονται. Όλα τα αντιδραστήρια που παρέχονται στο kit *therascreen* EGFR RGQ PCR προορίζονται για χρήση αποκλειστικά με άλλα αντιδραστήρια που περιέχονται στο ίδιο kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Τα αντιδραστήρια του kit δεν πρέπει να αντικαθίστανται, ώστε να διατηρηθεί η βέλτιστη απόδοση.

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

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

Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR μεταφέρεται σε ξηρό πάγο και θα πρέπει να είναι κατεψυγμένο κατά την παραλαβή. Εάν το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR δεν είναι κατεψυγμένο κατά την παραλαβή, η εξωτερική συσκευασία έχει ανοίξει κατά τη μεταφορά ή στο κιβώτιο αποστολής δεν περιλαμβάνονται το δελτίο συσκευασίας, το εγχειρίδιο ή τα αντιδραστήρια, επικοινωνήστε με κάποιο από τα τμήματα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (ανατρέξτε στο οπισθόφυλλο ή επισκεφτείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR πρέπει να αποθηκεύεται αμέσως μετά την παραλαβή στους –15 έως –25°C σε καταψύκτη σταθερής θερμοκρασίας,

σε σκοτεινό χώρο. Το κιτ παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον αποθηκεύεται υπό τις συνιστώμενες συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχική του συσκευασία. Η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη θα πρέπει να αποφεύγεται. Συνιστάται οι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης να μην ξεπερνούν τους 7.

Σημείωση: Για να διασφαλιστεί βέλτιστη δραστηριότητα και απόδοση, τα Scorpions (όπως όλα τα επισημασμένα με φθορισμό μόρια) πρέπει να προστατεύονται από το φως, ώστε να αποφεύγεται η φωτολεύκανση.

Σημείωση: Για βέλτιστη χρήση των αντιδραστηρίων του κιτ *therascreen* EGFR RGQ PCR, τα δείγματα θα πρέπει να εξετάζονται σε παρτίδες. Εάν τα δείγματα υποβληθούν σε εξέταση μεμονωμένα, θα χρησιμοποιηθούν περισσότερα αντιδραστήρια και θα μειωθεί ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να εξεταστούν με το κιτ *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Χειρισμός και αποθήκευση δειγμάτων

Σημείωση: Όλα τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εν δυνάμει μολυσματικά υλικά.

Το υλικό δείγματος πρέπει να είναι γενωμικό DNA ανθρώπινης προέλευσης, το οποίο εξάγεται από δείγματα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE). Η μεταφορά των δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την τυπική μεθοδολογία παθολογίας για τη διασφάλιση της ποιότητάς τους.

Τα νεοπλασματικά δείγματα δεν είναι ομοιογενή και τα δεδομένα από ένα δείγμα της νεοπλασίας ενδέχεται να μη συμφωνούν με άλλες τομές της ίδιας νεοπλασίας. Επίσης, τα νεοπλασματικά δείγματα ενδέχεται να περιέχουν μη νεοπλασματικό ιστό. Το DNA από μη νεοπλασματικό ιστό δεν αναμένεται να περιέχει τις μεταλλάξεις του EGFR που ανιχνεύονται από το κιτ *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Διαδικασία

Προσδιορισμός του επιπέδου νεοπλασματικών κυττάρων που απαιτείται για εκτέλεση της ανάλυσης EGFR

Ο ιστός που χρησιμοποιείται για την ανάλυση EGFR είναι μονιμοποιημένος σε φορμόλη και εγκλεισμένος σε παραφίνη (FFPE) ιστός από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Το DNA που εξάγεται από κύτταρα εντός αυτού του νεοπλασματικού ιστού ενδέχεται να είναι άγριου τύπου (wild type) σε σχέση με τις μεταλλάξεις του EGFR ή να παρουσιάζει μία ή περισσότερες μεταλλάξεις.

Ο ιστός FFPE NSCLC που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή ενδέχεται να περιέχει και φυσιολογικό, μη νεοπλασματικό ιστό, ο οποίος θα είναι άγριου τύπου (wild type) όσον αφορά τις μεταλλάξεις του EGFR. Το DNA άγριου

τύπου (wild type) από αυτόν τον ιστό μπορεί να αραιώσει το μεταλλαγμένο DNA, ενδεχομένως σε βαθμό στον οποίο δεν θα είναι πλέον δυνατή η ανίχνευσή από το kit. Ωστόσο, συνιστάται η εξέταση ακόμα και δειγμάτων με χαμηλά επίπεδα νεοπλασματικών κυττάρων, καθώς υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων υψηλού επιπέδου και λήψης απόφασης θεραπευτικής αγωγής για τον ασθενή.

Για μεγιστοποίηση των πιθανοτήτων ανίχνευσης μεταλλάξεων, εκτελέστε τις παρακάτω ενέργειες:

- Εκτελέστε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E) σε μία τουλάχιστον αντικειμενοφόρο πλάκα κάθε δείγματος ασθενή.
- Διασφαλίστε τον έλεγχο της αντικειμενοφόρου πλάκας, που έχει υποβληθεί σε χρώση, από παθολογοανατόμο για ύπαρξη νεοπλασιών.
- Εάν είναι εφικτό, ο παθολογοανατόμος θα πρέπει να ελέγξει διάφορες αντικειμενοφόρους πλάκες από όλο το μπλοκ FFPE.
- Όλα τα δείγματα που παρουσιάζουν νεοπλασίες μπορούν να εξεταστούν με το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA πρέπει να εκτελείται με το kit QIAamp® DNA FFPE Tissue.

Εκτελέστε καθαρισμό του DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του *Εγχειριδίου kit QIAamp DNA FFPE Tissue* με τις παρακάτω τροποποιήσεις.

- Συλλέξτε τις τομές FFPE σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Απομακρύνετε με απόξεση την περίσσεια παραφίνης γύρω από τις τομές ιστού χρησιμοποιώντας ένα καινούριο, αποστειρωμένο νυστέρι.
- Μεταφέρετε το υλικό απόξεσης των τομών ιστού σε σωληνάρια μικροφυγόκεντρου χρησιμοποιώντας καινούριο νυστέρι για κάθε δείγμα προς εξαγωγή.
- Η διάσπαση της πρωτεΐνάσης K πρέπει να συνεχίζεται για 1 ώρα.
- Η έκλυση του καθαρού γενωμικού DNA πρέπει να πραγματοποιείται σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATE (παρέχεται στο kit QIAamp DNA FFPE Tissue).
- Αποθηκεύστε το καθαρό γενωμικό DNA στους -15°C έως -30°C .
- Σε περιπτώσεις στις οποίες δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν οι αντικειμενοφόροι πλάκες δίπλα στη χρωσμένη με H&E αντικειμενοφόρο πλάκα, οι οποίες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νεοπλασματικό ιστό.

Σημείωση: Από όλες τις αναλύσεις στο kit *therascreen* EGFR RGQ PCR δημιουργούνται προϊόντα PCR μικρού μήκους. Ωστόσο, το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR δεν είναι αποτελεσματικό, όταν το DNA είναι ιδιαίτερα κατακερματισμένο.

Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δείγματος

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του ολικού ενισχύσιμου DNA στα δείγματα.

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

- Πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε τις «Γενικές προφυλάξεις», στη σελίδα 11.
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το Rotor-Gene Q, πριν προχωρήσετε στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου.
- Μη στροβιλίζετε την *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) ή οποιοδήποτε μείγμα που περιέχει *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*), καθώς υπάρχει κίνδυνος αδρανοποίησης του ενζύμου.
- Διοχετεύστε την *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*), τοποθετώντας το ρύγχος της πιπέτας ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφευχθεί η επικάλυψη του ρύγχους με περίσσεια ενζύμου.

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται εντελώς σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), να αναμειγνύονται με αναστροφή 10 φορές και να υποβάλλονται σε φυγοκέντρωση για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Βεβαιωθείτε ότι η *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από κάθε χρήση. Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε το μείγμα αντίδρασης ορού ελέγχου (Ctrl), το νερό χωρίς νουκλεάση για ορό ελέγχου χωρίς πρότυπο (NTC) και το θετικό ορό ελέγχου (PC) EGFR σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Όταν τα αντιδραστήρια έχουν αποψυχθεί, αναμείξτε τα αναστρέφοντας κάθε σωληνάριο 10 φορές, για την αποφυγή τοπικών συγκεντρώσεων αλάτων και, στη συνέχεια, εκτελέστε φυγοκέντρωση για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.

2. Προετοιμάστε επαρκείς ποσότητες κύριων μειγμάτων για τα δείγματα DNA καθώς και μία αντίδραση θετικού ορού ελέγχου και μία αντίδραση ορού ελέγχου χωρίς πρότυπο, σύμφωνα με τους όγκους που παρατίθενται στον Πίνακας 1. Συμπεριλάβετε αντιδραστήρια για 1 επιπλέον δείγμα, ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για τη ρύθμιση PCR.

Το κύριο μείγμα περιέχει όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση PCR, εκτός από το δείγμα.

Πίνακας 1. Προετοιμασία κύριου μείγματος ανάλυσης ορού ελέγχου*

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση (μl)
Μείγμα αντίδρασης ορού ελέγχου (Ctrl)	19,5
Taq DNA πολυμεράση (Taq)	0,5
Συνολικός όγκος	20,0

* Κατά την προετοιμασία του κύριου μείγματος, προετοιμάστε ποσότητα που να επαρκεί για ένα επιπλέον δείγμα.

3. Αναμείξτε ενδελεχώς το κύριο μείγμα αναρροφώντας και διοχετεύοντας προσεκτικά με πιπέτα 10 φορές. Προσθέστε αμέσως 20 μl κύριου μείγματος στη σειρά σωληναρίων για PCR (δεν παρέχεται).
- Σημείωση:** Για την αξιολόγηση των δειγμάτων, πρέπει να προστίθεται κύριο μείγμα ανάλυσης ορού ελέγχου σε ένα βύθισμα θετικού ορού ελέγχου, σε ένα βύθισμα αρνητικού ορού ελέγχου και σε ένα βύθισμα για κάθε δείγμα.
4. Προσθέστε αμέσως 5 μl δείγματος νερού χωρίς νουκλεάση (H₂O) στο σωληνάριο του ορού ελέγχου χωρίς πρότυπο (σωληνάριο PCR αρ. 9) και τοποθετήστε το πώμα στο σωληνάριο. Προσθέστε 5 μl δείγματος DNA στα σωληνάρια δείγματος και τοποθετήστε τα πώματα στα σωληνάρια. Προσθέστε 5 μl θετικού ορού ελέγχου (PC) EGFR στο σωληνάριο θετικού ορού ελέγχου (σωληνάριο PCR αρ. 1) και τοποθετήστε το πώμα στο σωληνάριο.
5. Τοποθετήστε τις σειρές σωληναρίων PCR στις αντίστοιχες θέσεις στο ρότορα και βεβαιωθείτε ελέγχοντας οπτικά ότι όλα τα σωληνάρια περιέχουν τον ίδιο όγκο υλικού.
- Σημείωση:** Βεβαιωθείτε ότι οι σειρές σωληναρίων δεν έχουν αναστραφεί κατά τη μεταφορά τους στο ρότορα.
6. Εάν ο ρότορας δεν είναι πλήρης, τοποθετήστε άδεια σωληνάρια με πώμα στις κενές θέσεις.

7. Τοποθετήστε αμέσως το ρότορα 72 βυθισμάτων στο όργανο Rotor-Gene Q 5plex HRM. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene Q) είναι τοποθετημένος στο πάνω μέρος του ρότορα για την ασφάλιση των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.
8. Ανατρέξτε στις ρυθμίσεις του οργάνου Rotor-Gene Q (βλ. «Πρωτόκολλο: Ρύθμιση Rotor-Gene Q EGFR», σελίδα 21), για να δημιουργήσετε το προφίλ θερμοκρασίας και να ξεκινήσετε την ανάλυση.

Πίνακας 2. Παράμετροι κυκλοποίησης

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

9. Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης, αναλύστε τα δεδομένα σύμφωνα με την ενότητα «Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων», στη σελίδα 31.

Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων του EGFR

Το πρωτόκολλο αυτό προορίζεται για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του EGFR. Μετά την επιτυχή αξιολόγηση του δείγματος, αυτό μπορεί να υποβληθεί σε εξέταση με χρήση των αναλύσεων μετάλλαξης του EGFR.

Σημαντικές πληροφορίες πριν από την έναρξη

- Πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία, διαβάστε τις «Γενικές προφυλάξεις», στη σελίδα 11.
- Αφιερώστε χρόνο για να εξοικειωθείτε με το Rotor-Gene Q, πριν προχωρήσετε στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου.
- Μη στροβιλίζετε την *Taq* DNA πολυμεράση (*Taq*) ή οποιοδήποτε μείγμα που περιέχει *Taq* DNA πολυμεράση, καθώς υπάρχει κίνδυνος αδρανοποίησης του ενζύμου.
- Για αποτελεσματική χρήση του kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, τα δείγματα πρέπει να ομαδοποιούνται σε παρτίδες των 7 για την πλήρωση του ρότορα 72 βυθισμάτων. Εάν το μέγεθος της παρτίδας είναι μικρότερο, θα υποβληθούν σε εξέταση λιγότερα δείγματα με το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR.
- Διοχετεύστε την *Taq*, τοποθετώντας το ρύγχος της πιπέτας ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του υγρού, ώστε να αποφευχθεί η επικάλυψη του ρύγχους με περίσσεια ενζύμου.
- Για κάθε δείγμα DNA οι αναλύσεις ορού ελέγχου και μετάλλαξης πρέπει να πραγματοποιούνται στην ίδια ανάλυση PCR, ώστε να αποφευχθούν διακυμάνσεις μεταξύ αναλύσεων.

Απαραίτητα βήματα πριν από την έναρξη

- Πριν από κάθε χρήση, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποψύχονται εντελώς σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C), να αναμειγνύονται με αναστροφή 10 φορές και να υποβάλλονται σε φυγοκέντρωση για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
- Βεβαιωθείτε ότι η *Taq* βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) πριν από κάθε χρήση. Φυγοκεντρίστε για σύντομο χρονικό διάστημα το σωληνάριο, ώστε το ένζυμο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε τα μείγματα αντίδρασης, το νερό χωρίς νουκλεάση για ορό ελέγχου χωρίς πρότυπο (NTC) και το θετικό ορό ελέγχου (PC) EGFR σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Όταν τα αντιδραστήρια έχουν αποψυχθεί, αναμείξτε τα αναστρέφοντας κάθε σωληνάριο 10 φορές, για την αποφυγή τοπικών συγκεντρώσεων αλάτων και, στη συνέχεια, εκτελέστε φυγοκέντρωση για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε το περιεχόμενο να συγκεντρωθεί στον πυθμένα των σωληναρίων.
2. Προετοιμάστε επαρκείς ποσότητες κύριων μειγμάτων για τα δείγματα DNA καθώς και μία αντίδραση θετικού ορού ελέγχου και μία αντίδραση ορού ελέγχου χωρίς πρότυπο, σύμφωνα με τους όγκους που παρατίθενται στον Πίνακας 3. Συμπεριλάβετε αντιδραστήρια για 1 επιπλέον δείγμα, ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα επιπλέον υλικού για τη ρύθμιση PCR.

Το κύριο μείγμα περιέχει όλα τα συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση PCR, εκτός από το δείγμα.

Πίνακας 3. Προετοιμασία κύριων μειγμάτων*

Συστατικό	Όγκος/αντίδραση (μl)
Μείγμα αντίδρασης	19,5
<i>Taq</i> DNA πολυμεράση (<i>Taq</i>)	0,5
Συνολικός όγκος	20,0

* Κατά την προετοιμασία του κύριου μείγματος, προετοιμάστε ποσότητα που να επαρκεί για ένα επιπλέον δείγμα.

3. Αναμείξτε ενδελεχώς κάθε κύριο μείγμα αναρροφώντας και διοχετεύοντας προσεκτικά με πιπέτα 10 φορές. Προσθέστε αμέσως 20 μl κύριου μείγματος σε κάθε σειρά σωληναρίων για PCR (δεν παρέχεται).
4. Προσθέστε αμέσως 5 μl νερού χωρίς νουκλεάση (H₂O) στις σειρές σωληναρίων για PCR του ορού ελέγχου χωρίς πρότυπο (σωληνάρια PCR αρ. 9–16) και τοποθετήστε το πώμα στα σωληνάρια. Προσθέστε 5 μl κάθε δείγματος στα σωληνάρια δείγματος (σωληνάρια PCR 17–72) και τοποθετήστε τα πώματα στα σωληνάρια. Προσθέστε 5 μl θετικού ορού ελέγχου (PC) EGFR στα σωληνάρια θετικού ορού ελέγχου (σωληνάρια PCR αρ. 1–8). Κάθε δείγμα DNA πρέπει να υποβληθεί σε εξέταση τόσο με την ανάλυση ορού ελέγχου όσο και με όλες τις αναλύσεις μετάλλαξης. Η διάταξη φαίνεται στον Πίνακας 4.

Πίνακας 4. Διάταξη αναλύσεων ορού ελέγχου και μετάλλαξης

Ανάλυση	Οροί ελέγχου		Αριθμός δείγματος						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Ελλείψεις	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
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
Προσθήκες	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. Τοποθετήστε τις σειρές σωληναρίων PCR στις αντίστοιχες θέσεις στο ρότορα και βεβαιωθείτε ελέγχοντας οπτικά ότι όλα τα σωληνάρια περιέχουν τον ίδιο όγκο υλικού.
Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι οι σειρές σωληναρίων δεν έχουν αναστραφεί κατά τη μεταφορά τους στο ρότορα.
6. Εάν ο ρότορας δεν είναι πλήρης, τοποθετήστε άδεια σωληνάρια με πώμα στις κενές θέσεις.
7. Τοποθετήστε αμέσως το ρότορα στο όργανο Rotor-Gene Q 5plex HRM. Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης (εξάρτημα του οργάνου Rotor-Gene Q) είναι τοποθετημένος στο πάνω μέρος του ρότορα για την ασφάλιση των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.
8. Ανατρέξτε στις ρυθμίσεις του οργάνου Rotor-Gene Q (βλ. «Πρωτόκολλο: Ρύθμιση Rotor-Gene Q EGFR», σελίδα 21), για να δημιουργήσετε το προφίλ θερμοκρασίας και να ξεκινήσετε την ανάλυση.

Πίνακας 5. Παράμετροι κυκλοποίησης

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

9. Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης, αναλύστε τα δεδομένα σύμφωνα με την ενότητα «Ανάλυση δεδομένων μετάλλαξης του EGFR», στη σελίδα 34.

Πρωτόκολλο: Ρύθμιση Rotor-Gene Q EGFR

Στο πρωτόκολλο αυτό γίνεται αναφορά στις ενότητες «Πρωτόκολλο: Αξιολόγηση δείγματος», σελίδα 15, και «Πρωτόκολλο: Ανίχνευση μεταλλάξεων του EGFR», σελίδα 18.

Διαδικασία

1. Δημιουργήστε ένα προφίλ θερμοκρασίας ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα.

Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων ανάλυσης	Εικόνες 1–3
Αρχική ενεργοποίηση του ενζύμου θερμής εκκίνησης (hot-start)	Εικόνα 4
Ενίσχυση του DNA	Εικόνες 5–7
Ρύθμιση των καναλιών φθορισμού	Εικόνες 8–12
Εκκίνηση της ανάλυσης	Εικόνα 13

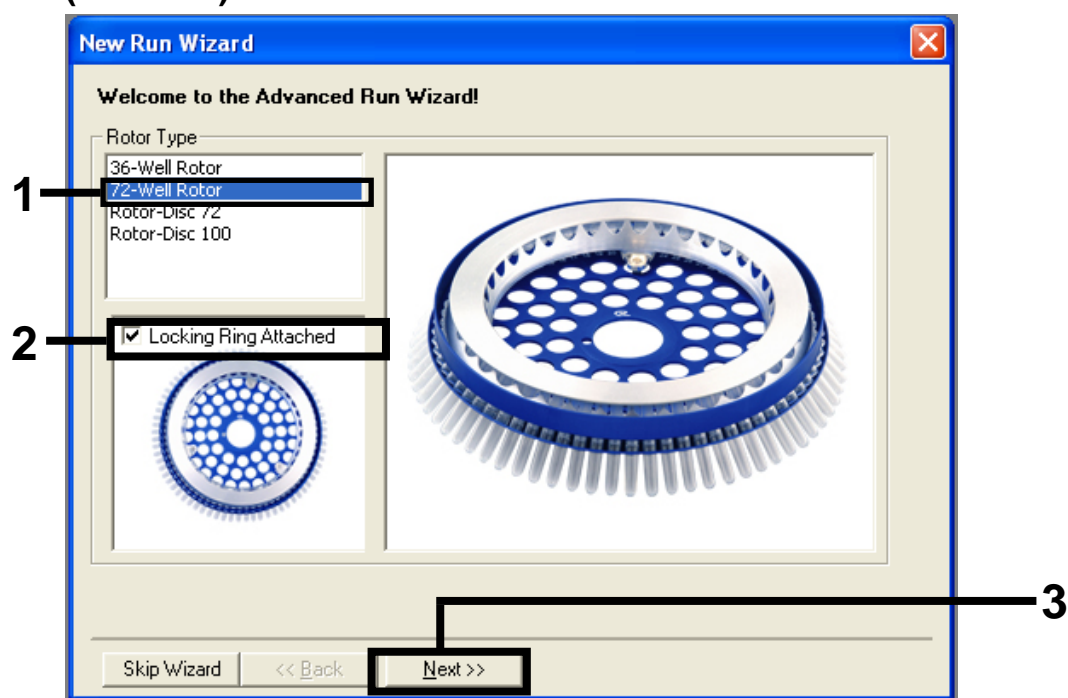
Συνοψίζοντας, οι παράμετροι κυκλοποίησης είναι οι εξής.

Πίνακας 6. Παράμετροι κυκλοποίησης

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

Όλες οι προδιαγραφές αφορούν το λογισμικό Rotor-Gene Q, έκδοση 2.0.2. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον προγραμματισμό των οργάνων Rotor-Gene, ανατρέξτε στα αντίστοιχα εγχειρίδια χρήσης των οργάνων. Στις απεικονίσεις οι ρυθμίσεις αυτές επισημαίνονται με ένα έντονο μαύρο πλαίσιο.

2. Κάντε διπλό κλικ στο εικονίδιο του λογισμικού Rotor-Gene Q, έκδοση 2.0.2 στην επιφάνεια εργασίας του Η/Υ που είναι συνδεδεμένος με το όργανο Rotor-Gene Q 5plex HRM. Επιλέξτε την καρτέλα «Advanced» (Για προχωρημένους) στο πλαίσιο διαλόγου «New Run» (Νέα ανάλυση) που εμφανίζεται.
3. Για να δημιουργήσετε ένα νέο πρότυπο, επιλέξτε «Empty Run» (Κενή ανάλυση) και στη συνέχεια κάντε κλικ στο «New» (Νέα) για να μεταβείτε στο «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης).
4. Στον τύπο ρότορα επιλέξτε *72-Well Rotor* (Ρότορας 72 βυθισμάτων). Βεβαιωθείτε ότι ο δακτύλιος ασφάλισης είναι τοποθετημένος και επισημάνετε το πλαίσιο «Locking Ring Attached» (Δακτύλιος ασφάλισης τοποθετημένος). Κάντε κλικ στο «Next» (Επόμενο) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Πλαίσιο διαλόγου «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης).

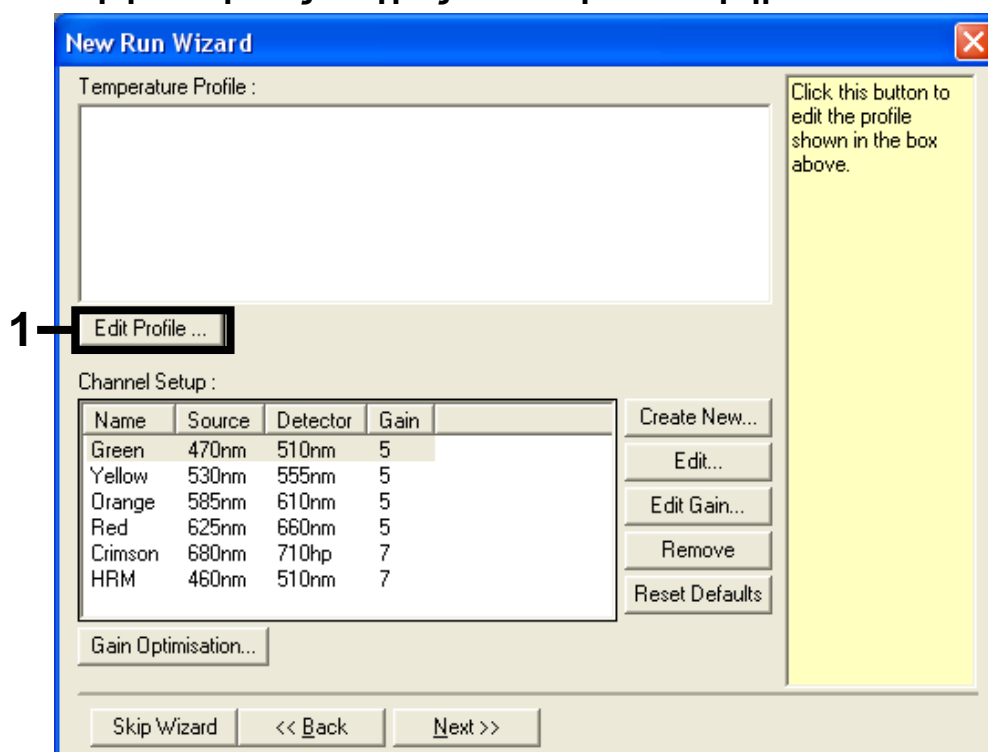
5. Πληκτρολογήστε το όνομα του χειριστή. Προσθέστε τυχόν σημειώσεις και πληκτρολογήστε τον όγκο αντίδρασης ως 25. Βεβαιωθείτε ότι στο πλαίσιο «Sample Layout» (Διάταξη δειγμάτων) εμφανίζεται η ένδειξη «1,2,3...». Κάντε κλικ στο «Next» (Επόμενο) (Εικόνα 2).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' window. It contains the following elements:

- Operator:** A text box containing 'QIAGEN', highlighted with a black box and labeled with a '1'.
- Notes:** A large empty text area, highlighted with a black box and labeled with a '2'.
- Reaction Volume (μL):** A spinner box set to '25', highlighted with a black box and labeled with a '3'.
- Sample Layout:** A dropdown menu showing '1, 2, 3...', highlighted with a black box and labeled with a '4'.
- Buttons:** 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'. The 'Next >>' button is highlighted with a black box.
- Help:** A yellow box on the right with instructions: 'This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.'

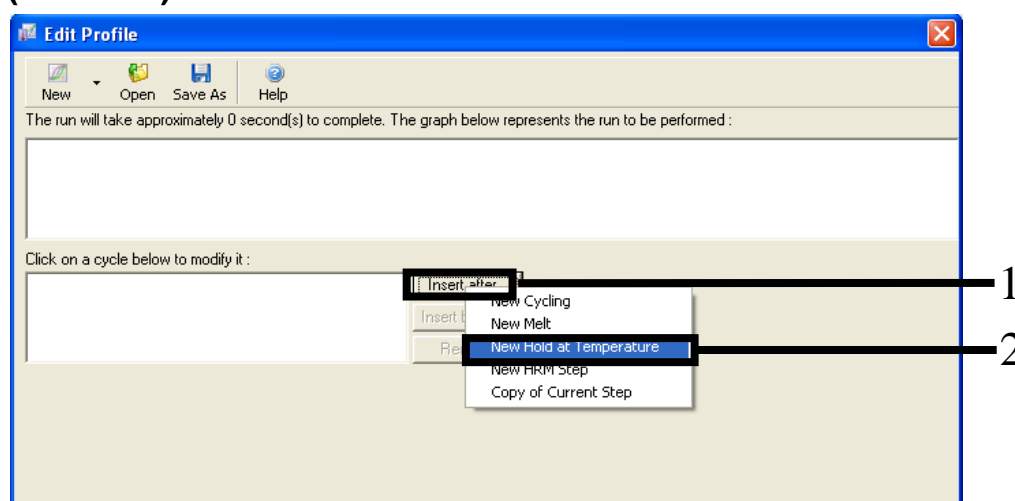
Εικόνα 2. Ρύθμιση των γενικών παραμέτρων ανάλυσης.

6. Κάντε κλικ στο κουμπί «Edit Profile» (Επεξεργασία προφίλ) στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου του «New Run Wizard» (Οδηγός νέας ανάλυσης) (Εικόνα 3) και προγραμματίστε το προφίλ θερμοκρασίας σύμφωνα με τις οδηγίες των παρακάτω βημάτων.



Εικόνα 3. Επεξεργασία του προφίλ.

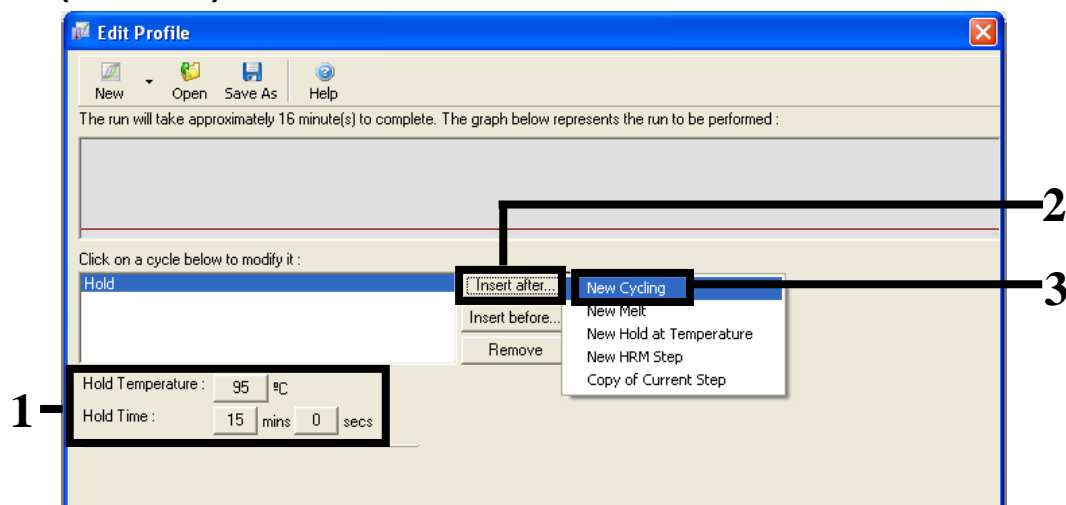
7. Κάντε κλικ στο κουμπί «Insert after» (Εισαγωγή μετά από) και επιλέξτε «New Hold at Temperature» (Διατήρηση νέας θερμοκρασίας) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Αρχικό βήμα επώασης στους 95°C.

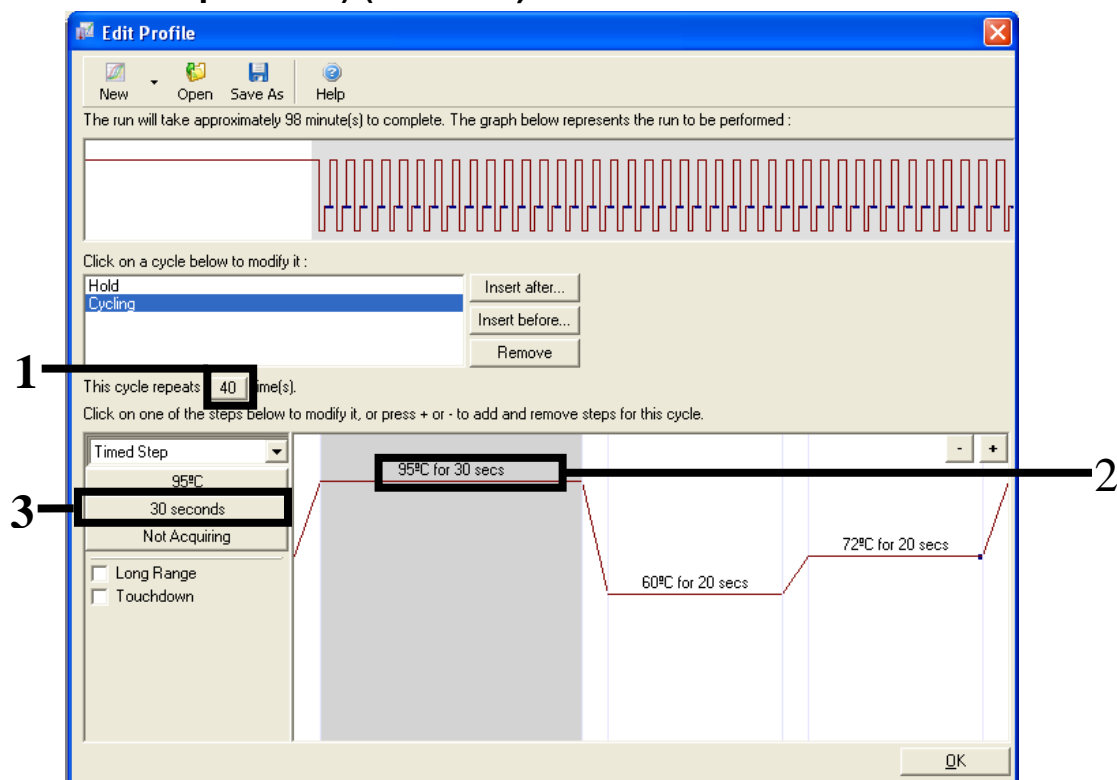
8. Αλλάξτε την τιμή στο πλαίσιο «Hold Temperature» (Διατήρηση θερμοκρασίας) σε 95°C και στο «Hold Time» (Διατήρηση χρόνου) σε 15 mins (15 λεπτά). Κάντε κλικ στο κουμπί «Insert after» (Εισαγωγή

μετά από) και στη συνέχεια επιλέξτε **New Cycling** (Νέα κυκλοποίηση) (Εικόνα 5).



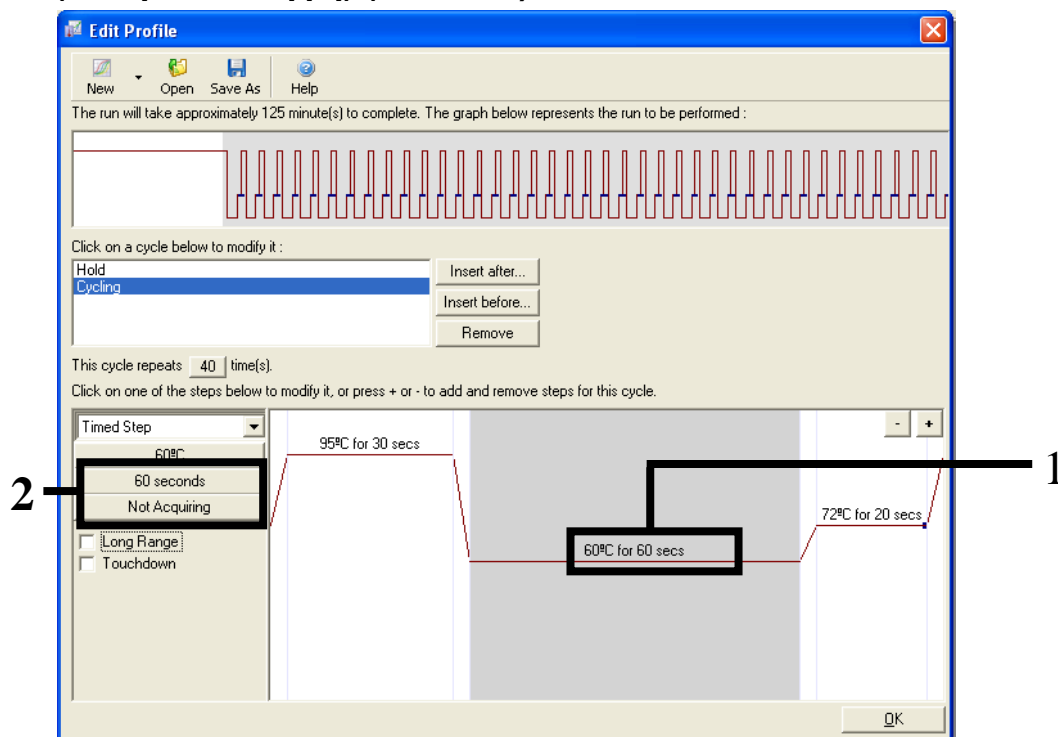
Εικόνα 5. Αρχικό βήμα επώασης στους 95°C.

9. Αλλάξτε τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων κύκλων σε 40. Επιλέξτε το πρώτο βήμα και ρυθμίστε σε 95°C for 30 secs (95°C για 30 δευτερόλεπτα) (Εικόνα 6).



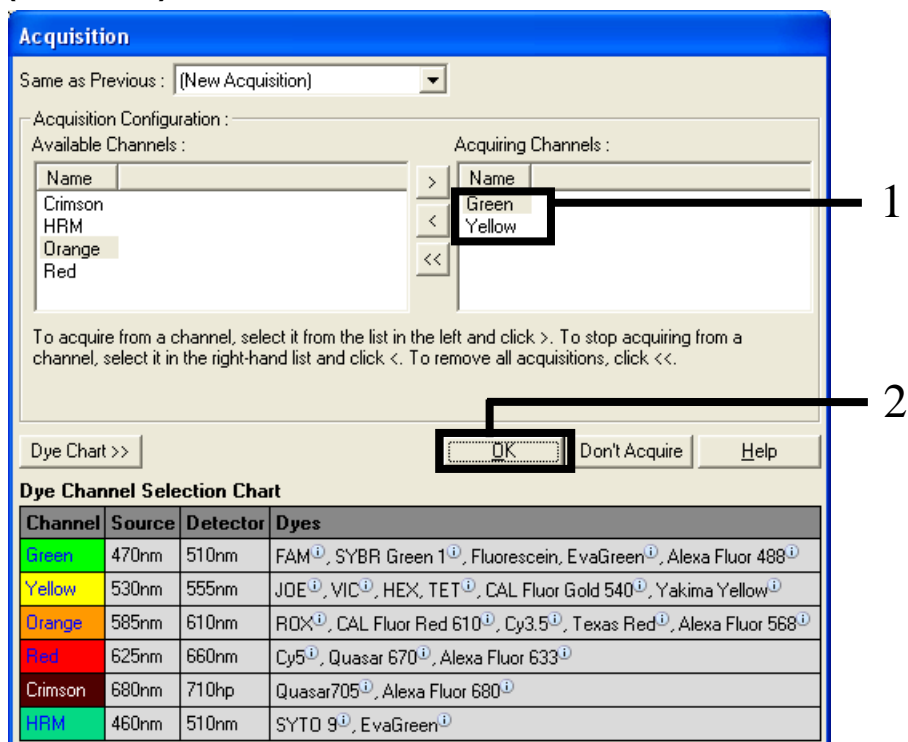
Εικόνα 6. Βήμα κυκλοποίησης στους 95°C.

10. Επισημάνετε το δεύτερο βήμα και ρυθμίστε σε **60°C for 60 secs** (60°C για 60 δευτερόλεπτα). Ενεργοποιήστε τη λήψη δεδομένων κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος, πατώντας το κουμπί «Not Acquiring» (Δεν γίνεται λήψη) (Εικόνα 7).



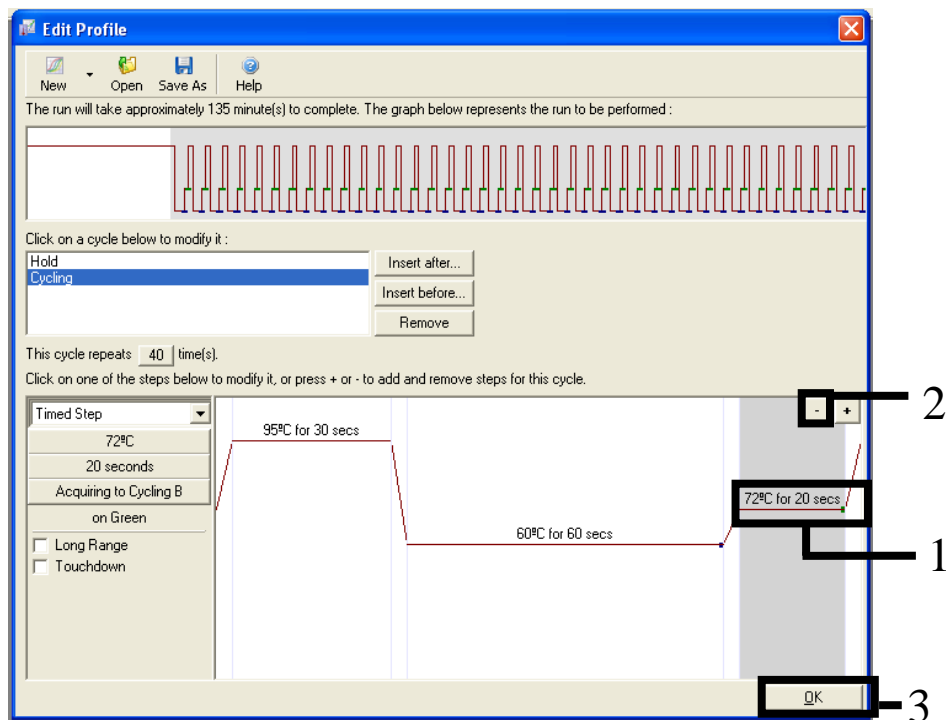
Εικόνα 7. Βήμα κυκλοποίησης στους 60°C.

11. Ορίστε τα **Green** (Πράσινο) και **Yellow** (Κίτρινο) ως κανάλια λήψης, χρησιμοποιώντας το κουμπί «>» για να τα μεταφέρετε από τη λίστα «Available Channels» (Διαθέσιμα κανάλια). Κάντε κλικ στο «OK» (Εικόνα 8).



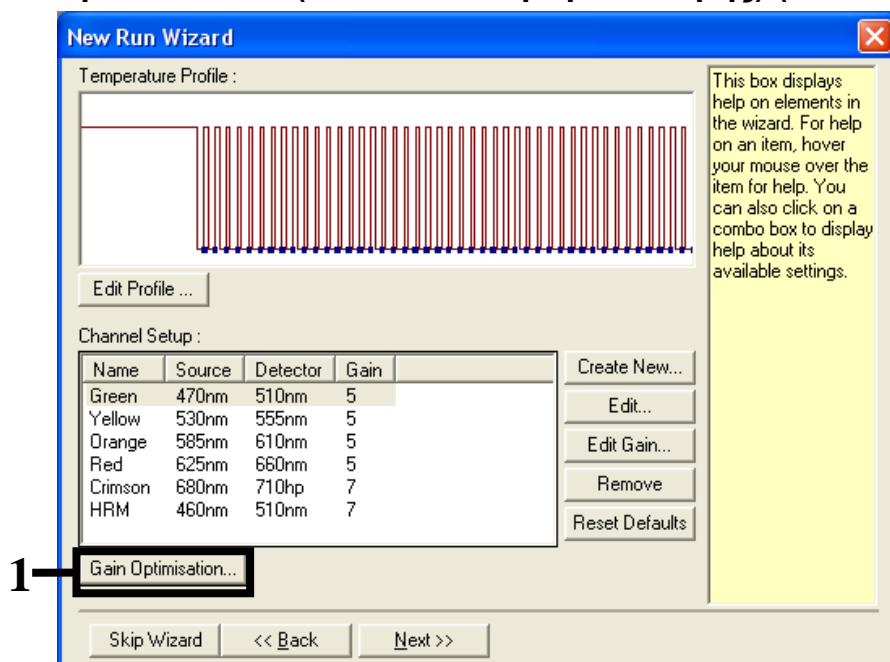
Εικόνα 8. Λήψη στο βήμα κυκλοποίησης των 60°C.

12. Επισημάνετε το τρίτο βήμα και εκτελέστε διαγραφή κάνοντας κλικ στο κουμπί «-». Κάντε κλικ στο «OK» (Εικόνα 9).



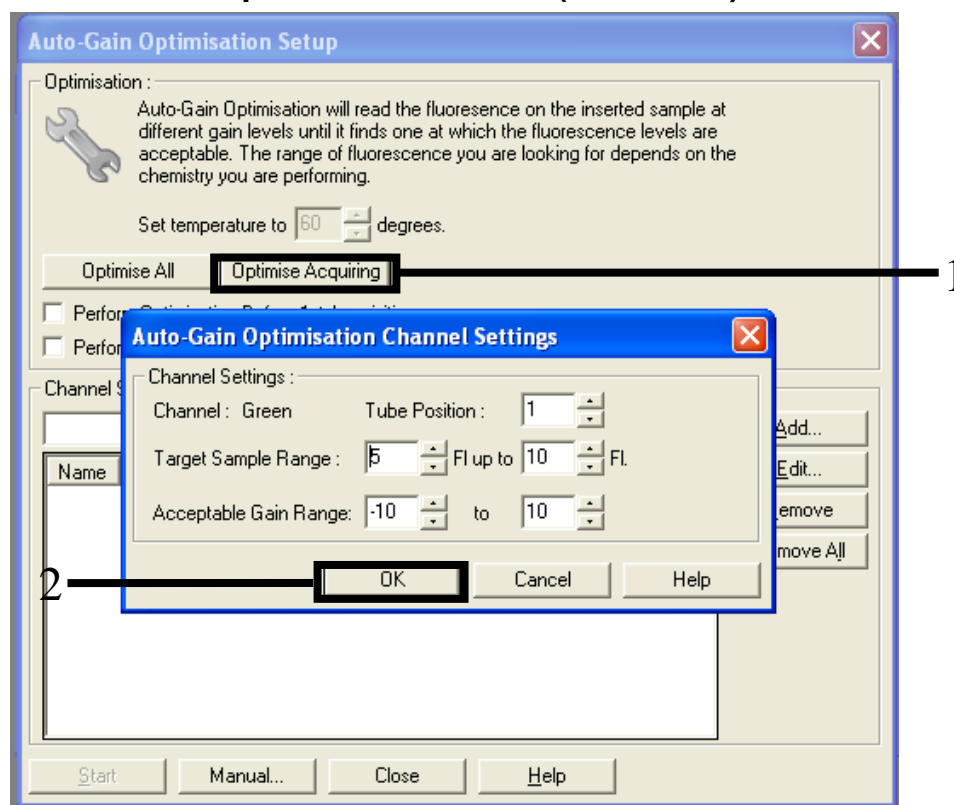
Εικόνα 9. Διαγραφή του βήματος επέκτασης.

13. Στο επόμενο πλαίσιο διαλόγου, κάντε κλικ στο κουμπί «Gain Optimisation» (Βελτιστοποίηση απολαβής) (Εικόνα 10).



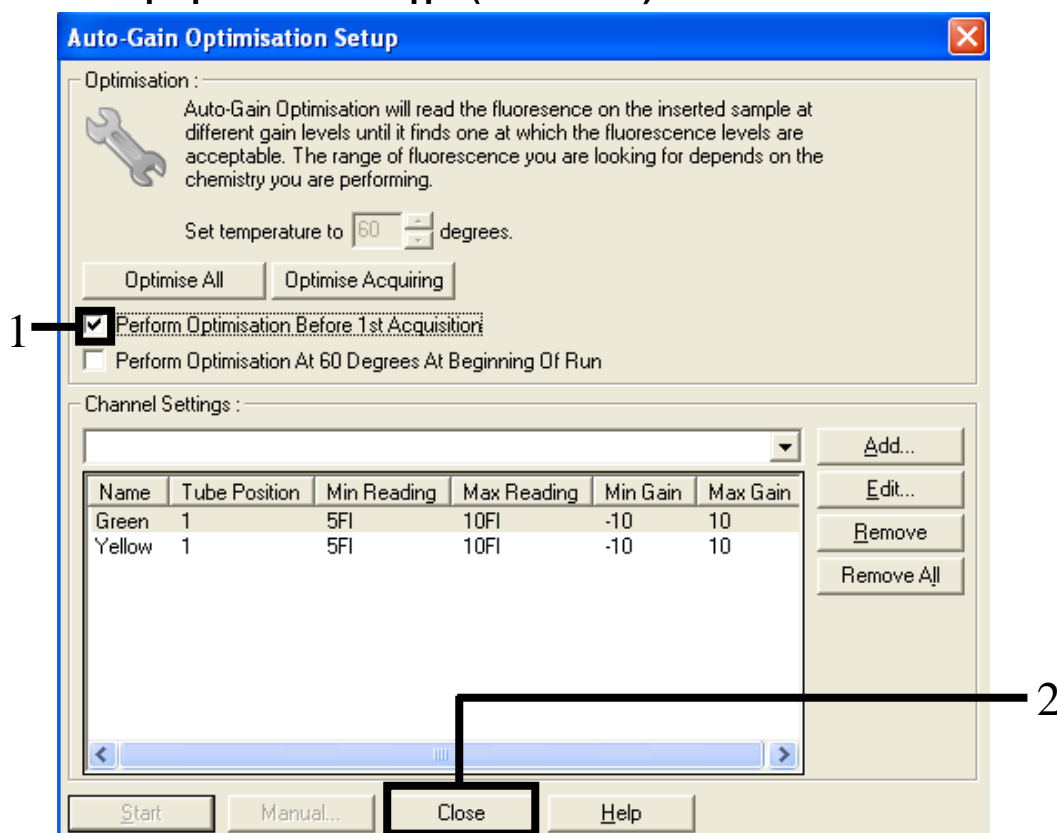
Εικόνα 10. Βελτιστοποίηση απολαβής.

14. Κάντε κλικ στο κουμπί «Optimise Acquiring» (Βελτιστοποίηση λήψης). Στη συνέχεια, εμφανίζονται οι ρυθμίσεις καναλιού για κάθε κανάλι. Αποδεχτείτε αυτές τις προεπιλεγμένες τιμές κάνοντας κλικ στο «OK» και για τα δύο κανάλια (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Αυτόματη βελτιστοποίηση απολαβής για το πράσινο κανάλι.

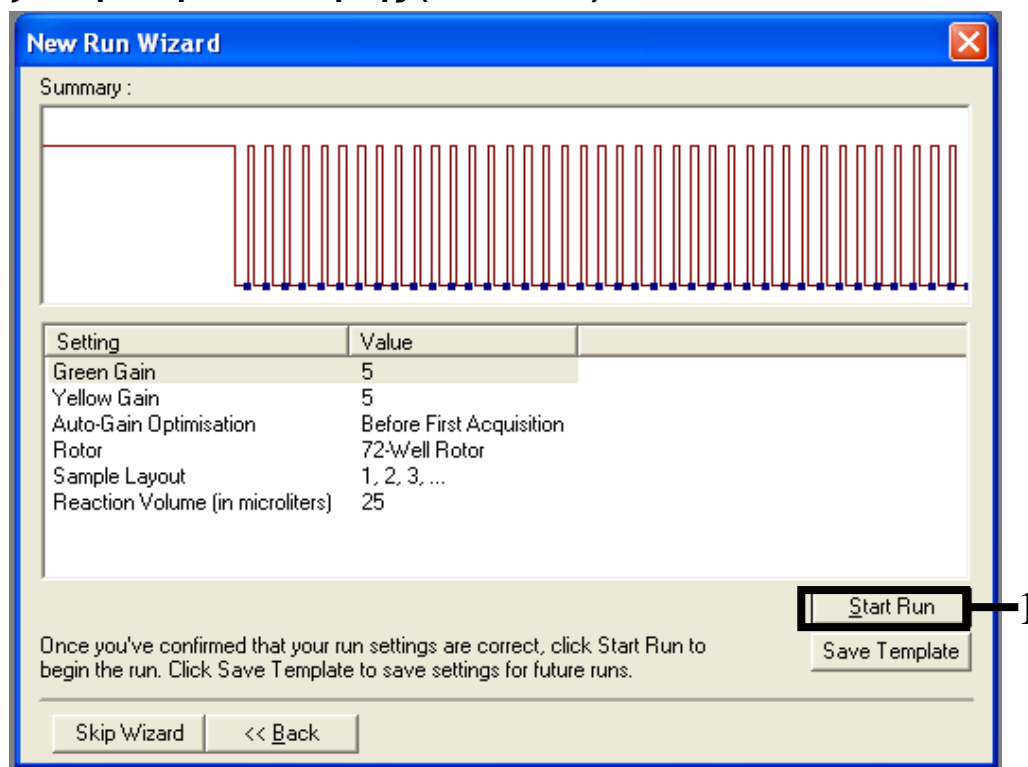
15. Επισηµάνετε το πλαίσιο «Perform Optimisation before 1st Acquisition» (Εκτέλεση βελτιστοποίησης πριν από την 1η λήψη) και, στη συνέχεια, κάντε κλικ στο κουµπί «Close» (Κλείσιµο), για να επιστρέψετε στον οδηγό (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Επιλογή πράσινου και κίτρινου καναλιού.

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

17. Ελέγξτε τη σύνοψη και κάντε κλικ στο «Start Run» (Εκκίνηση ανάλυσης) για να αποθηκεύσετε το αρχείο της ανάλυσης και να ξεκινήσει η εκτέλεσή της (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Εκκίνηση της ανάλυσης.

18. Αφού ξεκινήσει η ανάλυση, εμφανίζεται ένα νέο παράθυρο μέσα στο οποίο έχετε τη δυνατότητα είτε να εισαγάγετε τα ονόματα των δειγμάτων τη δεδομένη στιγμή είτε να κάνετε κλικ στο «Finish» (Τέλος) και να τα εισαγάγετε αργότερα, επιλέγοντας το κουμπί «Sample» (Δείγμα) κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ή μετά την ολοκλήρωσή της.
19. Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με το κατάλληλο πρωτόκολλο:
- Για την αξιολόγηση δειγμάτων, βλ. ενότητα «Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων», στη σελίδα 31.
 - Για την ανάλυση μετάλλαξης, βλ. ενότητα «Ανάλυση δεδομένων μετάλλαξης του EGFR», στη σελίδα 34.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Μέθοδος ανάλυσης ΔC_T

Οι αναλύσεις πραγματικού χρόνου Scorpions χρησιμοποιούν τον απαιτούμενο αριθμό κύκλων PCR για την ανίχνευση ενός σήματος φθορισμού άνω του σήματος υποβάθρου ως μέτρηση των μορίων-στόχων που υπάρχουν κατά την έναρξη της αντίδρασης. Το σημείο ανίχνευσης του σήματος άνω του φθορισμού υποβάθρου ονομάζεται τιμή κατωφλίου κύκλου (C_T).

Οι τιμές δείγματος ΔC_T υπολογίζονται ως η διαφορά μεταξύ της τιμής C_T της ανάλυσης μετάλλαξης και της τιμής C_T της ανάλυσης ορού ελέγχου από το ίδιο δείγμα:

$$\Delta C_T = C_T \text{ μετάλλαξ.} - C_T \text{ ορού ελέγχ.}$$

Σημείωση: Τα δείγματα ταξινομούνται ως θετικά για μετάλλαξη, εάν η τιμή ΔC_T που δίνουν είναι μικρότερη από την τιμή του ορίου ευαισθησίας ΔC_T για τη συγκεκριμένη ανάλυση. Πάνω από την τιμή αυτή, το δείγμα ενδέχεται να περιέχει μετάλλαξη σε ποσοστό μικρότερο από αυτό που μπορεί να ανιχνευθεί από το kit (εκτός των ορίων των αναλύσεων) ή να είναι αρνητικό για μετάλλαξη.

Σημείωση: Οι τιμές μετάλλαξης C_T 40 και άνω πρέπει να ταξινομούνται ως αρνητικές ή εκτός των ορίων του kit.

Όταν χρησιμοποιούνται εκκινητές ARMS, ενδέχεται να παρατηρηθεί ανεπαρκής εκκίνηση, με αποτέλεσμα να παρέχεται υπερβολικά όψιμη τιμή υποβάθρου C_T από DNA που δεν περιέχει μετάλλαξη. Όλες οι τιμές ΔC_T που υπολογίζονται από την ενίσχυση υποβάθρου θα είναι μεγαλύτερες από τις τιμές του ορίου ευαισθησίας ΔC_T και το δείγμα θα ταξινομηθεί ως αρνητικό για μετάλλαξη.

Ανάλυση δεδομένων αξιολόγησης δειγμάτων

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης

1. Ανοίξτε το κατάλληλο αρχείο με τη χρήση του λογισμικού Rotor-Gene Q series, έκδοση (2.0.2) ή νεότερη.
2. Βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα είναι επισημασμένα.
3. Όταν βρίσκεστε στη σελίδα δεδομένων πρωτογενούς φθορισμού καναλιού για κάθε ανιχνευτή/κανάλι, κάντε κλικ στο «Options» (Επιλογές) και μεταβείτε στο *Crop start cycles* (Διαγραφή κύκλων έναρξης). Στη σελίδα με την επιλογή «Remove data before cycle» (Διαγραφή δεδομένων πριν από την έναρξη του κύκλου), πληκτρολογήστε 15 και πατήστε «OK».

4. Κάντε κλικ στο «Analyse» (Ανάλυση). Στη σελίδα της ανάλυσης κάντε κλικ στο «Cycling A (from 15), Yellow» (Κυκλοποίηση A (από 15), Κίτρινο) για να ελέγξετε το κανάλι HEX.
5. Βεβαιωθείτε ότι είναι επισημασμένο το «dynamic tube» (δυναμικό σωληνάριο). Πατήστε «Slope correct» (Σωστή κλίση) και «Linear scale» (Γραμμική κλίμακα).
6. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο 0,02 και ελέγξτε τις τιμές HEX C_T.
7. Στη σελίδα της ανάλυσης πατήστε «Cycling A (from 15), Green» (Κυκλοποίηση A (από 15), Πράσινο) για να προβάλλετε το κανάλι FAM.
8. Το δυναμικό σωληνάριο θα πρέπει να είναι επισημασμένο. Πατήστε «Slope correct» (Σωστή κλίση) και «Linear scale» (Γραμμική κλίμακα).
9. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο 0,075 και ελέγξτε τις τιμές FAM C_T.

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων ως εξής:

- **Αρνητικός ορός ελέγχου:** Για να διασφαλίσετε ότι δεν υπάρχει μόλυνση του προτύπου, από τον ορό ελέγχου NTC δεν πρέπει να προκύπτει τιμή C_T στο πράσινο κανάλι (FAM) μικρότερη από 40. Για σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση διαγραμμάτων του ορού ελέγχου χωρίς πρότυπο (NTC), ανατρέξτε στην ενότητα «Σημειώσεις για την ερμηνεία δεδομένων», στη σελίδα 41. Για να διασφαλίσετε ότι η ανάλυση έχει ρυθμιστεί σωστά, ο ορός ελέγχου NTC πρέπει να εμφανίζει τιμή ενίσχυσης εντός του εύρους τιμών 31–37 στο κίτρινο κανάλι (HEX).

Αν υφίσταται θετική ενίσχυση στο πράσινο κανάλι και/ή ενίσχυση εκτός του εύρους τιμών 31–37 στο σήμα από το κίτρινο κανάλι, τα αποτελέσματα του δείγματος πρέπει να απορριφθούν.

- **Θετικός ορός ελέγχου:** Ο θετικός ορός ελέγχου (PC) EGFR πρέπει να δίνει τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου C_T (κανάλι FAM) μεταξύ 26,26–30,95. Μια ανάλυση με τιμή C_T εκτός αυτού του εύρους υποδεικνύει πρόβλημα ρύθμισης της ανάλυσης, η οποία θα πρέπει να ορίζεται ως μη επιτυχής. Εάν η τιμή της ανάλυσης θετικού ορού ελέγχου C_T κυμαίνεται εντός του εύρους τιμών 26,26–30,95 (εξώνιο 2, FAM) αλλά η τιμή εσωτερικού προτύπου ελέγχου C_T (HEX) βρίσκεται εκτός του εύρους τιμών 31–37, συνεχίστε την ανάλυση.

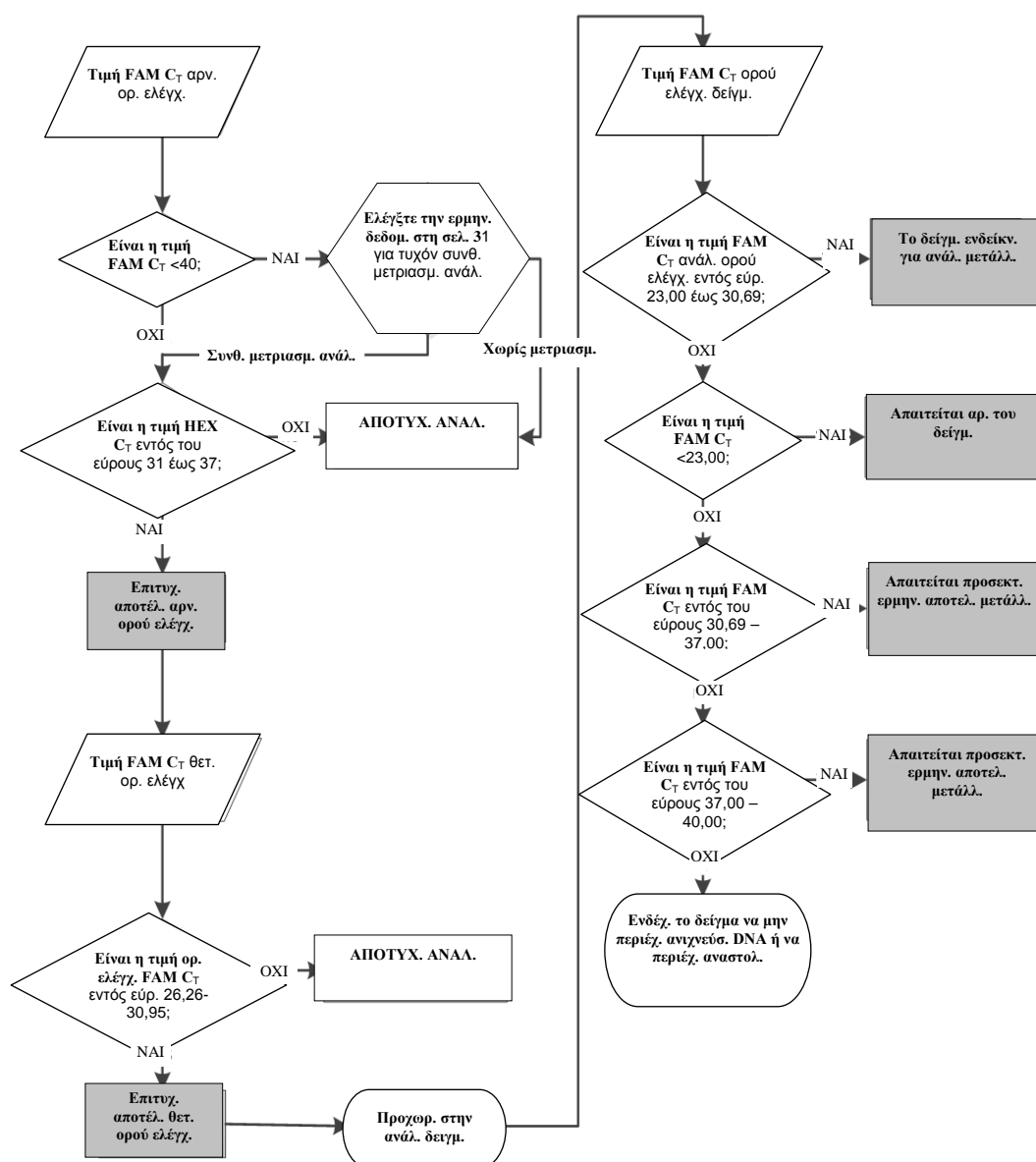
Σημείωση: Τα δεδομένα των δειγμάτων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν ένας από αυτούς τους δύο ορούς ελέγχου ανάλυσης δεν είναι επιτυχής.

Υπό την προϋπόθεση ότι και οι δύο οροί ελέγχου ανάλυσης είναι έγκυροι, κάθε τιμή δείγματος C_T πρέπει να κυμαίνεται εντός του εύρους τιμών 23–30,69 στο πράσινο κανάλι (FAM). Σε περίπτωση που η τιμή του δείγματος βρίσκεται εκτός αυτού του εύρους τιμών, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες.

- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος $C_T < 23$:** Τα δείγματα με τιμή ορού ελέγχου $C_T < 23$ θα προκαλέσουν υπερκορεσμό των αναλύσεων μετάλλαξης και πρέπει να αραιωθούν. Για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων σε χαμηλό επίπεδο, είναι απαραίτητη η αραιώση των υπερβολικά συμπυκνωμένων δειγμάτων, ώστε οι τιμές τους να κυμαίνονται εντός του παραπάνω εύρους τιμών, λαμβάνοντας υπόψη ότι αραιώνοντας κατά το ήμισυ, η τιμή C_T αυξάνεται κατά 1 μονάδα.
- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος $C_T 30.69–37$:** Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς ενδέχεται να μην ανιχνευτούν μεταλλάξεις εξαιρετικά χαμηλού επιπέδου.
- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος $C_T 37–40$:** Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς θα ανιχνευτούν μόνο μεταλλάξεις εξαιρετικά υψηλού επιπέδου.
- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος $C_T > 40$:** Το δείγμα δεν περιέχει επαρκή ποσότητα DNA, ώστε να είναι δυνατή η εκτέλεση της ανάλυσης.

Σημείωση: Εάν δεν προκύψει τιμή C_T (δηλ., $C_T > 40$) από ένα δείγμα, ενδέχεται να οφείλεται στην παρουσία αναστολέα, σε σφάλμα στη ρύθμιση της ανάλυσης ή στην απουσία ενισχύσιμου EGFR DNA.

- **Τιμή C_T εσωτερικού προτύπου ελέγχου 31–37:** Δεν υπάρχει ενισχύσιμο EGFR DNA.
- **Τιμή C_T εσωτερικού προτύπου ελέγχου εκτός του εύρους τιμών 31–37:** Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη σφάλματος ρύθμισης ανάλυσης ή αναστολέα. Μπορείτε να μειώσετε τη δράση του αναστολέα αραιώνοντας το δείγμα, ωστόσο στην περίπτωση αυτή θα αραιωθεί και το DNA.



Εικόνα 14. Ροή εργασιών ανάλυσης αξιολόγησης δειγμάτων.

Ανάλυση δεδομένων μετάλλαξης του EGFR

Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης, προχωρήστε σε ανάλυση των δεδομένων σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία.

Ρυθμίσεις λογισμικού ανάλυσης

1. Ανοίξτε το κατάλληλο αρχείο με τη χρήση του λογισμικού Rotor-Gene Q series, έκδοση (2.0.2) ή νεότερη.
2. Βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα είναι επισημασμένα.
3. Όταν βρίσκεστε στη σελίδα δεδομένων πρωτογενούς φθορισμού καναλιού για κάθε ανιχνευτή/κανάλι, κάντε κλικ στο «Options» (Επιλογές) και μεταβείτε στο *Crop start cycles* (Διαγραφή κύκλων

έναρξης). Στη σελίδα με την επιλογή «Remove data before cycle» (Διαγραφή δεδομένων πριν από την έναρξη του κύκλου), πληκτρολογήστε 15 και πατήστε «OK».

4. Κάντε κλικ στο «Analyse» (Ανάλυση). Στη σελίδα της ανάλυσης κάντε κλικ στο «Cycling A (from 15), Yellow» (Κυκλοποίηση A (από 15), Κίτρινο) για να ελέγξετε το κανάλι HEX.
5. Βεβαιωθείτε ότι είναι επισημασμένο το «dynamic tube» (δυναμικό σωληνάριο). Πατήστε «Slope correct» (Σωστή κλίση) και «Linear scale» (Γραμμική κλίμακα).
6. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο 0,02 και ελέγξτε τις τιμές HEX C_T.
7. Στη σελίδα της ανάλυσης πατήστε «Cycling A (from 15), Green» (Κυκλοποίηση A (από 15), Πράσινο) για να προβάλλετε το κανάλι FAM.
8. Βεβαιωθείτε ότι είναι επισημασμένο το «dynamic tube» (δυναμικό σωληνάριο). Πατήστε «Slope correct» (Σωστή κλίση) και «Linear scale» (Γραμμική κλίμακα).
9. Ρυθμίστε την τιμή κατωφλίου στο 0,075 και ελέγξτε τις τιμές FAM C_T.

Ανάλυση ορών ελέγχου ανάλυσης:

Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής εργασιών «Ανάλυση ορών ελέγχου ανάλυσης», στην Εικόνα 15.

- **Αρνητικός ορός ελέγχου:** Για να διασφαλίσετε ότι δεν υπάρχει μόλυνση του προτύπου, από τον ορό ελέγχου NTC δεν πρέπει να προκύπτει τιμή C_T στο πράσινο κανάλι (FAM) μικρότερη από 40. Για σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση διαγραμμάτων του ορού ελέγχου χωρίς πρότυπο (NTC), ανατρέξτε στην ενότητα «Σημειώσεις για την ερμηνεία δεδομένων», στη σελίδα 41. Για να διασφαλίσετε ότι η ανάλυση έχει ρυθμιστεί σωστά, ο ορός ελέγχου NTC πρέπει να εμφανίζει τιμή ενίσχυσης C_T εντός του εύρους τιμών 31–37 στο κίτρινο κανάλι (HEX).

Αν υφίσταται θετική ενίσχυση στο πράσινο κανάλι και/ή ενίσχυση εκτός του εύρους τιμών 31–37 στο σήμα από το κίτρινο κανάλι, τα αποτελέσματα του δείγματος πρέπει να απορριφθούν.

- **Θετικός ορός ελέγχου:** Ο θετικός ορός ελέγχου (PC) EGFR πρέπει να δίνει τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου C_T 26,26–30,95 στο πράσινο κανάλι. Μια ανάλυση με τιμή C_T εκτός αυτού του εύρους τιμών υποδεικνύει πρόβλημα ρύθμισης της ανάλυσης, η οποία θα πρέπει να ορίζεται ως μη επιτυχής. Εάν η τιμή της ανάλυσης θετικού ορού ελέγχου C_T κυμαίνεται εντός του εύρους τιμών 26,26–30,95 (εξώνιο 2, FAM) αλλά η τιμή εσωτερικού προτύπου ελέγχου C_T (HEX) βρίσκεται εκτός του εύρους τιμών 31–37, συνεχίστε την ανάλυση.

Υπολογίστε την τιμή ΔC_T για κάθε ανάλυση μετάλλαξης, όπως υποδεικνύεται παρακάτω, διασφαλίζοντας ότι οι τιμές μετάλλαξης και ορού ελέγχου C_T προέρχονται από το θετικό ορό ελέγχου.

$$\Delta C_T = C_T \text{ μετάλλαξ.} - C_T \text{ ορού ελέγχ.}$$

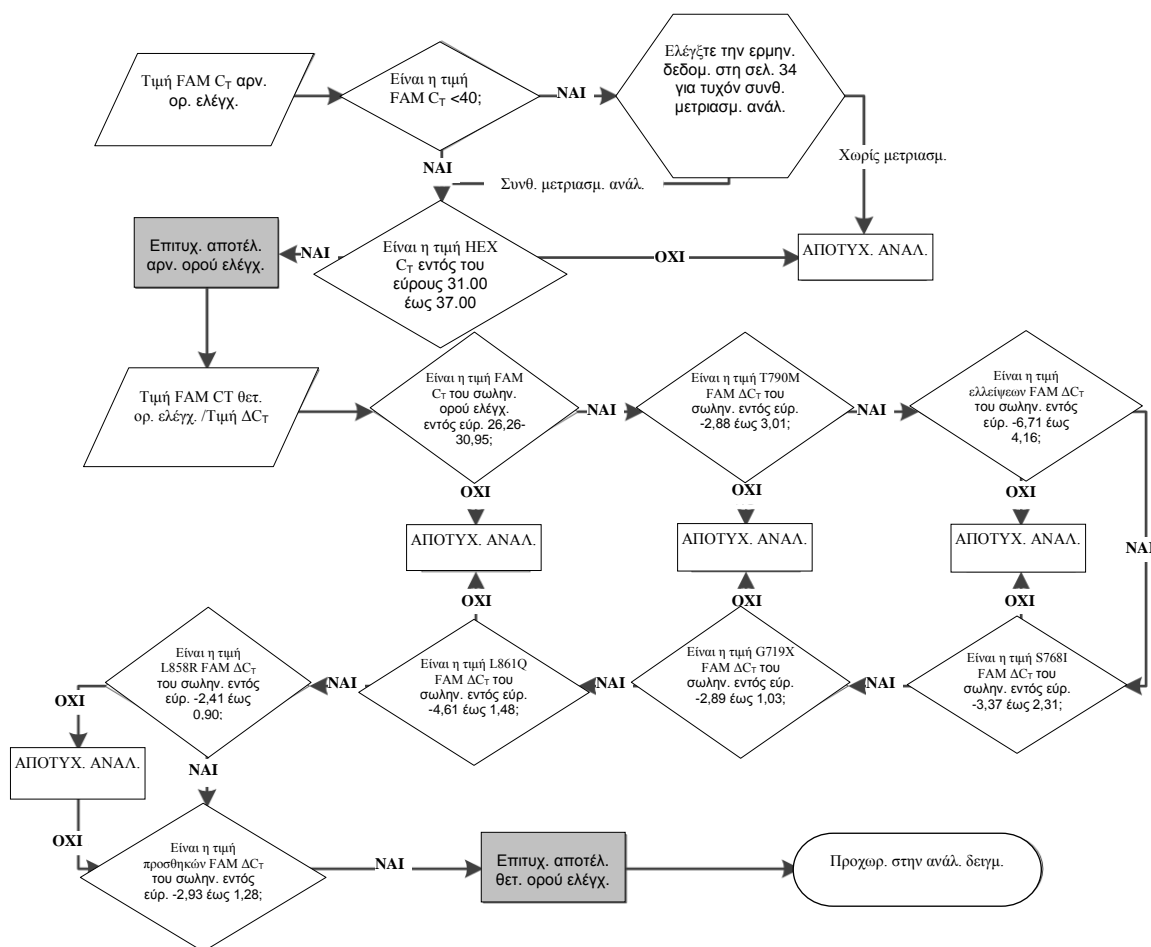
Οι τιμές του θετικού ορού ελέγχου (PC) EGFR ΔC_T θα πρέπει να κυμαίνονται εντός των ορίων που παρατίθενται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Αναμενόμενες τιμές ΔC_T θετικού ορού ελέγχου*

Ανάλυση	Τιμή ΔC_T θετικού ορού ελέγχου
T790M	-2,88 έως 3,01
Ελλείψεις	-6,71 έως 4,16
L858R	-2,41 έως 0,90
L861Q	-4,61 έως 1,48
G719X	-2,89 έως 1,03
S768I	-3,37 έως 2,31
Προσθήκες	-2,93 έως 1,28

* Λογισμικό Rotor-Gene Q (2.0.2)

Σημείωση: Τα δεδομένα των δειγμάτων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εάν ο αρνητικός ή ο θετικός ορός ελέγχου ανάλυσης δεν είναι επιτυχής.



Εικόνα 15. Ροή εργασιών ανάλυσης ορών ελέγχου ανάλυσης.

Ανάλυση δειγμάτων:

Τιμή FAM C_T ορού ελέγχου δείγματος

Υπό την προϋπόθεση ότι και οι δύο οροί ελέγχου ανάλυσης είναι έγκυροι, κάθε τιμή δείγματος C_T πρέπει να κυμαίνεται εντός του εύρους τιμών 23–30,69 στο πράσινο κανάλι. Ανατρέξτε στο διάγραμμα ροής εργασιών «Ανάλυση δειγμάτων», στην Εικόνα 16.

- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος C_T <23:** Τα δείγματα με τιμή ορού ελέγχου C_T <23 θα προκαλέσουν υπερκορεσμό των αναλύσεων μεταλλάξης και πρέπει να αραιωθούν. Για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων σε χαμηλό επίπεδο, είναι απαραίτητη η αραιώση των υπερβολικά συμπυκνωμένων δειγμάτων, ώστε οι τιμές τους να κυμαίνονται εντός του παραπάνω εύρους τιμών, λαμβάνοντας υπόψη ότι αραιώνοντας κατά το ήμισυ, η τιμή C_T αυξάνεται κατά 1 μονάδα.
- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος C_T εντός του εύρους 30,69–37:** Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς ενδέχεται να μην ανιχνευτούν μεταλλάξεις εξαιρετικά χαμηλού επιπέδου.

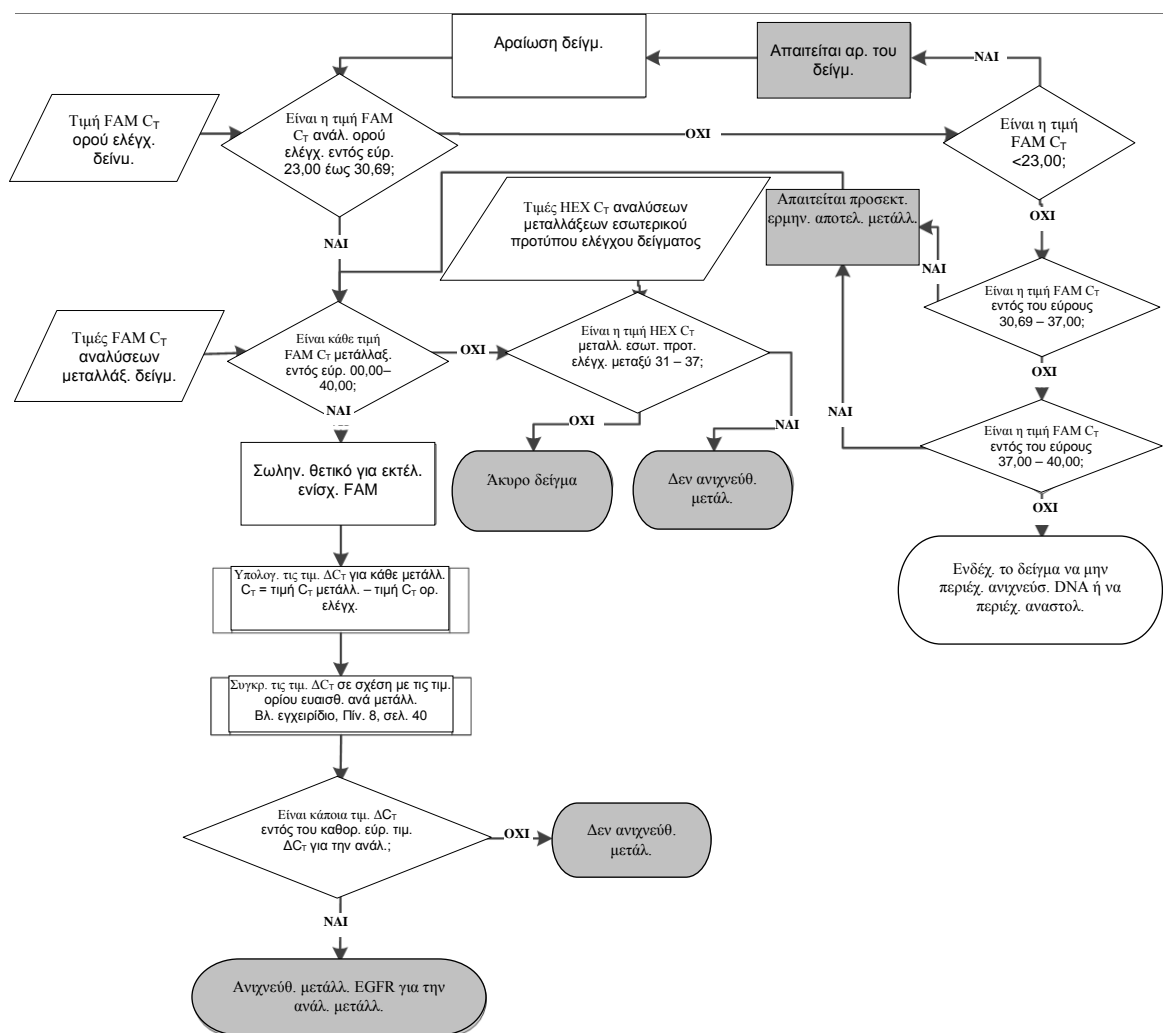
- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος C_T εντός του εύρους 37–40:** Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς θα ανιχνευτούν μόνο μεταλλάξεις εξαιρετικά υψηλού επιπέδου.
- **Τιμή ανάλυσης ορού ελέγχου δείγματος $C_T >40$:** Το δείγμα δεν περιέχει επαρκή ποσότητα DNA, ώστε να είναι δυνατή η εκτέλεση της ανάλυσης.

Σημείωση: Εάν η τιμή δείγματος FAM C_T κυμαίνεται μεταξύ 23 και <37, δεν είναι απαραίτητη η αξιολόγηση του εσωτερικού προτύπου ελέγχου.

Σημείωση: Εάν δεν προκύψει τιμή C_T (δηλ., $C_T >40$) από ένα δείγμα, ενδέχεται να οφείλεται στην παρουσία αναστολέα, σε σφάλμα στη ρύθμιση της ανάλυσης ή στην απουσία ενισχύσιμου EGFR DNA.

- **Τιμή C_T εσωτερικού προτύπου ελέγχου 31–37:** Η ανάλυση εκτελείται σωστά, αλλά δεν υπάρχει ενισχύσιμο EGFR DNA.
- **Τιμή C_T εσωτερικού προτύπου ελέγχου εκτός του εύρους τιμών 31–37:** Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη σφάλματος ρύθμισης ανάλυσης ή αναστολέα. Μπορείτε να μειώσετε τη δράση του αναστολέα αραιώνοντας το δείγμα, ωστόσο στην περίπτωση αυτή θα αραιωθεί και το DNA.

Σημείωση: Εάν από την αντίδραση FAM της ανάλυσης μετάλλαξης δεν προκύπτει τιμή C_T ενώ από τις αντιδράσεις εσωτερικού προτύπου ελέγχου προκύπτει τιμή C_T εκτός του εύρους τιμών 31–37, τα δεδομένα πρέπει να απορρίπτονται, καθώς είναι πιθανή η ύπαρξη αναστολέων που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Η αραιώση του δείγματος μπορεί να μειώσει τη δράση των αναστολέων, ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση αυτή αραιώνεται και το DNA.



Εικόνα 16. Διάγραμμα ροής εργασιών ανάλυσης μετάλλαξης.

Τιμή FAM C_T αναλύσεων μεταλλάξ. δείγμ.

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

Πίνακας 8. Αποδεκτές τιμές δειγμάτων αντίδρασης μετάλλαξης (FAM)*

Ανάλυση	Εύρος αποδεκτών τιμών C _T	Τιμή ορίου ευαισθησίας ΔC _T
T790M	15,00–40,00	6,38
Ελλείψεις	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
Προσθήκες	15,00–40,00	7,91

*Οι αποδεκτές τιμές κυμαίνονται μεταξύ των τιμών που παρατίθενται και τις περιλαμβάνουν.

- Αν η τιμή FAM C_T βρίσκεται εντός του καθορισμένου εύρους τιμών 15,00–40,00, είναι θετική για την εκτέλεση ενίσχυσης FAM.
- Αν η τιμή FAM C_T υπερβαίνει το καθορισμένο εύρος τιμών ή δεν παρατηρείται ενίσχυση, είναι αρνητική για την ενίσχυση FAM.

Υπολογίστε την τιμή ΔC_T για κάθε ανάλυση μετάλλαξης, όπως υποδεικνύεται παρακάτω, διασφαλίζοντας ότι οι τιμές μετάλλαξης και ορού ελέγχου C_T προέρχονται από το ίδιο δείγμα.

$$\Delta C_T = C_T \text{ μετάλλαξ.} - C_T \text{ ορού ελέγχ.}$$

Συγκρίνετε την τιμή ΔC_T για το δείγμα με το όριο ευαισθησίας για τη συγκεκριμένη ανάλυση (Πίνακας 8), διασφαλίζοντας ότι χρησιμοποιείται το σωστό όριο ευαισθησίας σε κάθε ανάλυση.

Το όριο ευαισθησίας είναι το σημείο πάνω από το οποίο ένα θετικό σήμα θα μπορούσε δυνητικά να οφείλεται στο σήμα υποβάθρου από έναν εκκινητή ARMS στο DNA άγριου τύπου (wild-type). Αν η τιμή ΔC_T του δείγματος είναι υψηλότερη από εκείνη του ορίου ευαισθησίας, ταξινομείται ως δείγμα στο οποίο δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη ή ως δείγμα με τιμές εκτός των ορίων ανίχνευσης του kit. Αν η τιμή του δείγματος είναι μικρότερη από εκείνη του ορίου ευαισθησίας, το δείγμα θεωρείται θετικό για μετάλλαξη που έχει ανιχνευτεί από τη συγκεκριμένη ανάλυση.

Σημείωση: Για δείγματα που δεν εμφανίζουν τιμή μετάλλαξης FAM C_T, απαιτείται αξιολόγηση της τιμής εσωτερικού προτύπου ελέγχου (HEX) C_T, για να προσδιοριστεί εάν δεν ανιχνεύεται μετάλλαξη ή αν η ανάλυση δεν είναι έγκυρη. Εάν η τιμή HEX C_T κυμαίνεται μεταξύ 31 και 37, τότε δεν ανιχνεύεται μετάλλαξη. Εάν η τιμή HEX C_T είναι εκτός του εύρους τιμών 31–37, το δείγμα είναι άκυρο.

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

- **Ανιχνεύθηκε μετάλλαξη:** Η θετική τιμή για την εκτέλεση ενίσχυσης FAM και η τιμή ΔC_T είναι ίσες ή μικρότερες από την τιμή του ορίου ευαισθησίας. Εάν ανιχνευθούν περισσότερες μεταλλάξεις, μπορούν να αναφερθούν όλες.
- **Δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη:**
Η θετική τιμή FAM για την εκτέλεση ενίσχυσης και η τιμή ΔC_T είναι μεγαλύτερες από την τιμή του ορίου ευαισθησίας.
Η τιμή FAM είναι αρνητική για την εκτέλεση ενίσχυσης και η τιμή HEX (εσωτερικό πρότυπο ελέγχου) είναι θετική για την εκτέλεση ενίσχυσης.
- **Μη έγκυρη:**
Η τιμή FAM είναι αρνητική για την εκτέλεση ενίσχυσης και η τιμή HEX είναι εκτός εύρους για την εκτέλεση ενίσχυσης.

Σημειώσεις για την ερμηνεία δεδομένων

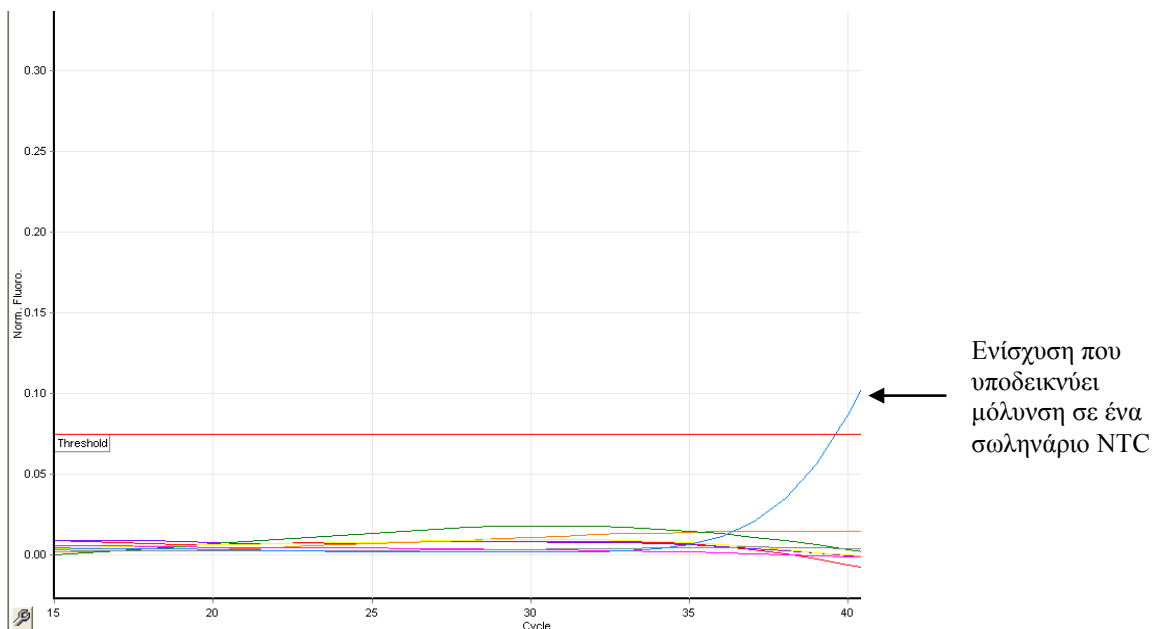
Γραμμική ενίσχυση

Θα πρέπει να ελέγχονται τα διαγράμματα του Rotor-Gene Q για όλες τις αντιδράσεις. Ενίοτε, παρατηρείται αύξηση στο σήμα φθορισμού στον ορό ελέγχου NTC και τα αρνητικά δείγματα. Εάν ισχύει κάτι τέτοιο και λαμβάνεται τιμή C_T, ο χρήστης πρέπει να διακρίνει ένα πραγματικό συμβάν ενίσχυσης, το οποίο θα υποδεικνύει μόλυνση στον ορό ελέγχου NTC, από μία γραμμική αύξηση στο φθορισμό, η οποία είναι πιθανό να προκλήθηκε από κάποιο τεχνικό σφάλμα φθορισμού.

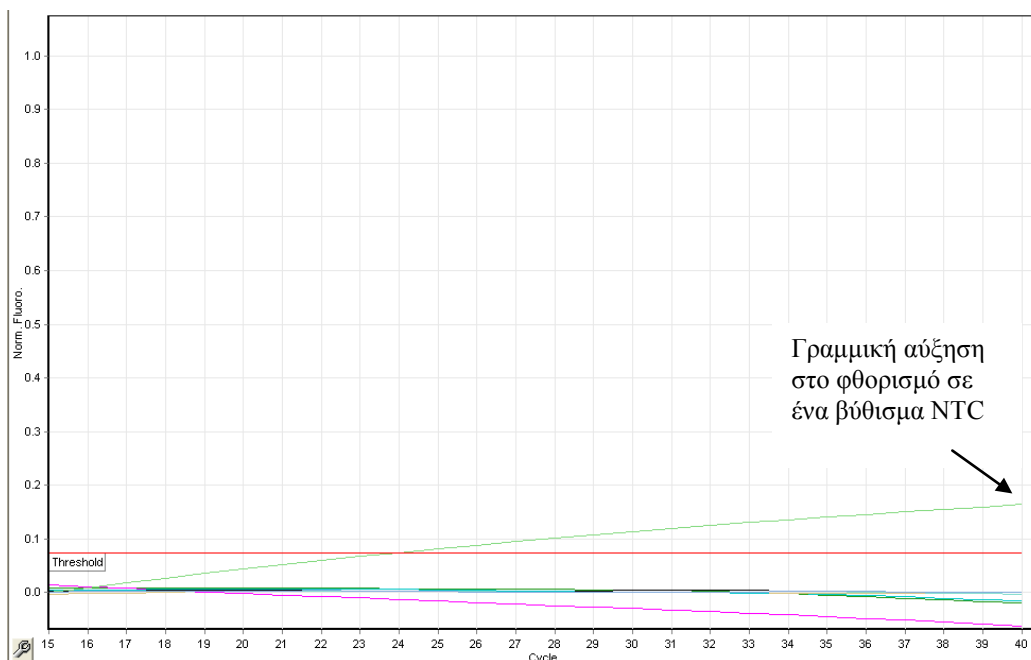
Ανάλυση του NTC

Στις εικόνες 17–18 παρατίθενται δύο παραδείγματα συμπεριφοράς δειγμάτων ορού ελέγχου NTC. Στην Εικόνα 17, παρατηρείται μη γραμμική (πραγματική ενίσχυση) λόγω μόλυνσης του δείγματος. Η ανάλυση αυτή πρέπει να απορριφθεί και τα δείγματα να εξεταστούν εκ νέου. Στην Εικόνα 18, παρατηρείται γραμμική ενίσχυση σε NTC. Υπό αυτές τις περιστάσεις θα πρέπει να εξεταστεί ο πρωτογενής φθορισμός. Το αντίστοιχο διάγραμμα του πρωτογενούς φθορισμού εμφανίζεται στην Εικόνα 19, υποδεικνύοντας μάλλον μία γραμμική αύξηση στο φθορισμό, αντί ενός πραγματικού συμβάντος ενίσχυσης. Τα δεδομένα αυτής της ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν,

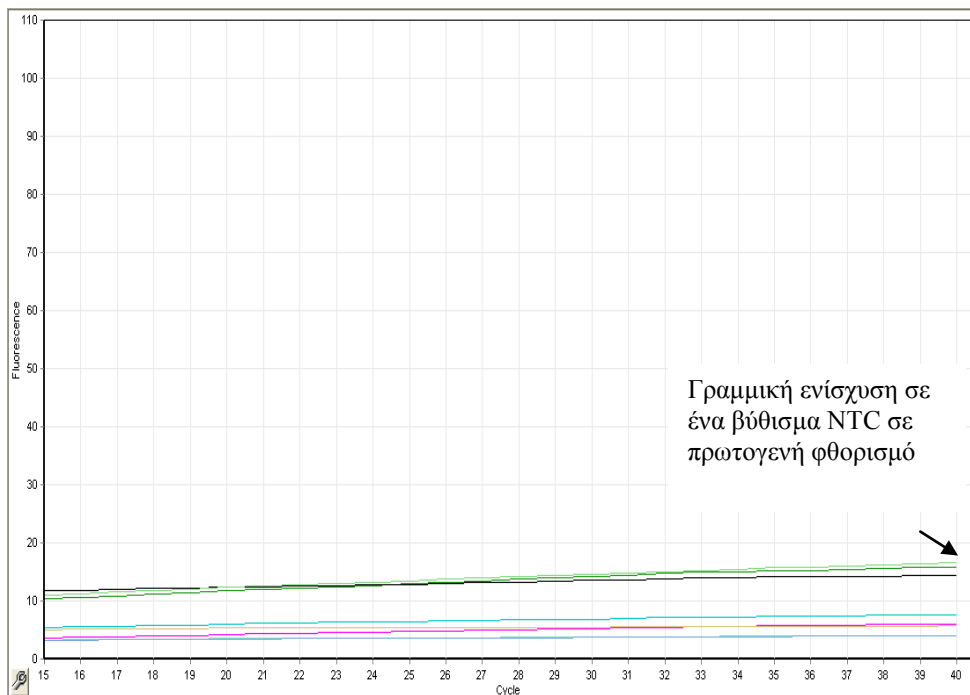
υπό την προϋπόθεση ότι έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχώς οι αντιδράσεις θετικού ορού ελέγχου και εσωτερικού προτύπου ελέγχου. Συγκριτικά με την Εικόνα 19, στην Εικόνα 20 παρουσιάζονται δεδομένα πρωτογενούς φθορισμού όπου έχει πραγματοποιηθεί πραγματική ενίσχυση. Υπό αυτές τις περιστάσεις, τα δεδομένα θα πρέπει να απορριφθούν και τα δείγματα να εξεταστούν εκ νέου, καθώς το γεγονός αυτό υποδεικνύει την παρουσία μόλυνσης.



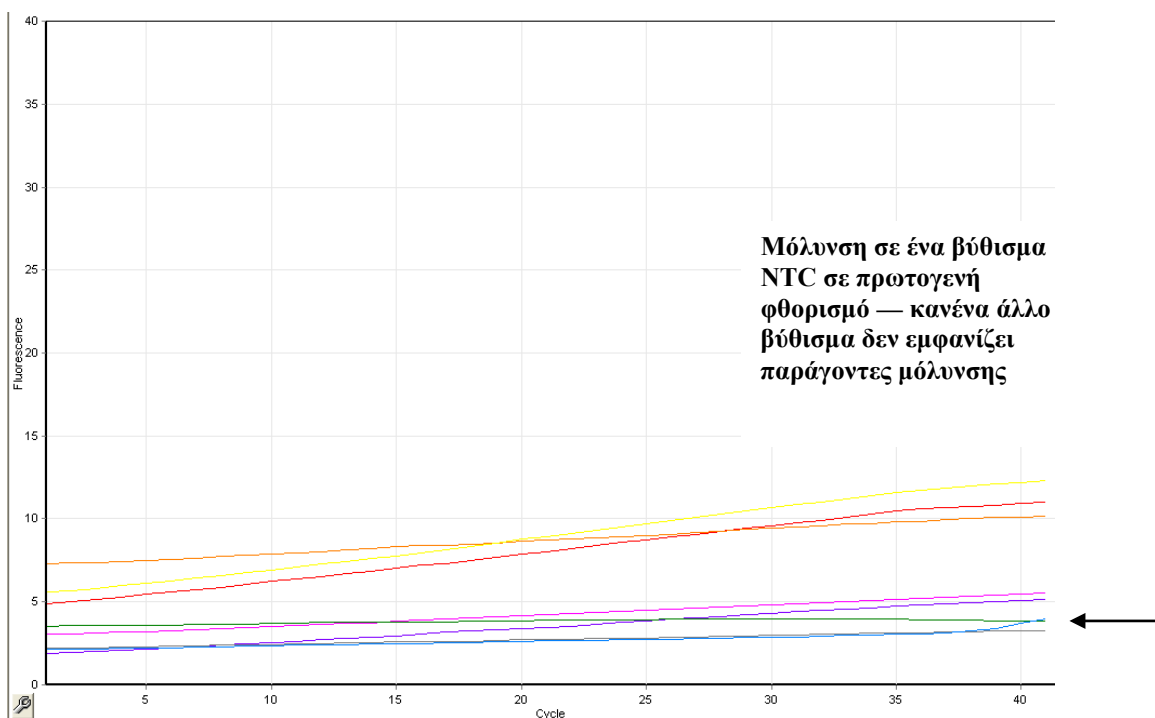
Εικόνα 17. Μόλυνση σε ένα NTC ανάλυσης στο πλαίσιο μιας ανάλυσης που εκτελείται.



Εικόνα 18. Παράδειγμα γραμμικής αύξησης στο φθορισμό σε ένα βύθισμα NTC.



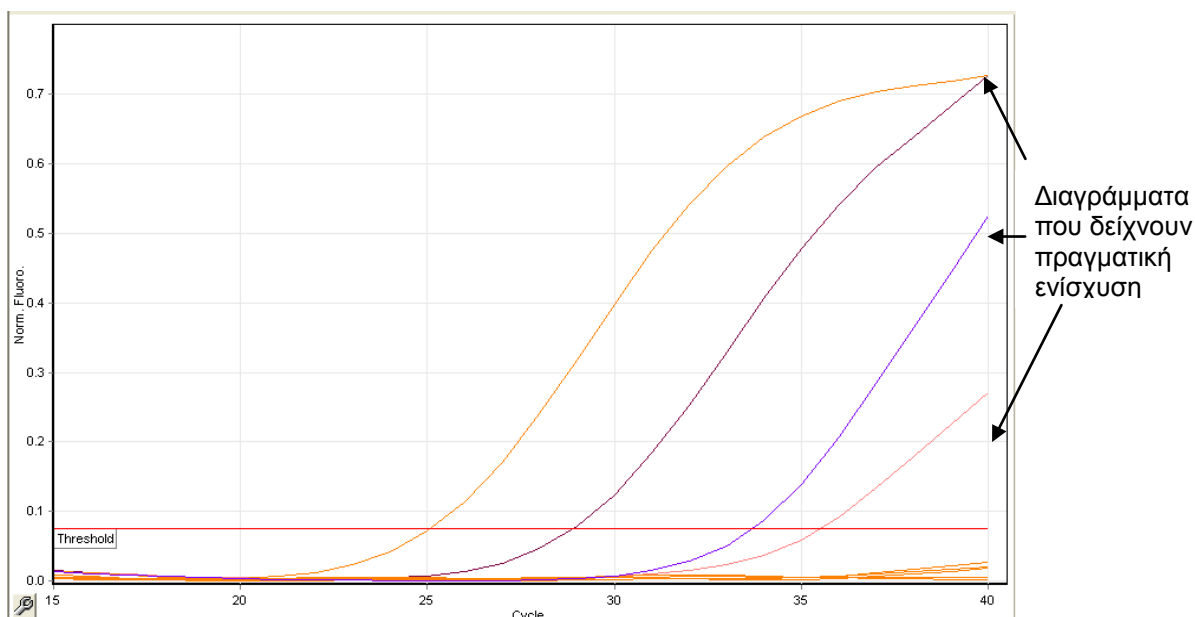
Εικόνα 19. Πρωτογενής φθορισμός για την Εικόνα 18.



Εικόνα 20. Δεδομένα πρωτογενούς φθορισμού που υποδεικνύουν ένα βύθισμα NTC, στο οποίο παρουσιάστηκε ένα πραγματικό συμβάν ενίσχυσης.

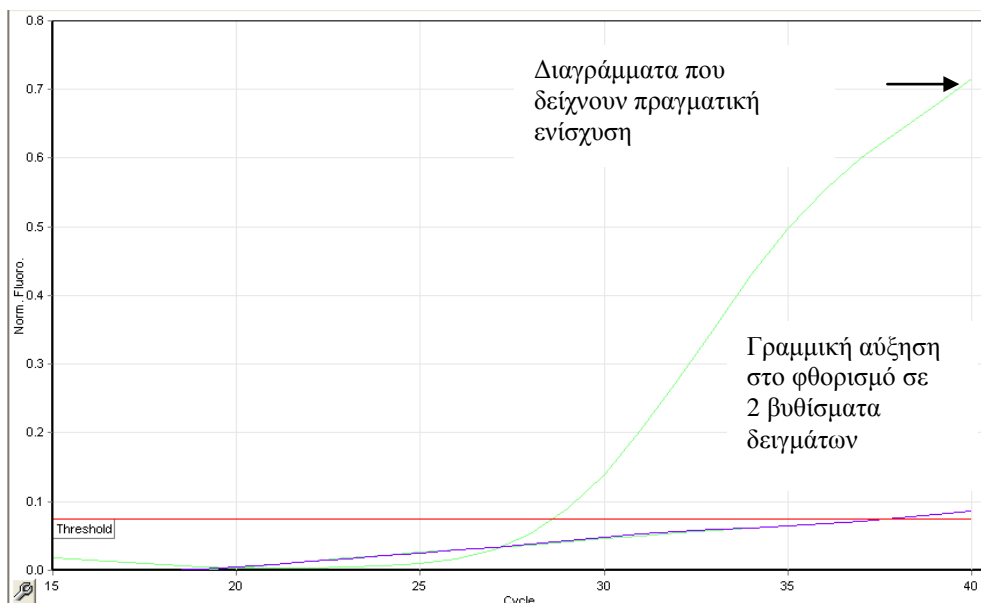
Ανάλυση δειγμάτων

Στις εικόνες 21–22 παρατίθενται δύο παραδείγματα ενίσχυσης σε αντιδράσεις δειγμάτων. Στην Εικόνα 21 παρατίθεται ένα παράδειγμα πραγματικής ενίσχυσης σε ένα βύθισμα δείγματος σε μία ανάλυση που εκτελείται. Εάν σε μία ανάλυση εμφανίζεται η σιγμοειδής καμπύλη ενίσχυσης αυτού του τύπου, πρόκειται για πραγματική ενίσχυση και τα δεδομένα της ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν, υπό την προϋπόθεση ότι έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχώς οι αντιδράσεις θετικού ορού ελέγχου και εσωτερικού προτύπου ελέγχου.

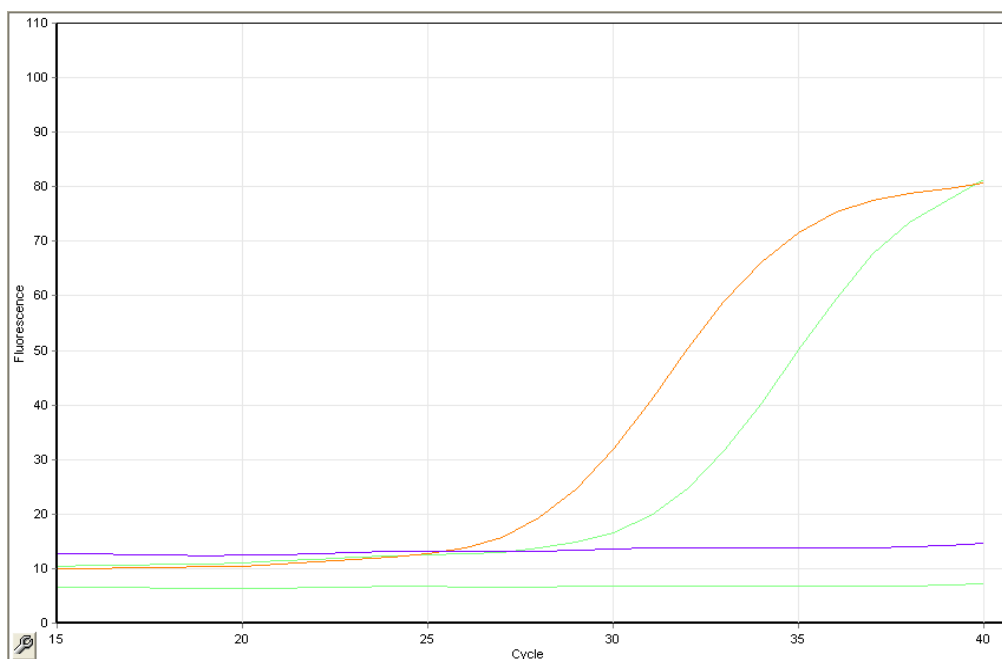


Εικόνα 21. Πραγματική ενίσχυση σε ένα βύθισμα δείγματος σε μια ανάλυση που εκτελείται.

Στην Εικόνα 22 παρατίθεται ένα παράδειγμα γραμμικής ενίσχυσης σε μια αντίδραση δείγματος. Υπό αυτές τις περιστάσεις, θα πρέπει να εξεταστούν τα δεδομένα πρωτογενούς φθορισμού. Το αντίστοιχο διάγραμμα πρωτογενούς φθορισμού (Εικόνα 23) υποδεικνύει ότι η γραμμική ενίσχυση που παρατηρείται στην Εικόνα 22 αντιστοιχεί σε γραμμική ενίσχυση σε πρωτογενή φθορισμό και δεν πρόκειται για αληθή ενίσχυση. Υπό την προϋπόθεση ότι έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχώς οι αντιδράσεις θετικού ορού ελέγχου και εσωτερικού προτύπου ελέγχου, είναι δυνατή η χρήση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων για τις συγκεκριμένες αναλύσεις φροντίζοντας ο χαρακτηρισμός της γραμμικής ενίσχυσης να είναι «απουσία τιμής C_T ».



Εικόνα 22. Παράδειγμα γραμμικής αύξησης στο φθορισμό σε δύο βυθίσματα δείγματος.



Εικόνα 23. Πρωτογενής φθορισμός για την Εικόνα 22.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου τεχνικής υποστήριξης της εταιρείας μας:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε ερωτήσεις σχετικά με τα πρωτόκολλα αυτού του εγχειριδίου ή

τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Σχόλια και συστάσεις

Δεν ανιχνεύεται σήμα με το θετικό ορό (PC) EGFR στο κανάλι φθορισμού Cycling Green

- | | |
|--|---|
| α) Το επιλεγμένο κανάλι φθορισμού για την ανάλυση δεδομένων της αντίδρασης PCR δεν είναι συμβατό με το πρωτόκολλο | Για την ανάλυση δεδομένων επιλέξτε το κανάλι φθορισμού Cycling Green για την ανάλυση αντίδρασης PCR του EGFR και το κανάλι φθορισμού Cycling Yellow για την ανάλυση αντίδρασης PCR εσωτερικού προτύπου ελέγχου. |
| β) Εσφαλμένος προγραμματισμός του προφίλ θερμοκρασίας στο όργανο Rotor-Gene | Συγκρίνετε το προφίλ θερμοκρασίας με το πρωτόκολλο και αν είναι εσφαλμένο επαναλάβετε την ανάλυση. |
| γ) Εσφαλμένη διευθέτηση της PCR | Ελέγξτε τα βήματά της ροής εργασιών σας μέσα από το σχεδιάγραμμα διοχέτευσης με πιπέτα και, αν χρειάζεται, επαναλάβετε την PCR. |
| δ) Οι συνθήκες αποθήκευσης για ένα ή περισσότερα από τα περιεχόμενα του κιτ δεν συμμορφώνονται με τις οδηγίες που περιλαμβάνονται στην ενότητα «Αποθήκευση και χειρισμός αντιδραστηρίων» (σελίδα 12) | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούριο κιτ, αν χρειαστεί. |
| ε) Η ημερομηνία λήξης του κιτ <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR έχει παρέλθει | Ελέγξτε τις συνθήκες αποθήκευσης και την ημερομηνία λήξης (ανατρέξτε στην ετικέτα του κιτ) των αντιδραστηρίων και χρησιμοποιήστε ένα καινούριο κιτ, αν χρειαστεί. |

Σήματα των αρνητικών ορών ελέγχου στο κανάλι φθορισμού **Cycling Green** της ανάλυσης PCR

- | | |
|---|---|
| α) Παρατηρήθηκε μόλυνση κατά την προετοιμασία της PCR | Επαναλάβετε την PCR με νέα αντιδραστήρια και αντίγραφα.
Αν είναι δυνατόν, σφραγίστε τα σωληνάρια PCR αμέσως μετά την προσθήκη του δείγματος που πρόκειται να υποβληθεί σε εξέταση.
Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας σας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. |
| β) Παρατηρήθηκε μόλυνση κατά τη διάρκεια της εξαγωγής | Επαναλάβετε την εξαγωγή και την αντίδραση PCR του εξεταζόμενου δείγματος χρησιμοποιώντας νέα αντιδραστήρια.
Βεβαιωθείτε ότι ο χώρος εργασίας σας και τα όργανα απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. |

Ποιοτικός έλεγχος

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

Περιορισμοί

Τα αποτελέσματα που εξάγονται από το προϊόν αυτό πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο όλων των σχετικών κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αυτόνομα για διαγνωστικούς σκοπούς.

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

Στις αναλυτικές μελέτες επαλήθευσης συμπεριλήφθηκε ανθρώπινο DNA που έχει εξαχθεί από μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη νεοπλασματικά δείγματα.

Το προϊόν προορίζεται για χρήση αποκλειστικά στο θερμοκυκλοποιητή PCR πραγματικού χρόνου Rotor-Gene Q, της σειράς 5plex HRM.

Η αυστηρή συμμόρφωση με το εγχειρίδιο του kit *therascreen* EGFR RGQ PCR είναι απαραίτητη για την επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Δεν συνιστάται η αραίωση των αντιδραστηρίων, με τρόπο που δεν προβλέπεται

από το παρόν εγχειρίδιο, καθώς κάτι τέτοιο θα οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης.

Είναι σημαντικό να έχει προηγηθεί αξιολόγηση τόσο της ποσότητας όσο και της ποιότητας του DNA στο δείγμα πριν προχωρήσετε σε ανάλυσή του με χρήση του kit *therascreen* EGFR RGQ PCR. Παρέχεται πρόσθετο μείγμα ορού ελέγχου (Ctrl) για να διαπιστωθεί ότι η τιμή C_T είναι αποδεκτή για την ανάλυση. Δεν είναι απαραίτητη η εκτέλεση μετρήσεων απορρόφησης, καθώς δεν συσχετίζονται με τις τιμές C_T στα δείγματα κατακερματισμένου DNA.

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

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τιμές ορίου ευαισθησίας

Εξετάστηκαν 171 δείγματα FFPE χρησιμοποιώντας μια μέθοδο σύμφωνα με τις οδηγίες που περιλαμβάνονται στο NCCLS EP17-A (2004).

Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από 159 δείγματα για τον καθορισμό των τιμών ορίου ευαισθησίας του kit. Το εύρος τιμών αντίδρασης ορού ελέγχου C_T ορίστηκε από 23,00 έως 30,69 C_T . Οι τιμές ορίου ευαισθησίας καθορίστηκαν και παρατίθενται στον Πίνακα 8.

Όριο ανίχνευσης (LOD)

Για τον προσδιορισμό του ορίου LOD για το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, δημιουργήθηκε ένα σετ δειγμάτων αναμειγνύοντας συνθετικό μεταλλαγμένο DNA με γενωμικό DNA άγριου τύπου (wild-type) για την προσομοίωση ενός εύρους ποσοστών μετάλλαξης για καθεμία από τις 29 μεταλλάξεις. Το όριο LOD για κάθε ανάλυση ορίζεται ως η ποσοστιαία μετάλλαξη στην οποία το 95% των αντιγράφων προσδιορίστηκαν ως θετικά από το kit *therascreen* EGFR PCR RGQ. Οι τιμές ορίου LOD παρατίθενται στον Πίνακα 9. Στις πολλαπλές αναλύσεις, με τις οποίες ανιχνεύονται πολλαπλές μεταλλάξεις (G719X, οι ελλείψεις και οι προσθήκες), παρέχεται η τιμή για την αντίδραση με την υψηλότερη τιμή ορίου LOD.

Πίνακας 9. Όρια LOD για καθεμία από τις επτά αναλύσεις μετάλλαξης του EGFR

Μετάλλαξη	Ανιχνεύσιμο ποσοστό μετάλλαξης (%)
T790M	7,02
Ελλείψεις	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Προσθήκες	2,03

Ακρίβεια

Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας του kit *therascreen* EGFR RGQ PCR, δημιουργήθηκε ένα σετ δειγμάτων αναμειγνύοντας συνθετικό μεταλλαγμένο DNA με γενωμικό DNA άγριου τύπου (wild-type) για την προσομοίωση ενός ποσοστού μετάλλαξης χαμηλού επιπέδου για καθεμία από τις επτά αναλύσεις μετάλλαξης. Η ακρίβεια αξιολογήθηκε μέσω της εξέτασης δειγμάτων σε ένα κέντρο εξέτασης, χρησιμοποιώντας πολλαπλές παρτίδες kit, χειριστές και αναλύσεις σε διάστημα διαφορετικών ημερών, με δύο αντίγραφα για κάθε δείγμα. Η διακύμανση που παρατηρήθηκε, όσον αφορά την εκτιμώμενη τυπική απόκλιση από την ανάλυση διασποράς δειγμάτων, ήταν μικρότερη από 1 ΔC_T και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκτίμηση ακριβείας (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακών εξετάσεων*

Ανάλυση	Ποσοστό δειγμάτων θετικών για μετάλλαξη	Εκτίμηση τυπικής απόκλισης (ΔC_T)
T790M	100%	0,33
Ελλείψεις	100%	0,40
L858R	100%	0,45
L861Q	100%	0,49
G719X	97,9%	0,59
S768I	97,9%	0,31
Προσθήκες	97,9%	0,38

* 93 αντίγραφα εξετάστηκαν για κάθε μετάλλαξη.

Αναπαραγωγιμότητα

Η αναπαραγωγιμότητα αξιολογήθηκε μέσω της εξέτασης δειγμάτων υψηλού επιπέδου μετάλλαξης σε υπόβαθρο γενωμικού DNA άγριου τύπου (wild-type), σε τρία κέντρα εξέτασης, χρησιμοποιώντας πολλαπλές παρτίδες κιτ, χειριστές και αναλύσεις σε διάστημα διαφορετικών ημερών, με δύο αντίγραφα για κάθε δείγμα. Και στις επτά αναλύσεις μετάλλαξης τα δείγματα μεταλλαγμένου DNA προέκυψαν θετικά για μετάλλαξη σε ποσοστό 96,1–100%. Τα δείγματα άγριου τύπου (wild type) ήταν αρνητικά για μετάλλαξη σε όλες τις αναλύσεις σε όλα τα κέντρα.

Επίδραση της συγκέντρωσης εισαγόμενου DNA

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης της αλλαγής συγκέντρωσης εισαγόμενου DNA στα αποτελέσματα που λήφθηκαν με το κιτ *therascreen* EGFR RGQ PCR κοντά στο όριο LOD, δημιουργήθηκε ένα σετ δειγμάτων και για τις 29 μεταλλάξεις αναμειγνύοντας συνθετικό μεταλλαγμένο DNA με γενωμικό DNA άγριου τύπου (wild-type) για την παραγωγή δειγμάτων σε χαμηλό, μεσαίο και υψηλό επίπεδο ολικού εισαγόμενου DNA.

Το υψηλό και χαμηλό επίπεδο εισαγόμενου DNA ανιχνεύτηκαν σε τιμή-στόχο ώστε να αντιστοιχούν στο εύρος τιμών C_T ανάλυσης ορού ελέγχου (23,50 έως 29,50).

Η αξιολόγηση του σετ δεδομένων εισαγόμενου DNA (29 μεταλλάξεις, σε τιμές συγκέντρωσης κοντά στο όριο LOD και σε τρία διαφορετικά επίπεδα εισαγόμενου DNA) κατέδειξε ποσοστό 95,44% θετικό για μετάλλαξη.

Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η διακύμανση επιπέδου του εισαγόμενου DNA, εντός του εύρους εργασίας της ανάλυσης, δεν επηρεάζει την τιμή ΔC_T ή την ένδειξη για μετάλλαξη ενός δείγματος.

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Αξιολογήθηκε η επίδραση στην απόδοση του kit στοιχείων που θα μπορούσαν δυνητικά να προκαλέσουν επιμόλυνση από το kit QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue κατά την επεξεργασία των δειγμάτων FFPE.

Φορμόλη, κήρος παραφίνης, ξυλένιο, αιθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα ATL, πρωτεϊνάση K, ρυθμιστικό διάλυμα AL, ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης AW1 και ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης AW2 χρησιμοποιήθηκαν στις υψηλότερες («χειρότερο σενάριο») αναμενόμενες συγκεντρώσεις (θεωρώντας ότι κάθε βήμα έκπλυσης ή καθαρισμού στο πρωτόκολλο του kit εξαγωγής είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης κατά 1 log).

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με τριπλάσια όρια LOD αντί δειγμάτων με πολύ υψηλότερο επίπεδο μετάλλαξης, ώστε να διασφαλιστεί η ανίχνευση πιθανής παρεμβολής.

Η διαφορά στην τιμή $\Delta C_T \geq 3$ των τυπικών αποκλίσεων (που λήφθηκαν από τη μελέτη ακρίβειας) μεταξύ της «εξέτασης» και του «ορού ελέγχου» (δηλ., χωρίς παρεμβαλλόμενη ουσία) θεωρήθηκε ένδειξη πιθανής παρεμβολής.

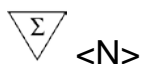
Καμία από τις παρεμβαλλόμενες ουσίες που αξιολογήθηκαν δεν παρουσίασε αλλαγή στην τιμή $\Delta C_T \geq 1$ της τυπικής απόκλισης κατά τη σύγκριση με τους ορούς ελέγχου.

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί στο διαδίκτυο μια μεγάλη, ενημερωμένη βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε, είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού είτε ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κ.λπ.

Για έναν πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε τη βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στο διαδίκτυο στη διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με τα τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Σύμβολα



Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> εξετάσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



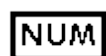
Αριθμός υλικού



Συστατικά



Περιεχόμενα



Αριθμός



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/Support, καλέστε το 00800-22-44-6000 ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN ή τους κατά τόπους αντιπροσώπους (δείτε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.qiagen.com).

Παράρτημα: Λεπτομέρειες μετάλλαξης

Οι αριθμοί COSMIC ID προέρχονται από τον κατάλογο *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Πίνακας 11. Κατάλογος μεταλλάξεων και COSMIC ID.

Μετάλλαξη	Εξόνιο	Αλλαγή βάσης	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
Προσθήκες	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Ελλείψεις	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (σύμπλοκο)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (σύμπλοκο)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (σύμπλοκο)	12422
		2238_2252>GCA (σύμπλοκο)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

Πίνακας 11. Κατάλογος μεταλλάξεων και COSMIC ID (συνέχεια)

Μετάλλαξη	Εξόνιο	Αλλαγή βάσης	COSMIC ID
Ελλείψεις	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (σύμπλοκο)	12382
		2239_2258>CA (σύμπλοκο)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (σύμπλοκο)	12383

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: 1 ανάλυση ορού ελέγχου, 7 αναλύσεις μετάλλαξης, θετικός ορός ελέγχου, <i>Taq</i> DNA πολυμεράση	870111
Rotor-Gene Q και εξαρτήματα		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Θερμοκυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, βυσσινί) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, εξαρτήματα, εγγύηση 1 έτους για τα μέρη και τα εργαστηριακά. Η εγκατάσταση και η εκπαίδευση δεν συμπεριλαμβάνονται.	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Θερμοκυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, βυσσινί) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, εξαρτήματα, εγγύηση 1 έτους για ανταλλακτικά και εργασία, εγκατάσταση και εκπαίδευση	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Θερμοκυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, βυσσινί) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, εξαρτήματα, εγγύηση 1 έτους για τα μέρη και τα εργαστηριακά. Η εγκατάσταση και η εκπαίδευση δεν συμπεριλαμβάνονται.	9001650

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Θερμοκυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής καμπυλών τήξης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRM) με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, βυσσινί) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, εξαρτήματα, εγγύηση 1 έτους για ανταλλακτικά και εργασία, εγκατάσταση και εκπαίδευση	9001580
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Μονάδα αλουμινίου για χειροκίνητη προετοιμασία αντίδρασης με μονοκάναλη πιπέτα σε σωληνάκια 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 σειρές των 4 σωληναρίων και πώματα για 1000 αντιδράσεις	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 σειρές των 4 σωληναρίων και πώματα για 10.000 αντιδράσεις	981106

Για ενημερωμένες πληροφορίες άδειας και αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο του kit QIAGEN ή στο εγχειρίδιο χρήστη. Τα εγχειρίδια του kit QIAGEN και τα εγχειρίδια χρήστη είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα κενή

Η αγορά αυτού του προϊόντος επιτρέπει στον αγοραστή να το χρησιμοποιήσει για την παροχή διαγνωστικών υπηρεσιών στο πλαίσιο της in vitro διαγνωστικής χρήσης σε δείγματα ανθρώπινης προέλευσης. Κανένα γενικό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ή άλλη άδεια οποιουδήποτε είδους πέρα από αυτό το συγκεκριμένο δικαίωμα χρήσης που απορρέει από την αγορά δεν παρέχεται διά του παρόντος.

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

Το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR είναι ένα διαγνωστικό προϊόν που φέρει τη σήμανση CE σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 98/79/EK περί In Vitro διαγνωστικών ιατροτεχνολογικών προϊόντων. Δεν είναι διαθέσιμο σε όλες τις χώρες.

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το kit *therascreen* EGFR RGQ PCR

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του kit των εξής όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο αυτό, και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο εγχειρίδιο αυτό, και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα συμπληρωματικά πρωτόκολλα παρέχονται από χρήστες της QIAGEN για χρήση από χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν δοκιμαστεί σχολαστικά ούτε έχουν βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση επ' αυτών, ούτε εγγυάται πως αυτά δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν εγγυάται πως αυτό το kit και/ή η χρήση/-εις του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα περιεχόμενά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του kit συμφωνεί να μην πραγματοποιήσει ή να μην επιτρέψει σε κανέναν να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιουδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το kit και/ή τα περιεχόμενά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, ανατρέξτε στη διεύθυνση www.qiagen.com.

© 2012–2013 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

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

