


***therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit**

Uputstvo za rad

Verzija 1

 24

IVD

Za *in vitro* diagnostiku

Koristi se na instrumentu Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM



REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, Royaume-Uni

R4 **MAT** 1063321SR

QIAGEN Tehnologije za uzorkovanje i testiranje

QIAGEN je vodeći dobavljač inovativnih tehnologija za uzorkovanje i testiranje, koje omogućuju izolaciju i detekciju sadržaja bilo kog biološkog uzorka. Naši proizvodi i usluge, napredni i visoko kvalitetni, čine da je od uzorka do rezultata uspeh siguran.

QIAGEN setovi su standardni u:

- Prečišćavanju DNK, RNK i proteina
- Testiranju nukleinskih kiselina i proteina
- Ispitivanju mikro RNK i iRNK
- Automatizaciji tehnologija za uzorkovanje i testiranje

Naša misija je da Vam pomognemo u postizanju izvanrednih rezultata i dostignuća. Za više informacija, možete posetiti www.qiagen.com.

Sadržaj

Namena testa	5
Pregled i objašnjenje testa	5
Princip procedure	6
Materijal sadržan u kitu	8
Sadržaj kita	8
Potreban materijal koji nije sadržan u kitu	9
Upozorenja i mere predostrožnosti	10
Informacije o bezbednosti	10
Opšte mere opreza	10
Čuvanje i rukovanje reagensima	11
Čuvanje i rukovanje uzorcima	11
Procedura	12
Određivanje količine tumorskih ćelija potrebnih za analizu EGFR	12
DNK izolacija	12
■ Protokol: Procena uzorka	14
■ Protokol: Detekcija EGFR mutacija	17
■ Protokol: Rotor-Gene Q EGFR podešavanje	20
Interpretacija rezultata	28
Procena uzoraka analizom podataka	28
EGFR analiza podataka o mutaciji	31
Vodič za rešavanje problema	41
Kontrola kvaliteta	42
Ograničenja	42
Karakteristike Performance	42
Cut-off vrednosti	42
Granica detekcije (Limit of detection, LOD)	43
Preciznost	43
Reproducibilnost	44
Efekat na koncentraciju ulazne DNK	44
Interferirajuće supstance	44
Reference	45

Symbols	45
Informacije o kontaktu	46
Dodatak: Detalji o Mutacijama	47
Informacije o Porudžbini	49

Namena testa

Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR je in vitro dijagnostički test za detekciju 29 somatskih mutacija u EGFR genu povezanim sa kancerom i daje kvalitativnu procenu statusa mutacija.

Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR treba da koristi obučeno osoblje u profesionalnom laboratorijskom okruženju, sa uzorcima DNK ekstrahovanim iz tkiva nesitnoćelijskih karcinoma pluća (NSCLC) fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafin. Rezultati treba da pomognu kliničarima u identifikaciji pacijenata sa NSCLC kod kojih tretman inhibitorima tirozin kinaze može dovesti do poboljšanja.

Kit *therascreen* EGFR RGQ PCR namenjen je in-vitro dijagnostičkoj primeni.

Pregled i objašnjenje testa

Therascreen EGFR RGQ PCR Kit je spreman za upotrebu i namenjen detekciji 29 somatskih mutacija na EGFR genu koji je povezan sa pojavom kancera, primenom polimeraza lančane reakcije (PCR) na Rotor-Gene Q instrumentu.

Koristeći *Scorpions*[®] i *ARMS*[®] tehnologije, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit omogućuje detekciju sledećih mutacija naspram nemutirane genomske DNK.

- 19 delecija na eksonu 19 (detektuje prisustvo neke od 19 delecija ali ih ne razlikuje)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (detektuje prisustvo G719S, G719A, or G719C, ali ih ne razlikuje)
- S768I
- 3 insercije u eksonu 20 (detektuje prisustvo neke od 3 insercija, ali ih ne razlikuje)

Korišćene metode su visoko selektivne i, u zavisnosti od prisutne količine ukupne DNK, omogućuju detekciju malog procenta mutant naspram nemutirane (wild type) genomske DNK. Ova selektivnost i osetljivost su superiorne u odnosu na tehnologije kao što je sekvenciranje sa obojenim "terminatorima".

Princip procedure

Therascreen EGFR RGQ PCR Kit koristi dve tehnologije — ARMS i Scorpions — u detekciji mutacija u real-time PCR-u.

ARMS

Alel- ili mutacija-specifična amplifikacija postiže se korišćenjem ARMS (Amplification Refractory Mutation System). *Taq* DNK polimeraza (*Taq*) je efektivna u razlikovanju između match-a i mismatch-a na 3' kraju PCR prajmera. Specifično mutirane sekvence selektivno se amplifikuju, čak i u uzorcima u kojima većina sekvenci ne sadrži mutaciju. Kada je prajmer savršeno "uklopljen" – full match – amplifikacija se odigrava sa punom efikasnošću. Kada je 3' baza mismatch, javlja se samo pozadinska amplifikacija niskog intenziteta.

Scorpions

"Škorpion" probe se koriste za detekciju amplifikacije. To su bifunkcionalni molekuli koji sadrže PCR prajmer kovalentno vezan za probu. Fluorofor sadržan u probi interaguje sa kvenčerom, takođe inkorporiranim u probu, koji smanjuje ("gasi") fluorescenciju. U toku PCR-a, kada se proba veže za ampikon, dolazi do razdvajanja fluorofora i kvenčera, što dovodi do pojačanja fluorescencije u reakcionoj kiveri.

Format kita

U *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sadržano je osam testova:

- Jedan kontrolni test (Ctrl)
- Sedam testova mutacija

Sve reakcione smeše sadrže reagense koji detektuju target molecule, obeležene sa FAM™ bojom, i inteRNAI kontrolni test obeležen bojom HEX™. Kontrola inteRNAI služi detekciji inhibitora koji mogu prouzrokovati lažno negativne rezultate. FAM amplifikacija može zagušiti amplifikaciju inteRNAI kontrole a svrha inteRNAI kontrole je samo da pokaže da u uzorcima u kojima nije došlo do FAM amplifikacije to predstavlja stvarno negativni rezultat a ne neuspešnu PCR reakciju.

Procedura

Therascreen EGFR RGQ PCR Kit sadrži procedure koja se izvodi u dva koraka. U prvom koraku, testira se kontrola da bi se utvrdila količina ukupne DNK u uzorku. U drugom koraku, radi se i test mutacije i kontrola, da bi se ustanovilo prisustvo ili odsustvo mutirane DNK.

Testovi:

Kontrolni test

Kontrolni test, obeležen bojom FAM, koristi se za utvrđivanje količine ukupne DNK u uzorku. U ovom testu se amplifikuje region eksona 2 EGFR gena. Prajmer i proba su dizajnirani tako da su izbegnuti svi poznati EGFR polimorfizmi.

Za procenu količine ukupne DNK u uzorku izričito preporučujemo korišćenje Control Reaction Mix-a (Ctrl) koji je sadržan u pakovanju *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita. U kontrolnom testu se amplifikuje region eksona 2 EGFR gena. Preporučujemo da se pri izvođenju kontrolnog testa u instrumentu kao uzorci podese samo EGFR pozitivna kontrola (PC) kao pozitivna kontrola i nukleaza-čista voda (H₂O) kao negativna kontrola.

Napomena: Procena količine DNK treba da se zasniva na PCR-u i dobijene vrednosti se mogu razlikovati od onih dobijenih tehnikama očitavanja absorbancije. Obezbeđen je dodatni kontrolni reakcioni miks (Control Reaction Mix (Ctrl)) koji omogućuje procenu kvaliteta i količine DNK u uzorcima pre analize kitom *therascreen* EGFR RGQ PCR.

Testovi mutacija

Svaki test mutacije sadrži FAM-obeleženu Scorpion probu kao i ARMS prajmer koji služe razlikovanju wild-type DNK i specifično mutirane DNK.

Kontrole

Napomena: Svaka serija eksperimenata mora da sadrži sledeće kontrole.

Pozitivna kontrola

Svaka serija mora da sadrži pozitivnu kontrolu u tubicama 1–8. *Therascreen* EGFR RGQ PCR Kit sadrži EGFR pozitivnu kontrolu (PC) koja se koristi kao templejt u reakciji pozitivne kontrole. Rezultati pozitivne kontrole će biti procenjeni kako bi se utvrdilo da performanse kita odgovaraju navedenim kriterijumima prihvatljivosti.

Negativna kontrola

Svaka serija mora da sadrži negativnu kontrolu ("no template control", NTC) u tubicama 9–16. NTC se sastoji od vode čiste od nukleaza -Nuclease-Free Water (H₂O) i koristi se kao templejt za negativnu kontrolu. Ova kontrola služi da ukaže na potencijalnu kontaminaciju tokom postavljanja reakcije i na uspešnost inteRNAI kontrolne reakcije.

Procena uspešnosti InteRNAI kontrolne reakcije

Svaka reakciona smeša pored ciljne reakcije sadrži internu kontrolu - inteRNAI kontrolu. Ukoliko izostane amplifikacija ove kontrole to ukazuje na moguće prisustvo inhibitora koji mogu dovesti do lažno negativnog rezultata, ili na postojanje greške u radu prilikom postavljanja reakcije u toj tubici.

Ukoliko *inter*NAI nije uspela zbog postojanja PCR inhibicije, efekat inhibitora se može smanjiti razblaženjem uzorka ali treba napomenuti da će ovim takođe biti razblažena i analizirana DNK. FAM amplifikacija može biti uspješnija od amplifikacije *inter*NAI kontrole tako da dobijena IC C_T (HEX) vrednost može biti izvan zadanog opsega. Za ove uzorke su FAM rezultati i dalje validni.

Materijal sadržan u kitu

Sadržaj kita

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit			(24)
Kataloški broj			870111
Broj reakcija			24
Crveno	Control Reaction Mix (Reakcioni miks za kontrolu)	Ctrl	2 x 600 µL
Ljubičasto	T790M Reaction Mix (T790M Reakcioni miks)	T790M	600 µL
Narandžasto	Deletions Reaction Mix (Reakcioni miks za delecije)	Del	600 µL
Ružičasto	L858R Reaction Mix (L858R Reakcioni miks)	L858R	600 µL
Zeleno	L861Q Reaction Mix (L861Q Reakcioni miks)	L861Q	600 µL
Žuto	G719X Reaction Mix (G719X Reakcioni miks)	G719X	600 µL
Sivo	S768I Reaction Mix (S768I Reakcioni miks)	S768I	600 µL
Plavo	Insertions Reaction Mix (Reakcioni miks za insercije)	Ins	600 µL
Braon	EGFR Positive Control (EGFR Pozitivna kontrola)	PC	300 µL
Tirkiz	Taq DNA Polymerase (Taq DNK polimeraza)	Taq	138 µL
Belo	Nuclease-Free Water (Voda čista od nukleaza)	H ₂ O	2 x 1,9 mL
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Handbook (uputstvo na engleskom)			1

Potreban materijal koji nije sadržan u kitu

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočari. Više informacija potražite u odgovarajućim tehničkim specifikacijama (SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

- kit za DNK izolaciju (videti "DNK izolacija", strana 12)
- Ksilen
- Etanol (96–100%)*
- 1.5 ml ili 2 ml mikrocentrifuške tubice (za korake liziranja)
- 1.5 ml mikrocentrifuške tubice (za korake eluiranja) (mogu se nabaviti od firmi Brinkmann [Safe-Lock, kat.br. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat.br. 0030 120.086], ili Sarstedt [Safety Cap, kat.br. 72.690])[†]
- Pipete[‡] (podesive zapremine) određene za pripremu uzorka
- Pipete[‡] (podesive zapremine) određene za pripremu PCR master miksa
- Pipete[‡] (podesive zapremine) određene za razlivanje analizirane DNK*
- DNase, RNase i DNA-free nastavci za pipette sa filtrima (radi izbegavanja unakrsne kontaminacije, preporučujemo nastavke za pipette sa aerosolnom barijerom)
- Termomikser, orbitalni incubator sa grejanjem, grejni blok ili vodeno kupatilo sa mogućnošću inkubacije na 90°C[‡]
- Benchtop centrifuga[‡] sa rotorom za reakcione tubice od 2 ml
- Vorteks
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrument^{‡§} sa fluorescentnim kanalima za Cycling Green i Cycling Yellow (detekcija FAM, odnosno HEX)
- Rotor-Gene Q softver, verzija 2.0.2 ili novija
- Strip tubice i kapice, 0.1 ml, za korišćenje sa rotorom od 72 mesta (kat.br. 981103 or 981106)
- DNase, RNase, i DNA-free mikrocentrifuške tubice za pripremu master mikseva
- Stalak za 72 x 0.1 ml tubice, aluminijumski stalak za manuelno postavljanje reakcije jednokanalnom pipetom (QIAGEN, kat.br. 9018901)

* Nemojte koristiti denaturisani alkohol, koji sadrži druge supstance kao što su metanol ili metiletilketon.

[†] Ova lista ne obuhvata sve dobavljače.

[‡] Vodite računa da se instrumenti proveravaju i kalibrišu u skladu sa preporukama proizvođača.

[§] Instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM, ako je primenljivo.
Poznat u nekim zemljama i kao Rotor-Gene Q MDx.

Upozorenja i mere predostrožnosti

Za primenu u in vitro dijagnostici

Informacije o bezbednosti

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočari. Više informacija potražite u odgovarajućim tehničkim specifikacijama (SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate tehničke specifikacije za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.

24-časovna hitna informacija

Pomoć u slučaju hemijske nezgode ili nesreće dostupna je 24 časa na dan:

CHEMTREC

SAD i Kanada ■ Tel: 1-800-424-9300

Van SAD i Kanade ■ Tel: +1-703-527-3887 (prihvataju se i pozivi na naš račun)

Opšte mere opreza

Korisnik uvek treba da void računa o sledećem.

- Koristite DNKse, RNKse, i DNK-free nastavke za pipette sa filterima i vodite računa da su pipete kalibrisane u skladu sa uputstvom proizvođača.
- Pozitivne materijale (uzorke i pozitivne kontrole) čuvajte i ekstrahujte odvojeno od svih ostalih reagenasa, i dodajte ih u reakcionu smešu u odvojenoj prostoriji.
- Pre započinjanja testa sve komponente pažljivo otopite na sobnoj temperaturi (15–25°C).
- Nakon otapanja, promešajte komponente okretanjem svake tubice 10 puta i kratko centrifugirajte.

Napomena: Budite izuzetno oprezni kako biste sprečili kontaminaciju PCR-a sintetičkim kontrolnim materijalom. Preporučujemo da se za postavljanje reakcionih smeša i dodavanje DNK templejta koriste posebne pipete, određene za tu svrhu. Priprema i razlivanje reakcionih mikseva mora se izvoditi u prostoru odvojenom od onog u kom se dodaje templejt. Rotor-Gene Q tubice se ne smeju otvarati nakon što je PCR serija završena. Razlog tome je prevencija kontaminacije laboratorije post-PCR produktima.

Napomena: Reagensi su validirani za manuelno postavljanje. Ukoliko se koristi automatizovana metoda, broj mogućih reakcija može biti manji zbog potrebne količine reagenasa za popunjavanje "mrtve zapremine" na ovim instrumentima.

Napomena: Svi reagensi u *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitu formulisani su specifično za date testove. Svi reagensi sadržani u *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitu namenjeni su korišćenju isključivo sa drugim reagensima u istom *therascreen* EGFR RGQ PCR kitu. Da bi se zadržala optimalna performansa ne smeju se menjati reagensi u kitu.

Napomena: Koristite samo *Taq* DNK polimerazu (*Taq*) koja je data u kitu. Nemojte je zameniti *Taq* DNK polimerazom iz drugih kitova istog ili bilo kog drugog tipa, ili *Taq* DNK polimerazom drugog proizvođača.

Napomena: Reagensi u *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit su optimalno razblaženi. Ne preporučujemo dalje razblaženje reagenasa, jer to može dovesti do pogoršanja performansi testa. Ne preporučujemo korišćenje reakcionih zapremina manjih od 25 µl, jer bi to povećalo rizik od lažne negativnosti.

Čuvanje i rukovanje reagensima

Therascreen EGFR RGQ PCR Kit se šalje na suvom ledu i mora biti još uvek zaleđen prilikom dospeća. Ako *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit pri dospeću nije zamrznut, spoljašnje pakovanje je otvoreno tokom prenosa, ili pošiljka ne sadrži dokument o pakovanju, uputstvo ili reagens, molimo da kontaktirate neko od odeljenja QIAGEN tehničke podrške ili lokalnog distributera (videti spoljašnju stranu ili posetiti www.qiagen.com).

Therascreen EGFR RGQ PCR Kit treba odmah po dospeću staviti na –15 do –25°C u zamrzivač sa konstantnom temperaturom i zaštititi od svetlosti. Kada se čuva pod preporučenim uslovima i u originalnom pakovanju, the kit je stabilan do isteka roka trajanja navedenog na nalepnici. Treba izbegavati ponovljeno zamrzavanje i otapanje. Preporučujemo maksimalno 7 ciklusa zamrzavanja i otapanja.

Napomena: Da bi se obezbedili optimalna aktivnost i performanse, Scorpion probe (kao i svi fluorescentno obeleženi molekuli) moraju se zaštititi od svetlosti da bi se izbeglo da izblede na svetlu.

Napomena: U cilju optimalnog korišćenja reagenasa u *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitu, uzorke treba testirati u serijama. Ako se uzorci testiraju individualno, koristiće se veća količina reagenasa i broj uzoraka koji se mogu testirati jednim *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom biće smanjen.

Čuvanje i rukovanje uzorcima

Napomena: Sve uzorke treba smatrati potencijalno infektivnim materijalom.

Uzorkovani materijal mora biti humana genomska DNK ekstrahovana iz formalinom fiksiranih, parafinom ukalupljenih (FFPE) uzoraka nesitnoćelijskih karcinoma pluća. Uzorci se moraju transportovati u skladu sa standardnim patološkim metodama da bi se obezbedio kvalitet uzoraka.

Uzorci tumora su nehomogeni i podaci dobijeni testiranjem jednog tumorskog uzorka mogu biti u neskladu sa drugim isečcima istog tumora. Tumorski uzorci takođe mogu sadržati netumorsko tkivo. Nije očekivano da DNK iz netumorskog tkiva sadrži EGFR mutacije koje detektuje *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Procedura

Određivanje količine tumorskih ćelija potrebnih za analizu EGFR

Tkivo koje se koristi za analizu EGFR je fiksirano formalinom i ukalupljeno u parafinu (FFPE), tkivo uzoraka nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NSCLC). DNK ekstrahovana iz ćelija ovog tumora u pogledu EGFR može biti bez mutacija (wild type) ili može sadržati jednu ili više mutacija.

FFPE NSCLC tkivo koje se koristi za ekstrakciju može takođe sadržati zdravo, netumorsko tkivo, koje neće sadržati mutacije EGFR. Wild type DNK iz ovog tkiva može razblažiti mutiranu DNK, moguće i do nivoa kad je više neće biti moguće detektovati ovim kitom. Ipak, preporučuje se da se čak i uzorci sa malom količinom tumora testiraju jer postoji mogućnost detekcije mutacija visokog nivoa i donošenja odluke o terapiji za pacijenta.

Da biste maksimalno povećali šanse za detekciju mutacije, postupite na sledeći način.

- Bar jedan isečak svakog uzorka pacijenta obojte hematoksilinom i eozinom.
- Neka patolog pregleda obojeni preparat kako bi uočio prisustvo tumora.
- Ako je moguće, trebalo bi da patolog pregleda nekoliko isečaka iz različitih delova bloka FFPE.
- Svi uzorci u kojima je prisutan tumor mogu se testirati sa *therascreen* EGFR RGQ PCR kitom.

DNK izolacija

DNK izolacija se mora izvoditi korišćenjem QIAamp® DNK FFPE Tissue Kita.

Izvedite prečišćavanje DNK prema uputstvima u QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Uputstvu (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) za upotrebu sa sledećim izmenama.

- Sakupite FFPE isečke na staklenim pločicama.
- Ostružite višak parafina oko isečka tkiva koristeći nov sterilni skalpel.
- Isečke tkiva ostružite u mikrocentrifuške tubice koristeći nov skalpel za svaki uzorak iz kog se radi ekstrakcija.
- Digestiju proteinazom K treba izvoditi 1 sat.
- Prečišćena genomska DNK mora se eluirati u 200 µl ATE pufera (Buffer ATE, priložen u QIAamp DNK FFPE Tissue Kitu).
- Prečišćenu genomsku DNK čuvajte na –15 do –30°C.
- Kada postoji informacija o tome, treba koristiti isečak najbliži H&E obojenom preparatu koji ima najveći sadržaj tumora.

Napomena: Svi testovi u *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitu stvaraju kratke PCR produkte. Ipak, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit neće raditi sa jako fragmentisanom DNK.

Protokol: Procena uzorka

Ovo je protokol za procenu ukupne DNK u uzorcima koja se može amplifikovati.

Važno pre nego što počnete

- Pre započinjanja procedure pročitajte "Opšte mere opreza", strana 10.
- Pre započinjanja protokola odvojte vreme za upoznavanje sa Rotor-Gene Q instrumentom. Pogledajte uputstvo za upotrebu instrumenta.
- Nemojte vorteksovati *Taq* DNK polimerazu (*Taq*) ili bilo koju smešu koja sadrži *Taq* DNK polimerazu (*Taq*) jer se enzim time može inaktivirati.
- Pipetirajte *Taq* DNK polimerazu (*Taq*) tako što ćete vrh nastavka za pipetu uroniti tek malo ispod površine tečnosti, da biste izbegli višak enzima na spoljašnjoj strani nastavka.

Stvari koje treba uraditi pre početka

- Pre svake upotrebe, sve reagense treba potpuno otopiti na sobnoj temperaturi (15–25°C), promešati okretanjem 10 puta, i kratko centrifugirati kako bi se sadržaj spustio na dno tubice.
- Pre svake upotrebe sačekajte da *Taq* DNK polimeraza (*Taq*) dostigne sobnu temperaturu (15–25°C). Kratko centrifugirajte tubicu da bi se enzim spustio na dno.

Procedura

1. Otopite miks za kontrolnu reakciju (Ctrl), nukleaza-čistu vodu za negativnu kontrolu (NTC), i EGFR pozitivnu kontrolu (PC) na sobnoj temperaturi (15–25°C). Kada su reagensi otopljeni, promešajte invertovanjem svake tubice 10 puta da biste izbegli lokalizovano koncentrovanje soli zatim kratko centrifugirajte kako bi se sadržaj spustio na dno tubice.
2. Pripremite dovoljno master mikseva za uzorke DNK, jednu reakciju pozitivne kontrole, i jednu reakciju negativne (no-template) kontrole prema zapreminama datih u Tabela 1. Uračunajte reagense u višku za 1 dodatni uzorak da biste imali dovoljno za postavljanje PCR -a. Master miks sadrži sve komponente potrebne za PCR, osim uzorka.

Tabela 1. Priprema master miksa za kontrolni test*

Komponenta	Zapremina/reakcija (μL)
Reakcioni miks za kontrolu (Ctrl)	19,5
Taq DNK polimeraza (Taq)	0,5
Totalna zapremina	20,0

* Kada pripremate master miks, pripremite dovoljno za jedan uzorak viška.

- 3. Promešajte pažljivo master miks laganim pipetiranjem gore i dole 10 puta. Odmah dodajte 20 μl master miksa u PCR strip tubice (nisu sadržane u kitu).**

Napomena: Za procenu uzorka, treba dodati master miks za kontrolni test u jednu tubicu za pozitivnu kontrolu, jednu za negativnu kontrolu, i po jednu tubicu za svaki uzorak.

- 4. Odmah dodajte 5 μl nukleaza-čiste vode (H₂O) u kontrolnu tubicu za negativnu kontrolu (PCR tubica broj 9) i zatvorite tubicu. Dodajte 5 μl DNK uzorka u tubice za uzorke i zatvorite ih. Dodajte 5 μl EGFR pozitivne kontrole (PC) u tubicu za pozitivnu kontrolu (PCR tubica 1) i zatvorite.**
- 5. Stavite PCR strip tubice na odgovarajuća mesta u rotoru i vizuelno proverite da li sve tubice sadrže jednake zapremine tečnosti.**

Napomena: Pazite da stripovi sa tubicama nisu okrenuti u pogrešnom smeru kada ih prebacujete u rotor.

- 6. Ako rotor nije pun, preostala mesta popunite zatvorenim praznim tubicama.**
- 7. Odmah stavite rotor sa 72 radna mesta u instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM. Pazite da je prsten za zatvaranje (koji spada u dodatnu opremu Rotor-Gene Q instrumenta) postavljen na vrh rotora kako bi tubice bile fiksirane tokom izvođenja reakcije.**
- 8. Proučite podešavanje Rotor-Gene Q instrumenta (videti "Protokol: Rotor-Gene Q EGFR podešavanje", strana 19) da biste kreirali temperaturni profil i pokrenuli reakciju.**

Tabela 2. Parametri cikliranja

Broj ciklusa	Temperatura	Vreme	Očitavanje podataka
1	95 °C	15 minuta	Ne
40	95 °C	30 sekundi	Ne
	60 °C	60 sekundi	Zeleno i žuto

9. Kada se serija završi, analizirajte podatke u skladu sa “Procena uzoraka analizom podataka”, strana 28.

Protokol: Detekcija EGFR mutacija

Ovo je protokol za detekciju EGFR mutacija. Nakon što je uzorak prošao procenu uzorka, može se testirati testovima na EGFR mutacije.

Važno pre nego što počnete

- Pre započinjanja procedure pročitajte "Opšte mere opreza", strana 10.
- Pre započinjanja protokola odvojte vreme za upoznavanje sa Rotor-Gene Q instrumentom. Pogledajte uputstvo za upotrebu instrumenta.
- Nemojte vorteksovati *Taq* DNK polimerazu (*Taq*) ili bilo koju smešu koja sadrži *Taq* DNK polimerazu (*Taq*) jer se enzim time može inaktivirati.
- Za efikasno korišćenje *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita, treba grupisati uzorke u serije od po 7 da bi se napunio rotor sa 72 radna mesta. Manje serije znače da će jednim *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom biti testirano manje uzoraka.
- Pipetirajte *Taq* DNK polimerazu (*Taq*) tako što ćete vrh nastavka za pipetu uroniti tek malo ispod površine tečnosti, da biste izbegli višak enzima na spoljašnjoj strani nastavka.
- Za svaki uzorak DNK, kontrola i i testovi mutacije moraju biti analizirani u istom izvođenju PCR-a kako bi se izbegle run-to-run varijacije.

Stvari koje treba uraditi pre početka

- Pre svake upotrebe, sve reagense treba potpuno otopiti na sobnoj temperaturi (15–25°C), promešati okretanjem 10 puta, i kratko centrifugirati kako bi se sadržaj spustio na dno tubice.
- Pre svake upotrebe sačekajte da *Taq* DNK polimeraza (*Taq*) dostigne sobnu temperaturu (15–25°C). Kratko centrifugirajte tubicu da bi se enzim spustio na dno.

Procedura

1. Otopite reakcione mikseve, nukleaza-čistu vodu za negativnu kontrolu (NTC), i EGFR pozitivnu kontrolu (PC) na sobnoj temperaturi (15–25°C). Kada su reagensi otopljeni, promešajte invertovanjem svake tubice 10 puta da biste izbegli lokalizovano koncentrovanje soli zatim kratko centrifugirajte kako bi se sadržaj spustio na dno tubice.
2. Pripremite dovoljno master mikseva za uzorke DNK, jednu reakciju pozitivne kontrole, i jednu reakciju negativne (no-template) kontrole prema zapreminama datih u Tabela 3. Uračunajte reagense u višku za 1 dodatni uzorak da biste imali dovoljno za postavljanje PCR -a.
Master miks sadrži sve komponente potrebne za PCR, osim uzorka.

Tabela 3. Priprema master miksa*

Komponenta	Zapremina/reakcija (μL)
Reakcioni miks	19,5
Taq DNK polimeraza (Taq)	0,5
Totalna zapremina	20,0

* Kada pripremate master miks, pripremite dovoljno za jedan uzorak viška.

3. Promešajte pažljivo master miks laganim pipetiranjem gore i dole 10 puta. Odmah dodajte 20 μl master miksa u PCR strip tubice (nisu sadržane u kitu).
4. Odmah dodajte 5 μl nukleaza-čiste vode (H₂O) u kontrolne tubice za negativnu kontrolu (PCR tubice sa brojevima 9-16) i zatvorite tubice. Dodajte 5 μl DNK uzorka u tubice za uzorke (PCR tubice 17-72) i zatvorite ih. Dodajte 5 μl EGFR pozitivne kontrole (PC) u tubice za pozitivnu kontrolu (PCR tubice 1-8). Svaki uzorak DNK mora se testirati kontrolnim i testovima za mutacije. Šema postavljanja uzoraka je prikazana u Tabeli 4.

Tabela 4. Šema kontrolnih i testova mutacije

Test	Kontrole		Broj uzoraka						
	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
Delecije	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
Insercije	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. PCR strip tubice na odgovarajuća mesta u rotoru i vizuelno Stavite proverite da li sve tubice sadrže jednake zapremine tečnosti.

Napomena: Pazite da stripovi sa tubicama nisu okrenuti u pogrešnom smeru kada ih prebacujete u rotor.

6. Ako rotor nije pun, preostala mesta popunite zatvorenim praznim tubicama.
7. Odmah stavite rotor u instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM. Pazite da je prsten za zatvaranje (koji spada u dodatnu opremu Rotor-Gene Q instrumenta) postavljen na vrh rotora kako bi tubice bile fiksirane tokom izvođenja reakcije.
8. Proučite podešavanje Rotor-Gene Q instrumenta (videti "Protokol: Rotor-Gene Q EGFR podešavanje", strana 20) da biste kreirali temperaturni profil i pokrenuli reakciju.

Tabela 5. Parametri cikliranja

Broj ciklusa	Temperatura	Vreme	Očitavanje podataka
1	95 °C	15 minuta	Ne
40	95 °C	30 sekundi	Ne
	60 °C	60 sekundi	Zeleno i žuto

9. Nakon završetka reakcije, analizirajte podatke kao što je navedeno "EGFR analiza podataka o mutaciji", strana 31.

Protokol: Rotor-Gene Q EGFR podešavanje

Ovaj protokol se pominje u "Protokol: Procena uzorka", strana 12, and "Protokol: Detekcija EGFR mutacija", strana 16.

Procedura

1. Kreirajte temperaturni profil prema sledećim koracima.

Podešavanje opštih parametara testa	Slike 1–3
Inicijalna aktivacija hot-start enzima	Slika 4
Amplifikacija DNK	Slike 5–7
Podešavanje fluorescentnih kanala	Slike 8–12
Započinjanje reakcije	Slika 13

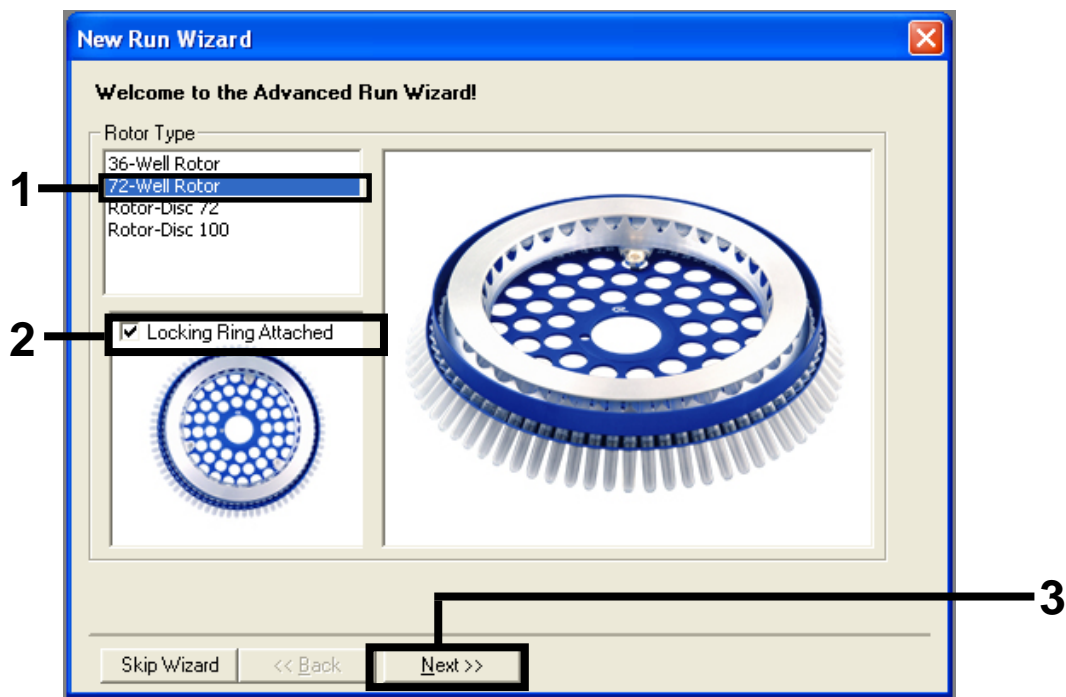
Ukratko, parametri cikliranja su sledeći.

Tabela 6. Parametri cikliranja

Broj ciklusa	Temperatura	Vreme	Očitavanje podataka
1	95°C	15 minuta	Ne
40	95°C	30 sekundi	Ne
	60°C	60 sekundi	Zeleno i žuto

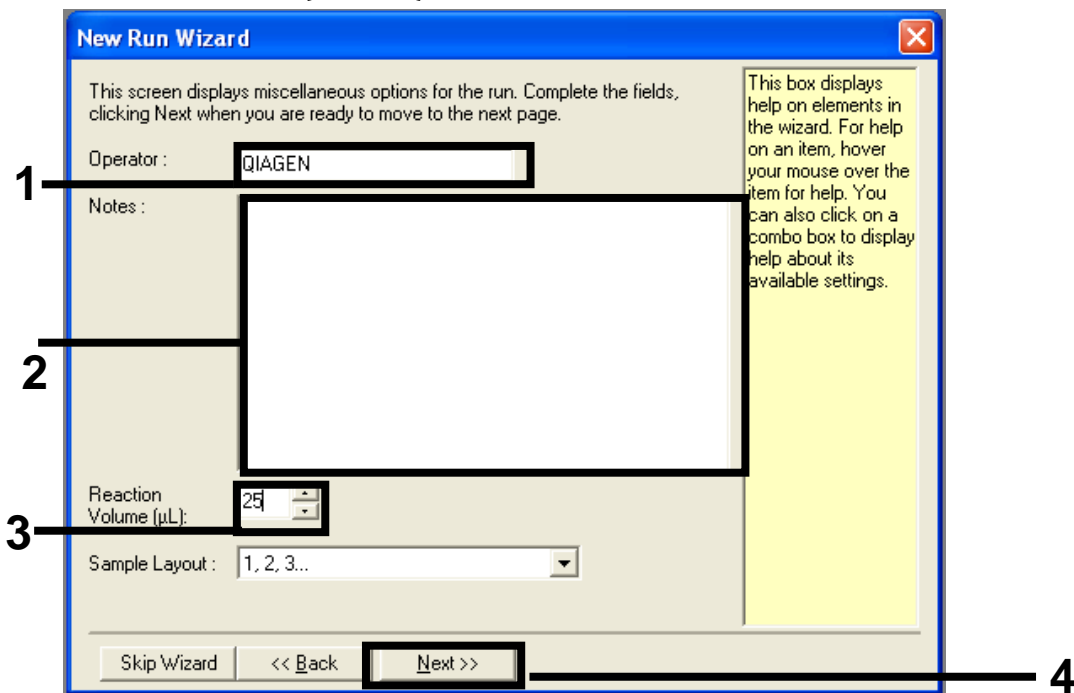
Sve specifikacije se odnose na Rotor-Gene Q softver verziju 2.0.2. Molimo da dalje informacije o programiranju Rotor-Gene pronađete u uputstvu za upotrebu instrumenta. U ilustracijama su ova podešavanja uokvirena debelom crnom linijom.

- Kliknite dvaput na ikonu Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2 softvera na kompjuteru povezanom za Rotor-Gene Q 5plex HRM instrument. Odaberite polje "Advanced" u prozoru "New Run" koji se pojavljuje.**
- Za kreiranje novog templejta, odaberite "Empty Run" i kliknite "New" da biste ušli u "New Run Wizard".**
- Kao tip rotora odaberite 72-Well Rotor. Potvrdite da je prsten za zaključavanje prikačen i označite kućicu "Locking Ring Attached" box. Kliknite "Next" (Slika 1).**



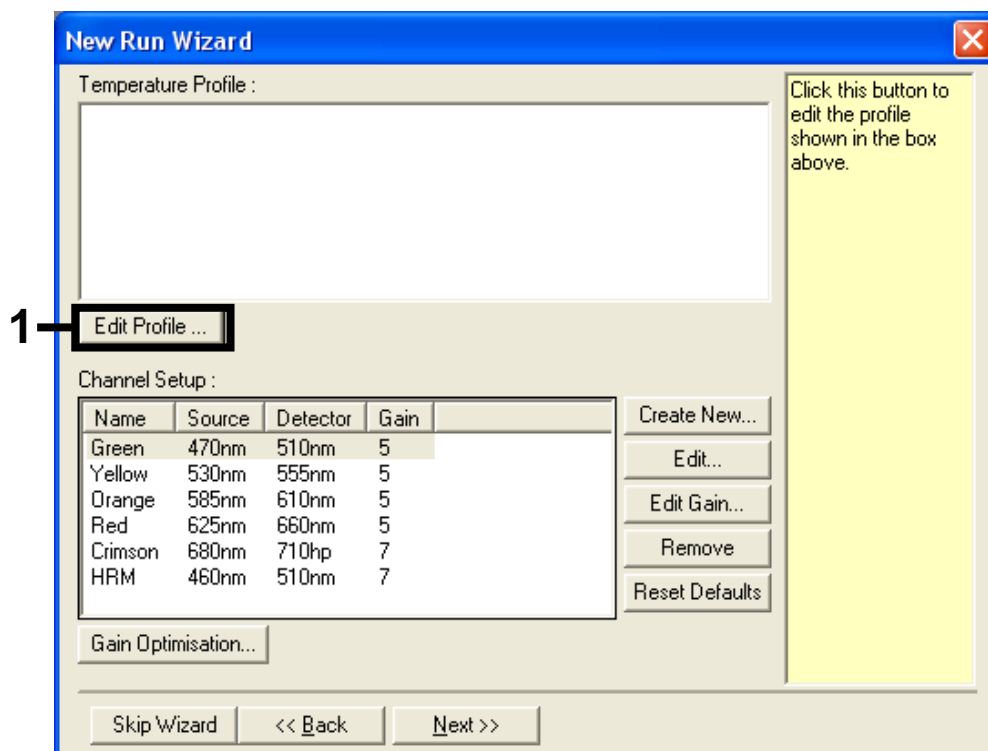
Slika 1. Prozor « New Run Wizard »

5. Unesite ime osobe koja radi. Unesite napomene, ukoliko ih ima, i unesite zapremine reakcije 25. Proverite da pod "Sample Layout" piše "1,2,3...". Kliknite "Next" (Slika 2).



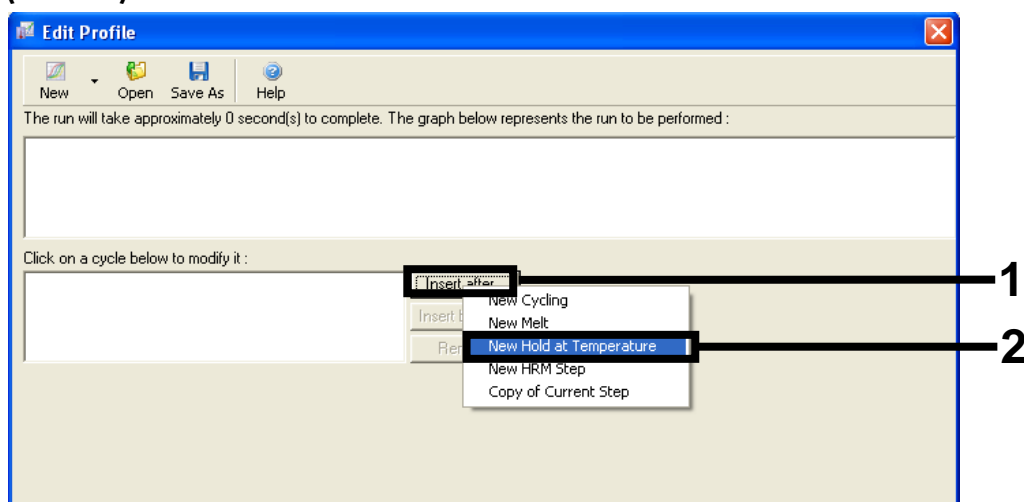
Slika 2. Podešavanje opštih parametara testa.

6. Kliknite na dugme "Edit Profile" u sledećem prozoru "New Run Wizard" (Slika 3) i programirajte temperaturni profil prema informacijama u sledećim koracima.



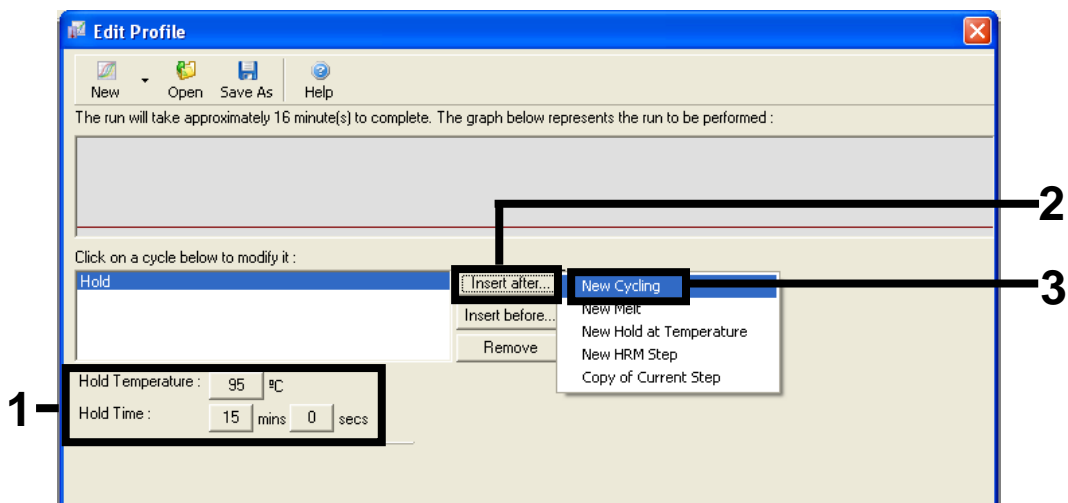
Slika 3. Menjanje profila.

- 7. Kliknite na dugme “Insert after” i odaberite New Hold at Temperature (Slika 4).**



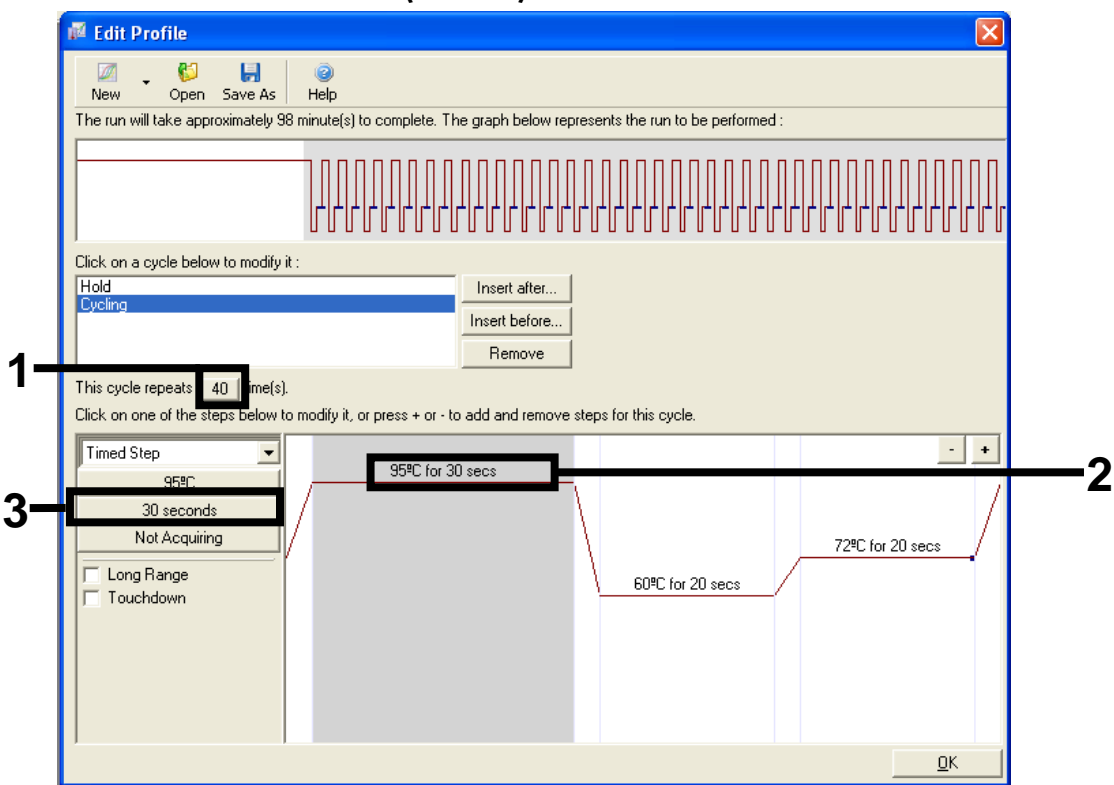
Slika 4. Inicijalni korak inkubacije na 95 °C.

- 8. Promenite “Hold Temperature” na 95°C i “Hold Time” na 15 minuta. Kliknite na dugme “Insert After” button i odaberite New Cycling (Slika 5).**



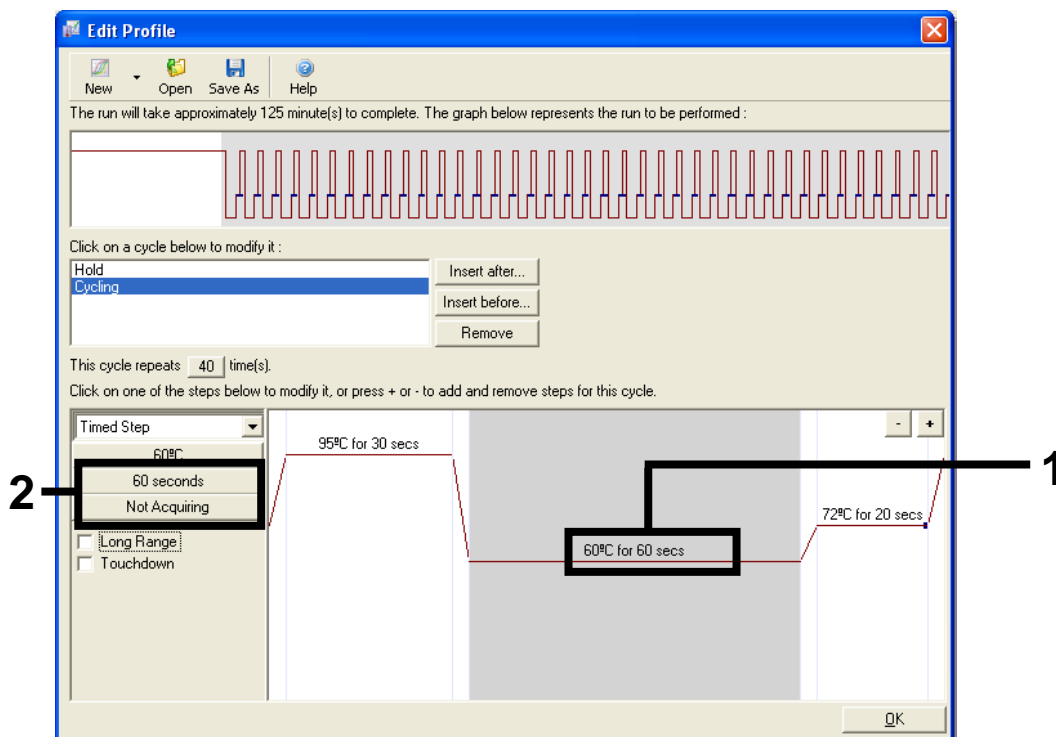
Slika 5. Inicijalni korak inkubacije na 95 °C.

9. Promenite broj ponavljanja ciklusa na 40. Odaberite prvi korak i podesite na 95°C na 30 sekundi (Slika 6).



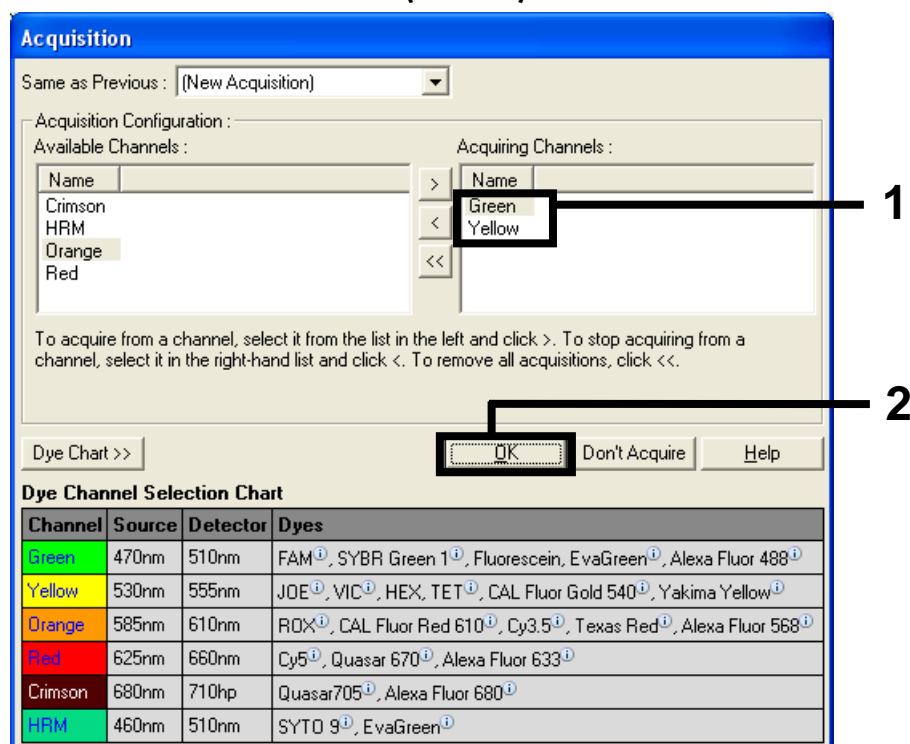
Slika 6. Korak cikliranja na 95 °C.

10. Označite drugi korak i podesite na 60°C na 60 sekundi. Tokom ovog koraka omogućite očitavanjem podataka odabiranjem dugmeta "Not Acquiring" (Slika 7).



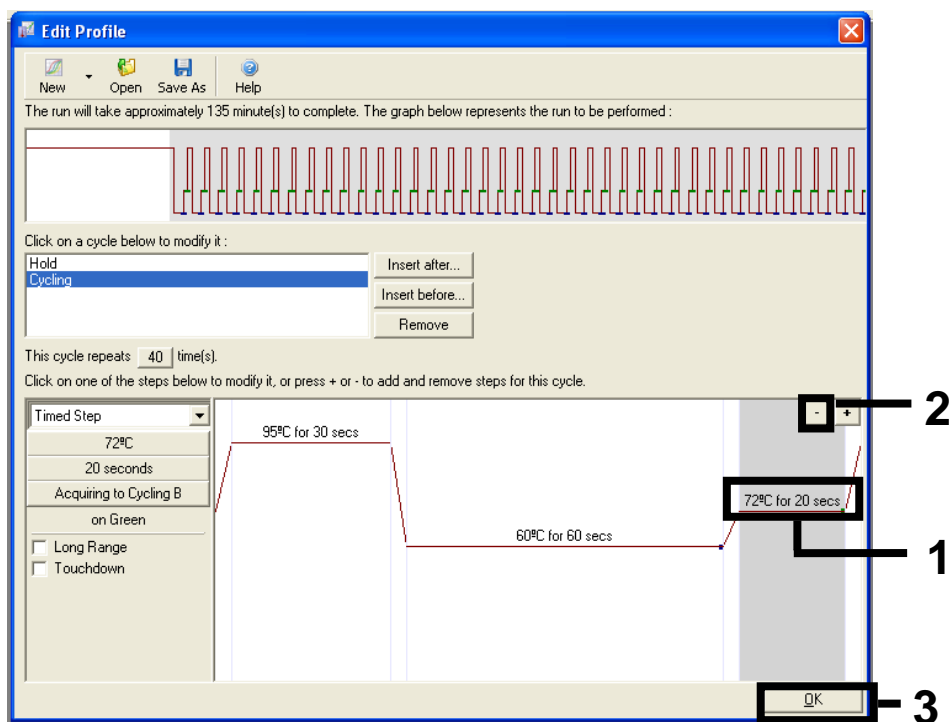
Slika 7. Etapa cikliranja na 60 °C.

11. Podesite Green and Yellow kao kanale za očitavanje fluorescencije tako što ćete odabrati dugme ">" da ih prenesete sa liste "Available Channels". Kliknite "OK" (Slika 8).



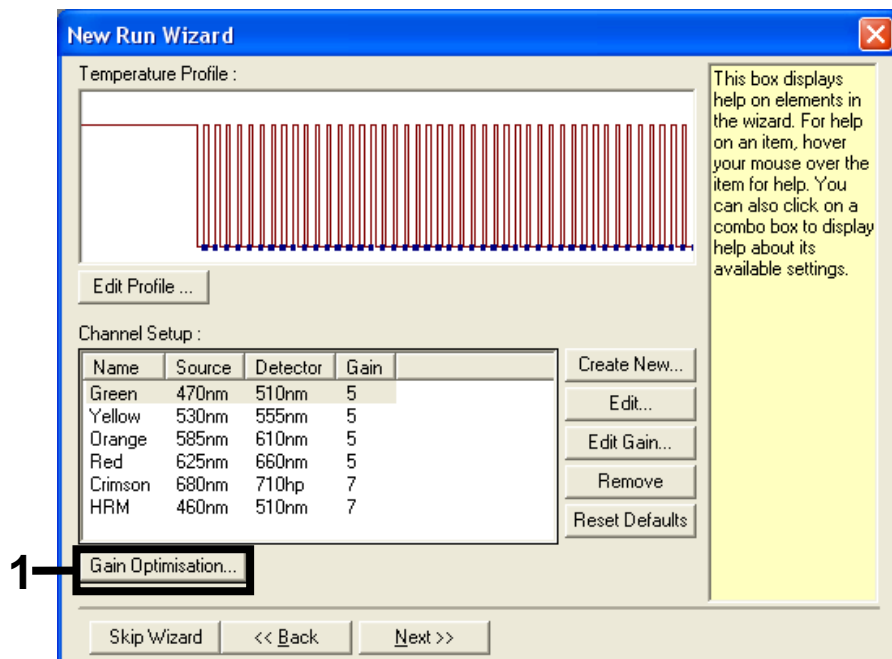
Slika 8. Očitavanje fluorescencije u koraku cikliranja na 60°

12. Označite treći korak i obrišite klikanjem na dugme "-". Kliknite "OK" (Slika 9).



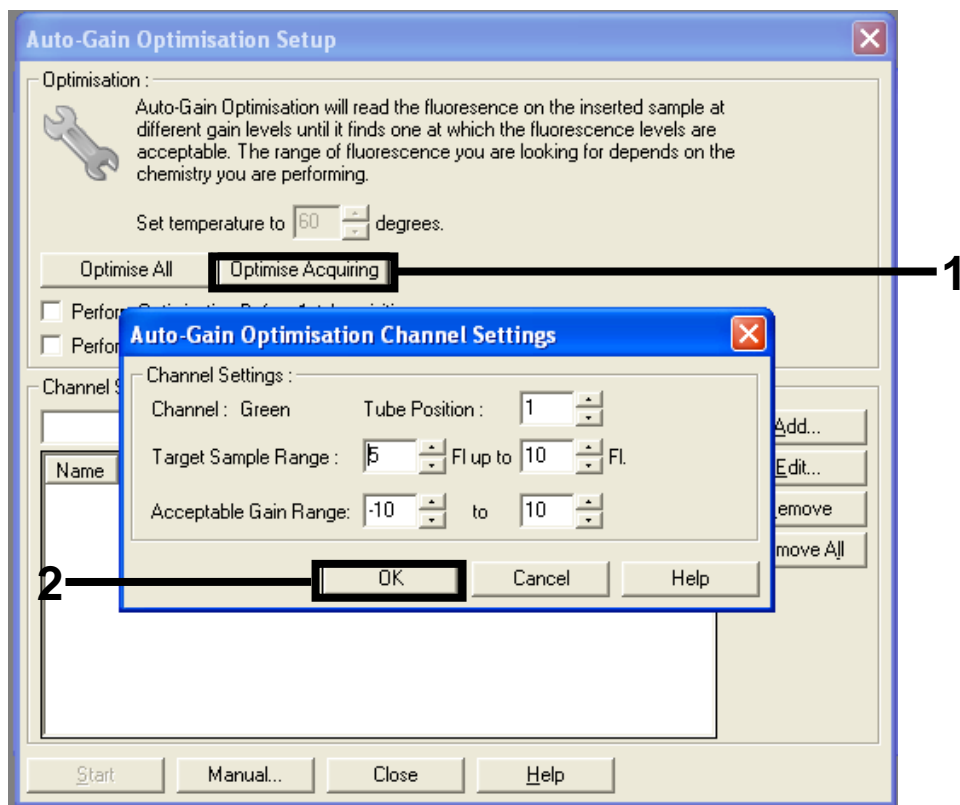
Slika 9. Uklanjanje koraka ekstenzije.

13. U sledećem prozoru, kliknite na dugme "Gain Optimisation" (Slika 10).



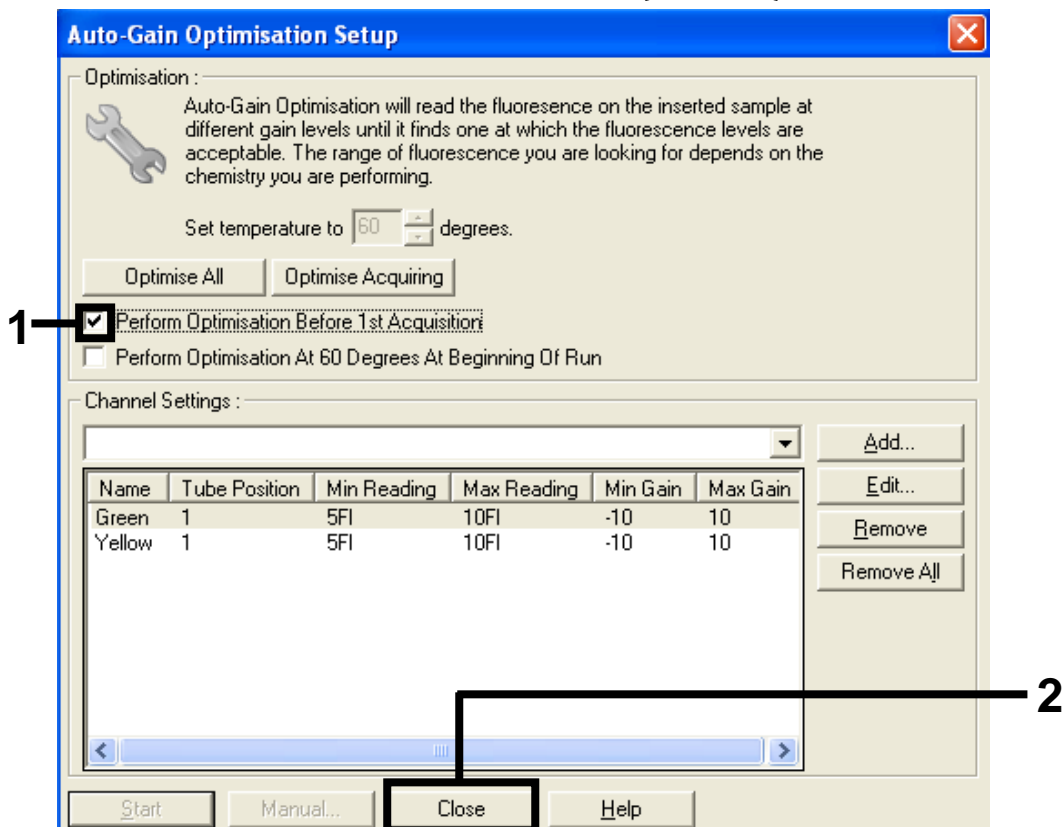
Slika 10. Optimizacija faktora optimizacije.

14. Kliknite dugme "Optimise Acquiring". Za svaki kanal se tada pokazuje podešavanje kanala. Prihvatite ove date vrednosti klikanjem "OK" za oba kanala (Slika 11).



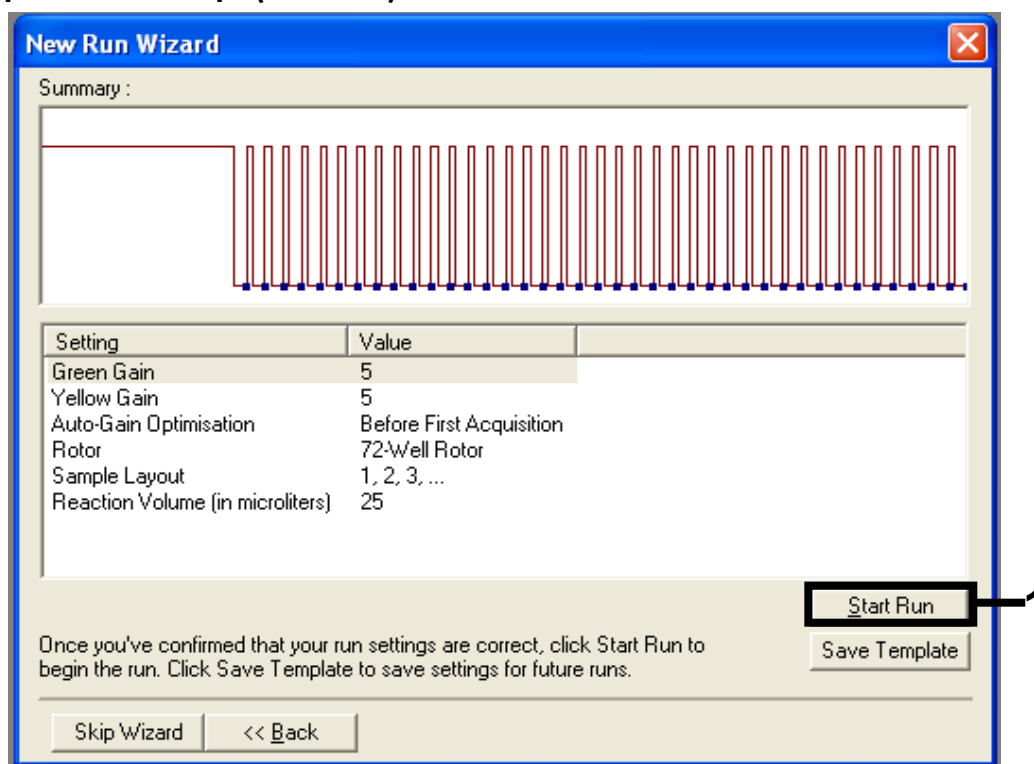
Slika 11. Auto-optimizacija faktora amplifikacije za zeleni kanal.

15. Označite kućicu "Perform Optimisation before 1st Acquisition", i kliknite dugme "Close" da se vratite u wizard (Slika 12).



Slika 12. Selekcija zelenih i žutih kanala.

16. Kliknite "Next" kako bi sačuvali templejt na odgovarajućoj lokaciji selektovanjem "Save Template".
17. Proverite rezime i kliknite "Start Run" da biste sačuvali fajl serije i pokrenuli seriju (Slika 13).



Slika 13. Startovanje serije.

18. Kada se pokrene serija, pojavljuje se novi prozor u koji možete uneti nazive uzoraka odmah ili kliknuti "Finish" i uneti ih kasnije selektovanjem tipke "Sample" u toku trajanja serije, ili onda kada se serija završi.
19. Kada je serija završena, analizirajte podatke prema odgovarajućem protokolu:
 - Za procenu uzoraka, pogledajte "Procena uzoraka analizom podataka", strana 28.
 - Za procenu mutacija, pogledajte "EGFR analiza podataka o mutaciji", strana 31.

Interpretacija rezultata

ΔC_T metod analize

Škorpion real-time testovi koriste onaj broj PCR ciklusa koji je neophodan za detekciju fluorescentnog signala iznad pozadinskog signala za merenje ciljnih molekula prisutnih na početku reakcije. Tačka pri kojoj je detektovan signal iznad pozadinske fluorescencije naziva se granični ciklus (cycle threshold, C_T).

ΔC_T vrednosti uzoraka računaju se kao razlika između C_T mutacije i C_T kontrole iz istog uzorka:

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutacije} - C_T \text{ kontrole}$$

Napomena: Uzorci se klasifikuju kao pozitivni na mutaciju ako daju ΔC_T manji od cut-off ΔC_T vrednosti za taj test. Iznad ove vrednosti, uzorak može ili sadržati mutaciju koja je toliko mala da se ne može detektovati kompletno (ispod granice testova), ili je uzorak negativan na mutaciju.

Napomena: Vrednosti C_T mutacije od 40 ili više biće ocenjene kao negativne ili ispod granica detekcije kompleta.

Kada se koriste ARMS prajmeri, može doći do nekog nepotpunog prajminga koji daje kasni C_T pozadine iz DNK koja ne sadrži mutaciju. Sve ΔC_T vrednosti koje se računaju iz pozadinske amplifikacije biće veće od cut-off ΔC_T vrednosti i uzorak će biti klasifikovan kao negativan na mutaciju.

Procena uzoraka analizom podataka

Kada je serija završena, analiziraju se podaci prema sledećoj proceduri.

Podešavanje softvera za analize

1. Otvorite odgovarajući fajl upotrebom Rotor-Gene Q serije softvera, verzije (2.0.2) i novije.
2. Proverite da li su uzorci obeleženi.
3. Kada ste na strani praznog kanala za svaki detektor/kanal, kliknite "Option" i unesite *Crop start cycles*. Na stranici sa "Remove data before cycles", unesite 15 i kliknite "OK".
4. Kliknite "Analysis". Na stranici analiza, kliknite "Cycling A (from 15), Yellow" da proverite HEX kanal.
5. Proverite da li je markirana "dynamic tube". Kliknite "Slope correct" i "Linear scale".
6. Podesite prag na 0.02 i proverite HEX C_T vrednosti.
7. Na stranici analiza, kliknite "Cycling A (from 15), Green" kako biste pogledali FAM kanal.
8. Dinamičnu tubicu treba markirati. Kliknite "Slope correct" i "Linear scale".
9. Podesite prag na 0.075 i proverite FAM C_T vrednosti.

Nakon što se završi serija, analizirajte podatke na sledeći način.

- **Negativna kontrola:** Da ne bi došlo do kontaminacije templejta, NTC ne sme davati, u zelenom (FAM) kanalu, vrednost za C_T manju od 40. Potražite u "Napomene za interpretaciju podataka", na strani 36, važne informacije o analizama kriva bez kontrole templejta (no template control, NTC). Da biste ispravno postavili seriju, NTC mora pokazivati amplifikaciju od 31-37 u žutom (HEX) kanalu.

Rezultati uzoraka se moraju odbaciti ako se javi pozitivno pojačanje u zelenom kanalu i/ili pojačanje izvan opsega 31-37 u žutom signalu.

- **Pozitivna kontrola:** The EGFR Pozitivna Kontrola (Positive Control, PC) mora dati C_T kontrole (FAM kanal) od 26.26–30.95. Serija sa C_T vrednosti izvan ovog opsega ukazuje na problem u postavljanju testa i seriju treba označiti kao neuspelu. Ako je C_T pozitivne kontrole od 26.26-30.95 (exon 2, FAM), a C_T unutrašnje kontrole (HEX) izvan opsega 31-37, nastavite sa analizama.

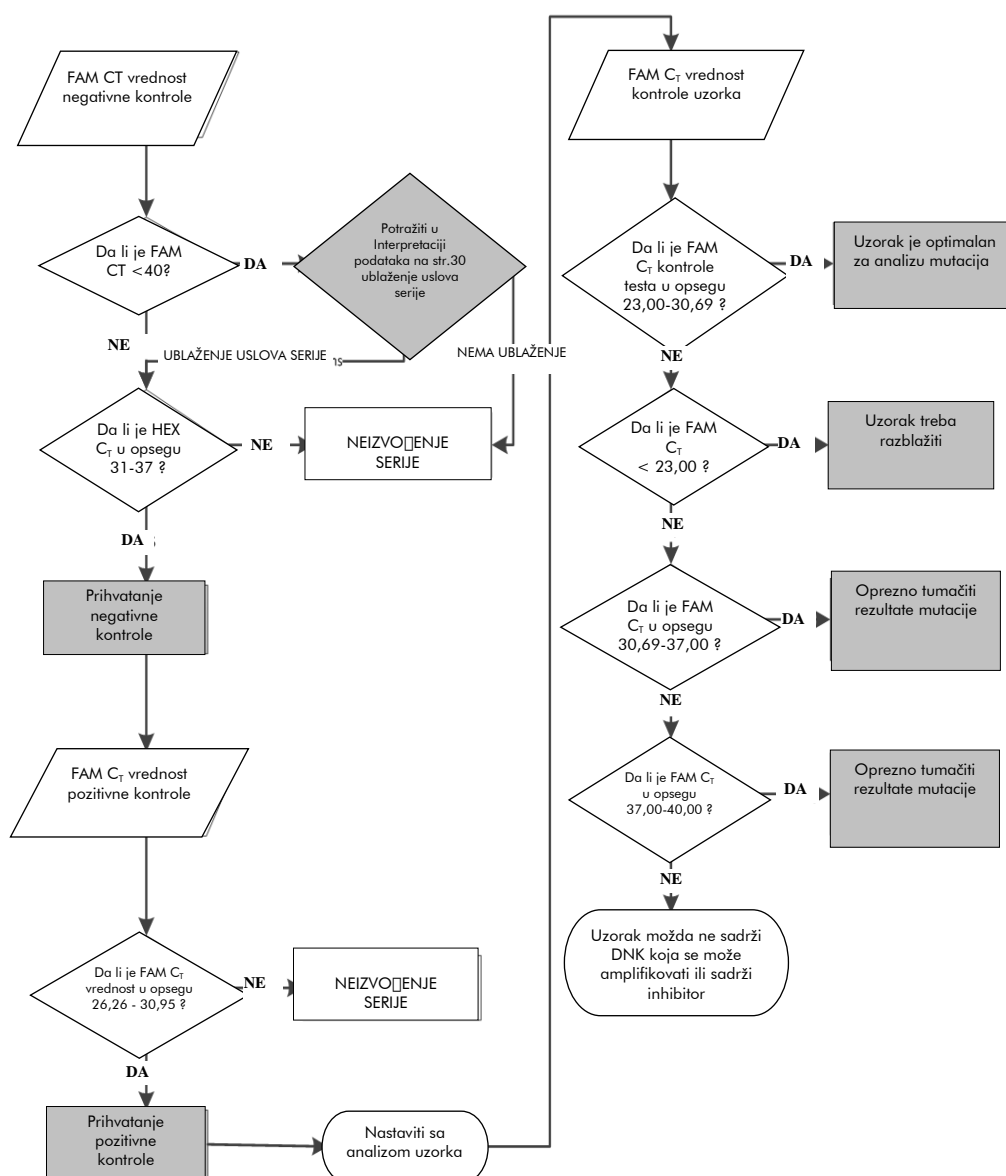
Napomena: Podaci o uzorcima ne smeju se koristiti ako bilo koja od ove dve serije kontrola nije uspeła.

Kada su obe serije kontrola validne, C_T vrednost svakog uzorka mora se nalaziti u okviru opsega 23-30.69 u zelenom (FAM) kanalu. Ako je uzorak izvan ovog opsega, predviđeno je sledeće uputstvo.

- **Uzorak sa C_T kontrole <23:** Uzorci sa C_T kontrole <23 dovešće do preopterećenja testova i moraju se razblažiti. Da bi se detektovale sve male količine mutiranih DNK, jako koncentrovani uzorci se moraju razblažiti kako bi upali u navedeni opseg s tim što se razblaženjem na pola, C_T povećava za 1.
- **Uzorak sa C_T kontrole od 30.69–37:** Oprezno interpretirajte pošto veoma male količine mutiranih DNK mogu da prođu nedetektovane.
- **Uzorak sa C_T kontrole od 37–40:** Oprezno interpretirajte pošto se mogu detektovati samo velike količine mutiranih DNK.
- **Uzorak sa C_T kontrole >40:** Uzorak ne sadrži dovoljno DNK da bi se izvela analiza.

Napomena: Ako uzorak ne generiše C_T (npr., $C_T > 40$), to može biti zbog prisustva inhibitora, greške u postavci testa, ili ako ne sadrži EGFR DNK koja se može amplifikovati.

- **C_T vrednost unutrašnje kontrole od 31–37:** Nema EGFR DNK koja se može amplifikovati.
- **C_T vrednost unutrašnje kontrole ne nalazi se u opsegu 31–37:** Ovo može da ukaže na grešku u postavci testa ili prisustvo inhibitora. Efekat inhibitora može se redukovati razblaženjem uzorka, iako će se na taj način razblažiti i DNK.



Slika 14. Tok rada kod analize procene uzorka.

EGFR analiza podataka o mutaciji

Kada je završeno izvođenje testa, analizirajte podatke prema sledećoj proceduri.

Postavljanje softvera za analize

1. Otvorite odgovarajući fajl koristeći Rotor-Gene Q seriju softvera, verzije (2.0.2) i novije.
2. Proverite da li su uzorci obeleženi.
3. Kada ste na stranici praznog kanala za svaki detektor/kanal, kliknite "Options" i unesite Crop start cycles. Na stranici sa "Remove data before cycle", unesite 15 i kliknite "OK".
4. Kliknite "Analysis". Na stranici analiza, kliknite "Cycling A (od 15), Yellow" da biste videli HEX kanal.
5. Proverite da li je "dynamic tube" označena. Kliknite "Slope correct" i "Linear scale".
6. Postavite prag (threshold) na 0.02 i proverite HEX CT vrednosti.
7. Na stranici analize, kliknite "Cycling A (od 15), Green" da biste videli FAM channel.
8. Proverite da li je "dynamic tube" označena. Kliknite "Slope correct" i "Linear scale".
9. Postavite prag na 0.075 i proverite FAM CT vrednosti.

Analiza kontrole serije:

Pogledajte blok dijagram "Analiza kontrole serije" na Slici 15.

- **Negativna kontrola:** Da biste bili sigurni da kontaminacije templejta nije prisutna, NTC ne sme dati C_T vrednost manju od 40 u zelenom (FAM) kanalu. Pogledajte u "Napomenama za interpretaciju podataka" strana 36 važne informacije o analizama kriva bez kontrole templejta (no template control, NTC). NTC mora pokazati amplifikaciju od C_T 31-37 u žutom (HEX) kanalu, ako je serija ispravno postavljena.

Ako postoji pozitivna amplifikacija u zelenom kanalu i/ili amplifikacija izvan opsega 31-37 u žutom signalu, rezultati uzorka se moraju odbaciti.

- **Pozitivna kontrola:** EGFR Pozitivna Kontrola (PC) mora dati C_T kontrole od 26.26–30.95 u zelenom kanalu. Serija sa C_T vrednosti izvan ovog opsega ukazuje na problem u postavci i seriju treba proglasiti neuspehom. Ako je C_T pozitivne kontrole od 26.26–30.95 (exon 2, FAM) ali C_T unutrašnje kontrole (HEX) izvan opsega 31–37, nastavite se sa analizom.

Izračunajte ΔC_T vrednost za svaku mutaciju na sledeći način, vodeći računa da C_T vrednosti mutacije i kontrole potiču od pozitivne kontrole.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutacije} - C_T \text{ kontrole}$$

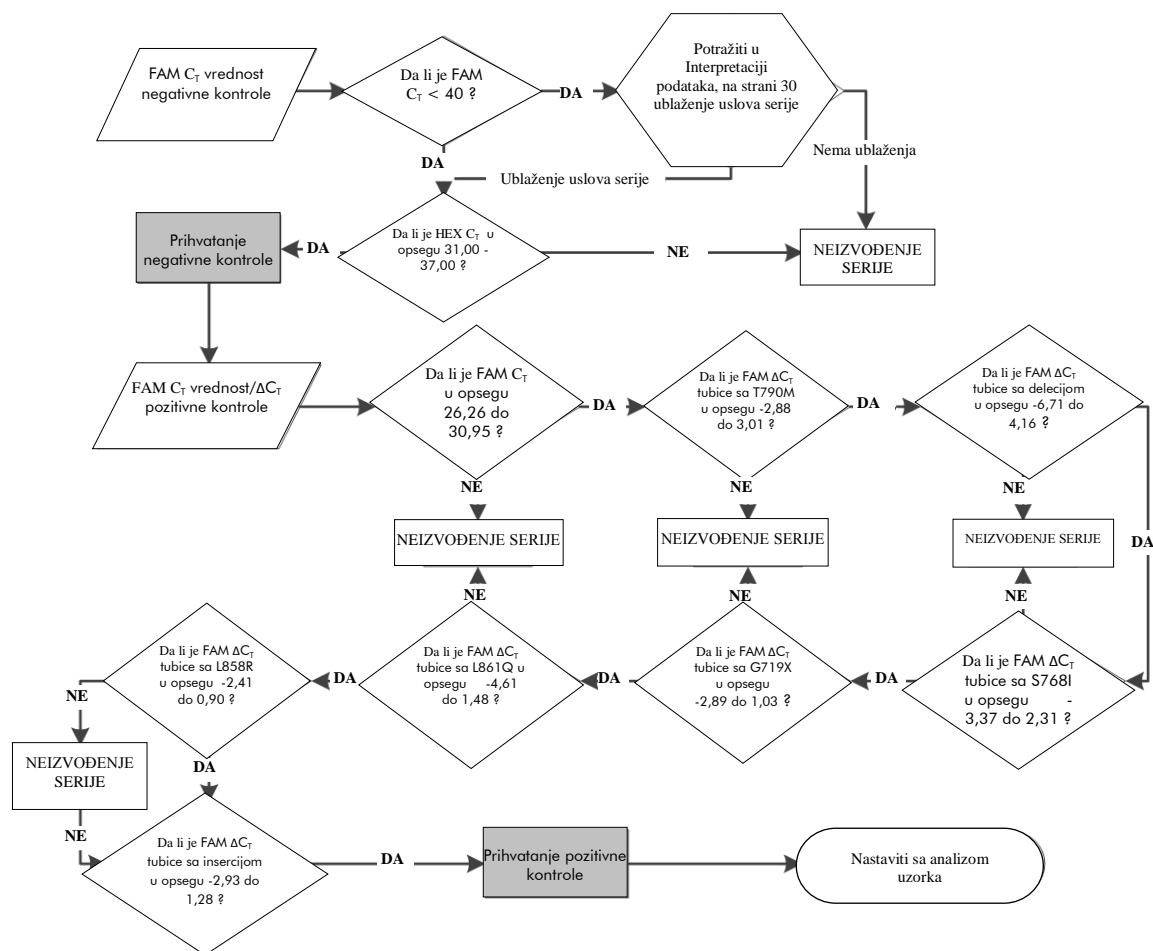
ΔC_T vrednosti EGFR Pozitivne Kontrole (PC) treba da se nađu u okviru vrednosti koje su date u Tabeli 7.

Tabela 7. Očekivane ΔC_T vrednosti pozitivne kontrole *

Test	ΔC_T vrednost pozitivne kontrole
T790M	–2,88 do 3,01
Delecije	–6,71 do 4,16
L858R	–2,41 do 0,90
L861Q	–4,61 do 1,48
G719X	–2,89 do 1,03
S768I	–3,37 do 2,31
Insercije	–2,93 do 1,28

* Rotor-Gene Q softver (version 2.0.2)

Napomena: Podaci o uzorku ne smeju se koristiti ako testiranje negativne ili pozitivne kontrole ne uspe.



Slika 15. Tok rada analize kontrole serije.

Analiza uzorka:

FAM C_T vrednost kontrole uzorka

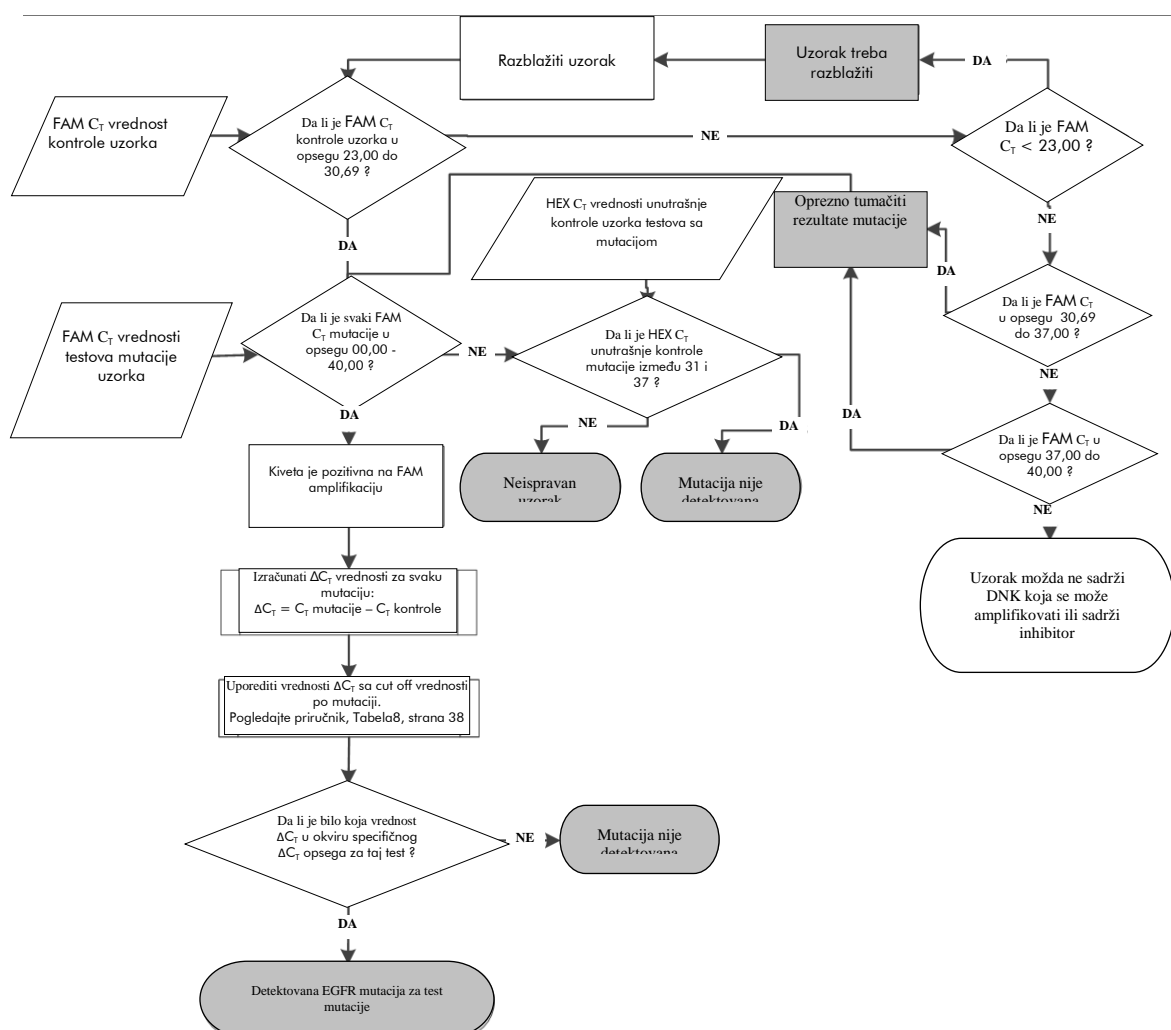
Ako su serije obe kontrole validne, C_T vrednost kontrole svakog uzorka mora se nalaziti u opsegu od 23–30.69 u zelenom kanalu. Pogledajte dijagram "Analiza uzorka" na Slici 16.

- **C_T kontrole uzorka < 23:** Uzorci sa C_T kontrole < 23 dovešće do preopterećenja testova mutacije i moraju se razblažiti. Da bi se detektovale sve male količine mutiranih DNK, jako koncentrovani uzorci se moraju razblažiti kako bi se našli u gore navedenom opsegu s tim da razblaživanjem na pola, C_T raste za 1.
- **C_T kontrole uzorka u opsegu od 30.69–37:** Oprezno tumačiti, pošto se jako male količine mutiranih DNK možda neće detektovati.
- **C_T kontrole uzorka u opsegu od 37–40:** Oprezno tumačiti, pošto se samo velike količine mutiranih DNK mogu detektovati.
- **C_T kontrole uzorka > 40:** Uzorak ne sadrži dovoljno DNK za izvođenje analize.

Napomena: Ako uzorak ne generiše C_T (npr., $C_T > 40$), to može biti zbog prisustva inhibitora, greške u postavci testa, ili ako nema EGFR DNK koja se može amplifikovati.

- **C_T vrednost unutrašnje kontrole od 31–37:** Test korektno funkcioniše, ali nema EGFR DNK koja se može amplifikovati.
- **C_T vrednost unutrašnje kontrole nije u opsegu od 31–37:** Ovo može ukazivati na grešku u postavci testa ili na prisustvo inhibitora. Razblaženjem uzorka moguće je redukovati efekat inhibitora, iako će se na ovaj način razblažiti i DNK.

Napomena: Ako FAM reakcija u testu mutacije ne generiše C_T vrednost a reakcije unutrašnje kontrole generišu C_T vrednost izvan opsega od 31–37, podaci se moraju odbaciti pošto mogu biti prisutni inhibitori, što može dovesti do lažno negativnih rezultata. Razblaživanjem uzorka može se redukovati efekat inhibitora, ali treba napomenuti da se na ovaj način razblažuje i DNK.



Slika 16. Tok rada analize mutacija.

FAM C_T vrednost mutacije uzorka

FAM vrednosti za svih sedam reakcionih mikseva mutacije treba uporediti sa vrednostima navedenim u Tabeli 8.

Tabela 8. Prihvatljive vrednosti (FAM) reakcije mutacije uzorka *

Test	Prihvatljiv opseg C _T	Cut off ΔC_T vrednost
T790M	15,00–40,00	6,38
Delecije	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
Insercije	15,00–40,00	7,91

* Prihvatljive vrednosti se nalaze u opsegu i obuhvataju prikazane vrednosti..

- Ako su FAM C_T u okviru navedenog opsega od 15.00–40.00, to je FAM amplifikacija pozitivno.
- Ako su FAM C_T iznad navedenog opsega, ili nema amplifikacije, to je FAM amplifikacija negativno.

Izračunajte ΔC_T vrednost za svaku mutaciju uzorka koja je pozitivna na amplifikaciju na sledeći način, vodeći računa da C_T vrednost mutacije i kontrole potiču od istog uzorka.

$$\Delta C_T = C_T \text{ mutacije} - C_T \text{ kontrole}$$

Uporedite ΔC_T vrednost za uzorak sa cut-off tačkom aktuelnog testa (Tabela 8), vodeći računa da se tačna cut-off tačka primenjuje u svakom testu.

Cut-off tačka je tačka iznad koje pozitivan signal može potencijalno biti zbog signala pozadine ARMS prajmera na wild tipu DNK. Ako je ΔC_T vrednost uzorka veća od cut-off tačke, to se klasifikuje kao "mutacija nije detektovana" ili izvan granica detekcije kompleta. Ako je vrednost uzorka na ili ispod cut-off tačke, uzorak se smatra pozitivnim na mutacije detektovane ovim testom.

Napomena: Za uzorke koji ne pokazuju FAM C_T mutacije, potrebno je proceniti (HEX) C_T unutrašnje kontrole kako bi se odredilo da li mutacija nije detektovana ili test nije ispravan. Ako je HEX C_T vrednost između 31 i 37, tada mutacija nije detektovana. Ako je HEX C_T vrednost izvan opsega 31–37, tada uzorak nije ispravan.

Ukratko, za svaki uzorak, svakoj reakciji mutacije biće dodeljen status: mutacija detektovana; mutacija nije detektovana, ili neispravna, upotrebom sledećih kriterijuma.

- **Mutacija detektovana:** FAM amplifikacija pozitivna i ΔC_T su na ili ispod cut-off vrednosti. Ako su detektovane višestruke mutacije, sve može biti prijavljeno.
- **Mutacija nije detektovana:**
FAM amplifikacija pozitivna i ΔC_T su iznad cut-off vrednosti.
FAM amplifikacija negativna i HEX (unutrašnja kontrola) amplifikacija pozitivna.
- **Neispravna:**
FAM amplifikacija negativna i HEX amplifikacija izvan specifikacija.

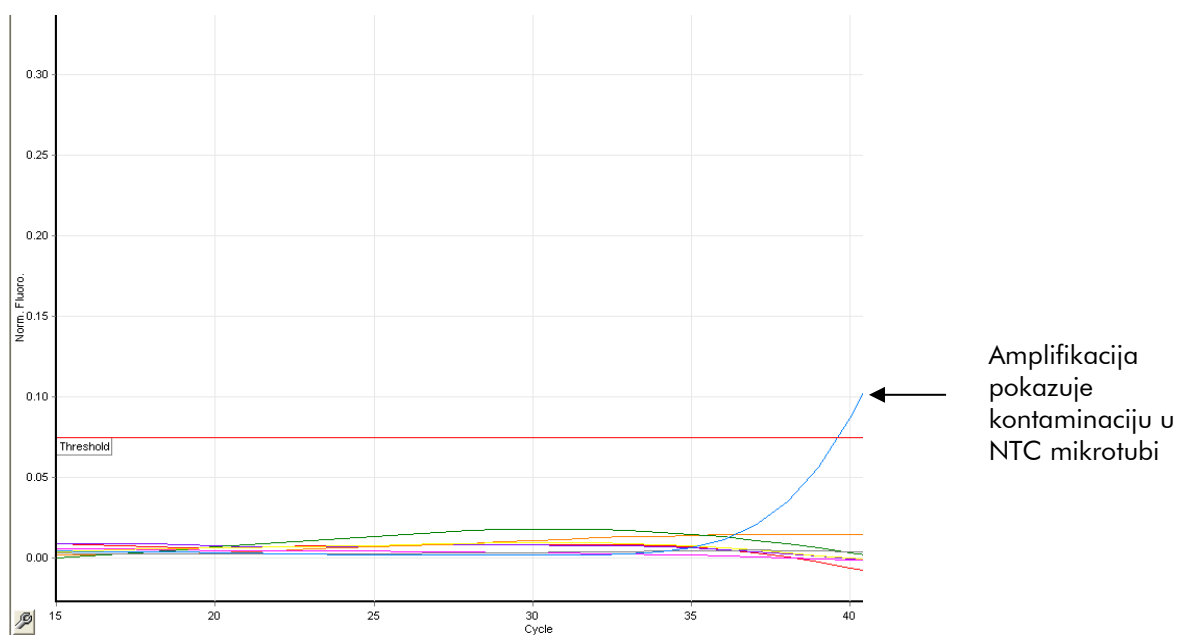
Napomene za interpretaciju podataka

Linearna amplifikacija

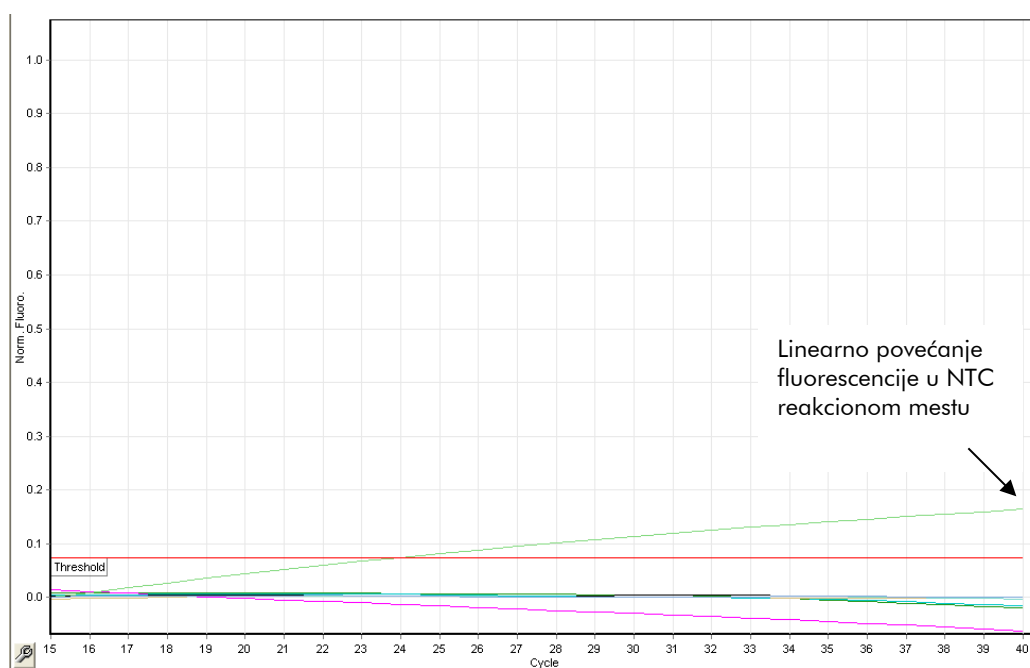
Rotor-Gene Q krive svih reakcija treba proveriti. Povremeno se zapaža porast signala fluorescencije u NTC i u negativnim uzorcima. Ako je ovo slučaj i C_T vrednost je dostignuta, od korisnika se traži da razgraniči pojavu prave amplifikacije, što bi ukazalo na kontaminaciju u NTC, i linearan porast fluorescencije, koji se pojavio zbog fluorescencije nečistoća.

Analiza NTC

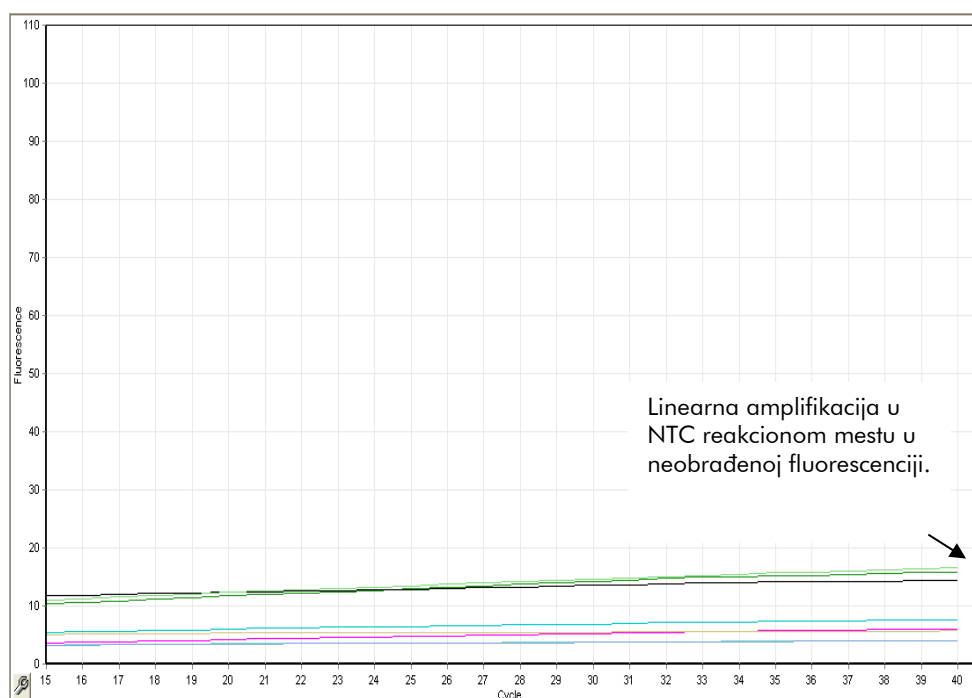
Slike 17–18 pokazuju dva primera ponašanja NTC uzoraka. Na Slici 17, vidi se nelinearna (prava amplifikacija) zbog kontaminacije uzorka. Ovu seriju treba odbaciti i uzorke ponovo testirati. Na Slici 18, uočava se linearna amplifikacija u NTC. Pod ovim okolnostima, treba pregledati neobrađenu očitanu fluorescenciju. Odgovarajuća kriva neobrađene očitane fluorescencije prikazana je na Slici 19, i ona pokazuje linearni porast fluorescencije pre nego pojavu prave amplifikacije. Podaci o ovoj seriji mogu se koristiti, pod uslovom da su pozitivna i interna kontrola prihvaćene. U poređenju sa Slikom 19, Slika 20 pokazuje podatke o neobrađenoj očitanoj fluorescenciji gde je došlo do prave amplifikacije. Pod ovim uslovima, podatke treba odbaciti i uzorke ponovo testirati pošto ovo pokazuje da je prisutna kontaminacija.



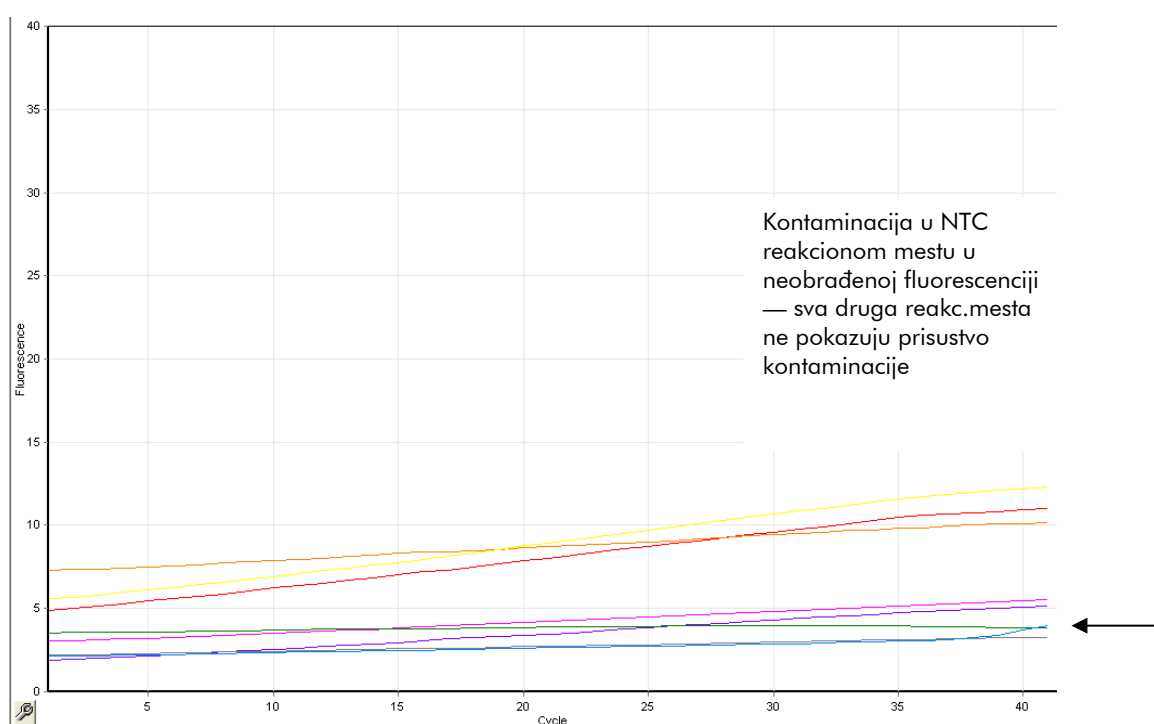
Slika 17. Kontaminacija kod NTC testa u analiziranoj seriji.



Slika 18. Primer linearnog povećanja fluorescencije u NTC reakcionom mestu.



Slika 19. Neobrađena fluorescencija sa Slike 18.

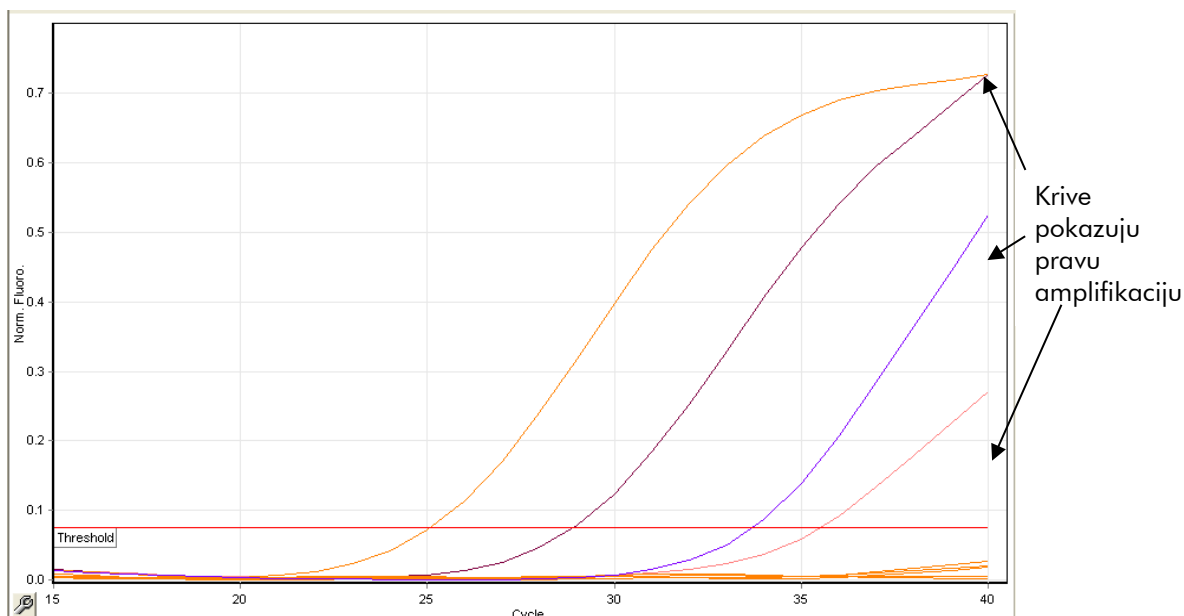


Slika 20. Podaci neobrađene očitane fluorescencije koji pokazuju NTC reakciono mesto sa pojavom prave amplifikacije.

Analiza uzoraka

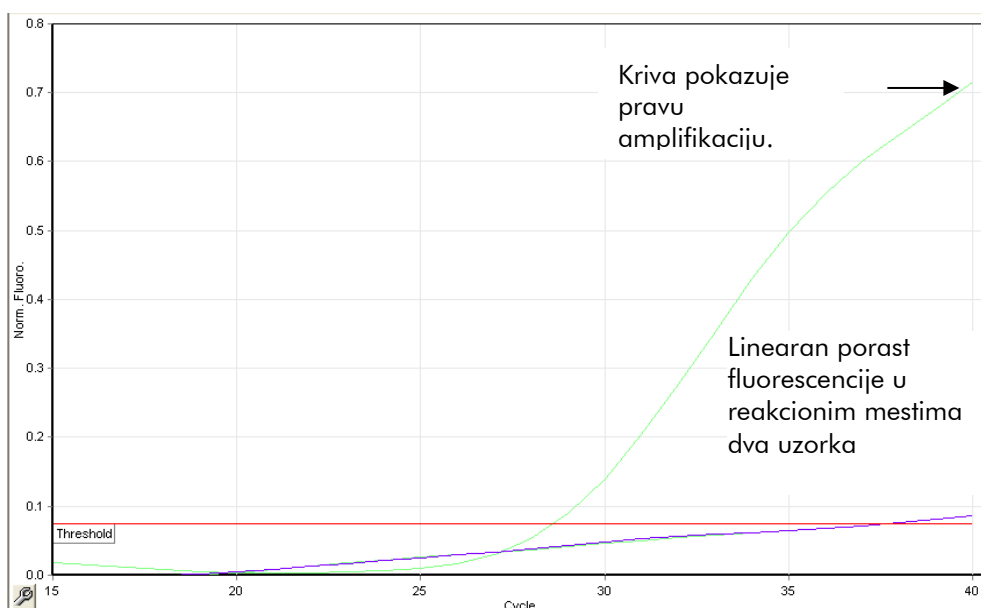
Slike 21–22 pokazuju dva primera amplifikacije u reakcijama uzorka. Primer prave amplifikacije u reakcionom mestu uzorka u analiziranoj seriji uočava se na Slici 21. Ako serija pokazuje ovaj tip sigmoidalne krive amplifikacije, to je prava amplifikacija i

podaci iz ove serije mogu se upotrebiti, po uslovom da su pozitivna i interna kontrola prihvaćene.

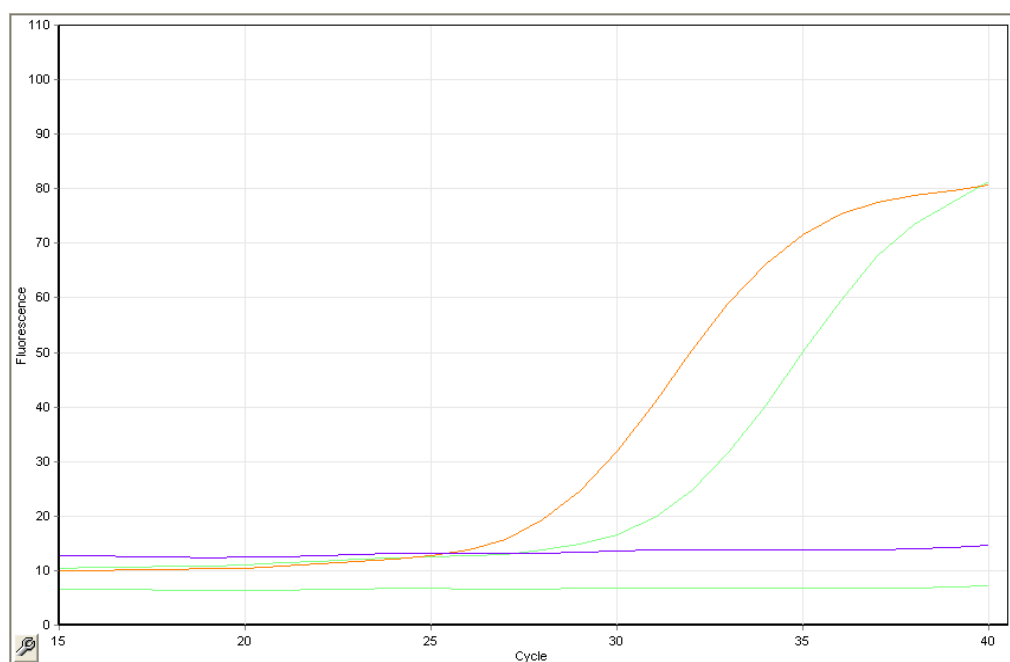


Slika 21. Prava amplifikacija u reakcionom mestu uzorka u analiziranoj seriji.

Na Slici 22 prikazan je primer linearne amplifikacije u reakciji uzorka. Pod ovim uslovima, treba pregledati podatke neobrađene očitane fluorescencije. Odgovarajuća kriva neobrađene očitane fluorescencije (Slika 23) pokazuje da linearan porast koje se uočava na Slici 22 korespondira sa linearnim porastom kod neobrađene fluorescencije i nije prava amplifikacija. Pod uslovom da su pozitivna i interna kontrola prihvaćene, rezultate uzorka iz ovih serija možete oprezno koristiti, tako da se linearna amplifikacija naziva "no C_T ".



Slika 22. Primer linearnog porasta fluorescencije u reakcionim mestima dva uzorka.



Slika 23. Neobrađena očitana fluorescencija sa Slike 22.

Vodič za rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može pomoći u rešavanju svih problema koji se mogu pojaviti. Više informacija možete naći na stranici the Frequently Asked Questions u našem Centru za tehničku podršku (Technical Support Center): www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naučnici u QIAGEN Tehničkim Službama uvek će rado odgovoriti na sva vaša pitanja koja možete imati o informacijama i protokolima u ovom priručniku ili o tehnologijama uzorkovanja i testiranja (za kontakt informacije pogledajte zadnju koranicu ili posetite www.qiagen.com).

Komentari i sugestije

Nema signala sa EGFR Pozitivnom Kontrolom (PC) u kanalu fluorescencije Cikliranje Zeleno

- | | |
|---|---|
| a) Odabran kanal fluorescencije za PCR analizu podataka ne odgovara protokolu | Za analizu podataka, odaberite kanal fluorescencije Cikliranje Zeleno za analitički EGFR PCR i kanal fluorescencije Cikliranje Žuto za PCR unutrašnje kontrole. |
| b) Pogrešno programiranje temperaturnog profila Rotor-Gene instrumenta | Uporedite temperaturni profil sa protokolom i ako je pogrešan, ponovite seriju. |
| c) Neispravna konfiguracija PCR-a | Proverite vaše korake u radu posredstvom šeme pipetiranja i ponovite PCR, ako je potrebno |
| d) Uslovi skladištenja za jedan ili više komponenti kompleta ne odgovaraju instrukcijama datim u "Čuvanje i rukovanje reagensima" (stranica 11) | Proverite uslove skladištenja i rok trajanja (pogledajte etiketu na kompletu) reagenasa i upotrebite novi kit, ako je potrebno. |
| e) Therascreen EGFR RGQ PCR Kitu je istekao rok trajanja | Proverite uslove skladištenja i rok trajanja (pogledajte etiketu na kompletu) reagenasa i upotrebite novi kit, ako je potrebno. |

Signali sa negativnim kontrolama u kanalu fluorescencije Cikliranje Zeleno analitičkog PCR

- | | |
|---|--|
| a) Kontaminacija se pojavila tokom pripreme PCR | <p>Ponovite PCR sa novim reagensima u replikatima.</p> <p>Ako je moguće, zatvorite PCR mikrotube direktno posle dodavanja uzoraka koje treba testirati.</p> <p>Uverite se da se radni prostor i instrumenti redovno dekontaminiraju.</p> |
|---|--|

Komentari i sugestije

b) Kontaminacija se pojavila tokom ekstrakcije	Ponovite ekstrakciju i PCR uzorka koji se testira upotrebom novih reagensa. Uverite se da se radni prostor i instrumenti redovno dekontaminiraju
--	---

Kontrola kvaliteta

U skladu sa QIAGEN's ISO-sertifikovanim sistemom za upravljanje kvalitetom, svaki lot theascreen EGFR RGQ PCR Kita testira se na unapred određene specifikacije kako bi se obezbedio konzistentan kvalitet produkta.

Ograničenja

Rezultate produkta treba tumačiti u kontekstu svih relevantnih kliničkih i laboratorijskih nalaza i ne treba ih izdvojeno koristiti za postavljanje dijagnoze.

Produkt treba da koristi isključivo specijalno obučeno i uvežbano osoblje za in vitro dijagnostičke procedure i Rotor-Gene Q.

Studije analitičke validnosti obuhvataju humanu DNK ekstrahovanu iz uzoraka tumorskog tkiva koji su fiksirani formalinom i ukalupljeni u parafinu.

Ovaj produkt je predviđen za upotrebu samo na Rotor-Gene Q real-time PCR cycler, 5plex HRM serije.

Potrebno je striktno se pridržavati *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Uputstva_kako bi se dobijali optimalni rezultati. Ne preporučuje se razblaživanje reagenasa na način koji nije opisan u priručniku pošto može dovesti do smanjenja performance.

Važno je da se količina i kvalitet DNK u uzorku procenjuje pre izvođenja analize uzorka koristeći *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Dodatni Kontrolni Reakcioni Miks (Ctrl) je obezbeđen kako bi se odredilo da li je C_T vrednost prihvatljiva za test. Ne treba koristiti čitanja apsorbancije, pošto ne koreliraju sa C_T vrednostima u fragmentiranim uzorcima DNK.

Treba obratiti pažnju na rokove trajanja i uslove skladištenja koji su odštampani na kutiji i etiketama svih komponenti. Nemojte koristiti komponente kojima je istekao rok ili koje su nepravilno skladišteni.

Karakteristike Performance

Cut-off vrednosti

171 FFPE uzorak je testiran upotrebom metode prema vodiču u NCCLS EP17-A (2004). Podaci od 159 uzoraka upotrebljeni su za postavljanje cut-off vrednosti za komplet. Ustanovljen C_T opseg za kontrolu je 23.00 do 30.69 C_T . Cut-off vrednosti su ustanovljene i prikazane u Tabeli 8.

Granica detekcije (Limit of detection, LOD)

Kako bi se odredila LOD za *Therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, set uzoraka je dobijen mešanjem sintetičkog mutant DNK sa wild tipom genomske DNK kako bi se simulirao opseg različitih procenata mutacije za svaki od 29 mutacija. LOD svakog testa definisan je kao procenat mutacije pri kojem se 95% replikata definiše kao pozitivan pomoću *therascreen* EGFR PCR RGQ Kita. LOD vrednosti date su u Table 9. Za testove multipleks formata, koji detektuju višestruke mutacije (G719X, delecije i insercije), data je vrednost za reakciju koja daje najveću LOD.

Tabela 9. LOD za svaki od sedam EGFR testova mutacije

Mutacije	Procenat detektovane mutacije (%)
T790M	7,02
Delecije	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Insercije	2,03

Preciznost

Za određivanje preciznosti *therascreen* EGFR RGQ PCR Kita, komplet uzoraka je dobijen mešanjem sintetičkog mutant DNK sa wild tipom genomske DNK kako bi se simulirao mali procenat mutacije za svaki od sedam testova mutacije. Preciznost je procenjena testiranjem uzoraka na jednom mestu za testiranje, upotrebom više šarži kita, operatera i izvođenja testa tokom različitih dana, sa dva replikata za svaki uzorak. Uočena varijabilnost, u vidu procenjene standardne devijacije iz Variance Component Analysis, bila je manja od 1 ΔC_T i može se koristiti kao procena preciznosti (Tabela 10).

Tableau 10. Rezultati intra-laboratorijskih testova

Test	Procenat pozitivnih rezultata testiranjem mutacija	Procena Standardne Devijacije (ΔC_T)
T790M	100 %	0,33
Delecije	100 %	0,40
L858R	100 %	0,45
L861Q	100 %	0,49
G719X	97,9 %	0,59
S768I	97,9 %	0,31
Insercije	97,9 %	0,38

* 93 replikata testirano je za svaku mutaciju.

Reproducibilnost

Reproducibilnost procenjena je testiranjem uzoraka sa visokim stepenom mutacije u pozadini wild tipom genomske DNA na tri mesta za testiranje, upotrebom višetrukih kit batches, operators i serija, tokom različitih dana, sa dva replikata od svakog uzorka. Za svih sedam testova mutacije 96.1–100% uzoraka mutantnih DNK bilo je pozitivno na mutaciju. Uzorci wild tipa bili su negativni na mutaciju u svim testovima za sva mesta.

Efekat na koncentraciju ulazne DNK

Da bi se odredio efekat promene koncentracije ulazne DNK na rezultate dobijene *therascreen* EGFR RGQ PCR Kitom bliske LOD, napravljen je set uzoraka za svih 29 mutacija mešanjem sintetičke mutantne DNK sa wild tipom genomske DNK da bi se dobili uzorci sa niskim, srednjim i visokim ukupnim nivoima ulazne DNK.

Visoki i niski nivoi ulazne DNK birani su tako da predstavljaju opseg C_T vrednostu za kontrolu (23.50 do 29.50).

Procena podataka seta ulaznih DNK (29 mutacija, pri koncentracijam bliskim LOD i pri tri različita nivoa ulazne DNK) pokazuju nivo od 95.44% pozitivnih mutacija.

Ovi podaci pokazuju da promenom nivoa ulazne DNK, u okviru radnog opsega testa, ne dolazi do uticaja na ΔC_T ili procenu prisustva mutacije uzorka.

Interferirajuće supstance

Procenjen je efekat supstanci koje bi se potencijalno mogle preneti iz QIAGEN® QIAamp DNK FFPE Tissue Kita tokom obrade FFPE uzoraka na performanse kita.

Formalin, parafinski vosak, ksilen, etanol, pufer ATL, proteinaza K, pufer AL, puffer za ispiranje AW1, i pufer za ispiranje AW2 upotrebljeni si pri najvišim ("najgori slučaj") očekivanim koncentracijama (pod pretpostavkom da svaki korak ispiranja ili prečišćavanja u protokolu kita za ekstrakciju dovodi do redukcije koncentracije komponente za 1 log).

U studiji su se pre koristili LOD uzorci tri puta pre nego jako visok nivo mutacije kako bi se sigurno detektovala potencijalna interferencija.

Smatra se da razlika ΔC_T od ≥ 3 standardne devijacije (preuzeto iz studije o preciznosti) između "testa" i "kontrole" (i.e., nema interferirajuće supstance) ukazuje na potencijalnu interferenciju.

Nijedna od potencijalno interferirajućih supstanci koje su procenjene nije imala promenu $\Delta C_T \geq 1$ standardne devijacije u poređenju sa kontrolama.

Reference

QIAGEN održava veliku, ažuriranu online bazu podataka naučnih publikacija utilizing QIAGEN products. Opcije uporedne pretrage omogućavaju vam da pronađete članke koji su vam potrebni, pretragom pomoću jednostavne ključne reči ili pomoću aplikacije, oblasti istraživanja, naslova, itd.

Da biste dobili kompletnu listu referenci, posetite online bazu podataka QIAGEN Referenci na www.qiagen.com/RefDB/search.asp ili kontaktirajte QIAGEN Tehničke službe ili vašeg lokalnog distributera.

Symbols



<N>

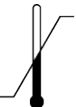


Sadrži reagense dovoljno za <N> testova



Upotrebljiv do



In vitro diagnostički medicinski uređaj

REF	Kataloški broj
LOT	Broj lota
MAT	Broj materijala
COMP	Komponente
CONT	Sadrži
NUM	Broj
	Ograničenje temperature
	Proizvođač
	Proučite uputstvo za upotrebu

Informacije o kontaktu

Tehničku pomoć i više informacija potražite u našem Centru za tehničku podršku na adresi www.qiagen.com/Support, telefon 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od QIAGEN odeljenja za tehničku pomoć ili lokalnim dobavljačima (pogledajte poledinu ili posetite adresu www.qiagen.com).

Dodatak: Detalji o Mutacijama

Svi COSMIC ID su preuzeti iz *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*
<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>.

Tabela 11. Lista mutacija i odgovarajućih COSMIC ID.

Mutacija	Exon	Promena baze	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	
Insercije	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delecije	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (kompleks)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (kompleks)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (kompleks)	12422
		2238_2252>GCA (kompleks)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

Tabela 11. Lista mutacija i odgovarajućih COSMIC ID (nastavak)

Mutacije	Exon	Promena baze	COSMIC ID
Delecije	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (kompleks)	12382
		2239_2258>CA (kompleks)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (kompleks)	12383

Informacije o Porudžbini

Produkt	Sadržaj	Kat.br.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Za 24 reakcije: 1 Test Kontrola, 7 Testova Mutacije, Pozitivna Kontrola, <i>Taq</i> DNK Polimeraza	870111
Rotor-Gene Q i dodaci		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyler i High Resolution Melt analizator sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, tamno crveni) plus HRM kanal, laptop kompjuter, softver, dodaci, 1 godine garancije za delove i upotrebu, instalacija i obuka nisu obezbeđeni	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyler i High Resolution Melt analizator sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, tamno crveni) plus HRM kanal, laptop kompjuter, softver, dodaci, 1 godina garancije za delove i upotrebu, instalacija i obuka	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Real-time PCR cyler i High Resolution Melt analizator sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, tamno crveni) plus HRM kanal, laptop kompjuter, softver, dodaci, 1 godina garancije za delove i upotrebu, instalacija i obuka nisu obezbeđeni	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Real-time PCR cyler i High Resolution Melt analizator sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, tamno crveni) plus HRM kanal, laptop kompjuter, softver, dodaci, 1 godina garancije za delove i upotrebu, instalacija i obuka	9001580
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcije sa jednokanalnom pipetom u 72 x 0.1 ml mikrotuba	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 stripova od 4 mikrotube i zatvarači za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 stripova od 4 mikrotube i zatvarači za 10,000 reakcija	981106

Sve novije informacije o licenciranju i odricanjima specifičnim za produkt, potražite u odgovarajućem QIAGEN kit priručniku ili uputstvu za korišćenje. QIAGEN kit priručnici i uputstva za korišćenje dostupni su na www.qiagen.com a možete ih tražiti i od QIAGEN Tehničkog servisa ili od vašeg lokalnog distributera.

Ova stranica je namerno ostavljena prazna.

Kupovinom ovog produkta kupac može da ga koristi za izvođenje dijagnostičkih usluga u humanoj in vitro dijagnostici. Ovim nije dozvoljena nijedna zajednička dozvola ili druga licenca bilo koje druge vrste osim ovog specifičnog prava na korišćenje stečenog kupovinom.

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

Therascreen EGFR RGQ PCR Komplet je CE-obebežen dijagnostički komplet u skladu sa Evropskom In Vitro Dijagnostičkom Direktivom 98/79/EC. Nije dostupna u svim zemljama.

Sporazum o ograničenoj licenci za komplet *therascreen* EGFR RGQ PCR

Upotreba ovog produkta označava saglasnost kupca ili korisnika produkta sa sledećim uslovima:

1. Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučenih komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu i dodatnim protokolima dostupnim na adresi www.qiagen.com. Neke od ovih dodatnih protokola su obezbedili korisnici QIAGEN proizvoda za korisnike QIAGEN proizvoda. Kompanija QIAGEN nije detaljno testirala niti optimizovala te protokole. QIAGEN ne daje garancije za njih niti tvrdi da oni ne krše prava nezavisnih proizvođača.
2. Osim posebno navedenih dozvola, QIAGEN ne pruža garanciju da ovaj komplet i/ili njegova upotreba(e) ne narušava prava trećih strana.
3. Dozvoljeno je ovaj Komplet i njegove komponente jednom upotrebiti i ne mogu se ponovo koristiti, osvežiti ili ponovo prodati.
4. QIAGEN naročito ne priznaje druge licence, direktno navedene ili one koje se podrazumevaju osim onih posebno navedenih.
5. Kupac i korisnik Kit pristaje da ne ustupa ili dopušta drugom licu da preduzima bilo kakve korake koji mogu dovesti do ili olakšati bilo koje nedozvoljene radnje gore nevedene. QIAGEN može staviti na snagu zabranu Ugovora o ograničenoj licenci u bilo kom Sudu, i pokriće sve troškove istrage i sudske troškove, uključujući angažovanje advokata u bilo kom postupku da se pribavi ovaj Ugovor o ograničenoj licenci ili bilo koja prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na Komplet i/ili njegove komponente.

Za sve ažurirane uslove licence, posetite www.qiagen.com.

© 2012–2013 QIAGEN, sva prava zadržana.

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

