

Tammikuu 2019

therascreen[®] EGFR RGQ PCR -sarjan käsikirja



Versio 2



In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx -laitteiden kanssa



874111



QIAGEN Manchester Ltd Skelton House, Lloyd Street North,
Manchester, M15 6SH, UK



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, SAKSA



1116287FI



Sisältö

Käyttötarkoitus.....	6
Yhteenveto ja selitykset.....	7
Menetelmän toimintaperiaate.....	9
Toimitetut materiaalit.....	14
Sarjan sisältö.....	14
Tarvitavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen).....	15
Varoitukset ja varotoimet.....	17
Yleiset varotoimet.....	17
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	19
Kuljetusolosuhteet.....	19
Säilytysolosuhteet.....	19
Näytteen käsittely ja säilytys.....	20
Toimenpide.....	21
DNA:n uuttaminen ja valmistelu.....	21
Protokolla: Näytteen arviointi.....	22
Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen.....	34
Tulosten tulkinta (automaattinen).....	47
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR -testipakkauksen merkinnät.....	48
Vianetsintä.....	53
Laadunvarmistus.....	54
Rajoitukset.....	54
Suorituskykyominaisuudet.....	55

Analyttinen suoritus	55
LOB (Limit of blank), toiminta-alue ja raja-arvot	55
Lähtö-DNA:n vaikutus ΔC_T -arvoihin	56
Ristireagoivuus	56
Tarkkuus: Vertailu analyttiseen vertailumenetelmään	57
Havaitsemisraja (LOD) -arvot	58
Häiriöt	59
Uusittavuus	60
Kliininen suorittaminen	63
Kliinisten tulosten tiedot: GIOTRIF®	63
Kliinisten tulosten tiedot: IRESSA®	65
Lähdeviitteet	68
Merkinnät	70
Liite A: <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR -sarjan manuaalinen protokolla	71
Yleistä	71
Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen	71
Toimenpide (manuaalinen)	82
Protokolla: Näytteen arviointi (manuaalinen)	82
Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen (manuaalinen)	82
Protokolla: <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset	83
Tulosten tulkinta (manuaalinen)	88
Ohjelmiston analyysiasetukset	88
Näytteen arviointitietojen analyysi	89
EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi	91

Liite B <i>therascreen</i> EGFR CE -testipaketin asennus	99
Yhteystiedot	102
Tilaustiedot	103
Käsikirjan muutoshistoria	105

Käyttötarkoitus

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja on diagnostinen in vitro -testi, jonka avulla pystytään havaitsemaan 29 EGFR-geenin somaattista mutaatiota. Se tuottaa kvalitatiivisen arvioinnin mutaation statuksesta ei-pienisoluisista keuhkosityöpää (non-small cell lung cancer, NSCLC) sairastavilta potilailta otetuista kasvainnäytteistä.

Tulosten on tarkoitus auttaa tunnistamaan NSCLC-potilaat, jotka voivat hyötyä EGFR-tyrosiinkinasiin estäjähoidosta.

therascreen EGFR RGQ PCR -sarjalla testataan formaliinifiksoiduista parafiinivaletuista (formalin-fixed, paraffin embedded, FFPE), NSCLC-potilailta otetuista kudoksenäytteistä uutettuja DNA-näytteitä, jotka käsitellään Rotor-Gene Q MDx -laitteella. Se on tarkoitettu koulutettujen henkilöiden käytettäväksi ammattimaisessa laboratorioympäristössä.

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja on tarkoitettu in vitro -diagnostiseen käyttöön.

Yhteenveto ja selitykset

EGFR-syöpägeenien mutaatioita on löydetty ihmisen syöivistä (1, 2). Näiden mutaatioiden esiintyminen korreloi tiettyjen tyrosiinikinaasin estäjähoitojen vasteen kanssa potilailla, joilla on ei-pienisoluinen keuhkosyöpä (NSCLC) (3–8). Tällaisia EGFR-syöpägeenin mutaatioita esiintyy yleisessä NSCLC-potilaspopulaatiossa noin 10 %:lla eurooppalaista tai australialaisista potilaista ja jopa 30 %:lla japanilaisilla ja taiwanilaisilla potilaista (1, 2, 9).

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja on käyttövalmis sarja syöpään liittyvän EGFR-geenin 29 mutaation havaitsemiseen polymeraasiketjureaktiomenetelmän (polymerase chain reaction, PCR) avulla Rotor-Gene Q MDx -laiteella.

Scorpions®- (10) ja ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (11) -tekniikoita käyttämällä *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan avulla voidaan havaita 29 mutaatiota EGFR-syöpägeenin eksoneissa 18, 19, 20 ja 21 villityypin genomisessa DNA:ssa (Taulukko 1). Yhteenveto:

- 19 deleetiota eksonissa 19 (havaitsee minkä tahansa deleetion yhteensä 19 deleetiosta, mutta ei erota niitä toisistaan)
- kolme insertiota eksonissa 20 (havaitsee minkä tahansa insertion yhteensä kolmesta insertiosta, mutta ei erota niitä toisistaan)
- G719X (havaitsee G719S:n, G719A:n tai G719C:n olemassaolon, mutta ei erota niitä toisistaan)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

Käytetyt menetelmät ovat erittäin selektiivisiä ja mahdollistavat DNA:n kokonaismäärän mukaan matalan tason DNA:n mutaatioiden havaitsemisen villityypin genomisessa DNA:ssa.

Annetut selektiivisyys- ja havaitsemisrajat ovat tehokkaampia kuin väriaineeseen perustuva sekvensointi.

Taulukko 1. Mutaatioluettelo ja COSMIC-tunnisteet

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

* COSMIC: syövän somaattisten mutaatioiden luettelo: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Taulukko 1 jatkuu. Mutaatioluettelo ja COSMIC-tunnisteet

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Emäsjärjestyksen muutos
20	S768I	6241	2303G>T
	Insertiot	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC: syövän somaattisten mutaatioiden luettelo: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Menetelmän toimintaperiaate

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja koostuu kahdeksasta erillisestä PCR-monistuksen reaktioseoksesta: seitsemästä EGFR-syöpägeenin eksonien 18, 19, 20 ja 21 mutaatiokohtaisista reaktiosta ja yhdestä eksonin 2 villityypin kontrollista. Sarjan tärkeimmät osat on esitelty alla.

ARMS

Alleeli- tai mutaatiokohtainen monistus saadaan aikaan ARMS-tekniikan avulla. *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) erottaa tehokkaasti vastaavuudet ja poikkeamat PCR-alukkeen 3'-päässä. Spesifiset mutaation läpikäyneet sekvenssit monistetaan tasaisesti näytteissä, joissa suurimassa osassa sekvenssejä mutaatiota ei ole. Kun alukkeen vastaavuus on täydellinen, monistus jatkuu täydellä teholla. Kun 3'-pään emäs ei ole vastaava, ilmenee vain matalan tason taustan monistusta.

Scorpions

Monistuksen tunnistamisessa käytetään Scorpions-tekniikkaa. Scorpionit ovat bifunktionaalisia molekyylejä, jotka sisältävät PCR-aluketta, joka on kovalenttisesti kiinnittynyt koettimeen. Koettimen fluorofori liittyy koettimessa olevaan sammuttajaan, joka vähentää fluoresenssia. Kun koetin PCR:n aikana sitoutuu amplikoniin, fluorofori ja sammuttaja irtoavat toisistaan ja aiheuttavat fluoresenssin havaittavan kasvun.

Sarjan rakenne

therascreen EGFR RGQ PCR -sarjaan sisältyy kahdeksan testiä:

- yksi kontrollitesti (CTRL)
- seitsemän mutaatiotestiä.

Kaikki reaktioseokset sisältävät reagensseja, joissa on karboksyylifluoreseiinia (FAMTM), ja sisäisen kontrollitestin, jossa on heksakloorifluoreseiinia (HEXTM). Sisäinen kontrollitesti voi havaita inhibiittoreita, jotka voivat johtaa väärin negatiivisiin tuloksiin. FAM-monistus voi ylikilpailla kontrollimonistuksen kanssa ja sisäisen kontrollin tarkoitus on vain osoittaa, että jos FAM-monistusta ei ole, tulos on todellinen negatiivinen tulos eikä syynä ole epäonnistunut PCR-reaktio.

Testit

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja koostuu kaksivaiheisesta toimenpiteestä. Ensimmäisessä vaiheessa suoritetaan kontrollitesti näytteen monistettavissa olevan EGFR-DNA:n arvioimiseksi. Toisessa vaiheessa suoritetaan sekä mutaatio- että kontrollitesti DNA:n mutaation läsnäolon vahvistamiseksi/poissulkemiseksi.

Kontrollitesti

Kontrollitestillä, jossa on FAM-merkintä, arvioidaan näytteen monistettavissa oleva EGFR-DNA. Kontrollitesti monistaa EGFR-geenin eksoni 2 -alueen. Alukkeet ja Scorpion-koetin on suunniteltu välttämään tunnettuja EGFR-polymorfismeja.

Mutaatiotestit

Jokaisessa mutaatiotestissä on FAM-leimattu Scorpion-koetin ja ARMS-aluke, joilla erotetaan villityypin DNA ja erityinen DNA:n mutaatio.

Kontrollit

Huomautus: Kaikissa testierissä on oltava mukana positiiviset ja negatiiviset kontrollit.

Positiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana positiivinen kontrolli putkissa 1–8. *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja sisältää EGFR-positiivisen kontrollin (Positive Control, PC), jota käytetään mallina positiivisessa kontrollireaktiossa. Positiiviset kontrollitulokset arvioidaan, jotta voidaan varmistaa, että sarja toimii mainittujen hyväksyntäkriteerien vaatimusten mukaisesti.

Negatiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana negatiivinen kontrolli ("no template control" (malliton kontrolli): NTC) putkissa 9–16. *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja sisältää vettä sitä NTC:tä varten, jota käytetään "mallina" mallittomassa kontrollissa. Mallitonta kontrollia käytetään arvioimaan mahdollinen kontaminaatio erän valmistelun aikana sekä arvioimaan sisäisen kontrollin reaktion toimintaa.

Sisäisen kontrollireaktion arviointi

Jokainen reaktioseos sisältää kohdereaktion lisäksi sisäisen kontrollin (internal control, IC). Epäonnistuminen osoittaa, että läsnä saattaa olla inhibiittoreita, jotka voivat johtaa epätarkkaan tulokseen tai kyseessä saattaa olla testin suorittajan virheellinen putken käsittely erän valmistelun aikana. IC:ssä on EGFR:ään liittymätön oligonukleotidikohdesekvenssi, leimaamaton aluke ja HEX-leimattu Scorpions-alue, jotta se voidaan erottaa FAM-leimatusta Scorpions-alueesta kontrolli- ja mutaatioreaktioseoksissa. FAM-monistus voi ylikilpailla sisäisen kontrollin monistuksen kanssa niin, että saatu IC C_T (HEX) -arvo voi olla määritetyn vaihteluvälin ulkopuolella. Näiden näytteiden FAM-tulokset ovat silti hyväksyttäviä.

Näytteen arviointi

On erittäin suositeltavaa käyttää *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan mukana toimitettua kontrollireaktioseosta (CTRL-putki) näytteen monistettavissa olevan EGFR-DNA:n arvioimiseksi. Kontrollitesti monistaa EGFR-geenin eksoni 2 -alueen. On suositeltavaa valmistaa näytteitä käyttämällä ainoastaan kontrollitestiä, käyttämällä EGFR-positiivista kontrollia positiivisena kontrollina ja ”malliin” tarkoitettua vettä mallittoman kontrollina.

Huomautus: DNA:n arvioinnin tulisi perustua PCR:ään, ja se saattaa erota absorbanssilukemiin perustuvasta kvantifikaatiosta. Sarjan mukana toimitetaan myös ylimääräinen kontrollireaktioseos (CTRL-putki), jonka avulla voidaan arvioida näytteiden DNA:n laatu ja määrä ennen *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla suoritettavaa analyysia.

Alusta ja ohjelmisto

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja on suunniteltu käytettäväksi Rotor-Gene Q MDx -laitteiden kanssa. Rotor-Gene Q MDx -laitteisiin on ohjelmoitu erilaisia jakson parametrejä tai ”ajoja” *therascreen* EGFR CE -testipaketin mukaisesti.

therascreen EGFR CE -testipaketti koostuu kahdesta mallista: "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" -mallista (näytteen arviointiin) ja "therascreen EGFR CE Locked Template" -mallista (EGFR-mutaatioiden havaitsemiseen). Nämä mallit sisältävän PCR-ajon parametrit ja laskevat tulokset.

Tarkoitukseen voidaan käyttää myös *therascreen* EGFR RGQ PCR -pakkausta yhdessä Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3 kanssa avoimessa tilassa (eli ilman Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE -testipakkausta). Katso lisätietoja kohdasta "Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan manuaalinen protokolla" sivulla 71.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

therascreen EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Luettelonumero				874111
Reaktioiden määrä				24
Väri	Sisältö	Putken tunnus		Määrä
Punainen	Control Reaction Mix (kontrollireaktioseos)	1	CTRL	2 x 600 µl
Purppura	T790M Reaction Mix (T790M-reaktioseos)	2	T790M	600 µl
Oranssi	Deletions Reaction Mix (deleetioiden reaktioseos)	3	Del	600 µl
Vaaleanpunainen	L858R Reaction Mix (L858R-reaktioseos)	4	L858R	600 µl
Vihreä	L861Q Reaction Mix (L861Q-reaktioseos)	5	L861Q	600 µl
Keltainen	G719X Reaction Mix (G719X-reaktioseos)	6	G719X	600 µl
Harmaa	S768I Reaction Mix (S768I-reaktioseos)	7	S768I	600 µl
Sininen	Insertions Reaction Mix (insertioiden reaktioseokset)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-positiivinen kontrolli)	9	PC	300 µl
Mintunvihreä	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeraasi)	Taq	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Valkoinen	Nuclease-free water for no template control (nukleasiton vesi mallittamaan kontrolliin)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Valkoinen	Nuclease-free water for dilution (nukleasiton vesi laimennukseen)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook (therascreen EGFR RGQ PCR -sarjan käsikirja)				1

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkaa, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Reagenssit

- DNA:n uuttosarja (katso "DNA:n uuttaminen ja valmistelu", sivu 21)

Kulutustuotteet ja yleiset laboratoriolaitteet

- tarkoitukseen sopivia pipettejä* (säädettäviä) näytteen valmisteluun
- tarkoitukseen sopivia pipettejä (säädettäviä) PCR-päaseoksen valmisteluun
- tarkoitukseen sopivia pipettejä (säädettäviä) malli-DNA:n annosteluun
- DNAasittomia, RNAasittomia ja DNA:ttomia, suodattimellisia pipetin kärkiä (ristikontaminaation välttämiseksi suosittelemme käyttämään pipetin kärkiä, joissa on aerosoliesteet)
- 0,1 ml:n putkiliuskat ja korkit käytettäväksi 72-kuoppaisen roottorin kanssa (tuotenro 981103 tai 981106)
- DNAasittomat, RNAasittomat ja DNA:ttomat mikrosentrifugiputket pääseosten valmistusta varten
- latauslohko, jossa on 72 x 0,1 ml:n putkea, alumiinilohko manuaaliseen reaktion valmisteluun, sis. yksikanavainen pipetti (tuotenro 9018901).
- lämpösekoitin*, kuumennettava ravistava inkubaattori*, kuumennuslohko* tai vesihaude*, joka mahdollistaa inkuboinnin 90 °C:ssa

* Varmista, että välineet ja tarvikkeet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

- pöytämallinen sentrifugi*, jossa roottori 2ml:n reaktioputkille
- vortex-sekoitin*

Laitteet PCR:ää varten

- Rotor-Gene Q MDx -laite, jossa on vihreä ja keltainen fluoresenssikanava (FAM:n ja HEX:n havaitsemiseen)*†
- Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE -testipakkaus-CD, versio 3.0.5 (luettelonro 9023537)

Huomautus: Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE -testipakkausohjelmisto vaatii Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3.

* Varmista, että välineet ja tarvikkeet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

† Joissakin maissa voidaan tilanteen mukaan käyttää Rotor-Gene Q 5plex HRM -instrumenttia, jonka valmistuspäivä on toukokuussa 2011 tai myöhemmin. Valmistuspäivämäärä on nähtävissä laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvätiedotteista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa **www.qiagen.com/safety**, jossa voidaan tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedotteita.

Katso Rotor-Gene Q -laitteen turvallisuustiedot laitteen mukana toimitetusta käyttöoppaasta.

Hävitä näyte- ja analyysijäte paikallisten turvallisuismääräysten mukaisesti.

Yleiset varotoimet

Noudata aina seuraavia ohjeita:

- Testi on tarkoitettu käytettäväksi FFPE NSCLC -näytteiden kanssa.
- Säilytä ja uuta positiiviset materiaalit (näytteet ja positiiviset kontrollit) erillään, poissa kaikkien muiden reagenssien läheisyydestä ja lisää ne reaktioseokseen erillisessä tilassa.
- Varmista huolellisesti, etteivät PCR:t pääse kontaminoitumaan synteettisestä kontrollimateriaalista. Suosittelemme käyttämään reaktioseosten valmistuksessa ja DNA-mallin lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä. Reaktioseosten valmistaminen ja annostelu on suoritettava eri paikassa kuin mallin lisääminen. Rotor-Gene Q -putkia ei saa avata PCR-ajon on päättymisen jälkeen. Syynä on laboratorionkontaminoitumisen estäminen PCR-ajon jälkeen.
- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.

- *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan reagenssit on laimennettu optimaaliseen vahvuuteen. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyyvyn heikkeneminen. Älä käytä reagensseja, joiden reaktiivilavuus on alle 25 µl, koska muutoin väärin negatiivisten tulosten riski kasvaa.
- Kaikki *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä korvaa *therascreen* EGFR RGQ PCR -pakkauksen reagensseja tai vaihda niitä muiden *therascreen* EGFR RGQ PCR -pakkausten reagenssien kanssa, sillä tämä voi vaikuttaa suorituskyyvyn.
- Käytä vain *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*-putki), joka toimitetaan *therascreen* EGFR RGQ PCR -pakkauksen yhteydessä. Älä korvaa *Taq* DNA -polymeraasia muiden saman- tai toisentyypisten sarjojen polymeraaseilla tai muiden toimittajien *Taq* DNA -polymeraaseilla.
- Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Huomautus: varmista, että testaat oikean näytteen. Varo erityisesti väärän näytteen käyttämistä, latausvirheitä ja pipetointivirheitä.

Huomautus: Reagenssit on hyväksytty käytettäväksi manuaalisessa valmistelussa. Jos käytetään automaattista menetelmää, se voi vähentää mahdollisten reaktioiden määrää, koska reagenssin on täytettävä näiden laitteiden "kuolleet tilat".

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kuljetusolosuhteet

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja toimitetaan pakattuna hiilihappojäähän, ja sen on oltava jäässä toimitushetkellä. Jos *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja ei ole toimitushetkellä jäässä, ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin paikalliseen tekniseen tukipalveluun tai jälleenmyyjään (katso yhteystiedot takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytysolosuhteet

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa $-30...-15\text{ °C}$:n lämpötilassa olevaan pakastimeen valolta suojattuna. Scorpions-alkukeet (kuten kaikki fluoresoivalla aineella leimatut molekyylit) on suojattava auringonvalolta, jotta valon aiheuttama valkaisu ja suorituskyvyn menetykset voidaan välttää. Alkuperäispakkauksessaan suositelluissa säilytysolosuhteissa säilytetty sarja on käyttökelpoinen etiketissä mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti. Sarjan toistuvaa pakastamista ja sulattamista on vältettävä. Suosittelemme korkeintaan kahdeksaa pakastus-sulatusjaksoa.

Reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä ($15-25\text{ °C}$) vähintään 1 tunti ja enintään 4,5 tuntia. Kun reagenssit ovat valmiita käytettäväksi, PCR-reaktiot voidaan valmistella ja pääseokset sisältävät Rotor-Gene Q -putket ja DNA-näyte on lisättävä Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen välittömästi. Kokonaisaika PCR:n valmistelun aloittamisesta ajon alkuun ei saa olla yli:

- 6 tuntia, jos putkia säilytetään huoneenlämmössä

Huomautus: tämä aika sisältää sekä PCR:n valmistelun että säilytyksen.

- 18 tuntia, jos putkia säilytetään jääkaapissa ($2-8\text{ °C}$:ssa)

Huomautus: tämä aika sisältää sekä PCR:n valmistelun että säilytyksen.

Huomautus: testin paras mahdollinen aktivoituminen ja suorituskyky on taattava suojaamalla Scorpions-alukkeet (kuten kaikki fluoresoivalla aineella leimatut molekyylit) auringonvalolta, jotta valon aiheuttama valkaisu voidaan välttää.

Huomautus: Jotta reagensseja voi käyttää *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjassa, näytteet on jaettava eriin. Jos näytteitä testataan erikseen, testauksessa kuluu enemmän reagensseja ja tämä vähentää *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla testattavien näytteiden määrää.

Näytteen käsittely ja säilytys

Huomautus: kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti infektiivana materiaalina.

Näytteen materiaalin on oltava ihmisen genomista DNA:ta, joka on eristetty FFPE-kudoksesta. Näytteen hyväksyttävä laatu on varmistettava kuljettamalla näytteet tavanomaisia patologian käytäntöjä noudattaen.

Kasvainnäytteet ovat ei-homogeenisiä, ja kasvainnäytteen tiedot eivät välttämättä ole yhdenmukaisia saman kasvaimen muiden osien tietojen kanssa. Kasvainnäytteet saattavat sisältää kasvaimen lisäksi myös muuta kudosta. Muun kudoksen kuin kasvainkudoksen DNA:n ei oleteta sisältävän *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan havaitsemia mutaatioita.

Kudosnäytteiden valmistelu DNA:n uuttamiseen:

- Käytä vakiomuotoisia materiaaleja ja menetelmiä ja kiinnitä kudosnäyte 10-prosenttiseen neutraaliin formaliinipuskuriin (NBF) sekä upota kudosnäyte parafiiniin. Leikkaa mikrotomilla sarjassa 5 µm:n osia parafiinilohkosta ja aseta ne objektilaseille.
- Anna koulutetun henkilön (esim. patologi) arvioida hematoksyliini-eosiinivärjätty osa, ja varmista, että osassa on kasvain.
- Värjättyjä osia ei saa käyttää DNA:n uuttamiseen.
- Säilytä kaikkia FFPE-lohkoja ja objektilaseja huoneenlämmössä (15–25 °C). Objektilaseja voidaan säilyttää huoneenlämmössä korkeintaan kuukausi ennen DNA:n uuttamista.

Toimenpide

DNA:n uuttaminen ja valmistelu

Tämän sarjan suorituskykyominaisuudet on saatu käyttämällä QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjalla (luettelonro 60404) uutettua DNA:ta. DNA:n valmisteluun on käytettävä tätä sarjaa, jos se on saatavilla maassasi. Jos käytössä on toiminnoltaan vastaava QIAamp DNA FFPE Tissue -sarja (luettelonro 56404), suorita DNA:n uuttaminen käsikirjan ohjeiden mukaisesti **huomioiden myös alla esitetyt ohjeet**.

- Älä käytä QIAGEN-deparafinisaatioliuosta. Käytä deparafiinisointiin ainoastaan *QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjan käsikirjassa (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook)* kuvattua ksyleeni-/etanolimenetelmää.
- Käytä kaikissa vaadituissa vaiheissa molekyylibiologiaan soveltuvan luokan etanolia*.
- Raaputa koko kudoksen alue kahdesta osasta leimattuun mikrosentrifugiputkeen. Käytä jokaiselle näytteelle uutta skalpellia.
- Proteinaasi K:n pilkkoutuminen (vaihe 11 *QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjan käsikirjassa*) on tehtävä 1 tunnin (± 5 min) kohdalla 56°C :ssa ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).
- Proteinaasi K:n pilkkoutuminen (vaihe 12 *QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjan käsikirjassa*) on tehtävä 1 tunnin (± 5 min) kohdalla 90°C :ssa ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).
- Älä käytä *QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjan käsikirjassa* kuvattua RNAasivaihetta.
- Näytteet on uutettava 120 μl :an QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjan uuttamispuskuria (ATE) (vaihe 20 *QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjan käsikirjassa*).
- Genomista DNA:ta voidaan säilyttää $2-8^{\circ}\text{C}$:ssa viikon ajan uuttamisen jälkeen, tai $-30\ldots-15^{\circ}\text{C}$:ssa korkeintaan 8 viikkoa ennen käyttöä.

* Älä käytä denaturoitua alkoholia, joka sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

Huomautus: Kaikki *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan testit tuottavat lyhyitä PCR-tuotteita. *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja ei kuitenkaan toimi voimakkaasti fragmentoituneen DNA:n kanssa.

Protokolla: Näytteen arviointi

Tämän protokollan avulla arvioidaan näytteiden monistettavissa olevan DNA:n kokonaismäärä käyttäen "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" -mallia Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE -testipakkauksesta automatisoituun näytteen arviointiin.

Huomautus: Katso lisätietoja manuaalisesta DNA-näytteen arvioinnista kohdasta "Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan manuaalinen protokolla" sivulta 71.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Lue ennen toimenpiteen aloittamista kohta "Yleiset varotoimet" sivulta 17.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Tutustu laitteen käyttöoppaaseen.
- Älä sekoita *Taq*-seosta tai mitään *Taq*-ainetta sisältävää seosta vortex-laitteessa, sillä sekoittaminen saattaa inaktivoida entsyymien.
- Pipetoi *Taq* asettamalla pipetin kärki aivan nestepinnan alapuolelle, jotta kärkeen ei pääse liikaa entsyymia.
- Kontrollireaktioseoksen avulla voidaan arvioida enintään 24 näytettä.

Ennen aloittamista suoritettavat valmistelut

- Varmista, että *therascreen* EGFR CE -testipaketin ohjelmisto on asennettu ennen Rotor-Gene Q -laitteen ensimmäistä käyttökertaa (katso "Liite B *therascreen* EGFR CE -testipaketin asennus", sivu 99).
- Ennen jokaista reagenssien käyttökertaa kaikkia reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ja enintään 4,5 tunnin ajan,

kunnes ne ovat täysin sulaneet, käänneltävä 10 kertaa ja käytettävä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

- Sekoita kaikkia näytteitä kääntämällä ne ylösalaisin 10 kertaa ja käyttämällä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että *Taq* on huoneenlämpöistä (15–25 °C). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

Toimenpide

1. Sulata kontrollireaktioseosta (CTRL), mallittomaan kontrolliin (NTC) tarkoitettua vettä ja EGFR:n positiivista kontrollia (PC) huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden ja enintään 4,5 tunnin ajan.

Reagenssien sulatusajat, PCR-valmisteluajat ja testiajoa edeltävän säilytyksen tiedot on merkitty kohtaan Taulukko 2.

Taulukko 2. Sulatusajat, PCR:n valmisteluajat ja säilytyslämpötilat

Vähimmäis-sulatusaika	Enimmäis-sulatusaika	Säilytyslämpötila PCR:n valmistelun jälkeen	PCR:n valmistelun ja säilytyksen enimmäisaika
1 h	4,5 h	Huoneenlämpötila (15–25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2–8 °C	18 h

Huomautus: PCR-asetukset tehdään huoneenlämmössä (15–25 °C). ”Säilytyksellä” tarkoitetaan aikaa PCR:n valmistelun ja Rotor-Gene Q MDx -laitteella aloitettavan PCR-ajon välillä.

Huomautus: Tuo *Taq* huoneenlämpöön (15–25 °C) samaan aikaan kuin muut reagenssit (katso ”Reagenssien säilytys ja käsittely”, sivu 19). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

2. Kun reagenssit ovat sulaneet, sekoita ne kääntelemällä jokaista putkea 10 kertaa, jotta paikallisia suolakertymiä ei pääse muodostumaan, ja käytä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

3. Valmista riittävä määrä pääkontrolliseoksia (kontrollireaktioseos [CTRL] sekä *Taq* DNA-näytteitä varten, yksi positiivinen EGFR-kontrollireaktio ja yksi NTC-reaktio noudattaen kohdassa Taulukko 3 annettuja määriä koskevia ohjeita. Sisällytä mukaan reagensseja yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten. Pääseos sisältää kaikki PCR:ää varten tarvittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 3. Kontrollitestin pääseoksen valmistaminen

Komponentti	Määrä
Kontrollireaktioseos (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
<i>Taq</i> DNA -polymeraasi (<i>Taq</i>)	0,5 µl × (n + 1)
Kokonaismäärä	20 µl/reaktio

* n = reaktioiden määrä (näytteet plus kontrollit). Valmista pääseosta riittävä määrä yhtä ylimääräistä näytettä varten (n+1), jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-asetuksia varten. Arvo n ei saa olla yli 26 (24 näytettä plus 2 kontrollia).

Huomautus: valmistettaessa pääseosta kontrollireaktioseokseen tarvittava määrä lisätään asianomaiseen putkeen ensin ja *Taq* lisätään viimeiseksi.

4. Sekoita pääseos huolellisesti pipetoimalla sitä varovasti 10 kertaa ylös ja alas. Aseta sopiva määrä liuskaputkia latauslohkoon kohdassa Taulukko 4 esitetyllä tavalla. Lisää välittömästi 20 µl pääseosta jokaiseen PCR-liuskaputkeen.

Pidä korkit muovisäiliössä myöhempää käyttöä varten. DNA-näytteen arviointia varten kontrollitestin pääseosta lisätään yhteen positiivisen kontrollin putkeen, yhteen negatiivisen kontrollin putkeen ja jokaisen näytteen yhteen putkeen.

Taulukko 4. Latauslohkossa olevien DNA-näytteiden arviointi. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Testi	Sijainti								
Kontrolli	1[PC]	9	17	25	–	–	–	–	–
Kontrolli	2[NTC]	10	18	26	–	–	–	–	–
Kontrolli	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Kontrolli	4	12	20	–	–	–	–	–	–
Kontrolli	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Kontrolli	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Kontrolli	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Kontrolli	8	16	24	–	–	–	–	–	–

5. Lisää välittömästi 5 µl NTC:hen tarkoitettua vettä sijainnissa 2 olevaan putkeen ja aseta putken korkki paikalleen.
6. Lisää näyteputkiin 5 µl jokaista näytettä (putket sijainneissa 3–26) ja aseta putkien korkit paikoilleen.
7. Lisää 5 µl EGFR PC -kontrollia sijainnissa 1 olevaan putkeen ja aseta putken korkki paikalleen.
Vältä lataus- ja pipetointivirheitä varmistaaksesi, että NTC, näytteet ja PC lisätään virheettömästi oikeisiin putkiin. Merkitse putkien korkeihin suunta, jota noudattaen putket ladataan Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen.
8. Kun kaikkien PCR-putkien korkit on asetettu paikoilleen, tarkista näyteputkien täyttötasot silmämääräisesti, jotta voit varmistaa, että näyte on lisätty kaikkiin putkiin.
9. Kääntelee kaikkia PCR-putkia neljä kertaa, jotta näytteet ja reaktioseokset sekoittuvat.
10. Aseta PCR-liuskaputket oikeisiin kohtiinsa 72-kuoppaiseen roottoriin kohdan Taulukko 4 mallin mukaan.
Jos roottori ei ole täynnä, aseta tyhjiin kohtiin tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan.

11. Aseta välittömästi 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen. Varmista, että lukkorengas (Rotor-Gene Q MDx -laitteen varuste) on asetettu roottorin päälle, jotta putket pysyvät paikoillaan käytön aikana.

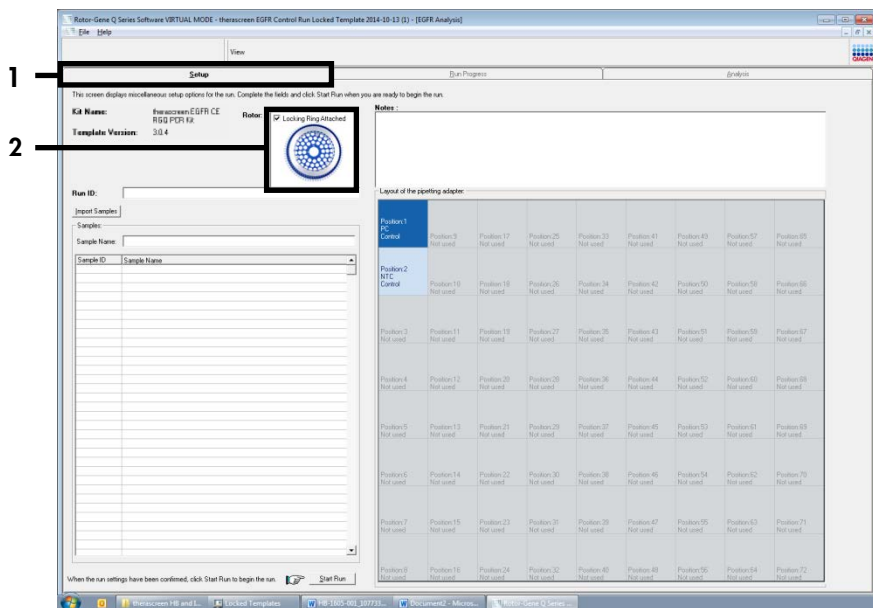
Huomautus: jos näytteet arvioidaan manuaalisesti, katso lisätietoja kohdasta "Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan manuaalinen protokolla" sivulta 71.

12. Avaa Rotor-Gene Q -ohjelmisto kaksoisnapsauttamalla Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn tietokoneen näytössä näkyvää "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" -kuvaketta (katso kuva 1).



Kuva 1. EGFR CE Locked Template -kuvake kontrolliajooa (näytteen arviointia) varten.

13. Setup (Asennus) -välilehti tulee oletuksena näkyviin (kuva 2). Varmista, että lukkorengas on kunnolla paikallaan, ja laita rasti Locking Ring Attached (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Sulje Rotor-Gene Q -laitteen kansi.



Kuva 2. "Setup" (Asennus) -välilehti (1) ja "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu (2).

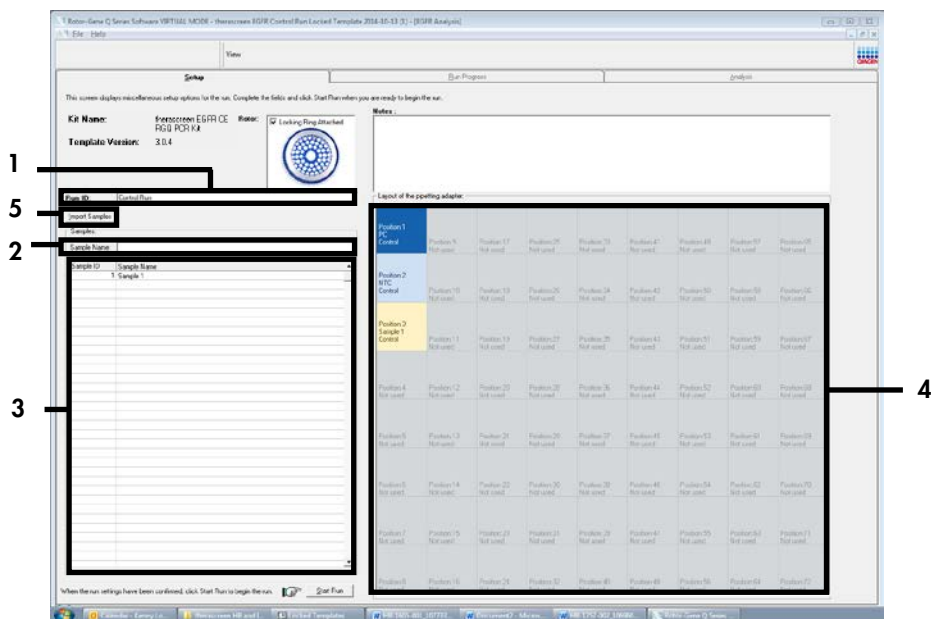
14. Anna "Run ID" (Ajon tunniste) -kenttään ajon tunniste oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Anna "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään näytteen nimi oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti.

Tällöin näytteen nimi lisätään alla olevaan näyteluetteloon ja näytteelle annetaan "Sample ID" (Näytteen tunniste) -nimi (1, 2, 3 jne.). Lisäksi näytteen nimi päivitetään oikealla puolella näkyvään "Layout of the pipetting adaptor" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeliin (kuva 3).

Huomautus: Vaihtoehtoisesti *.smp (Rotor-Gene Q -näytetiedosto) -muodossa tai *.csv (CSV-tiedosto) -muodossa (arvojen välissä on pilkku) tallennetut näytteet voidaan tuoda valitsemalla "Import Samples" (Tuo näytteet) -painike. Näytteiden nimet täytetään automaattisesti tätä menetelmää käyttäen.

Huomautus: Tarkista "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa, että lisäty näyttteen nimi on korostettu eri värillä kuin muut nimet ja että näytteen nimi on näytekohdassa (kuva 3).

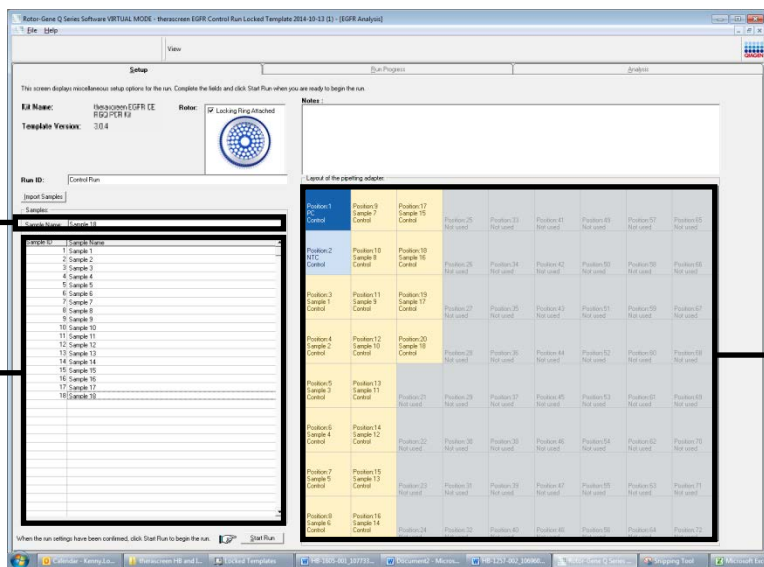
Huomautus: Jos näytteen nimessä on yli kahdeksan merkkiä, nimi ei mahdollisesti näy "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa kokonaan.



Kuva 3. Run ID (Ajon tunniste)- ja Sample Name (Näytteen nimi) -tietojen antaminen. 1 = "Run ID" (Ajon tunniste) -kenttä, 2 = "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttä, 3 = "Sample List" (Näyteluettelo), 4 = "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeli, 5 = "Sample Import" (Näytteen tuonti) -painike.

15. Anna muiden näytteiden nimet toistamalla vaihe 14 (kuva 4).

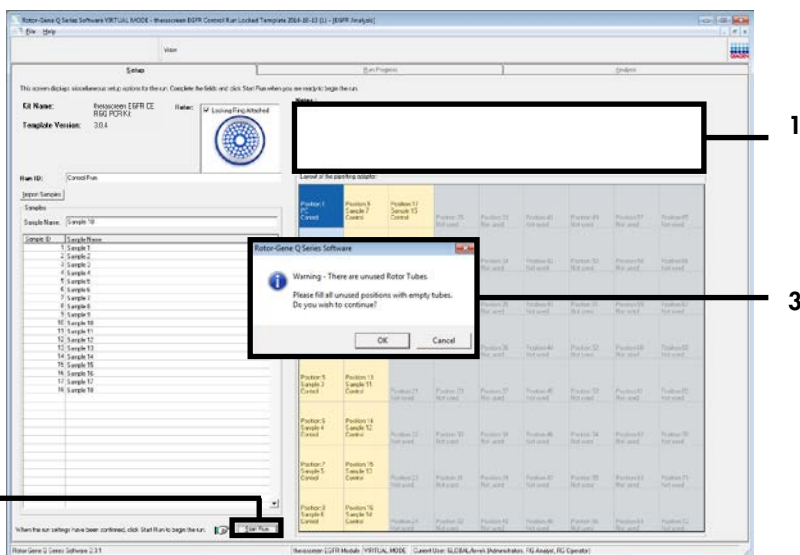
Huomautus: Voit muokata näytteen nimeä napsauttamalla näyteluettelossa kohtaa "Sample Name" (Näytteen nimi), jolloin valittu näyte tulee edellä mainittuun "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään. Muokkaa nimeä oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti ja päivitä nimi painamalla Enter-painiketta.



Kuva 4. Muiden näytteiden nimien lisääminen "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään. 1 = "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttä, 2 = "Sample List" (Näyteluetelo), 3 = "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeli.

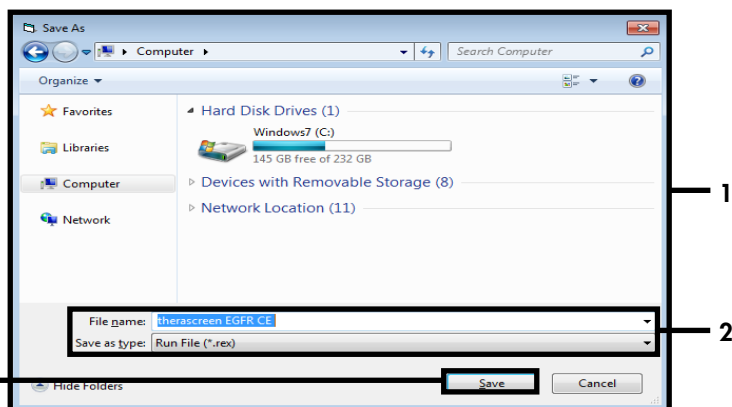
16. Kun kaikkien näytteiden nimet on annettu, varmista, että ne ovat oikein. Lisää tarvittaessa lisätietoja "Notes" (Huomautukset) -kenttään ja napsauta "Start Run" (Käynnistä ajo) -painiketta (kuva 5).

Huomautus: Jos jokin roottorin paikka on tyhjä, näkyviin tulee "Warning" (Varoitus) (kuva 5), jolla käyttäjää muistutetaan siitä, että kaikkiin roottorin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjä korkilla suljettu putki. Tarkista, että kaikissa roottorin tyhjissä kohdissa on tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan, ja jatka valitsemalla "OK".



Kuva 5. "Notes" (Huomautukset) -kenttä (1), "Start Run" (Käynnistä ajo) -painike (2) ja tyhjiä roottorin paikkoja koskeva "Warning" (Varoitus) (3).

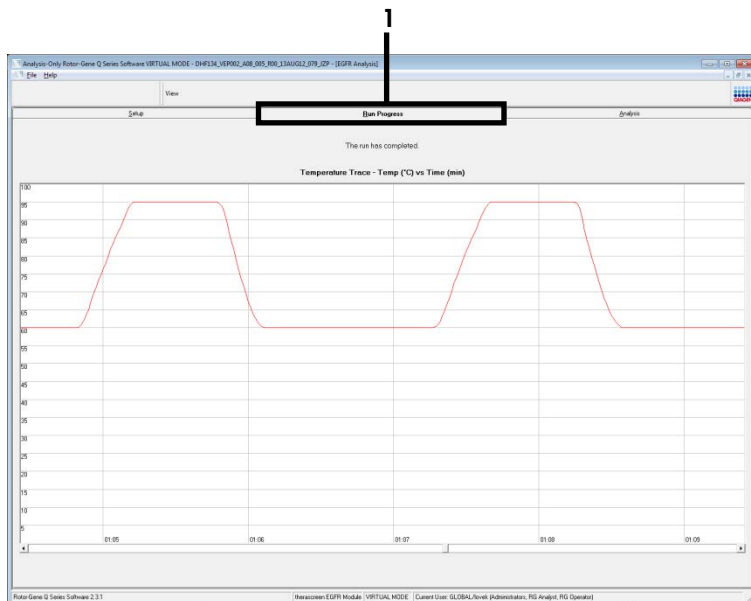
17. "Save As" (Tallenna nimellä) -ikkuna avautuu. Valitse haluamasi tiedostonimi ja tallenna PCR-ajo *.rex-tiedostona valittuun sijaintiin. Valitse "Save" (Tallenna) (kuva 6).



Kuva 6. "Save As" (Tallenna nimellä) -ikkuna (1). 2 = "File Name" (Tiedostonimi)- ja "Save as type" (Tallenna tyyppinä) -kentät, 3 = "Save" (Tallenna) -painike.

18. PCR-ajo käynnistyy.

Huomautus: Kun ajo alkaa, "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti avautuu, ja siinä näkyvät lämpötilatiedot ja jäljellä oleva ajoaika (kuva 7).

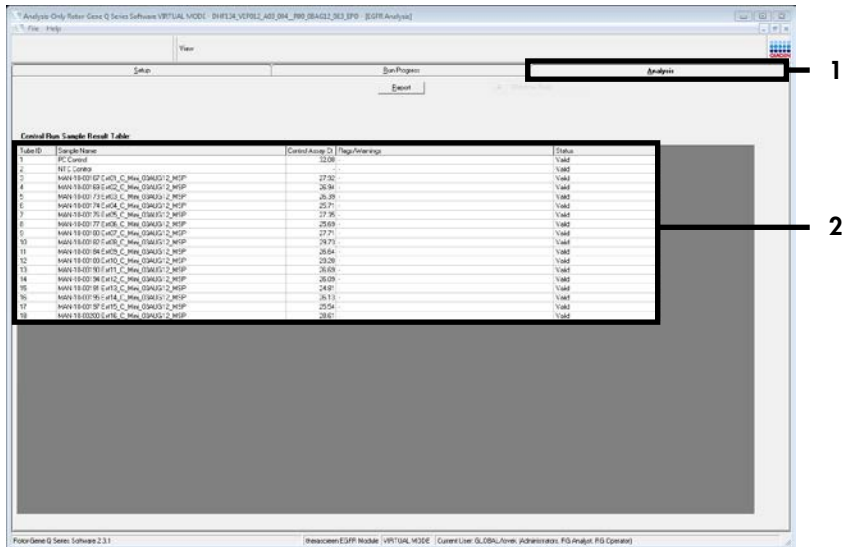


Kuva 7. "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti (1).

19. Kun ajo on valmis, "Analysis" (Analyysi) -välilehti avautuu automaattisesti.

Huomautus: jos "Analysis" (Analyysi) -välilehti ei avaudu, napsauta "Analysis" (Analyysi) -välilehteä (kuva 8).

Huomautus: laskentamenetelmä on selitetty kohdassa "Tulosten tulkinta (automaattinen)" sivulla 47.



Kuva 8. "Analysis" (Analyysi) -välilehti (1) ja tulosten raportointi (2 = "Sample QC Result Table" [Näytteen QC-tulostaulukko]).

20. Kontrollitulokset raportoidaan, kuten kohdassa "Sample QC Result Table" (Näytteen QC-tulostaulukko) (kuva 8) on esitetty.

Aja kontrollit (PC ja NTC, putkien sijainnit 1 ja 2). Jos tulokset ovat hyväksyttävillä alueilla, jokaisen kohdalla näkyy "Valid" (Hyväksytty). Muussa tapauksessa tuloksena näkyy "Invalid" (Hylätty).

Näytteen kontrollireaktion $C_T > 31,10$ kohdalle tulee teksti "Invalid" (Hylätty). DNA:n määrä ei ole riittävä mutaatioanalyysia varten. Testaa näyte uudelleen. Jos DNA:n määrä on edelleen riittämätön, uuta lisää kudosnäytettä, jos sitä on saatavilla.

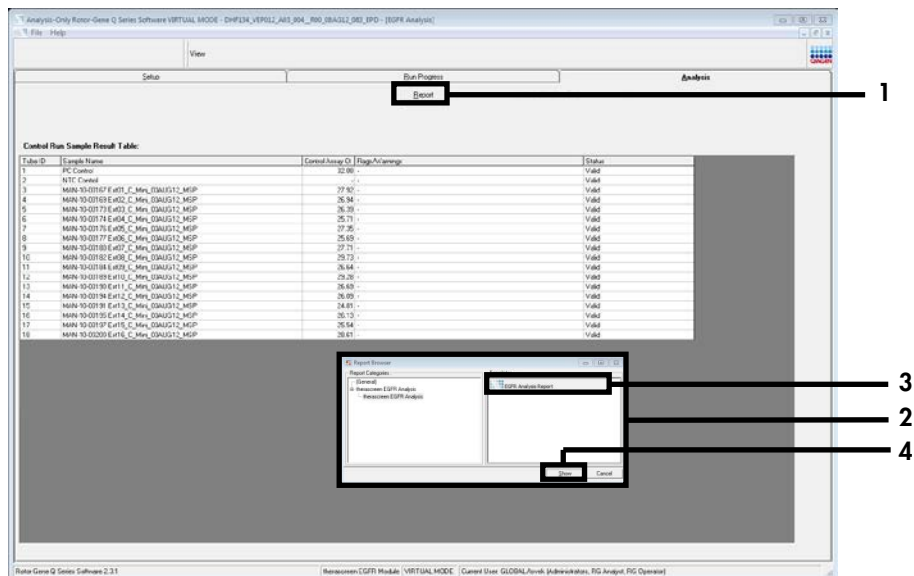
Näytteen kontrollireaktion $C_T < 23,70$ kohdalle tulee teksti "Invalid" (Hylätty). DNA:n konsentraatio on liian korkea mutaatioanalyysia varten. Laimenna nukleasittomalla laimentamiseen tarkoitetulla vedellä (Dil.) ja suorita testi uudelleen. Laimenna pitoisuuteen C_T 23,70-31,10. Laimennussuhde 1:1 kasvattaa C_T -arvoa 1,0:lla.

Näytteen kontrollireaktion C_T -arvon 23,70–31,10, ($23,70 \leq \text{kontrolli } C_T \leq 31,10$) kohdalle tulee teksti "Valid" (Hyväksytty). DNA:n konsentraatio on sopiva mutaatioanalyysia varten.

Huomautus: Jos uudelleen uuttaminen tai laimennus on tarpeellinen, toista kontrollireaktio, jotta voit varmistaa, että DNA:n pitoisuus on sopiva käyttöä varten.

21. Luo raporttitiedosto valitsemalla "Report" (Raportti). "Report Browser" (Raporttiselain) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse kohdasta "Templates" (Mallit) kohta "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE -analyysiraportti) ja napsauta sen jälkeen "Show" (Näytä) -painiketta (kuva 9).

Huomautus: Jos haluat tallentaa raportit Web Archives (Verkkokirjasto) -muodossa toiseen sijaintiin, napsauta kunkin raportin vasemmassa yläkulmassa "Save As" (Tallenna nimellä) -painiketta.



Kuva 9. "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE -analyysiraportti) -kohdan valitseminen. 1 = "Report" (Raportti) -painike, 2 = "Report Browser" (Raporttiselain) -paneeli, 3 = "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE -analyysiraportti) -painike, 4 = "Show" (Näytä) -painike.

Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen

Tämä protokolla koskee EGFR-mutaatioiden havaitsemista. Kun näyte on läpäissyt DNA-näytteen arvioinnin, se voidaan testata EGFR-mutaatiotesteillä automatisoitua ohjelmistoa käyttäen.

Huomautus: katso lisätietoja manuaalisesta mutaatioiden havaitsemisesta kohdasta ”Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan manuaalinen protokolla” sivulta 71.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Lue ennen toimenpiteen aloittamista kohta ”Yleiset varotoimet” sivulta 17.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Tutustu laitteen käyttöoppaaseen.
- Näyte voidaan testata EGFR-mutaatiotestillä, kun näyte on läpäissyt DNA-näytteen arvioinnin.
- *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan tehokkaan toiminnan takaamiseksi näytteet on jaettava seitsemän kappaleen eriin. Jos eräkoko on pienempi, *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla voidaan testata yhteensä pienempi määrä näytteitä.
- Näytteen testaamiseen on käytettävä kaikkia *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjassa olevia reaktioseoksia.
- Älä sekoita *Taq*-seosta tai mitään *Taq*-ainetta sisältävää seosta vortex-laitteessa, sillä sekoittaminen saattaa inaktivoida entsyymien.
- Pipetoi *Taq* asettamalla pipetin kärki varovasti aivan nestepinnan alapuolelle, jotta kärkeen ei pääse liikaa entsyymiä.

Ennen aloittamista suoritettavat valmistelut

- Varmista, että *therascreen* EGFR CE -testipaketin ohjelmisto on asennettu ennen Rotor-Gene Q -laitteen ensimmäistä käyttökertaa (katso "Liite B *therascreen* EGFR CE -testipaketin asennus", sivu 99).
- Ennen jokaista reagenssien käyttökertaa kaikkia reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ja enintään 4,5 tunnin ajan, kunnes ne ovat täysin sulaneet, käänneltävä 10 kertaa ja käytettävä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Sekoita kaikkia näytteitä kääntämällä ne ylösalaisin 10 kertaa ja käyttämällä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että *Taq* on huoneenlämpöistä (15–25 °C). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

Toimenpide

1. Sulata kaikkia reaktioseosputkia, mallittomaan kontrolliin (NTC) tarkoitettua vettä ja EGFR:n positiivista kontrollia (PC) huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden ja enintään 4,5 tunnin ajan.

Reagenssien sulatusajat, PCR-valmisteluajat ja testiajoa edeltävän säilytyksen tiedot on merkitty kohtaan Taulukko 5.

Taulukko 5. Sulatusajat, PCR:n valmisteluajat ja säilytyslämpötilat

Vähimmäis-sulatusaika	Enimmäis-sulatusaika	Säilytyslämpötila PCR:n valmistelun jälkeen	PCR:n valmistelun ja säilytyksen enimmäisaika
1 h	4,5 h	Huoneenlämpötila (15–25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2–8 °C	18 h

Huomautus: PCR-asetukset tehdään huoneenlämmössä (15–25 °C). "Säilytyksellä" tarkoitetaan aikaa PCR:n valmistelun ja Rotor-Gene Q MDx -laitteella aloitettavan PCR-ajon välillä.

Huomautus: Tuo *Taq* (putki *Taq*) huoneenlämpöön (15–25 °C) samaan aikaan kuin muut reagenssit (katso ”Reagenssien säilytys ja käsittely”, sivu 19). Käytä putkea hetki sentrifugissa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.

- Kun reagenssit ovat sulaneet, sekoita ne kääntelemällä jokaista putkea 10 kertaa, jotta paikallisia suolakertymiä ei pääse muodostumaan, ja käytä niitä sentrifugissa hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva sisältö sekoittuu.
- Valmista riittävä määrä pääseoksia (testin reaktioseos sekä *Taq*) DNA-näytteitä varten, yksi positiivinen EGFR-kontrollireaktio ja yksi NTC-reaktio noudattaen kohdassa Taulukko 6 annettuja määriä koskevia ohjeita. Sisällytä mukaan reagensseja yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten. Pääseokset sisältävät kaikki PCR:ää varten tarvittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 6. Testin pääseosten valmistaminen

Testi	Reaktioseosputki	Reaktioseoksen määrä	<i>Taq</i> DNA -polymeraasin (putki <i>Taq</i>) määrä
Kontrolli	CTRL	19,5 µl × (n + 1)*	0,5 µl × (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Deleetiot	Del	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L858R	L858R	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L861Q	L861Q	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
G719X	G719X	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
S768I	S768I	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Insertiot	Ins	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)

* n = reaktioiden määrä (näytteet plus kontrollit). Valmista pääseosta riittävä määrä yhtä ylimääräistä näytettä varten (n+1), jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-asetuksia varten. Arvon n pitäisi olla suurempi kuin seitsemän (plus kontrollien määrä), sillä seitsemän on yhdellä kerralla käsiteltävien näytteiden enimmäismäärä.

- Sekoita testin pääseoksia huolellisesti pipetoimalla sitä varovasti 10 kertaa ylös ja alas. Aseta sopiva määrä liuskaputkia latauslohkoon kohdassa Taulukko 7 esitetyllä tavalla. Lisää välittömästi 20 µl sopivaa testin pääseosta jokaiseen PCR-liuskaputkeen. Pidä korkit muovisäiliössä myöhempää käyttöä varten.

Taulukko 7. Latauslohkossa olevien kontrolli- ja mutaatiotestien arviointi. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Testi	Kontrollit		Sijainti						
			Näytteen numero						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Kontrolli	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deleetiot	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
Insertiot	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Lisää välittömästi 5 µl NTC:hen tarkoitettua vettä sijainneissa 9–16 oleviin putkiin ja aseta putkien korkit paikalleen.
- Lisää 5 µl vettä jokaiseen näyteputkeen (putkien sijainnit 17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64 ja 65–72) ja aseta putkien korkit paikoilleen.
- Lisää 5 µl EGFR PC -kontrollia sijainneissa 1–8 oleviin putkiin ja aseta putkien korkit paikalleen.

Vältä lataus- ja pipetointivirheitä varmistaaksesi, että NTC, näytteet ja EGFR PC lisätään virheettömästi oikeisiin putkiin.

Jokaisessa putkessa on oltava yhteensä 25 µl reaktioliuosta (20 µl vaiheessa kolme [Taulukko 6] valmisteltua testin pääseosta ja 5 µl NTC-/näyte-/PC-liuosta). Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

Merkitse putkien korkkeihin suunta, jota noudattaen putket ladataan Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen.

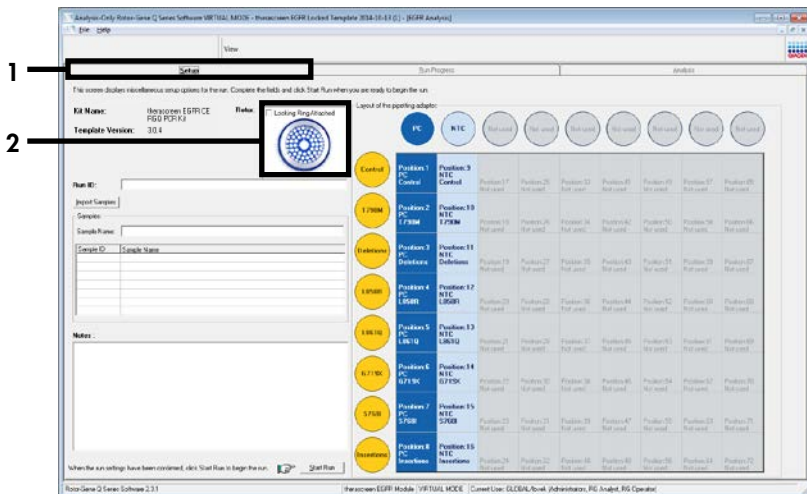
- Kun kaikkien PCR-putkien korkit on asetettu paikoilleen, tarkista näyteputkien täyttötasot silmämääräisesti, jotta voit varmistaa, että näyte on lisätty kaikkiin putkiin.

9. Kääntelee kaikkia PCR-putkia neljä kertaa, jotta näytteet ja reaktioseokset sekoittuvat.
10. Aseta PCR-liuskaputket oikeisiin kohtiinsa 72-kuoppaiseen roottoriin kohdan Taulukko 7 mallin mukaan.
- Yhdessä PCR-ajossa voi olla mukana enintään seitsemän näytettä. Jos roottori ei ole täynnä, aseta tyhjiin kohtiin tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan.
11. Aseta välittömästi 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen. Varmista, että lukkorengas (Rotor-Gene Q MDx -laitteen varuste) on asetettu roottorin päälle, jotta putket pysyvät paikoillaan käytön aikana.
- Huomautus:** Jos havaitset EGFR-mutaation manuaalisesti, katso lisätietoja ”liitteestä A: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan manuaalinen protokolla”, sivu 72.
12. Avaa Rotor-Gene Q -ohjelmisto kaksoisnapsauttamalla Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn tietokoneen näytössä näkyvää ”*therascreen* EGFR CE Locked Template” -kuvaketta (katso kuva 10).



Kuva 10. EGFR CE Locked Template -kuvake (EGFR-mutaation havaitseminen).

13. ”Setup” (Asennus) -välilehti tulee oletuksena näkyviin (kuva 11). Varmista, että lukkorengas on kunnolla paikallaan ja laita rasti ”Locking Ring Attached” (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Sulje Rotor-Gene Q -laitteen kansi.



Kuva 11. "Setup" (Asennus) -välilehti (1) ja "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu (2).

14. Anna "Run ID" (Ajon tunniste) -kenttään ajon tunniste oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Anna "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään näytteen nimi oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti.

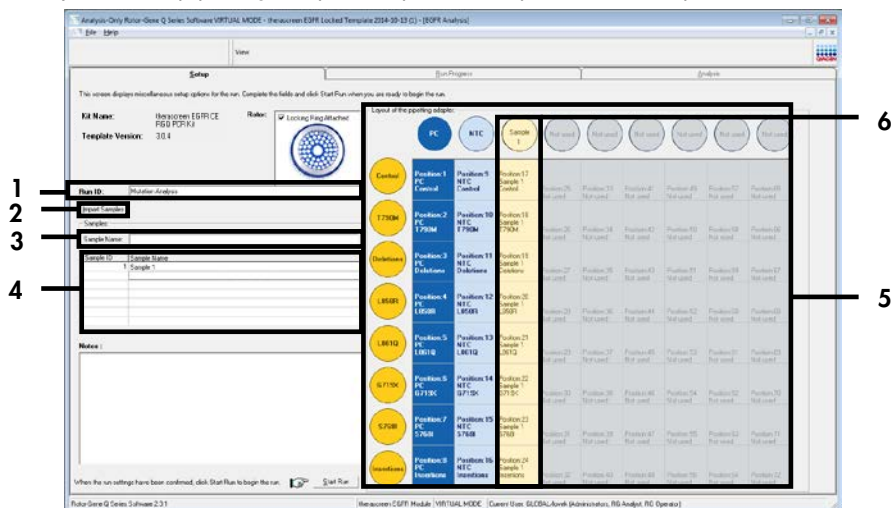
Tällöin näytteen nimi lisätään alla olevaan näyteluetteloon ja näytteelle annetaan "Sample ID" (Näytteen tunniste) -nimi (1, 2, 3 jne.). Lisäksi näytteen nimi päivitetään oikealla puolella näkyvään "Layout of the pipetting adaptor" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeliin (kuva 12).

Huomautus: Vaihtoehtoisesti *.smp (Rotor-Gene Q -näytetiedosto) -muodossa tai *.csv (CSV-tiedosto) -muodossa tallennetut näytteet voidaan tuoda valitsemalla "Import Samples" (Tuo näytteet) -painike. Näytteiden nimet täytetään automaattisesti tätä menetelmää käyttäen.

Huomautus: Tarkista "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa, että lisätty näytteen nimi on korostettu eri värillä kuin muut nimet ja että näytteen nimi on näytekohdassa (kuva 12).

Huomautus: Lisättävien näytteiden enimmäismäärä on seitsemän. Näytteiden tunnistet (näyteympyröihin) annetaan automaattisesti käyttäen numeroita 1–7.

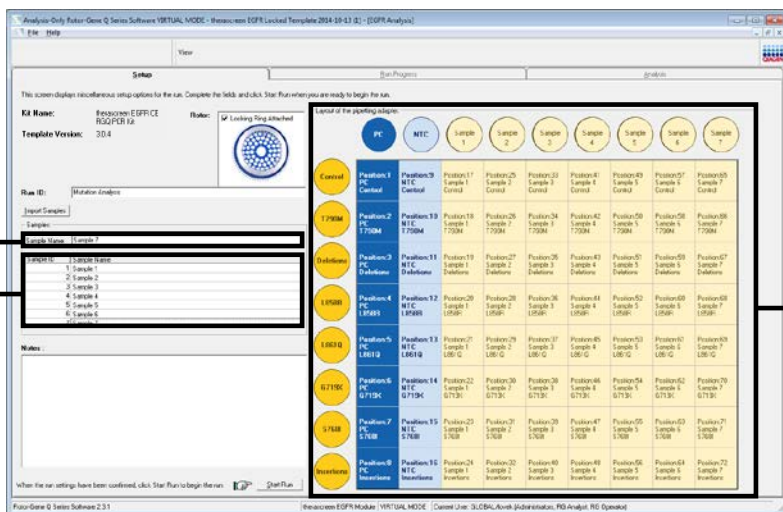
Huomautus: Jos näytteen nimessä on yli kahdeksan merkkiä, nimi ei mahdollisesti näy "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa kokonaan.



Kuva 12. "Run ID" (Ajon tunniste)- ja "Sample Name" (Näytteen nimi) -tietojen antaminen. 1 = "Run ID" (Ajon tunniste) -kenttä, 2 = "Sample Import" (Näytteen tuonti) -painike 3 = "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttä, 4 = "Sample List" (Näyteluettelo), 5 = "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeli, 6 = Korostettu näytempyrä ja 8 testin sarakke paneelin alapuolella

15. Anna muiden näytteiden nimet toistamalla vaihe 14 (kuva 13).

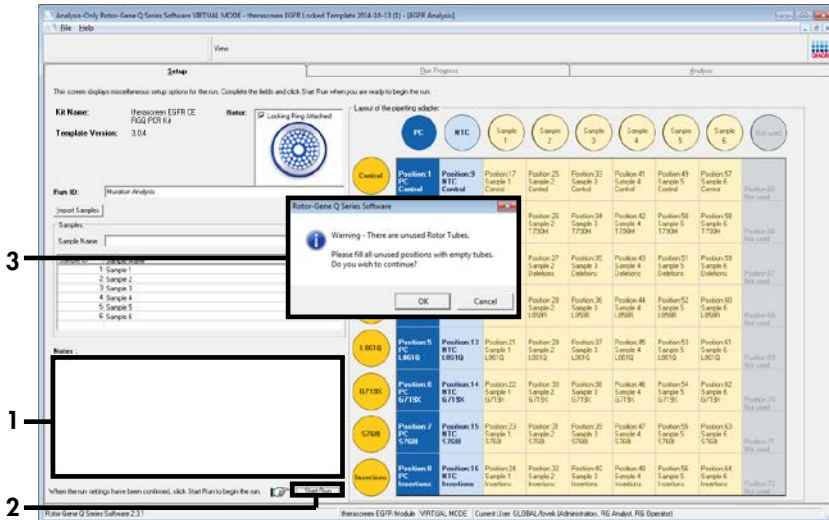
Huomautus: Voit muokata näytteen nimeä napsauttamalla näyteluettelossa kohtaa "Sample Name" (Näytteen nimi), jolloin valittu näyte tulee edellä mainittuun "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään. Muokkaa nimeä oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti ja päivitä nimi painamalla Enter-painiketta.



Kuva 13. Muiden näytteiden nimien lisääminen "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään. 1 = "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttä, 2 = "Sample List" (Näyteluettelo), 3 = "Layout of the pipetting adaptor" (Pipetointiadapterin aseteltu) -paneeli.

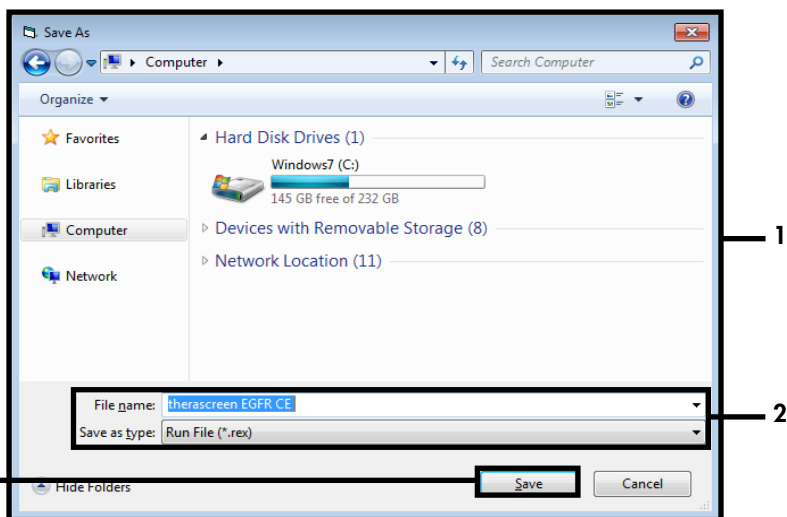
16. Kun kaikkien näytteiden nimet on annettu, varmista, että ne ovat oikein. Lisää tarvittaessa lisätietoja "Notes" (Huomautukset) -kenttään ja napsauta "Start Run" (Käynnistä ajo) -painiketta (kuva 14).

Huomautus: Jos jokin roottorin paikka on tyhjä, näkyviin tulee "Warning" (Varoitus) (kuva 14), jolla käyttäjää muistutetaan siitä, että kaikkiin roottorin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjä korkilla suljettu putki. Tarkista, että kaikissa roottorin tyhjissä kohdissa on tyhjiä putki, jonka korkki on paikallaan, ja jatka valitsemalla "OK".



Kuva 14. "Notes" (Huomautukset) -kenttä (1), "Start Run" (Käynnistä ajo) -painike (2) ja tyhjiä roottorin paikkoja koskeva "Warning" (Varoitus) (3).

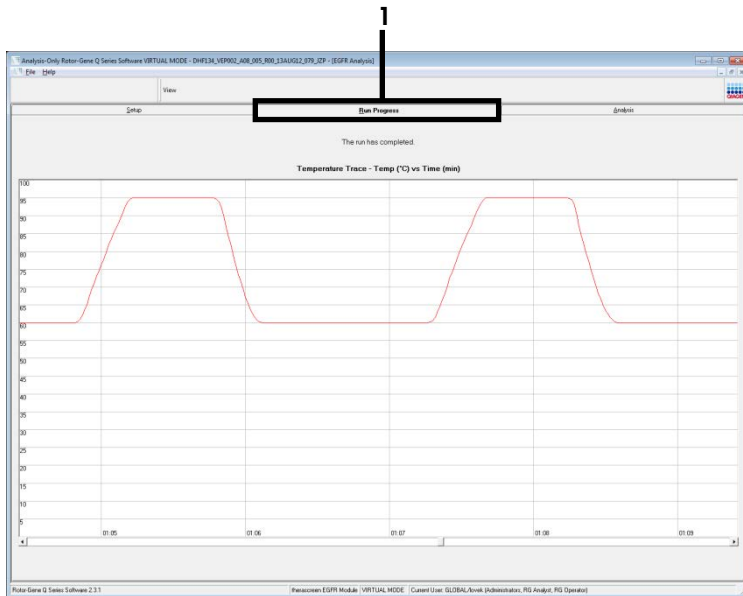
17. "Save As" (Tallenna nimellä) -ikkuna avautuu. Valitse haluamasi tiedostonimi ja tallenna PCR-ajo *.rex-tiedostona valittuun sijaintiin. Valitse "Save" (Tallenna) (kuva 15).



Kuva 15. "Save As" (Tallenna nimellä) -ikkuna (1). 2 = "File Name" (Tiedostonimi)- ja "Save as" type (Tallenna tyyppinä) kentät, 3 = "Save" (Tallenna) -painike.

18. PCR-ajo käynnistyy.

Huomautus: Kun ajo alkaa, "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti avautuu, ja siinä näkyvät lämpötilatiedot ja jäljellä oleva ajoaika (kuva 16).

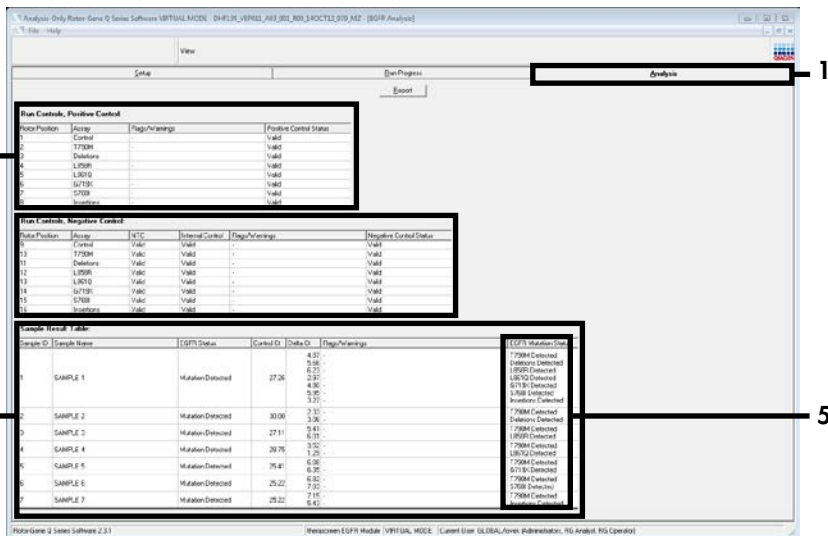


Kuva 16. "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti.

19. Kun ajo on valmis, "Analysis" (Analyysi) -välilehti avautuu automaattisesti.

Huomautus: jos "Analysis" (Analyysi) -välilehti ei avaudu, napsauta "Analysis" (Analyysi) -välilehteä (kuva 17).

Huomautus: laskentamenetelmä on selitetty kohdassa "Tulosten tulkinta (automaattinen)" sivulla 47.



Kuva 17. "Analysis" (Analyysi) -välilehti (1) ja tulosten raportointi. 2 = "Run Controls, Positive Control" (Ajon kontrollit, positiivinen kontrolli) -paneeli, 3 = "Run Controls, Negative Control" (Ajon kontrollit, negatiivinen kontrolli) -paneeli, 4 = "Sample Result Table" (Näytteen tulostaulukko), 5 = "Mutation Status" (Mutaatiostatus) -paneeli.

20. Testin tulokset raportoidaan seuraavasti (kuva 18):

Run Controls, Positive Control (Ajon kontrollit, positiivinen kontrolli): jos tulokset ovat hyväksyttävän alueen rajoissa, näytössä näkyy teksti "Valid" (Hyväksytty). Muussa tapauksessa näyttöön tulee teksti "Invalid" (Hylätty).

Run Controls, Negative Control (Ajon kontrollit, negatiivinen kontrolli): jos sekä "NTC"-että "Internal Control" (Sisäinen kontrolli) -tulokset ovat hyväksyttävän alueen rajoissa, "Negative Control Status" (Negatiivisen kontrollin status) -kohdalla näkyy teksti "Valid" (Hyväksytty). Muussa tapauksessa näyttöön tulee teksti "Invalid" (Hylätty).

Sample Result Table (Näytteen tulostaulukko): spesifiset mutaatiot raportoidaan mutaatioposiitivisten näytteiden taulukossa "EGFR Mutation Status" (EGFR-mutaatiostatus) -sarakeessa.

21. Luo raporttitiedosto valitsemalla "Report" (Raportti). "Report Browser" (Raporttiselain) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse kohdasta "Templates" (Mallit) kohta "EGFR CE Analysis

Report” (EGFR CE -analyysiraportti) ja napsauta sen jälkeen ”Show” (Näytä) -painiketta (kuva 18).

Huomautus: jos haluat tallentaa raportin ”Web Archives” (Verkkoarkisto) -muodossa toiseen sijaintiin, napsauta kunkin raportin vasemmassa yläkulmassa ”Save As” (Tallenna nimellä) -painiketta.

1 = "Report" (Raportti) -painike

2 = "Report Browser" (Raporttiselain) -paneeli

3 = "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE -analyysiraportti)

4 = "Show" (Näytä) -painike.

Kuva 18. "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE -analyysiraportti) -kohdan valitseminen. 1 = "Report" (Raportti) -painike, 2 = "Report Browser" (Raporttiselain) -paneeli, 3 = "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE -analyysiraportti), 4 = "Show" (Näytä) -painike.

Tulosten tulkinta (automaattinen)

therascreen EGFR -testipaketti suorittaa ajon lopuksi automaattisesti analyysin ja mutaation havaitsemisen. Alla on kuvattu, miten *therascreen* EGFR -testipaketti suorittaa analyysin ja mutaation havaitsemisen.

Huomautus: katso lisätietoja manuaalisesta analyysin suorittamisesta kohdasta "Tulosten tulkinta (manuaalinen)" sivulta 88.

PCR-jakso, jossa tietyn reaktion fluoresenssi ylittää raja-arvon, on määritetty C_T -arvoksi. C_T -arvot ilmaisevat spesifisen input-DNA:n määrän. Matalat C_T -arvot merkitsevät korkeampia input-DNA:n tasoja ja korkeat C_T -arvot merkitsevät matalia input-DNA:n tasoja. C_T -arvon reaktiot luokitellaan positiivisiksi monistuksiksi.

Rotor-Gene Q -ohjelmisto interpoloi fluoresenssisignaalit minkä tahansa kahden tallennetun arvon välillä. C_T -arvot voivat näin ollen olla mitä tahansa reaalitylukuja (ei pelkkiä kokonaislukuja) alueella 0–40. *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan kynnysarvoksi on asetettu 0,075 suhteellista fluoresenssiyksikköä vihreälle (FAM) kanavalle ja 0,02 yksikköä keltaiselle (HEX) kanavalle. Nämä arvot on konfiguroitu *therascreen* EGFR -testipakettiin automaattisesti. Ajon kontrollit (PC, NTC ja IC) arvioidaan, jotta voidaan varmistaa, että hyväksytyt C_T -arvot on saavutettu ja että reaktiot on suoritettu oikein.

Näytteen ΔC_T -arvot lasketaan jokaisessa mutaatiotestissä seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$\Delta C_T = [\text{mutaatiotestin } C_T\text{-arvo}] - [\text{kontrollitestin } C_T\text{-arvo}]$$

Näytteet luokitellaan mutaatioposiivisiksi, jos niiden ΔC_T -arvo on pienempi tai yhtä suuri kuin kyseisen testin ΔC_T -raja-arvo. Tämän arvon ylittäviltä osin näyte voi sisältää mutaation, jonka prosenttiosuus on pienempi kuin *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan havaitsema

prosenttiosuus (testausrajan alapuolella) tai näyte on mutaationegatiivinen, jolloin testin tulokseksi raportoidaan "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu).

Jos mutaatioreaktioissa ei ilmene monistuksia, tuloksena on "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu). ΔC_T -arvojen, jotka on laskettu taustan monistuksesta, oletetaan olevan suurempia kuin ΔC_T -raja-arvojen ja näytteen tulokseksi raportoidaan "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu).

Testitulokset ovat seuraavat: "Mutation Detected" (Mutaatio havaittu), "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu), "Invalid" (Hylätty) tai, jos ajon kontrolli epäonnistuu, "Run Control Failed" (Ajon kontrolli epäonnistui). Näytteille, joiden tulos on mutaation osalta positiivinen, ilmoitetaan havaittu mutaatio. Kasvain saattaa sisältää useamman kuin yhden mutaation. Tällaisissa tilanteissa ilmoitetaan useampi kuin yksi mutaatio.

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR -testipakkauksen merkinnät

Kohdassa Taulukko 8 (seuraava sivu) Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR -testipakkauksessa mahdollisesti käytetyt merkinnät, niiden merkitys ja suoritettavat toimenpiteet.

Merkintöjen nimien tarkoitus on antaa tietoja pakkauksen komponentista, näytteestä tai kontrollista, jota ongelma koskee, ja vikatilasta.

Esimerkki:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = positiivinen kontrolli (PC), kontrollitesti (CTRL_ASSAY) on epäonnistunut (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = malliton kontrolli (NTC), sisäinen kontrolli (INT_CTRL) on epäonnistunut (FAIL)
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = näytteen (SAMPLE), kontrollitestin (CTRL) pitoisuus on korkea (HIGH_CONC).

Taulukko 8. Merkinnot, niiden merkitykset ja toimenpiteet

Merkinnot	Merkitys	Toimenpide
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-ajo hylätty – FAM C _T -arvo kontrollireaktion positiivisen kontrollin sallitun alueen ulkopuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR-ajo hylätty – FAM C _T -arvo sallitun alueen ulkopuolella yhdessä tai useammassa mutaatiokontrollireaktiossa.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR-ajo hylätty – positiivisen kontrollin (kontrollireaktioseos) fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR-ajo hylätty – positiivisen kontrollin (mutaatioreaktioseos) fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin sisäinen kontrolli rajan yläpuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin sisäinen kontrolli rajan alapuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INVALID_CT	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin FAM hylätty (rajan alapuolella).	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INVALID_DATA	PCR-ajo hylätty – negatiivisen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Näyte hylätty – näytteen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Toista virheelliset näytteet tekemällä uusi ajo.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Näyte hylätty – näytteen kontrollin FAM C _T liian matala	Laimenna näytettä, jotta kontrollin C _T -arvo suurenee. Laimennussuhde on laskettava siten, että oletuksena on, että kun näytettä laimennetaan sarjan mukana toimitetulla vedellä suhteessa 1:1, arvo nousee C _T 1,0:llä. Kun näyte on laimennettu, suorita näytteelle mutaatiotesti. Tai jos näyte on laimennettu DNA-näytteen arvioinnin jälkeen, jatka suoraan EGFR-mutaation havaitsemiseen laimennetusta näytteestä.

Merkintä	Merkitys	Toimenpide
SAMPLE_CTRL_FAIL	Näyte hylätty – näytteen kontrollin FAM C _T liian korkea.	Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty myös toistetussa PCR-ajossa, ja jos DNA:n määrä ei vielä riitä, uuta kaksi uutta FFPE-kudososaa, jos mahdollista. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty, toista PCR-ajo toiselle näytteelle. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Sisäisen kontrollin (HEX) CT liian korkea (tai ei C _T :tä), FAM-kanavan mutaatiotulos negatiivinen.	Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitseväällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätestaus ei ole tarpeen. Laimenna näytettä pakkauksen mukana toimitetulla vedellä sillä oletuksella, että näytteen laimentaminen 1:1-suhteeseen nostaa kontrollireaktion C _T :tä arvolla 1,0. Varmista, että lopullinen tilavuus on >40 µl (eli 40 µl DNA:ta ja 40 µl vettä putkesta, jossa on merkintä DIL). Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on hylätty, uuta näyte kahdesta FFPE-lisäosasta. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos toinen näyte on hylätty, tee laimennus yllä olevien ohjeiden mukaan. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutaatioputki hylätty – näytteen (sisäinen kontrolli) C _T HEX on liian matala.	Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitseväällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätestaus ei ole tarpeen. Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos toistettu PCR-ajo on hylätty, uuta uudet näytteet kahdesta FFPE-kudososasta, jos niitä on. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty, toista PCR-ajo toiselle näytteelle. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.

Merkintä	Merkitys	Toimenpide
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutaatioputki hylätty – sisäisen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	<p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitsevällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätestaus ei ole tarpeen.</p> <p>Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos toistettu PCR-ajo on hylätty, uuta uudet näytteet kahdesta FFPE-kudososiesta, jos niitä on. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos näyte on hylätty, toista PCR-ajo toiselle näytteelle. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.</p>

Merkintä	Merkitys	Toimenpide
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Näytteessä on yksi tai useampi positiivinen mutaatio, samalla yksi tai useampi saman näytteen mutaatioista on hylätty.	<p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joista havaitaan (tai ei havaita) mutaatiota, kun ne on käsitelty kliinisesti merkitsevällä mutaatioreaktioseoksella: raportoi tulokset, lisätestaus ei ole tarpeen.</p> <p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joiden kliinisesti merkityksellisen mutaatioreaktioseoksen tulos on hylätty (INVALID), on testattava uudelleen kaikkien reaktioseoksien kanssa merkinnän mukaisen toimenpiteen tekemisen jälkeen.</p> <p>Jos SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkintä annetaan kyseessä olevan näytteen muun merkinnän yhteydessä, on noudatettava SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkinnän toimenpiteen mukaista näytteen laimennusta. Valmistele uusi PCR-ajo ja testaa näyte uudelleen.</p> <p>Näytteet, jotka saavat SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID -merkinnän ja joiden kliinisesti merkityksellisen mutaatioreaktioseoksen tulos toistetussa PCR-ajossa on hylätty (INVALID) on uutettava uudelleen kahdesta uudesta FFPE-osasta. Valmistele uusi PCR-ajo kaikilla reaktioseoksilla tämän uutetun näytteen testaamista varten.</p> <p>Jos näyte tuottaa virheellisen tuloksen jälkeen kliinisesti merkityksellisille mutaatioreaktioseoksille, testaa näyte uudelleen kaikkien reaktioseoksien kanssa virheellisyydestä ilmoittavan merkinnän mukaisen toimenpiteen tekemisen jälkeen. Jos SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkintä annetaan kyseessä olevan näytteen muun merkinnän yhteydessä, on noudatettava SAMPLE_INT_CTRL_FAIL -merkinnän toimenpiteen mukaista näytteen laimennusta. Valmistele uusi PCR-ajo ja testaa näyte uudelleen.</p> <p>Jos tämän toiston aikana havaitaan SAMPLE_POS_AND_INVALID -merkintä, näytteelle annetaan määrittämättömän mutaation status.</p>

Vianetsintä

Tämä ongelmien ratkaisuoapas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustoltamme usein kysyttyjen kysymysten osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja testeihin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän käsikirjan takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com.)

Huomautuksia ja ehdotuksia

NTC-näytteiden tulos on positiivinen vihreässä FAM-kanavassa

PCR:n valmistelun aikana tapahtui kontaminaatio

Toista PCR uusilla reagensseilla replikaateissa.

Jos mahdollista, sulje PCR-putket heti testattavan näytteen lisäämisen jälkeen.

Varmista, että työskentelytila ja laitteet dekontaminoidaan säännöllisesti.

EGFR-positiivinen kontrolli ei anna signaalia

- | | |
|--|--|
| a) PCR-tietojen analysointia varten valittu fluoresenssikanava ei ole yhdenmukainen protokollan kanssa | Tietojen analysoimisessa pitää valita vihreä fluoresenssikanava analyyttistä EGFR:n PCR:ää varten ja keltainen fluoresenssikanava sisäisen kontrollin PCR:ää varten. |
| b) Rotor Gene Q MDx -laitteen lämpötilaprofiilin virheellinen ohjelmointi | Vertaa lämpötilaprofiilia protokollaan. Jos se on virheellinen, toista ajo. |
| c) PCR on määritetty väärin | Tarkista, noudattavatko työskentelyvaiheesi pipetointitapaa ja toista PCR tarvittaessa. |
| d) Yhden tai useamman sarjan osan säilytysolosuhteet eivät vastanneet kohdassa "Reagenssien säilytys ja käsittely" (sivu 19) annettuja ohjeita | Tarkista säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR -sarja on vanhentunut. | Tarkista säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (katso sarjan etiketti). Käytä tarvittaessa uutta sarjaa. |

Laadunvarmistus

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen *therascreen EGFR RGQ PCR* -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Rajoitukset

Tuotteella saatujen tulosten tulkinnessa on otettava huomioon kaikki asianmukaiset kliiniset löydökset ja laboratoriolöydökset, eikä diagnoosia saa tehdä yksin testitulosten pohjalta.

Tätä tuotetta saavat käyttää ainoastaan henkilöt, jotka ovat saaneet erityisopastuksen ja -koulutuksen *in vitro* -diagnostisiin toimenpiteisiin ja Rotor-Gene Q MDx -laitteisiin.

Tuote on tarkoitettu käytettäväksi vain Rotor-Gene Q MDx -laitteen reaaliaikaisessa PCR-laitteessa.

Optimaalisten tulosten saavuttaminen edellyttää kaikkien *therascreen EGFR RGQ PCR* -sarjan *käsikirjassa annettujen* ohjeiden huolellista noudattamista. Reagenssien muu kuin tässä käsikirjassa määritetty laimentaminen ei ole suositeltavaa, ja se johtaa suorituskyvyn heikkenemiseen.

On tärkeää, että näytteen sisältämän DNA:n määrä ja laatu arvioidaan ennen näytteen analysointia *therascreen EGFR RGQ PCR* -sarjaa käyttämällä. Testiin vaadittava hyväksyttävä C_T -arvo voidaan määrittää sarjan mukana toimitettavaa ylimääräistä kontrollireaktioseosta käyttäen. Absorbanssilukemien käyttö ei ole hyväksyttävää, sillä ne eivät korreloi DNA:n C_T -arvojen kanssa.

Kaikki kaikkien osien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Suorituskykyominaisuudet

Analyyttinen suoritus

therascreen EGFR RGQ PCR -sarjan suorituksen ominaispiirteet on määritetty tutkimuksissa, joissa käytettiin NSCLC-potilailta kerättyjä FFPE-näytteitä ja ihmisen FFPE-solulinjoja (FFPE-solulinjat). FFPE-solulinjat luotiin käyttämällä keuhkosyövän solulinjaa (A549), jotta saatiin aikaa haluttuja tiettyjä EGFR-mutaatioita sisältäviä solulinjoja. Jos kudosnäytteitä tai solulinjoja ei ollut käytettävissä, käytettiin DNA-plasmidia.

LOB (Limit of blank), toiminta-alue ja raja-arvot

Yhteensä 417 FFPE-näytettä testattiin tutkimuksessa NCCLS EP17-A -ohjeiden (2004) (12) mukaisesti LOB-arvojen ja raja-arvojen määrittämiseksi kussakin mutaatiotestissä. Lisäksi työskentelyalue määritettiin. Luodut raja-arvot on esitetty kohdassa Taulukko 9.

Taulukko 9. Mutaatiotesteille luodut raja-arvot

Testi	Raja-arvo (cutoff [Δ CT])
T790M	$\leq 7,40$
Deleetiot	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Insertiot	$\leq 8,00$

Kontrollireaktion C_T -alueeksi määritettiin 23,70–31,10 C_T .

Testin raja-arvot ja toiminta-alueet varmistettiin standardiliuosten avulla sekä lisäksi FFPE-näytteillä. Varmistuksen aikana raja-arvoista arvioitiin niiden kyky erottaa oikea mutaatio villityypin DNA:ssa arvioimalla jokainen testi suurella genomisella input-DNA:lla ja suurella DNA-mutaatiomäärällä (katso ”Ristireagoivuus”, sivu 56). Myös lähtö-DNA:n vaikutus mutaation havaitsemiseen arvioitiin (katso ”Lähtö-DNA:n vaikutus ΔC_T -arvoihin”, sivu 56).

therascreen EGFR RGQ PCR -sarjan suorituskyyvyn arvioimiseksi mallin puuttuessa sekä sen varmistamiseksi, että tyhjä näyte tai villityypin DNA:ta sisältävä näyte ei tuota pienen pitoisuuden mutaatiota ilmaisevaa analyttistä signaalia, mallittomat näytteet ja villityypin NSCLC EGFR -DNA arvioitiin. Tuloksissa ei ilmennyt positiivisia mutaatioilmoituksia NTC-näytteistä tai villityypin FFPE-näytteistä.

Lähtö-DNA:n vaikutus ΔC_T -arvoihin

DNA-lähtötaso on monistettavan EGFR DNA:n kokonaismäärä näytteessä kontrollireaktion C_T -arvoilla määritettynä. Jotta voitiin osoittaa, että *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan suorituskyyky on yhdenmukainen koko kontrollireaktion C_T -alueella (23,70–31,10), kaikki seitsemän EGFR-mutaatiotestiä testattiin kuusipisteisellä 1-in-3-laimennussarjalla (DNA uutettu FFPE-solulinjoista). Kunkin mutaation ensimmäisen laimennuksen C_T -tavoitearvo oli noin 24,70. Lopullinen laimennus, joka antoi C_T -arvoksi noin 32–33, oli kontrollireaktion C_T -alueen ulkopuolella. Eri DNA-kokonaislähtötasoilla mitatut ΔC_T -arvot olivat yleensä yhdenmukaisia *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan työskentelyalueella.

Ristireagoivuus

Villityypin EGFR DNA testattiin korkeana lähtö-DNA:na ei-spesifisen monistumisen arvioimiseksi. Tulokset osoittivat, että matalimmat ΔC_T -arvot ylittivät määritetyt raja-arvot, mikä tarkoitti, että ei-spesifistä monistumista ei tapahtunut.

Mahdollinen ristireaktiivisuus arvioitiin testaamalla FFPE-solulinjat korkeana lähtö-DNA:na kaikilla reaktioseoksilla. Tuloksissa ei ilmennyt ristireaktiivisuuden aiheuttamia vaikutuksia mutanttireaktioiden välillä. Vähimmäisarvot arvolle ΔC_T olivat korkeampia kuin kulloisenkin testin raja-arvot kaikille yhteensopimattomille reaktioseoksille ja DNA-näytteille.

Tarkkuus: Vertailu analyttiseen vertailumenetelmään

Tutkimuksessa ilmeni *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan korrelaatio mutaatiostatuksen suhteen kaksisuuntaisen Sanger-sekvensoinnin kanssa. Tässä tutkimuksessa testattiin 360 FFPE-näytettä.

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Positive Percent Agreement, PPA), negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Negative Percent Agreement, NPA) ja yleinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (Overall Percent Agreement, OPA) määritettiin analysoimalla näytteet, joiden sekä Sanger- ja *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan tulokset olivat hyväksyttyjä. Nämä prosentuaaliset arvot sekä niitä vastaavat kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit (confidence intervals, CI) on koottu kohtaan Taulukko 10.

Taulukko 10. Yhtäpitävyyden arviointi

Mittari	Prosentuaalinen yhtäpitävyys (N)	95 % CI
Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys	99,4% (157/158)	96,5–100,0 %
Negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys	86,6% (175/202)	81,2–91,0 %
Yleinen prosentuaalinen yhtäpitävyys	92,2% (332/360)	89,0–94,8 %

Huomiot 28 ristiriitaisesta yleisen prosentuaalisen yhtäpitävyyden tuloksesta:

- *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan mukaan 1 (3,6%) näyte oli villityyppiä (eli mutaatiota ei havaittu), mutta Sanger-sekvensointi antoi tulokseksi havaitun mutaation.

- *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja havaitsi mutaation 27 (96,4%) näytteessä, mutta Sanger-sekvensointi antoi tulokseksi villityypin näytteen.

Havaitsemisraja (LOD) -arvot

Jokaisen 29 EGFR-mutaation LOD määritettiin tutkimuksessa. Tutkimuksessa havaitsemisraja määritettiin matalimmaksi määräksi mutaatio-DNA:ta villityypin DNA:ssa, jolla mutaationäyte antaa 95 prosentissa testituloksista mutaatioposiitiivisen tuloksen (C₉₅).

Havaitsemisrajan määrittämiseksi kustakin mutaatiosta valmistettiin näytteitä, jotka erosivat toisistaan mutaatioprosentin ja matalan ja korkean lähtö-DNA:n pitoisuuden suhteen. Näytteet testattiin *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla (Taulukko 11). Kunkin testin havaitsemisraja laskettiin logistisella regressiolla. LOD varmistettiin testaamalla mutaationäytteet, joiden LOD oli määritetty, ja vahvistamalla positiivinen testitulos.

Taulukko 11. LOD määritettiin käyttämällä matalaa ja korkeaa lähtö-DNA:ta, kliinisiä FFPE-näytteitä, FFPE-solulinjoja ja plasmideja

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Emäsjärjestyksen muutos	LOD (mutantti-%)	
				Matala	Korkea
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	— [¶]
19	Deleetiot	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	— [¶]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	— [¶]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	— [¶]

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Emäsjärjestyksen muutos	LOD (mutantti-%)	
				Matala	Korkea
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	— [¶]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]
		12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Insertiot	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 [†]	— [¶]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

* COSMIC: syövän somaattisten mutaatioiden luettelo: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] LOD-arvot saatiin käyttämällä solulinjoja

[†] LOD-arvot saatiin käyttämällä plasmideja

[†] LOD-arvot saatiin käyttämällä kliinisiä näytteitä

[¶] ei arvioitu

Häiriöt

Nekroottisen kudoksen aiheuttamat häiriöt

Kliiniset NSCLC FPFE -näytteet, joissa oli korkeintaan 50 % nekroottista kudossisältöä eivät häirinneet *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan tulosten tulkintaa EGFR-mutaation tai villityypin näytteillä.

Eksogeeniset aineet

Seuraavia DNA-utteen sisältämiä mahdollisesti häiritseviä aineita testattiin mutantti- ja villityypin näytteissä 10-kertaisella pitoisuudella: parafiinivaha, ksyleeni, etanoli, proteinaasi K. Tulokset todistivat, että nämä aiheet eivät häirinneet *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan tulosten tulkintaa.

Uusittavuus

Erienvälinen uusittavuus

therascreen EGFR RGQ PCR -sarjan järjestelmässä käytetään kahta erillistä sarjaa: QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjaa tai QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjaa DNA:n eristämiseen ja *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjaa DNA:n monistamiseen ja EGFR-mutaatioiden tilan havaitsemiseen. Erienvälinen uusittavuus ja vaihtokelpoisuus todettiin käyttämällä kolmea eri QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan erää ja kolmea eri *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan erää. Erien välinen oikeiden tulosten kokonaisprosentti oli EGFR-mutaatiotestien osalta 97,8 % (317/324) ja villityypin näytteiden osalta 100 % (379/379).

Näytteiden käsittely

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan uusittavuus tutkittiin käyttämällä kolmesta FFPE-näytelohkosta otettuja osioita, erityisesti eksonin 19 deleetion mutaatiota (2235-2249 del15), eksonin 21 L858R-mutaatiota ja yhtä villityyppiä. Kullekin näytteelle uutteen tehtiin kaksoiskappaleina kolmessa tutkimuskeskuksessa ja testattiin kolmena ei-peräkkäisenä päivänä kuuden päivän sisällä toisistaan, jolloin tulokseksi saatiin yhteensä 18 tietopistettä jokaiselle näytteelle. Kussakin tutkimuskeskuksessa kaksi käyttäjää teki testauksen käyttämällä yhtä QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -sarjan erää (yksi erä jokaisessa tutkimuskeskuksessa, yhteensä kolme erää) ja yhden *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan erän reagensseja (kaikissa tutkimuskeskuksissa sama erä). Kaikkien mutantti- ja villityypin näytteiden tulokset olivat hyväksyttäviä ja tuottivat odotetun tuloksen (oikea tulos = 100 %, 18/18 kaikille näytteille), mikä tuki *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan uusittavuus- ja toistettavuustuloksia analyysiä edeltävässä DNA:n eristämisvaiheessa.

Tarkkuus ja uusittavuus

therascreen EGFR RGQ PCR -sarjan tarkkuus ja uusittavuus tutkittiin testaamalla kliinisistä NSCLC FFPE -näytteistä tai FFPE-solulinjoista uutettua DNA:ta, joka vastasi *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan seitsemää mutaatiotestiä. Testiin kuului myös kliinisiä NSCLC-villityypin FFPE-näytteitä (Taulukko 12).

Matriisitutkimusmallia käytettiin testin uusittavuuden arvioimiseen testaamalla näytteitä kolmessa laboratoriossa (tutkimuskeskus) kolmella eri *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan erällä niin, että kussakin tutkimuskeskuksessa oli kaksi käyttäjää, kaksi laitetta ja kaikki näytteet (valmisteltu miltei LOD:ta vastaavalle pitoisuudelle) testattiin kaksoiskappaleina 16 päivän aikana. Kunkin yksittäisen mutaation uusittavuus määritettiin kaikissa tutkimuskeskuksissa tekemällä testit muina kuin toisiaan seuraavina päivinä. Oikeiden tulosten jakauma on esitetty kohdassa Taulukko 12 seuraavalla sivulla.

Taulukko 12. Testin uusittavuus – oikeiden tulosten osuus testatuista EGFR-mutaatioista

Eksoni	Mutaatio	COSMIC*-tunniste	Tulokset		% oikein
			Oikein/yhteensä	% oikein	Matalampi yksipuolinen 95 %n CI
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Deleetiot	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
	Insertiot	12376	92/92	100	96,80
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Villityyppi	–	–	77/78	98,72	94,06

* COSMIC: syövän somaattisten mutaatioiden luettelo: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Keskihajonta ja 95 %:n luottamusvälit arvioitiin ajon aikana, ajojen välillä, päivien välillä, erien välillä ja tutkimuskeskusten välillä tekemällä varianssikomponentin analyysi. Kaikissa varianssikomponenteissa variaatiokerroin (CV) oli yhteensä $\leq 14,11$ % kaikille testatuille EGFR-mutaatioille. Kaikille mutanttipaneelin osille CV:n prosentti oli $\leq 8,33$ % erien välillä, päivien välillä ja ajojen välillä. CV:n prosentti ajon aikana vaihteli (uusittavuus/tarkkuus) alueella 5,99–13,49 %.

Kliininen suorittaminen

Kliinisten tulosten tiedot: GIOTRIF®

Kliininen LUX-Lung 3 -tutkimus oli kansainvälinen, avoin, satunnaistettu III:n vaiheen monikeskustutkimus, jossa verrattiin afatinibia ja kemoterapiaa ensisijaisena hoitona potilaille, joilla oli vaiheen IIIB tai IV keuhkojen adenokarsinooma, johon liittyi EGFR-aktivoiva mutaatio (ClinicalTrials.gov-numero NCT00949650). Tutkimukseen otettavien potilaiden sisäänottokriteerit määritettiin testaamalla potilaan EGFR-mutaation tila kliinisen tutkimuksen testillä (Clinical Trial Assay, CTA). Kudosnäytteille tehtiin retrospektiivinen testaus *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla. CTA-testin ja *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan konkordanssia arvioitiin järjestelmällä yhdistävä tutkimus.

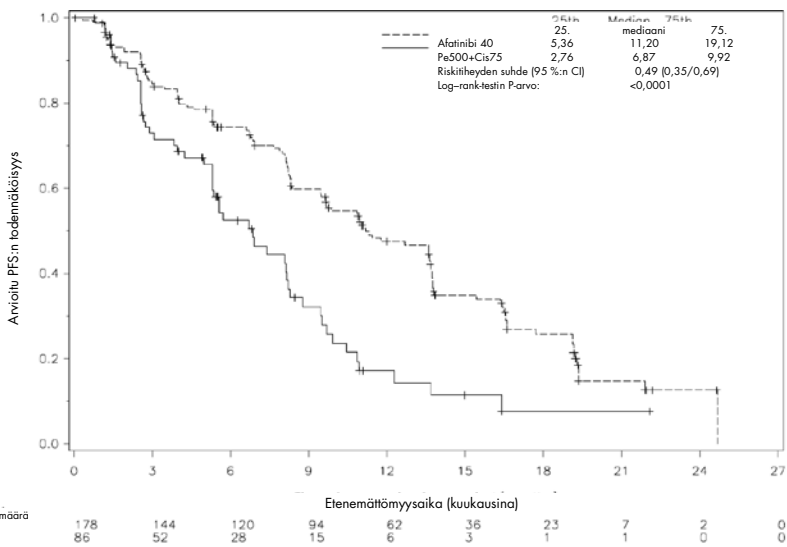
CTA-testin tuloksien mukaan 345 potilasta satunnaistettiin tutkimuksen alussa (afatinibi: 230 potilasta, kemoterapia: 115 potilasta). Tehokkuuden ensisijainen tulos oli etenemättömyysaika (**Progression-free survival**, PFS), jonka arvioi itsenäinen arviointitoimikunta (independent review committee, IRC). 345 satunnaistetun potilaan joukosta 264 potilaan (afatinibi: 178 potilasta, kemoterapia: 86 potilasta) kasvainnäytteet testattiin retrospektiivisesti *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan avulla. Tilastollisesti merkitsevä parannus PFS:ssä havaittiin IRC:n mukaan potilailla, jotka oli satunnaistettu saamaan afatinibihoitoa, verrattuna potilaisiin, jotka oli satunnaistettu saamaan kemoterapiaa, yleisesti CTA+-populaatiossa ja *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja+ / CTA+ -

populaatiossa. Tehokkuuden kokonaistuloksien yhteenveto on esitetty kohdassa Taulukko 13 ja kuvassa 19.

Taulukko 13. Kliiniset hyödyt *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla testatuilla kliinisen LUX-Lung 3 -tutkimuksen populaation potilailla

Parametri	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR -sarja+/ CTA+ -populaatio n = 264		CTA+-populaatio, n = 345	
	kemoterapia n = 86	afatinibi n = 178	Kemoterapia n = 115	afatinibi n = 230
Etenemättömyysaika (PFS)				
Kuolemien tai etenemisien määrä, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4 %)	69 (60,0 %)	152 (66,1 %)
PFS:n mediaani (kuukaudet)	6,9	11,2	6,9	11,1
PFS:n 95 %:n CI:n mediaani	5,3; 8,2	9,7; 13,7	5,4; 8,2	9,6; 13,6
Riskitiheyksien suhde	0,49		0,58	
Riskitiheyksien suhteen 95 %:n CI	0,35; 0,69		0,43; 0,78	
P-arvo (ositettu log-rank-testi)*	<0,0001		<0,001	

* ositettu EGFR-mutaatiostatuksen ja rodun suhteen.



Kuva 19. Kaplan-Meier-käyrä etenemättömyysajasta (PFS) itsenäisen arviointitoimikunnan mukaan hoitoryhmittäin *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja+ / CTA+ -populaatiossa).

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja+ / CTA+ -aliryhmän (n = 264) analyysi paljasti, että afatinibihoitoa saavien potilaiden ryhmässä PFS-aika (PFS-mediaani 11,2 vs. 6,9 kuukautta) piteni merkitsevästi, ja tässä ryhmässä etenevän sairaustapahtuman tai kuoleman (HR = 0,49, 95 % CI [0,35; 0,69], p<0,0001) todennäköisyys oli pienempi kuin kemoterapiaa saaneiden potilaiden ryhmässä. Havaittua kliinistä hyötyä *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla testattujen potilaiden aliryhmässä verrattiin koko tutkimuspopulaation (n = 345) vastaavaan havaittuun arvoon.

Kliinisten tulosten tiedot: IRESSA®

Kliininen IRESSA Follow-up Measure (IFUM) -seurantatutkimus oli faasin IV avoin yhden tutkimusryhmän tutkimus (NCT01203917), jossa arvioitiin ensisijaisen gefitinibihoiton tehokkuutta ja turvallisuutta/siedettävyyttä valkoihoisilla potilailla, joilla oli vaiheen IIIA/B/IV EGFR-mutaatioposiitiivinen paikallisesti levinnyt tai metastaattinen NSCLC. IFUM-tutkimus

suunniteltiin arvioimaan RECIST-kriteerien mukaista objektiivista vasteosuutta valkoihoisissa NSCLC-potilaissa, joilla oli prospektiivisesti valittu EGFR-mutaatio.

Tutkimukseen otettavilla potilailla piti olla deleetio EGFR:n eksonissa 19, L858R:n, L861Q:n tai G719X:n korvaava mutaatio eikä T790M- tai S768I-mutaatiota tai eksonin 20 insertioita kasvainnäytteissä prospektiivisesti tehdyn kliinisen tutkimuksen testin (CTA) mukaan. Kliiniseen IFUM-tutkimukseen otettujen potilaiden plasmanäytteiden myöhempi testaus tehtiin käyttämällä lisäksi diagnostista *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR -sarjaa. Yhdistävällä tutkimuksella arvioitiin *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan yhdenmukaisuutta sen CTA:n kanssa, jolla potilaat valikoitiin kliiniseen IFUM-tutkimukseen. Kahden testin välinen kokonaiskonkordanssi EGFR:n eksonin 19 deleetioiden ja L858R-mutaatioiden havaitsemisessa oli 98,2 % (n = 700/713; 95 % CI: 96,9 %, 99,0 %), jossa PPA oli 88,2 % (n = 90/102; 95 % CI: 80,4 %, 93,8 %), jossa NPA oli 99,8 % (n = 610/611; 95 % CI: 99,1 %, 100,0 %).

CTA-testien tulokset saatiin 859 seulotulta potilaalta, joista 106 oli hyväksyttävissä käyttämään gefitinibihoitoa. Yhteensä 859 näytteestä, joista oli olemassa CTA-tulokset, 765 näytettä oli myöhemmin käytettävissä testaukseen *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla. Näihin kuului 87 EGFR-mutaatiopositiivisen tuloksen CTA-testillä ja *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla antanutta näytettä.

Tärkein tehokkuustulos oli objektiivinen vasteisuus (objective response rate, ORR), jonka arvioivat sokkoutettu erillinen keskustoimikunta (Blinded Independent Central Review, BICR) ja tutkijat. Havaittua kliinistä hyötyä *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla testattujen potilaiden aliryhmässä verrattiin koko tutkimuspopulaation vastaavaan havaittuun arvoon.

Tehokkuuden kokonaistuloksien yhteenveto on esitetty kohdassa Taulukko 14.

Taulukko 14. Kliiniset hyödyt *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla testatuilla kliinisen IFUM-tutkimuksen populaation potilailla

Parametri	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR -sarja+ -populaatio, n = 87	CTA+ -populaatio, n = 106
Objektiivinen vasteisuus (ORR) BICR:n mukaan		
Vastemäärä (N)	42	53
ORR, % (95 % CI)	48,3 (38,1–58,6)	50,0 (40,6–59,4)
Vasteen mediaanikesto (kuukausina)	6,9 (5,6–11,4)	6,0 (5,6–11,1)
Objektiivinen vasteisuus (ORR) tutkijoiden mukaan		
Vastemäärä (N)	62	74
ORR, % (95 % CI)	71,3 (61,0–79,7)	69,8 (60,5–77,7)
Vasteen mediaanikesto (kuukausina)	8,3 (7,2–11,3)	8,3 (7,6–11,3)

BICR: sokkoutettu erillinen keskustoimikunta, **CI:** luottamusväli; **CTA:** kliinisen tutkimuksen testi

Huomautus: sarja+ ovat positiivisia eksonin 19 deleetioiden/L8585R:n/L861Q:n/G719X:n osalta.

Huomioitaessa, että *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjaa ei käytetty potilaiden valintaan kliiniseen IFUM-tutkimukseen, tehokkuuden lisäanalyysyjä tehtiin, jotta voitiin huomioida myös tutkimuksen ulkopuoliset potilaat, jotka olivat saaneet negatiivisen tuloksen CTA-testissä, mutta olisivat saattaneet saada positiivisen tuloksen *therascreen* EGFR RGQ PCR-sarjalla (eli *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA–), sekä tutkimukseen otetut potilaat, joiden *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjalla uudelleen tehty testitulokset eivät olleet hyväksyttäviä (eli *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarja tuntematon/CTA+). Kaikkien hypoteettisten analyysien tulokset olivat yleisesti samankaltaisia kuin ensisijaiset tehokkuuden analyysit.














Lähdeviitteet

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

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

Merkinnät

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Merkintä	Symbolin määritelmä
 <N>	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaite
	Luettelonumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	Suojaa auringonvalolta
	GTIN-numero
	Valtuutettu edustaja
Rn	R tarkoittaa käsikirjan versiota ja n on versionumero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Katso käyttöohjeet
	Huomio

Liite A: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan manuaalinen protokolla

Tässä osioissa on ohjeet *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan käyttöön yhdessä Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3 kanssa avoimessa tilassa (eli ilman Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE -testipakkausta).

Yleistä

- Katso tarvittavien materiaalien luettelo kohdasta "Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)" sivulta 15.
- Katso yksityiskohtaiset ohjeet näytteen valmistelusta ja asettelusta osasta Protokolla: Näytteen arviointi sivulta 22 ja osasta "Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen" sivulta 34.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että jakson parametrit on asetettu oikein.

Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen

Luo ennen aloittamista lämpötilaprofiili *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan analysointia varten. Jakson parametrit ovat samat sekä DNA-näytteen että mutaation havaitsemisessa.

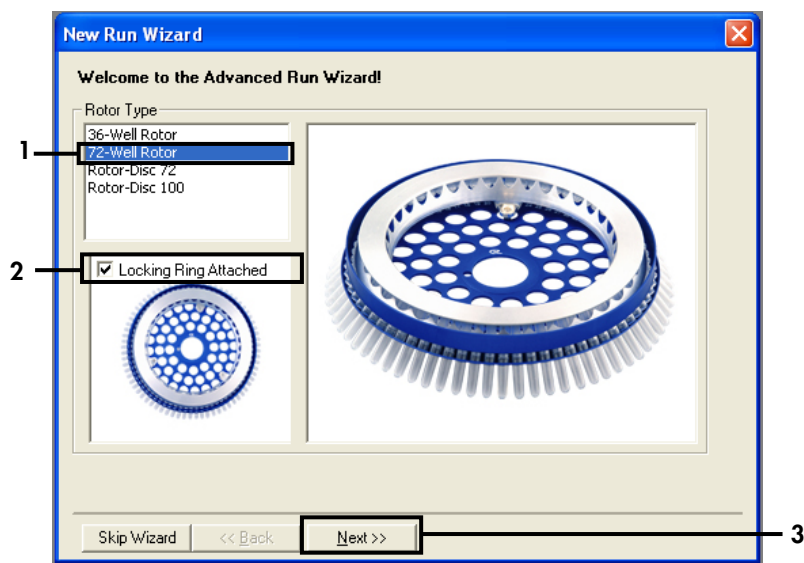
Toimenpide

Jakson parametrien yhteenveto esitetään kohdassa Taulukko 15.

Taulukko 15. Lämpötilaprofiili

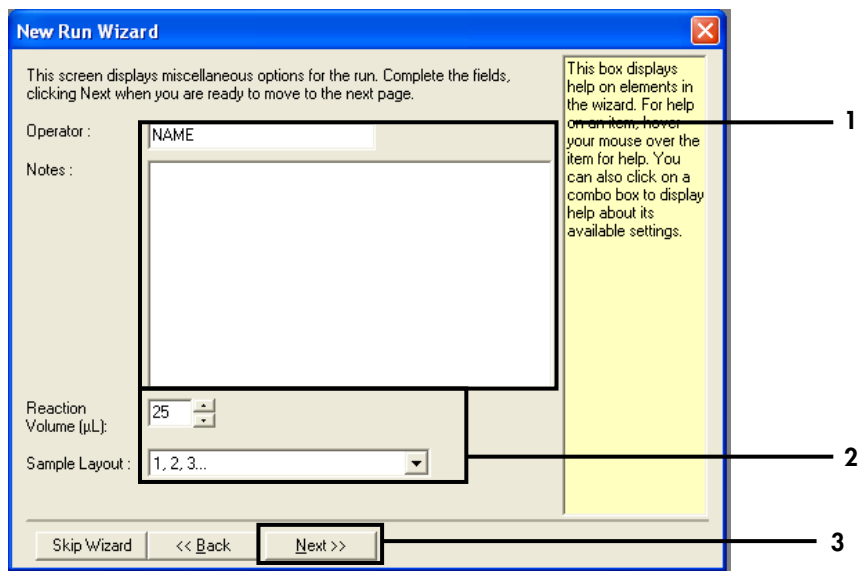
Jaksot	Lämpötila	Aika	Tiedonkeruu
1	95 °C	15 minuuttia	Ei mitään
40	95 °C	30 sekuntia	Ei mitään
	60 °C	60 sekuntia	Vihreä ja keltainen

1. Kaksoisnapsauta Rotor-Gene Q Series Software 2.3 -kuvaketta Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn tietokoneen työpöydällä.
2. Luo uusi malli valitsemalla "Empty Run" (Tyhjä ajo), valitse "New" (Uusi) ja käynnistä "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo).
3. Valitse roottorityypiksi 72-kuoppainen roottori. Varmista, että lukkorengas on paikallaan ja laita rasti "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Valitse "Next" (Seuraava) (kuva 20).



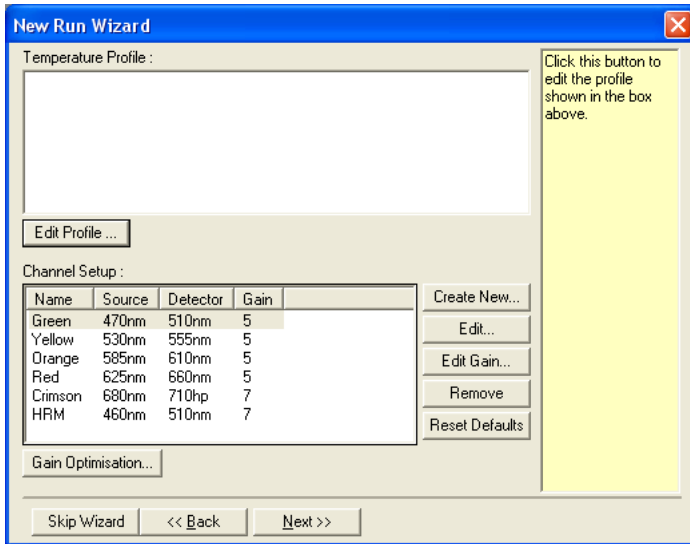
Kuva 20. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu. 1 = "Rotor type" (Roottorityyppi), 2 = "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu, 3 = "Next" (Seuraava) -painike.

4. Anna testaaajan nimi. Lisää mahdolliset huomautukset ja anna reaktiomääräksi 25. Varmista, että "Sample Layout" (Näytteen asettelu) -kohdassa lukee "1, 2, 3...". Valitse "Next" (Seuraava) (kuva 21).



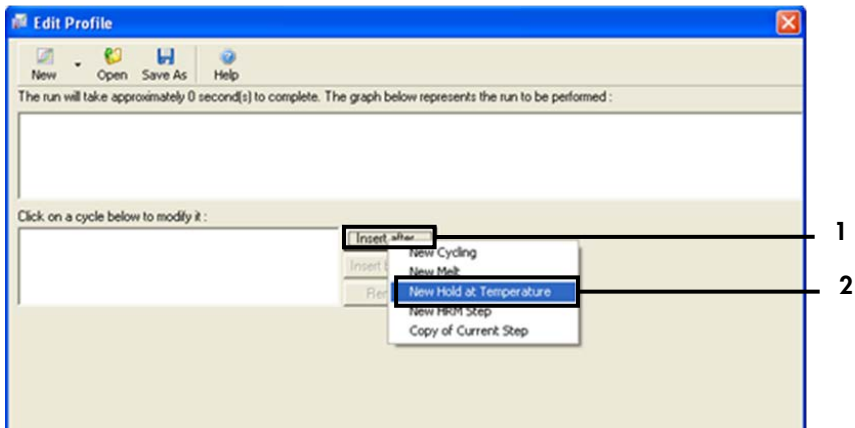
Kuva 21. Testaajan nimen ja reaktiomäärän antaminen. 1 = "Operator" (Testaaja) -kenttä ja "Notes" (Huomautukset) -kenttä, 2 = "Reaction Volume (Reaktiomäärä)" -kenttä ja "Sample Layout" (Näytteen asettelu) -kenttä, 3 = "Next" (Seuraava)

5. Napsauta "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -ikkunassa "Edit Profile" (Muokkaa profiilia) -painiketta (kuva 22) ja tarkista ajon parametrit alla esitettyjen vaiheiden mukaisesti.



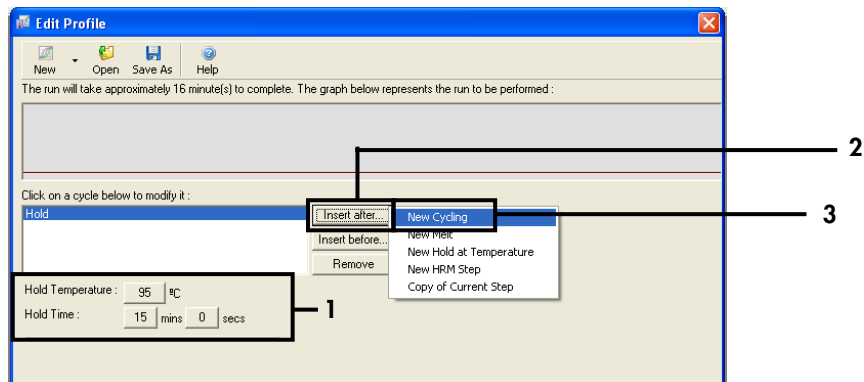
Kuva 22. "Edit Profile" (Muokkaa profiilia) "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -ikkunassa.

6. Napsauta "Insert after" (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta "New Hold at Temperature" (Uusi pito lämpötilassa) (kuva 23).



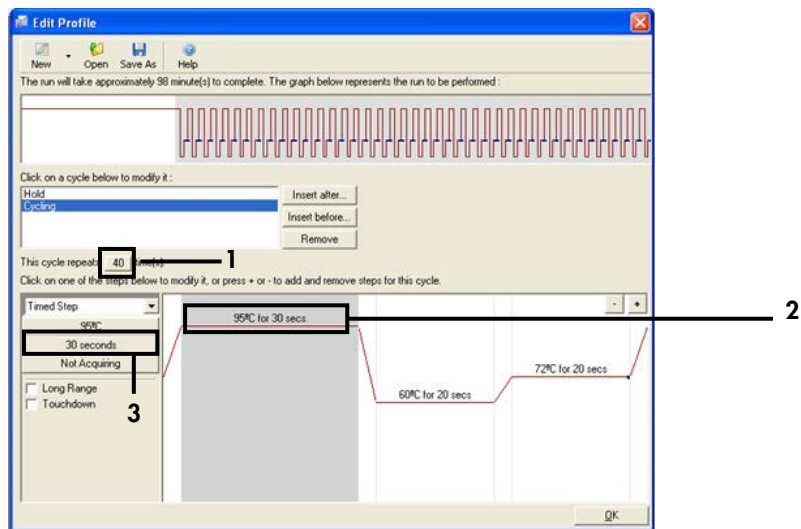
Kuva 23. Alun inkubointivaiheen määrittäminen. 1 = "Insert after" (Syötä seuraavan jälkeen) -painike, 2 = "New Hold at Temperature" (Uusi pito lämpötilassa).

7. Muuta "Hold Temperature" (Pitolämpötila) -asetukseksi 95 °C ja "Hold Time" (Pitoaika) -asetukseksi 15 min 0 s. Napsauta "Insert after" (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta "New Cycling" (Uusi jakso) (kuva 24).



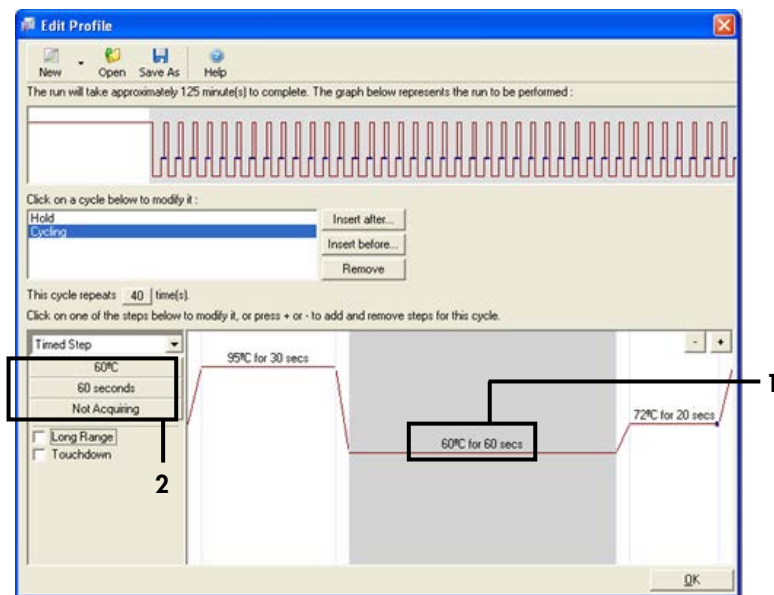
Kuva 24. Alun inkubointivaiheen lämpötila 95 °C. 1 = "Hold Temperature (Pitolämpötila)" -painike, "Hold Time" (Pitoaika) -painike, 2 = "Insert after" (Syötä seuraavan jälkeen) -painike, 3 = "New Cycling" (Uusi jakso).

8. Vaihda jakson toistojen määräksi 40. Valitse ensimmäinen vaihe ja asetus 95°C for 30 secs (95 °C 30 sekunnin ajan) (kuva 25).



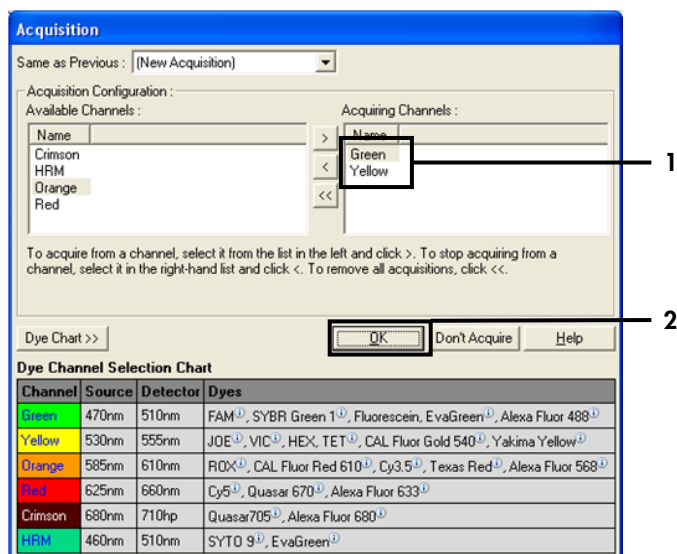
Kuva 25. Jakson vaiheen lämpötila 95 °C. 1 = "Cycle repeats" (Jakson toistot) -ruutu, 2 = 1. vaiheen lämpötila-asetus, 3 = 1. vaiheen ajan asetus.

9. Korosta toinen vaihe ja asetus 60°C for 60 secs (60 °C 60 sekunnin ajan). Ota käyttöön tiedonkeruu tämän vaiheen aikana valitsemalla "Not Acquiring" (Ei kerätä) -painike (kuva 26).



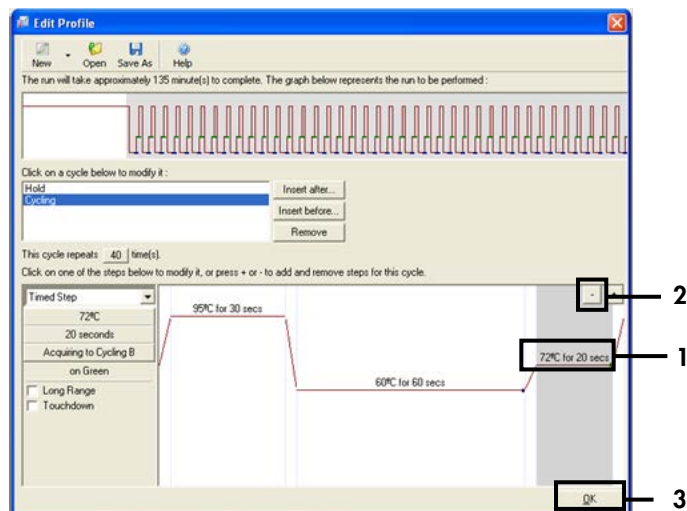
Kuva 26. Jakson vaiheen lämpötila 60 °C. (1 = 2. Vaiheen lämpötilan ja ajan asetus, 2 = "Not Acquiring" (Ei kerätä) -painike).

10. Aseta keruukanaviksi "Green" (Vihreä) ja "Yellow" (Keltainen) siirtämällä ne "Available Channels" (Käytettävissä olevat kanavat) -luettelosta valitsemalla ">"-painike. Valitse "OK" (kuva 27).



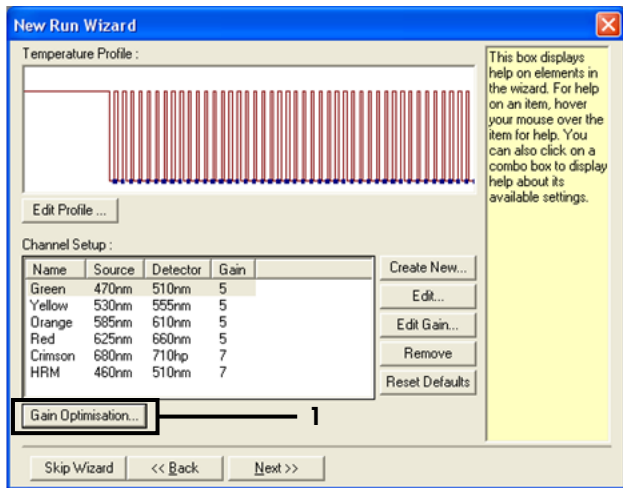
Kuva 27. Keruu vaiheen 60 °C lämpötilassa. (1 = Valitut kanavat, 2 = "OK"-painike).

11.Korosta 3. vaihe ja poista valitsemalla "-". Valitse "OK" (kuva 28).



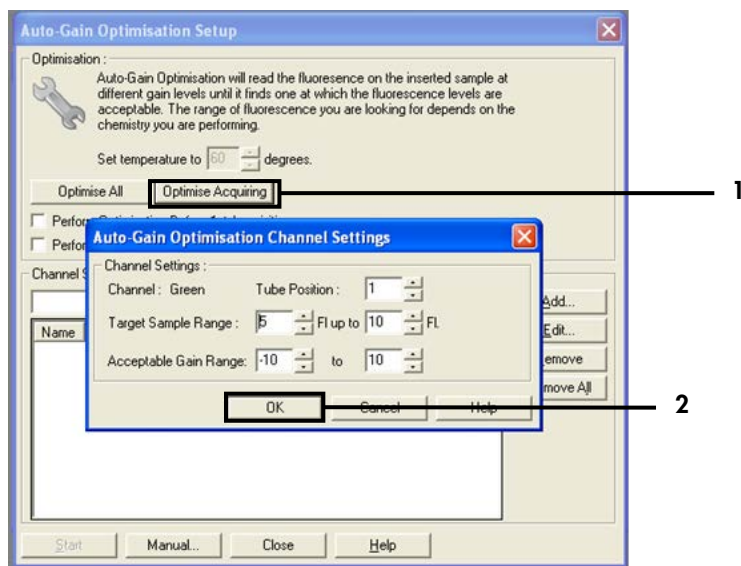
Kuva 28. Laajennusvaiheen poistaminen. 1 = 3. vaihe, 2 = Poistopainike, 3 = OK-painike.

12. Napsauta seuraavassa valintaikkunassa "Gain Optimisation" (Pöiminnan optimointi) -painiketta (kuva 29).



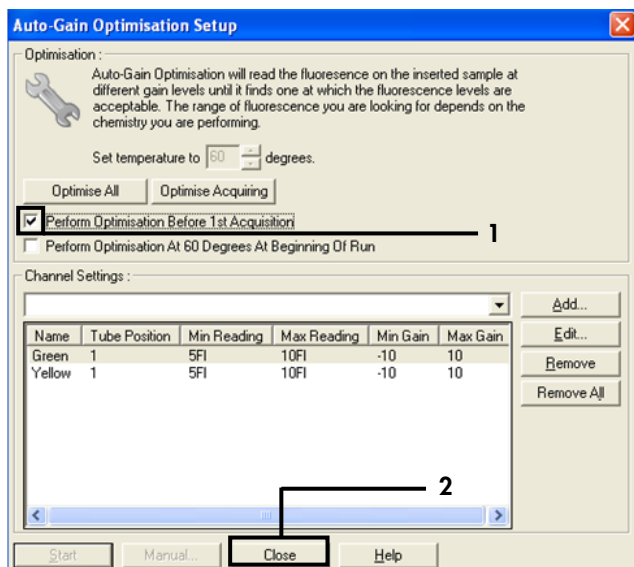
Kuva 29. "Gain optimization" (Pöiminnan optimointi) (1).

13. Valitse "Optimise Acquiring" (Optimoi keräys). Kanavan asetukset näytetään kullekin kanavalle. Hyväksy nämä oletusarvot valitsemalla molempien kanavien kohdalla "OK" (kuva 30).



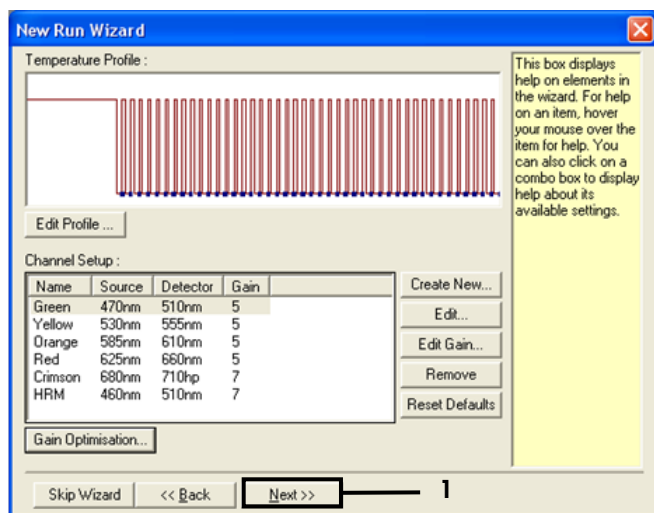
Kuva 30. Vihreän kanavan poiminnan automaattinen optimointi. 1 = "Optimise Acquiring" (Optimoi keruu) -painike, 2 = "OK"-painike.

14. Valitse "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu ja palaa ohjattuun toimintoon napsauttamalla "Close" (Sulje) -painiketta (kuva 31).



Kuva 31. Vihreän ja keltaisen kanavan valinta. 1 = "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu, 2 = "Close" (Sulje) -painike.

15. Siirry tallentamaan *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan malli (*.ret-tiedosto) valitsemalla "Next" (Seuraava) (kuva 32) ja valitse soveltuva tallennussijainti valitsemalla "Save Template" (Tallenna malli).



Kuva 32. "Next" (Seuraava) (1).

Toimenpide (manuaalinen)

Protokolla: Näytteen arviointi (manuaalinen)

Tätä protokollaa käytetään arvioimaan näytteissä olevan monistettavissa olevan DNA:n kokonaismäärä. Arviointi tulisi suorittaa ennen EGFR-mutaatioanalyysin tekemistä.

- Valmistele näytteet noudattamalla osassa "Protokolla: Näytteen arviointi" sivulla 22 annettuja ohjeita vaiheeseen 11 asti.
- Suorita PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx -laitteessa osassa "Protokolla: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset" sivulla 83 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.
- Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot osassa "Näytteen arviointitietojen analyysi" sivulla 89 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

Protokolla: EGFR-mutaation havaitseminen (manuaalinen)

- Kun näyte on läpäissyt näytteen arvioinnin, se voidaan testata EGFR-mutaatiotesteillä.
- Valmistele näytteet noudattamalla osassa "Protokolla EGFR-mutaation havaitseminen", sivulla 34 annettuja ohjeita vaiheeseen 11 asti.
- Suorita PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx -laitteessa osassa "Protokolla: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset" sivulla 83 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.
- Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot osassa "EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi" sivulla 91 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

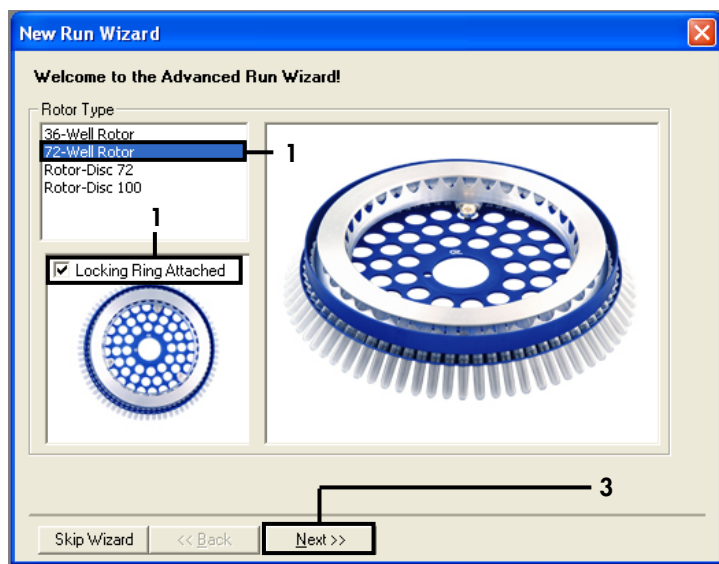
Protokolla: *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan Rotor-Gene Q -asetukset

Toimenpide

1. Avaa Rotor-Gene Q -sarjan ohjelmistoversio 2.3 ja avaa soveltuva *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan lämpötilaprofiili (.ret-tiedosto).

Katso ohjeet lämpötilaprofiilin luomisesta ja ajoparametrien tarkistamisesta osasta "Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen" sivulta 71.

2. Varmista, että oikea roottori on valittu, ja valitse valintaruutu, jossa varmistetaan, että lukkorengas on paikallaan. Valitse "Next" (Seuraava) (kuva 33).



Kuva 33. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja Tervetuloa-ruutu. 1 = "Rotor type" (Roottorityyppi), 2 = "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu, 3 = "Next" (Seuraava) -painike.

3. Anna testiaan nimi. Lisää mahdolliset huomautukset ja tarkista, että reaktiivovolyymiksi on asetettu 25 ja että "Sample Layout" (Näytteen asettelu) -kohdassa lukee "1, 2, 3...". Valitse "Next" (Seuraava) (kuva 34).

New Run Wizard

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : — 1

Notes : — 2

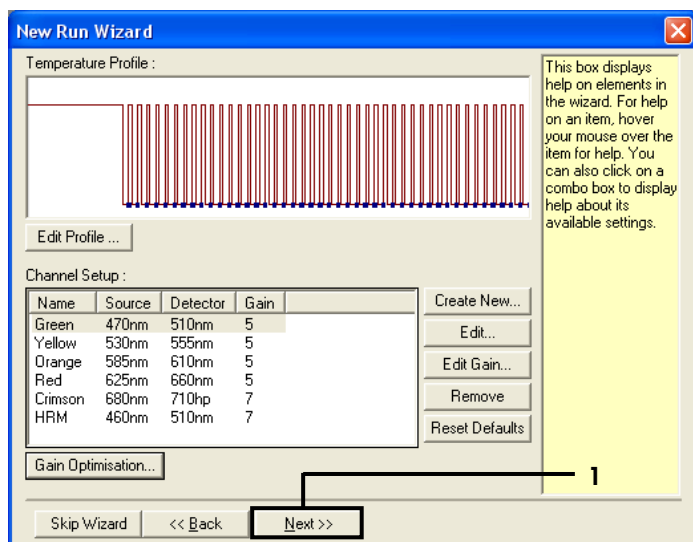
Reaction Volume (µL): — 3

Sample Layout : — 4

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.

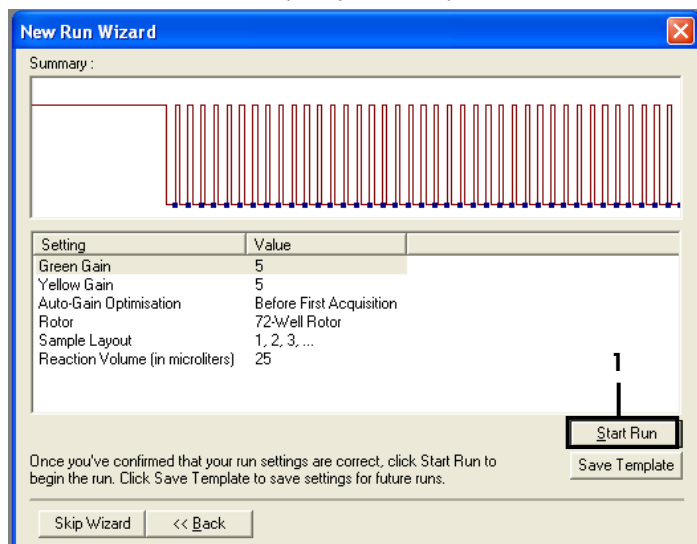
Kuva 34. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaikkuna. 1 = "Operator" (Testaaja) -kenttä, 2 = "Notes" (Huomautukset) -kenttä, 3 = "Reaction Volume" (Reaktiomäärä) -kenttä 4 = "Sample Layout" (Näytteen asettelu) -kenttä, 5 = "Next" (Seuraava) -painike.

4. Seuraavassa ikkunassa voit muokata lämpötilaprofiilia. (Muokkaus ei ole tarpeen, koska lämpötilaprofiili on jo luotu osassa "Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen" sivulla 71 esitettyjen ohjeiden mukaan.) Valitse "Next" (Seuraava) (Kuva 35).



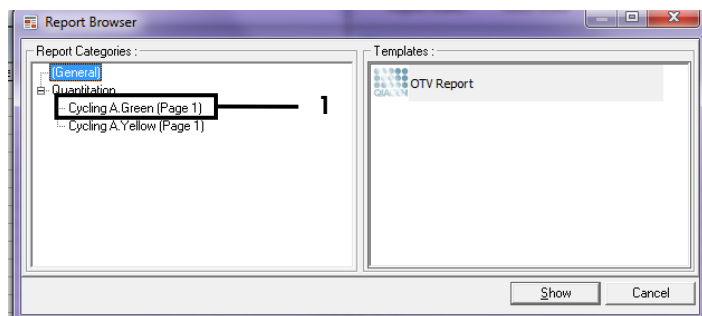
Kuva 35. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja lämpötilanmuokkausruutu (1 = "Next" [Seuraava]).

5. Tarkista tiivistelmä ja valitse "Start Run" (Käynnistä ajo), kun haluat tallentaa suoritettavan tiedoston ja käynnistää ajon (kuva 36).



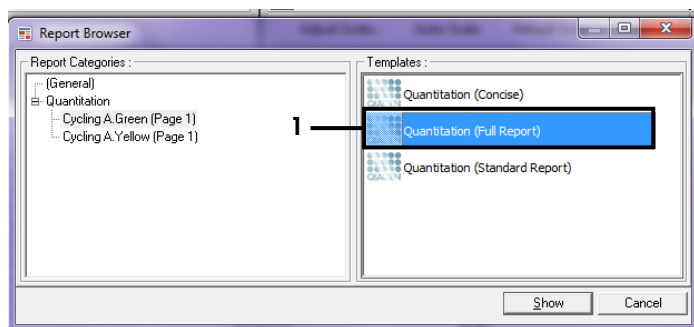
Kuva 36. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja tiivistelmäruutu (1 = "Start Run" [Käynnistä ajo]).

6. Kun ajo alkaa, uusi ikkuna tulee näkyviin. Ikkunassa voit joko antaa näytteiden nimet tai valita "Finish" (Lopeta) ja antaa nimet myöhemmin napsauttamalla ajon aikana tai ajon suorittamisen jälkeen "Sample" (Näyte) -painiketta.
7. Kun napsautat kohtaa "Finish and Lock Samples" (Lopeta ja lukitse näytteet), et voi enää muokata näytteiden nimiä. Käyttäjän on oltava erityisen huolellinen antaessaan näytteiden nimiä, jotta näytteiden testaus ja analyysi suoritetaan oikein.
Huomautus: Näytteitä nimettäessä tyhjen kuoppien kohdat "Name" (Nimi) -sarakeessa on jätettävä tyhjiksi.
8. Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot osassa "Näytteen arviointitietojen analyysi" sivulla 89 tai osassa "EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi" sivulla 91 esitettyjen ohjeiden mukaisesti tai tilanteen mukaan.
9. Jos tarvitaan kvantitatiivisia raportteja, napsauta Rotor-Gene Q -ajotiedoston työkalupalkissa olevaa "Reports" (Raportit) -kuvaketta.
10. Valitse raporttiselain "Report Categories" (Raporttiluokat) -kohdassa "Cycling A Green" (Page 1) (Vihreä jakso [sivu 1]) (kuva 37).



Kuva 37. Report Browser (Raporttiselain) (1 = "Cycling A. Green" (Page 1) [Vihreä jakso {sivu 1}]).

11. Valitse "Templates" (Mallit) -kohdasta "Quantitation (Full Report)" (Kvantitointi [täysi raportti]) (Kuva 38).



Kuva 38. Quantitation report (Full Report) (Kvantitointiraportti [täysi raportti]) (1).

- 12.Luo raportti valitsemalla "Show" (Näytä).
- 13.Tallenna elektroninen versio valitsemalla "Save As" (Tallenna nimellä).
- 14.Toista "Cycling A Yellow" (Page 1) (Keltainen jakso [sivu 1]).

Tulosten tulkinta (manuaalinen)

Kun *therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjan ajo (DNA-näytteen arviointi tai EGFR-mutaatioanalyysi) on päättynyt, analysoi tiedot seuraavien toimenpiteiden mukaan:

- ohjelmistoasetukset analyysiä varten
- DNA-näytteen arviointianalyysi (manuaalinen)
- EGFR-mutaation havaitsemisanalyysi (manuaalinen)

Huomautus: Katso putkien asettelumalli kohdasta Taulukko 4, sivulta 25.

Huomautus: Katso putkien asettelumalli kohdasta Taulukko 7, sivulta 37.

Ohjelmiston analyysiasetukset

1. Avaa tarvittava ajotiedosto (*.rex) Rotor-Gene Q series software 2.3 -ohjelmistolla.
2. Jos näytteitä ei ole nimetty ennen ajon suorittamista, valitse "Edit Samples" (Muokkaa näytteitä).
3. Anna näytteille nimet "Name" (Nimi) -sarakkeessa.
4. Valitse "Analysis" (Analyysi). Valitse analyysisivulla "Cycling A. Yellow" (Keltainen jakso), jos haluat tarkastella keltaista HEX-kanavaa.
5. Valitse "Named" On (Nimetty).

Huomautus: näin voit varmistaa, ettei tyhjiä putkia käytetä analyysissä.

6. Valitse "Dynamic tube" (Dynaaminen putki).
7. Valitse "Slope correct" (Pudotus oikea).
8. Valitse "Linear scale" (Lineaariasteikko).

9. Valitse "Take off Adj" (Mittauspisteen säätö) ja anna arvo 15,01 yläruutuun ("If take off point was calculated before cycle") (Jos mittauspiste laskettiin ennen jaksoa) ja arvo 20,01 alaruutuun ("then use the following cycle and take off point") (käytä sitten seuraavaa jaksoa ja mittauspistettä).
10. Aseta kynnysarvoksi 0,02 ja tarkista keltaisen kanavan (HEX) C_T -arvot.
11. Valitse analyysisivulla "Cycling A Green" (Vihreä jakso), jos haluat tarkastella vihreää kanavaa.
12. Valitse "Named On" (Nimetty).
13. Valitse "Dynamic tube" (Dynaaminen putki).
14. Valitse "Slope correct" (Pudotus oikea).
15. Valitse "Linear scale" (Lineaariasteikko).
16. Valitse "Take off Adj" (Mittauspisteen säätö) ja anna arvo 15,01 yläruutuun ("If take off point was calculated before cycle") (Jos mittauspiste laskettiin ennen jaksoa) ja arvo 20,01 alaruutuun ("then use the following cycle and take off point") (käytä sitten seuraavaa jaksoa ja mittauspistettä).
17. Aseta kynnysarvoksi 0,075 ja tarkista vihreän kanavan (FAM) C_T -arvot.

Näytteen arviointitietojen analyysi

Kun DNA-näytteen arviointi on tehty, katso lisätietoja kohdasta "Ohjelmiston analyysiasetukset", sivulla 88 ja analysoi tiedot seuraavien ohjeiden mukaan. (Katso putkien asettelumalli kohdasta Taulukko 4, sivulta 25.)

Ajon kontrollin analyysi

Negatiivinen kontrolli

Mallin kontaminoitumisen estämiseksi NTC ei saa tuottaa alle 40:n C_T -arvoa vihreässä (FAM) kanavassa.

Jotta voisit varmistaa, että ajo on määritetty oikein, NTC:ssä ei saa näkyä monistusta alueella 29,85–35,84 keltaisessa (HEX) kanavassa. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot.

Positiivinen kontrolli

EGFR PC:n C_T-arvon on oltava alueella 28,13–34,59 vihreässä (FAM) kanavassa. Tämän alueen ulkopuolella oleva arvo merkitsee ongelmaa ajon valmistelussa. Ajo on epäonnistunut.

Huomautus: näytteen tietoja ei saa käyttää, jos negatiivinen tai positiivinen kontrolli epäonnistuu.

Näytteen analyysi

Jos DNA-näytteen arviointiajan kontrollit ovat kelvollisia, analyysia voi jatkaa. Kontrollin C_T-arvon näytteelle on oltava alueella 23,70–31,10 vihreälle (FAM) kanavalle. Jos näytteen C_T on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

- Näytteen kontrollitesti C_T >23,70:

Näytteet, joiden kontrollin C_T-arvo on <23,70 (korkea DNA-pitoisuus), ylikuormittavat mutaatiotestejä, ja ne on laimennettava. Jotta kaikki mutaatiot voi havaita matalammalla tasolla, ylikuormittavat näytteet on laimennettava niin, että niiden C_T-arvo on alueella 23,70–31,10. DNA-näytteen laimentaminen nostaa C_T-arvoa (laimennussuhde 1:1 kasvattaa C_T-arvoa 1,0:lla). Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Vesi laimennukseen [Dil.]).

- Näytteen kontrollitesti C_T >31,10:

Suosittellemme uuttamaan uudelleen näytteet, joiden kontrollien C_T-arvo on >31,10 vihreässä (FAM) kanavassa. Riittämättömän aloitus-DNA:n malli on annettu, jotta voidaan havaita kaikki EGFR-mutaatiot testin ilmoitettujen raja-arvojen mukaan.

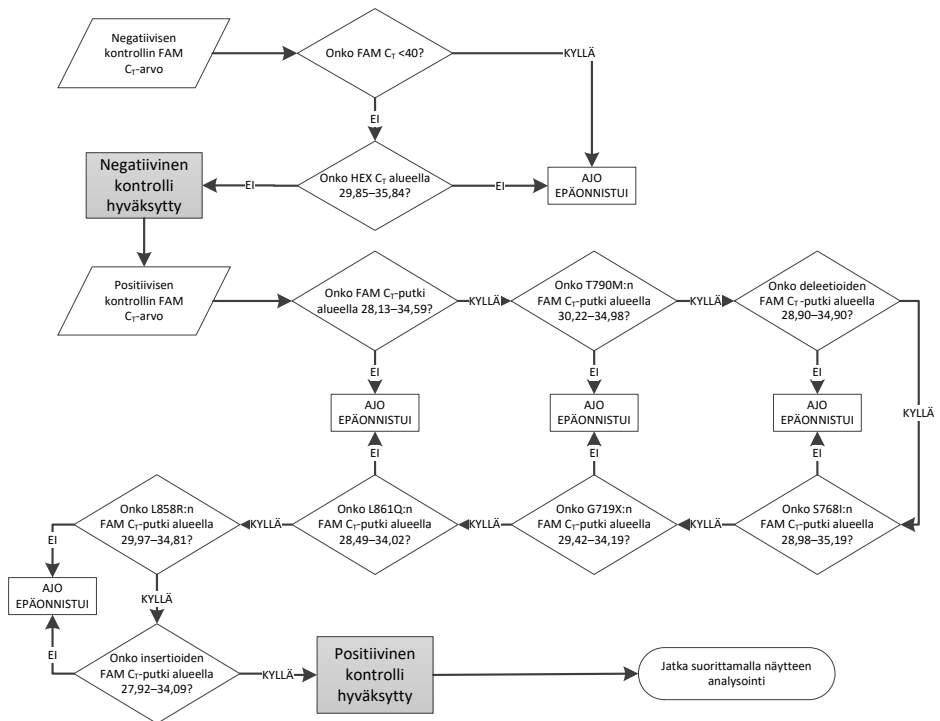
EGFR-mutaation havaitsemisen tietojen analysointi

Näytteen on läpäistävä DNA-näytteen arviointi hyväksyttävästi, ennen kuin siitä voidaan havaita EGFR-mutaatiot (katso kohta ”Näytteen arviointitietojen analyysi”, sivulla 89).

Kun EGFR-mutaation havaitseminen on tehty, katso lisätietoja kohdasta ”Ohjelmiston analyysiasetukset”, sivulla 88 ja analysoi tiedot seuraavien ohjeiden mukaan. (Katso putkien asettelumalli kohdasta Taulukko 7, sivulta 37.)

Ajon kontrollin analyysi

Katso ajon kontrollin analyysin vaihekaavio kuvassa 39.



Kuva 39. Ajon kontrollin analyysin vaihekaavio EGFR-mutaation havaitsemiseen.

Negatiivinen kontrolli

Mallin kontaminoitumisen estämiseksi minkään EGFR-mutaatiotestin NTC ei saa tuottaa alle 40:n C_T-arvoa vihreässä (FAM) kanavassa.

Jotta voisit varmistaa, että ajo on määritetty oikein, NTC:ssä ei saa näkyä monistusta alueella 29,85–35,84 keltaisessa (HEX) kanavassa. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot.

Positiivinen kontrolli

Kaikkien EGFR-mutaatiotestien EGFR PC:n C_T-arvojen on oltava alueella vihreässä (FAM) kanavassa, kuten kohdassa Taulukko 16. Tämän alueen ulkopuolella oleva arvo merkitsee ongelmaa ajon valmistelussa. Ajo on epäonnistunut.

Huomautus: näytteen tietoja ei saa käyttää, jos negatiivinen tai positiivinen kontrolli epäonnistuu.

Taulukko 16. Hyväksyttävät C_T-alueet reaktioiden positiivisille kontrolleille (EGFR-mutaatioiden havaitsemistesti)

Reaktioseos	Näyte	Kanava	C _T -alue
Kontrolli	PC	Vihreä	28,13–34,59
T790M	PC	Vihreä	30,22–34,98
Deleetiot	PC	Vihreä	28,90–34,90
L858R	PC	Vihreä	29,97–34,81
L861Q	PC	Vihreä	28,49–34,02
G719X	PC	Vihreä	29,42–34,19
S768I	PC	Vihreä	28,98–35,19
Insertiot	PC	Vihreä	27,92–34,09

Näytteen analyysi – näytteen kontrollin vihreän (FAM) kanavan C_T -arvo

Jos EGFR-mutaation havaitsemisen ajon positiivisen ja negatiivisen kontrollin tulokset ovat hyväksyttäviä, voidaan jatkaa EGFR-mutaation havaitsemiseen näytteistä.

Kontrollin C_T -arvon on oltava alueella 23,70–31,10 vihreässä (FAM) kanavassa. (Katso putkien asettelumalli taulukosta 7, sivulta 30.)

Jos näytteen kontrollin C_T on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

- Näytteen kontrollitesti $C_T > 23,70$:

Näytteet, joiden kontrollin C_T -arvo on $< 23,70$ (korkea DNA-pitoisuus), ylikuormittavat mutaatiotestejä, ja ne on laimennettava. Jotta kaikki mutaatiot voi havaita matalammalla tasolla, ylikuormittavat näytteet on laimennettava niin, että niiden C_T -arvo on alueella 23,70–31,10. DNA-näytteen laimentaminen nostaa C_T -arvoa (laimennussuhde 1:1 kasvattaa C_T -arvoa 1,0:lla). Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Vesi laimennukseen [Dil.]).

- Näytteen kontrollitesti $C_T > 31,10$:

Suosittelimme uuttamaan uudelleen näytteet, joiden kontrollien C_T -arvo on $> 31,10$ vihreässä (FAM) kanavassa. Riittämättömän aloitus-DNA:n malli on annettu, jotta voidaan havaita kaikki EGFR-mutaatiot testin ilmoitettujen raja-arvojen mukaan.

Katso EGFR-mutaation havaitsemisen ajon näytteen analyysin vaihekaavio kuvassa 40.

Näytteen analyysi – näytteen sisäisen kontrollin keltaisen (HEX) kanavan C_T -arvo

Katso EGFR-mutaation havaitsemisen ajon näytteen analyysin vaihekaavio kuvassa 40.

Jokaisen näytteen kaikki putket on analysoitava. Varmista, että jokainen putki antaa sisäiselle kontrollille keltaisesta (HEX) kanavasta HEX-signaalin alueella 29,85–35,84. Mahdollisia tuloksia on kolmenlaisia.

- Jos sisäisen kontrollin C_T -arvo on määritetyn alueen ($<29,85$) alapuolella mille tahansa mutaatiotestille, keltaisen (HEX) kanavan monistuksen tulos on hylätty. Keltaisen (HEX) kanavan monistus tälle putkelle on hylätty.
- Jos sisäisen kontrollin C_T -arvo on määritetyllä alueella (29,85–35,84), tulos keltaisen (HEX) kanavan monistuksen tulos on positiivinen.
Keltaisen (HEX) kanavan monistus tälle putkelle on hyväksytty.
- Jos sisäisen kontrollin C_T -arvo ylittää määritetyn alueen ($>35,84$), keltaisen (HEX) kanavan monistuksen tulos on negatiivinen.

Jos vihreässä (FAM) kanavassa on tehty monistus ja kyseisen reaktion ΔC_T -arvo on matalampi tai yhtä suuri kuin putken testin mukainen raja-arvo, keltaisen (HEX) kanavan monistuksen tulos on hyväksytty. Jos putkelle ei ole tehty monistusta vihreässä (FAM) kanavassa tai ΔC_T -arvo on korkeampi kuin testin mukainen raja-arvo, keltaisen (HEX) kanavan monistuksen tulos on hylätty.

Sisäisen kontrollin monistuminen keltaisessa (HEX) kanavassa voi epäonnistua PCR-eston takia. Näytteen laimentaminen voi vähentää estäjien vaikutuksia. On huomioitava, että laimentaminen laimentaa myös näytteessä olevaa kohde-DNA:ta. Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Vesi laimennukseen [Dil.]).

Näytteen analyysi – näytteen mutaatiotestin vihreän (FAM) kanavan C_T -arvo

Vihreän (FAM) kanavan arvot kaikille seitsemälle mutaatioreaktiokselle on tarkistettava taulukossa Taulukko 17 esitettyjen arvojen avulla. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot. (Katso putkien asettelumalli kohdasta Taulukko 7, sivulta 37.)

Taulukko 17. Hyväksyttävät arvot EGFR-mutaatioreaktiolle vihreässä (FAM) kanavassa (EGFR-mutaation havaitsemisen testi)

Testi	C_T -alue	Raja-arvo (ΔC_T)
T790M	0,00–40,00	$\leq 7,40$
Deleetiot	0,00–40,00	$\leq 8,00$
L858R	0,00–40,00	$\leq 8,90$
L861Q	0,00–40,00	$\leq 8,90$
G719X	0,00–40,00	$\leq 8,90$
S768I	0,00–40,00	$\leq 8,90$
Insertiot	0,00–40,00	$\leq 8,00$

- Jos näytteen saama vihreän (FAM) kanavan C_T -arvo on määritetyllä alueella, se on FAM-monistuspositiivinen.
- Jos näytteen saama vihreän (FAM) kanavan C_T -arvo on määritetyn alueen yläpuolella, tai monistusta ei ilmene, se on FAM-monistusnegatiivinen.

Laske ΔC_T -arvo kaikille FAM-monistuspositiivisille EGFR-mutaation havaitsemisen putkille alla esitetyllä tavalla varmistaen että mutaation ja kontrollin C_T -arvot ovat peräisin samasta näytteestä. (Katso putkien asettelumalli kohdasta Taulukko 7, sivulta 37.)

$$\Delta C_T = [\text{mutaatiotestin } C_T\text{-arvo}] - [\text{kontrollitestin } C_T\text{-arvo}]$$

Vertaa näytteen ΔC_T -arvoa kyseisen testin raja-arvoon (Taulukko 17). Varmista, että vertailussa käytetään oikeaa raja-arvoa.

Raja-arvo on arvo, jonka ylittävä positiivinen signaali voi johtua näytteen villityypin DNA:n ARMS-alukkeen taustasignaalista. Jos näytteen ΔC_T -arvo on korkeampi kuin testin raja-arvo, näyte luokitellaan negatiiviseksi tai testisarjan havaitsemisrajojen ulkopuolella olevaksi.

Jokaisen näytteen jokaisen mutaatioreaktion tila voi olla jokin seuraavista:

- mutaatio havaittu
- mutaatiota ei havaittu
- hylätty.

Mutaatio havaittu

Vihreän (FAM) kanavan monistus on positiivinen ja ΔC_T -arvo on raja-arvon mukainen tai sen alapuolella. Jos testi havaitsee näytteestä useita mutaatioita, kaikki voidaan raportoida.

Mutaatiota ei havaittu

Vihreän (FAM) kanavan monistus on positiivinen ja ΔC_T -arvo on raja-arvon yläpuolella.

Vihreän (FAM) kanavan monistus on negatiivinen ja keltaisen (HEX) kanavan monistus (sisäinen kontrolli) on positiivinen.

Hylätty

Keltaisen (HEX) kanavan monistus (sisäinen kontrolli) on hylätty.

Vihreän (FAM) kanavan monistus on negatiivinen ja keltaisen (HEX) kanavan monistus (sisäinen kontrolli) on negatiivinen.

Huomautus: Näytteen yhden putken tulos keltaisen (HEX) kanavan monistuksen osalta voi olla negatiivinen, mutta toisen putken tulos vihreän (FAM) kanavan monistuksen osalta voi olla positiivinen. Tässä tilanteessa toisen putken "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tulosta voidaan pitää hyväksyttynä, mutta havaittu mutaatio ei välttämättä ole ainoa näytteestä mahdollisesti havaittu mutaatio.

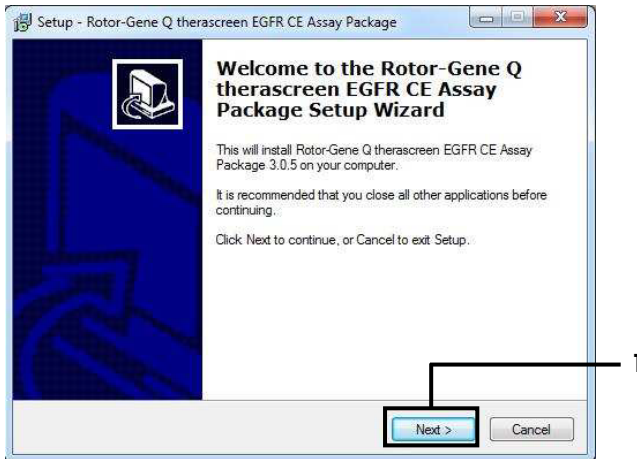
Liite B *therascreen* EGFR CE -testipaketin asennus

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja on tarkoitettu käytettäväksi Rotor-Gene Q MDx -laitteen ja 72-kuoppaisen roottorin kanssa. *therascreen* EGFR CE -testipaketti on saatavana erillisellä CD-levyllä (luettelonro 9023537). Testipaketti sisältää "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template"- ja "*therascreen* EGFR CE Locked Template"-mallit.

Huomautus: *therascreen* EGFR CE -testipaketti on yhteensopiva ainoastaan Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3 kanssa. Varmista, että oikea Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio on asennettu, ennen kuin aloitat *therascreen* EGFR CE -testipaketin asennuksen. Jos Rotor-Gene Q MDx -instrumentissa on ollut toimituksen aikaan aiempi ohjelmistoversio, päivitä ohjelmisto lataamalla Rotor Gene Q -ohjelmistoversio 2.3 Rotor-Gene Q MDx:n tuotesivulta, "Product Resources" (Lisämateriaalit) -välilehden kohdasta "Operating Software" (Käyttöohjelmisto), katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

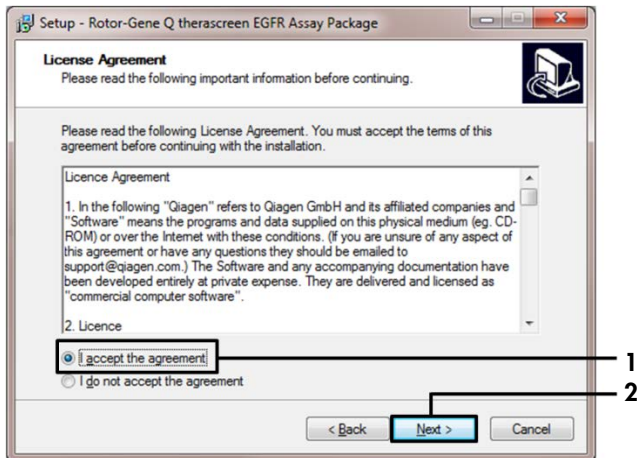
Toimenpide

1. Tilaa *therascreen* EGFR CE -testipaketin CD-levy (luettelonro 9023537).
2. Aseta CD-levy Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn tietokoneen levyasemaan.
3. Jos CD-levy latautuu automaattisesti, aloita asennus kaksoisnapsauttamalla tiedostoa "*therascreen*_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe".
Tai etsi ja avaa suoritettava tiedosto tietokoneen resurssienhallinnan kautta.
4. *therascreen* EGFR CE -testipaketin ohjattu asennus avautuu. Jatka valitsemalla "Next" (Seuraava) (kuva 41).



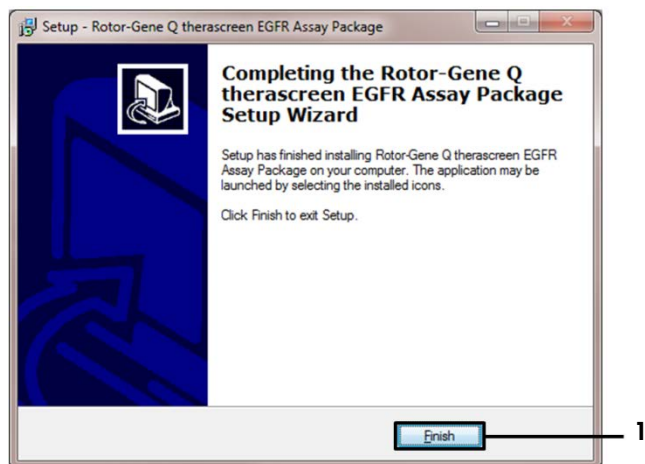
Kuva 41. Ohjatun asennuksen ikkuna (1 = "Next" [Seuraava]).

5. Lue lisenssisopimus näkyviin tulevassa ikkunassa ja hyväksy se valitsemalla kohta "I accept the agreement" (Hyväksyn sopimuksen). Jatka valitsemalla "Next" (Seuraava) (Kuva 42).



Kuva 42. "License Agreement" (Lisenssisopimus) -valintaikkuna. 1 = "I accept the agreement" (Hyväksyn sopimuksen), 2 = "Next" (Seuraava).

6. Asennus alkaa automaattisesti. Kun asennus on valmis, näkyviin tulee viimeinen ohjatun asennuksen ikkuna. Poistu valitsemalla "Finish" (Valmis) (Kuva 43).



Kuva 43. Ohjatun asennuksen päättäminen (1 = "Finish" [Valmis]).

7. Käynnistä tietokone uudelleen.

Pikakuvakkeet "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" -malliin ja "*therascreen* EGFR CE Locked Template" -malliin luodaan työpöydälle automaattisesti (kuva 44).



therascreen EGFR CE
Control Run Locked
Template



therascreen EGFR CE
Locked Template

Kuva 44. EGFR CE Control Run Locked Template- ja EGFR CE Locked Template -kuvakkeet.

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa **www.qiagen.com/Support**, soita ilmaisnumeroomme 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa **www.qiagen.com**).

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Luettelo- numero
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	24 reaktiota varten: kontrollitesti, 7 mutaatiotestiä, positiivinen kontrolli, <i>Taq</i> DNA -polymeraasi, NTC-testissä käytettävä vesi ja näytteen laimennuksessa käytettävä vesi	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	ohjelmistoprotokollapaketti käytettäväksi <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR -sarjan ja QIAGEN Rotor-Gene Q MDx-laitteen kanssa	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue -sarja		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50:een DNA:n valmistelukertaan: QIAamp MinElute® -pakkausta, proteinaasi K, puskureita ja näyteputkia (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 preparaatiota varten: 50 QIAamp MinElute -pakkausta, proteinaasi K, puskureita ja näyteputkia (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx ja lisävarusteet		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033

Tuote	Sisältö	Luettelo-numero
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-laite ja High Resolution Melt -analysointilaite, jossa 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle. Ei sisällä asennusta ja koulutusta.	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiininen levy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä 72 kpl:ssa 0,1 ml:n putkia	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 neljän putken ja korkin liuskaa, 1 000 reaktioon	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 neljän putken ja korkin liuskaa, 10 000 reaktioon	981106

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta **www.qiagen.com**, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Käsikirjan muutoshistoria

Asiakirja	Muutokset	Päivämäärä
HB-1909-002	LOD (Limit of detection) -arvot päivitetty (Taulukko 11) kohtaan "Suorituksen ominaispiirteet".	Kesäkuu 2015
HB-1909-003	Päivitykset testin ohjelmiston merkintöihin (Taulukko 8). Päivitykset testin uusittavuustietoihin (Taulukko 12). IRESSA-testin kliinisten tulostietojen lisäys "Suorituksen ominaispiirteisiin".	Elokuu 2016
HB-1909-004	Muutokset kappaleessa "Säilytysolosuhteet" ja taulukoissa 2 ja 5 mainittuihin asetusten säilytysaikoihin selventämään sulatusaikoja ja kokonaisaikoja. Päivitys kuvaan 40. Näytteen analyysin vaihekaavio EGFR-mutaation havaitsemiseen. Lisätty tilaustiedot QIAamp® DSP DNA FFPE -kudossarjalle (luottelonro 60404)	Maaliskuu 2018
HB-1909-005	Valtuutetun edustajan lisäys (etukanteen). Symbolit-osan päivitys.	Tammikuu 2019

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GLOTIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca Group)

therascreen EGFR RGQ PCR -sarja on CE-merkitty diagnostinen sarja in vitro -diagnostiikkaan tarkoitetuista lääkinällisistä laitteista annetun eurooppalaisen direktiivin 98/79/EY mukaisesti. Ei saatavana kaikissa maissa.

***therascreen* EGFR RGQ PCR -sarjaa koskeva rajoitettu lisenssisopimus**

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä henkisen omaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laatimaa. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssin osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN voi kääntä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetetyt käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

HB-1909-005 01-2019 © 2019 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Huomautukset

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com