

EML4-ALK

Real-Time PCR Kit

REF

G610020

SEZNAM VÝROBKŮ

Název kitu	SKU	Velikost balení
EML4-ALK Real-Time PCR Kit	G610020-1	25T

Předchozí REF č.: G2M708321

Toto je neautorizovaný pracovní překlad anglického originálu návodu k použití (IFU) do češtiny, vyhotovený pro interní referenční účely. Rozhodující je vždy anglický originální dokument výrobce; před použitím produktu si jej prosím ověřte.

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

Č.	Obsah	Číslo strany
1.	Účel použití	3
2.	Princip testu	3
3.	Souhrn	3
4.	Přístroje kompatibilní se soupravou	4
5.	Dodávaný materiál	4
6.	Materiál potřebný, ale nedodávaný	5
7.	Pokyny pro uchovávání a stabilitu	5
8.	Postup testu	5
9.	Nastavení přístroje pro real-time PCR	7
10.	Interpretace výsledků testu	8
12.	Varování a bezpečnostní opatření	10
13.	Omezení	10

Účel použití

EML4-ALK Real-Time PCR Kit (Lung Fusion Panel) je diagnostický test *in vitro* založený na technologii real-time PCR, určený ke kvalitativní detekci fúzního genu EML4-ALK a fúzního genu a transkriptu ROS1 v klinických vzorcích.

Určený uživatel

Test je určen k provádění laboratorním odborníkem v klinické laboratoři.

Princip testu

EML4-ALK RT-PCR Kit je navržena jako diagnostický produkt využívající technologii real-time PCR k detekci cílových sekvencí spojených se 12 fúzními mutacemi fúzního genu EML4-ALK a 14 fúzními mutacemi genu ROS1, spolu s genem interní kontroly (RNaseP). Specifické sondy jsou označeny fluoroforem FAM pro detekci fúzních mutací EML4-ALK a ROS1 a fluoroforem VIC (HEX) pro interní kontrolu. Tato souprava obsahuje šest reakčních pufrů (reaction buffer) takto: ALK Reaction Buffer-1: obsahuje směsi primerů a sond pro detekci fúzních mutací EML4-ALK 1, 2, 3a, 3b, 4, 6 a 7. ALK Reaction Buffer-2: obsahuje směsi primerů a sond pro detekci fúzních mutací 5a, 5b, 5', 8a a 8b. ROS1 Reaction Buffer-1/2/3 a 4: obsahují primery a sondy pro detekci konkrétních fúzních mutací ROS1. Podrobné informace o konkrétních fúzních mutacích cílených každým reaction buffer naleznete v Tabulce 2. Test se provádí na RNA extrahované z lidských vzorků. Fluorescence emitovaná fluorofory FAM a VIC (HEX) je detekována a měřena v reálném čase, což umožňuje identifikaci přítomnosti cílových fúzních mutací a genu interní kontroly a zajišťuje přesnost a spolehlivost výsledků testu.

Souhrn

Rakovina plic je celosvětově nejčastějším maligním nádorem, přičemž 80–85 % případů představuje nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC). Genová fúze echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) a anaplastické lymfomové kinázy (ALK) je novým cílem u NSCLC; geny EML4 a ALK se nacházejí na pásech P21 a P23 chromozomu 2 a jsou od sebe vzdáleny přibližně 12,7 milionu bází. Bylo zjištěno nejméně 20 fúzních variant, z nichž 12 fúzních mutantů uvedených v Tabulce 1 je běžných, přičemž mutant 1 (E13; A20) je nejčastější, následován mutanty 3a a 3b (E6; A20), které tvoří přibližně 33 % a 29 % pacientů s NSCLC s fúzním genem EML4-ALK. Inhibitory ALK, jejichž zástupcem je Krizotinib, jsou nízkomolekulární cílené léky vyvinuté pro fúzní mutace genu ALK. Inhibicí aktivity oblasti tyrozinkinázy ALK a blokováním jejich downstream abnormálních signálních drah potlačují růst nádorových buněk a dosahují tak cílené terapie nádorů. Detekce fúzní mutace EML4-ALK je proto předpokladem a základem pro řízení užívání léku Krizotinib. Tato testovací souprava se používá k řízení podávání inhibitorů ALK a poskytuje podklad pro personalizovanou medicínu u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. ROS1 je transmembránová tyrozinkináza z rodiny receptorů inzulinu. Fúzní gen ROS1 byl potvrzen jako další důležitý řídicí gen nemalobuněčného karcinomu plic. Jako zástupce nového unikátního molekulárního subtypu se výskyt fúzního genu ROS1 u NSCLC pohybuje přibližně od 1 % do 2 %; ROS1 podléhá genové rearanžaci zejména v exonech 32, 34, 35 a 36. Po fúzi s geny jako CD74, EZR, SLC34A2 a SDC4 dále aktivuje oblast tyrozinkinázy ROS1. Tato souprava se používá ke kvalitativní detekci 12 typů mutací fúzního genu EML4-ALK ve vzorcích lidských pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic *in vitro* a 14 typů mutací fúzního genu ROS1 v lidských vzorcích nemalobuněčného karcinomu plic. Výsledky testu slouží pouze pro klinickou referenci a nesmí být použity jako jediný podklad pro individualizovanou léčbu pacientů.

Tabulka 1a.

Obecný název	EML4 Splice Exon	ALK Splice Exon	Cosmic ID	Obecný název	EML4 Splice Exon	ALK Splice Exon	Cosmic ID
Variant 1	13	20	463	Variant 5b	2	20	480
Variant 2	20	20	465	Variant 5'	18	20	488
Variant 3a	6	20	474	Variant 6	13	20	1063
Variant 3b	6	20	493	Variant 7	14	20	1065
Variant 4	14	20	491	Variant 8a	17	20	-
Variant 5a	2	20	480	Variant 8b	17	20	-

Tabulka 1b.

S/N	Splice Gene	Splice Exony	ROS1 Splice Exony	Cosmic ID
1	SLC34A2	Exon13	Exon32	COSF1260
2	SLC34A2	Exon4	Exon32	COSF1197
3	SDC4	Exon4	Exon32	COSF1279
4	SDC4	Exon2	Exon32	COSF1266
5	CD74	Exon6	Exon34	COSF1203
6	CD74	Exon6	Exon34	COSF1201
7	EZR	Exon10	Exon34	COSF1268
8	SDC4	Exon4	Exon34	COSF1280
9	SLC34A2	Exon4	Exon34	COSF1198
10	SLC34A2	Exon13	Exon35	COSF1261
11	GOPC	Exon8	Exon35	COSF1251
12	LRIG3	Exon16	Exon35	COSF1270
13	TPM3	Exon8	Exon36	COSF1274
14	GOPC	Exon4	Exon36	COSF1295

Dodávaný materiál

Tabulka 2. (Pro 25 testů)

Obsah soupravy	Kód obsahu soupravy	Množství (G610020-1)
ALK Reaction Buffer 1	G2MA3-1631-2	1 X 625 µl
ALK Reaction Buffer 2	G2MA3-1632-2	1 X 625 µl
ALK Positive Control	G2MA3-1634-2	1 X 500 µl
ROS1 Reaction Buffer 1	G2MA3-1635-2	1 X 625 µl
ROS1 Reaction Buffer 2	G2MA3-1636-2	1 X 625 µl
ROS1 Reaction Buffer 3	G2MA3-1637-2	1 X 625 µl
ROS1 Reaction Buffer 4	G2MA3-1638-2	1 X 625 µl
ROS1 Positive Control	G2MA3-1640-2	1 X 500 µl
RNase/DNase Free Water	G2MA3-0001-4	1 X 500 µl

Přístroje kompatibilní se soupravou

⚠ Zajistěte, aby všechny používané přístroje byly instalovány, kalibrovány, kontrolovány a udržovány podle pokynů a doporučení výrobce.

- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics)
- RapiCycler 96 Real Time PCR System (Genes 2Me Private Limited)

Materiál potřebný, ale nedodávaný

- MagNXT FFPE DNA/RNA extraction kit (G2MBR4-0898, G2MBR4-0899) nebo SpiNXT FFPE DNA/RNA Extraction Kit (G2MBR4-0798, G2MBR4-0799), Genes 2Me Private Limited, nebo QIAamp RNA FFPE Extraction kit (Qiagen), nebo Paraffin-embedded Tissue RNA Rapid Extraction Kit (Qiagen)
- Stolní mikrocetrifuga
- Vortexer
- Mikropipety (nastavitelné)
- Jednorázové špičky s bariérovým filtrem
- Jednorázové bezpudrové rukavice
- Systém pro real-time PCR

Pokyny pro uchovávání a stabilitu

- Souprava má dobu použitelnosti 12 měsíců od data výroby. Testovací souprava je stabilní do data expirace uvedeného na krabici soupravy a/nebo na obalu jednotlivých komponent, pokud je uchovávána podle specifikace.
- Souprava a její komponenty jsou expedovány a uchovávány při teplotě -30 °C až -10 °C.
- Provádějte experiment při pokojové teplotě (15 °C až 30 °C) a během testování uchovávejte činidla v chladicím zařízení (2 °C až 8 °C).
- Opakovanému zmrazování a rozmrazování (více než 6krát) je třeba se vyhnout.
- ☀️ Chraňte před přímým slunečním zářením.

Postup testu

Odběr vzorku

- Vzorky patologické tkáně nebo řezu zalité do parafínu. Odebraná část by měla být pokud možno ze středu parafínového bloku, počet parafínových řezů by neměl být menší než 3 a tloušťka by měla být 5–10 µm.
- Zabraňte kontaminaci během odběru, uchovávání a přepravy vzorku.

Příprava vzorku

- Extrakce specifické RNA by měla probíhat podle doporučených pokynů uvedených v příbalovém letáku soupravy.
- Za účelem zabránění kontaminaci extrahujte vzorky a uchovávejte je odděleně od všech ostatních činidel.
- Optimální rozsah koncentrace vzorku RNA detekovaného touto soupravou je následující: u vzorků zalitých do parafínu je optimální rozsah koncentrace 20 ng/µl–1 µg/µl. Pokud koncentrace překročí 20 ng/µl, měl by být vzorek naředěn vodou RNase/DNase Free Water na 20 ng/µl–1 µg/µl. Ředící poměry jsou uvedeny v tabulce 3 níže.

Tabulka 3.

Koncentrace vzorku	Ředící poměr (vzorek : RNase/DNase Free Water)
21–40 ng/µl	1:1
41–60 ng/µl	1:2
61–100 ng/µl	1:4
101–200 ng/µl	1:9

Tabulka 4a.

Komponenty	Zkumavka 1	Zkumavka 2
ALK Reaction Buffer 1	25 µl	-
ALK Reaction Buffer 2	-	25 µl
Vzorek RNA	05 µl	05 µl
Konečný objem	30 µl	30 µl

Tabulka 4b.

Komponenty	Zkumavka 3	Zkumavka 4	Zkumavka 5	Zkumavka 6
ROS1 Reaction Buffer 1	25 µl	-	-	-
ROS1 Reaction Buffer 2	-	25 µl	-	-
ROS1 Reaction Buffer 3	-	-	25 µl	-
ROS1 Reaction Buffer 4	-	-	-	25 µl
Vzorek RNA	05 µl	05 µl	05 µl	05 µl
Konečný objem	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Příprava činidel

- Vyjměte a vyrovnejte všechny složky činidel této soupravy na okolní teplotu 2 °C až 8 °C a před použitím krátce vortexujte po dobu 20 sekund.

Příprava reakční směsi

- Připravte reakční směs podle následující tabulky v oblasti pro přípravu činidel (Tabulka 4a a Tabulka 4b).

⚠ Přípravte zkumavku s qPCR reakcí na ledu a rychle přejděte k amplifikačnímu kroku. Prodloužená inkubace reakční směsi, zejména při pokojové teplotě, ovlivňuje citlivost testu. Zkumavky před vložením do termocykleru krátce zcentrifugujte. Je třeba zabránit vzniku bublin v reakční směsi, protože interferují s detekcí fluorescence.

- Pro No Template Control (NTC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek RNA nahradíte vodou RNase/DNase Free Water.
- Pro reakci Positive Control (PC) postupujte podle stejného nastavení reakce jako výše, přičemž vzorek RNA nahradíte cílově specifickým Positive Control Template ve zkumavce.

Poznámka: Koncentrace extrahované RNA by měla být v rozsahu 20 ng/μl–1 mg/μl podle přístroje Nanodrop.

Nastavení přístroje pro real-time PCR

- Před nastavením programu na jakémkoli přístroji pro real-time PCR se řiďte uživatelskou příručkou příslušného přístroje.
- Níže je uveden příklad nastavení přístroje BioRad CFX96.

Nastavení PCR přístroje

- Vložte zkumavku/deštičku s PCR reakcí do přístroje. Nastavte No Template Control (NTC), Positive Control a testovaný vzorek v pořadí do 8zkumavkového stripu.

Nastavení kanálů fluorescence

- Definujte následující nastavení pro výběr kanálu detekce fluorescence (Tabulka 5).

Tabulka 5.

Cíl	Reportér	Zhášeč
EML4-ALK mutant 1\2\3a\3b\4\6\7	FAM	Žádný
EML4-ALK mutant 5a\5b\5\8a\8b	FAM	Žádný
ROS-1 (Exon-32)	FAM	Žádný
ROS-1 (Exon-34)	FAM	Žádný
ROS-1 (Exon-35)	FAM	Žádný
ROS-1 (Exon-36)	FAM	Žádný
Interní kontrola	HEX	Žádný

- Definujte následující nastavení teplotního profilu a PCR cyklů. Uložte soubor a spusťte reakci (Tabulka 6).

Tabulka 6.

Fáze	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (min:sec)
Denaturace	1	37	30:00
		95	10:00
Cyklická denaturace, annealing a extenze	40	95	00:15
		65	00:20
		72	01:00
		95	00:15
		60*	00:35

*Data amplifikace jsou sbírána při 60 °C po dobu 40 cyklů pro příslušné cílové kanály – HEX a FAM.

- Po nastavení výše uvedených podmínek uložte soubor a spusťte program reakce.

Kontrola kvality

- **No Template Control (NTC):** V kanálech FAM a HEX pro Reaction Buffer 1, 2, 3 a 4 ROS-1 nejsou žádné hodnoty Ct. Obdobně u EML4-ALK nejsou žádné hodnoty Ct v kanálech FAM a HEX pro Reaction Buffer 1 a 2.
- **Positive Control:** V kanálech FAM jsou zřetelné amplifikační křivky pro Reaction Buffer 1, 2, 3 ROS-1 a Reaction Buffer 1 EML4-ALK, s hodnotou Ct ≤30. Zřetelná amplifikační křivka je i v kanálu FAM a VIC (HEX) pro Reaction Buffer 4 ROS-1 a Reaction Buffer 2 EML4-ALK, s hodnotou Ct ≤30.

Výše uvedené požadavky musí být splněny ve stejném experimentu, jinak je tento experiment neplatný.

Interpretace výsledků testu

Mezní hodnota (Cut-off)

- Mezní hodnota (cut-off) soupravy pro detekci fúzní mutace EML4-ALK a ROS1 je hodnota Ct ≤38.
- Pokud není přítomen žádný amplifikační signál nebo zřetelná amplifikační křivka v kanálu FAM, je výsledek posouzen jako negativní.
- Kanál FAM Ct ≤38 – výsledek je pozitivní.
- Pokud je v kanálu FAM $38 < Ct < 40$, doporučuje se opakovat test. Pokud je výsledek opakovaného testu stále $38 < Ct < 40$, je hlášen jako pozitivní. Pokud je hodnota Ct opakovaného testu 0 nebo chybí, je test negativní.
- Pokud je hodnota Ct interní kontroly >30 (kanál VIC/HEX) u Reaction Buffer 2 EML4-ALK a Reaction Buffer 4 ROS-1, znamená to, že RNA může být částečně fragmentovaná nebo degradovaná. Pokud je přítomen amplifikační signál v kanálu FAM a Ct ≤38, výsledek je stále platný a je pozitivní; jinak se doporučuje znovu extrahovat RNA pro testování.
- Pokud kanál interní kontroly (VIC/HEX) u Reaction Buffer 2 EML4-ALK a Reaction Buffer 4 ROS-1 nevykazuje žádný amplifikační signál, znamená to, že RNA je silně fragmentovaná nebo degradovaná, případně obsahuje inhibitor, a vzorek musí být znovu extrahován pro detekci (Tabulka 7a a Tabulka 7b).

Tabulka 7a.

Cíl		qPCR signál			
ALK Reaction Buffer 1 (FAM)		+	-	-	-
ALK Reaction Buffer 2 (FAM)		-	+	-	-
Internal Control (HEX)		-	+	+	-
No Template Control (NTC)		-	-	-	+
Výsledek		Pozitivní výsledek pro EML4-ALK mutant 1\2\3a\3b\4\6\7	Pozitivní výsledek pro EML4-ALK mutant 5a\5b\5\8a\8b	Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Tabulka 7b.

Cíl		qPCR signál			
ROS1 Reaction Buffer 1 (FAM)		+	-	-	-
ROS1 Reaction Buffer 2 (FAM)		-	+	-	-
ROS1 Reaction Buffer 3 (FAM)		-	-	+	-
ROS1 Reaction Buffer 4 (FAM)		-	-	-	+
Internal control (HEX)		-	-	-	+
No Template Control (NTC)		-	-	-	+
Výsledek		Pozitivní výsledek pro ROS1 Exon-32	Pozitivní výsledek pro ROS1 Exon-34	Pozitivní výsledek pro ROS1 Exon-35	Pozitivní výsledek pro ROS1 Exon-36
				Negativní výsledek	Neplatný výsledek

Pro diagnostické účely by měly být výsledky vždy používány v kombinaci s dalšími lékařskými nálezy, jako jsou symptomy, výsledky jiných testů, klinický dojem apod. Pokud jsou výsledky v rozporu s klinickými nálezy, doporučuje se provést doplňující testování k potvrzení výsledku.

Varování a bezpečnostní opatření

- Před použitím si pečlivě přečtěte tento návod k použití (IFU) a seznámte se s postupy obsluhy a bezpečnostními opatřeními.
- Pracovní plocha by měla být pravidelně dezinfikována 1 % roztokem chlornanu sodného nebo 75 % etanolem.
- Nepoužívejte komponenty soupravy po datu jejich expirace.
- Při provádění testu používejte jednorázovou zástěru, rukavice a masku.
- Vzorky by měly být zcela dávkovány do reakční směsi a žádný vzorek by neměl ulpívat na stěně zkumavky.
- Dodržujte nezbytná opatření v souladu s bezpečnými laboratorními postupy při manipulaci se vzorky a přístroji, protože testované vzorky jsou klasifikovány jako nebezpečné.
- Bylo prokázáno, že heparin inhibuje PCR. Nepoužívejte s tímto postupem heparinizované vzorky. Spolehlivost výsledků závisí na řádném odběru vzorků a správných postupech přepravy.
- Používejte běžná laboratorní bezpečnostní opatření. Při manipulaci se vzorky a činidly soupravy používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště.
- Po manipulaci se vzorky a činidly soupravy si důkladně umyjte ruce.
- Činidlo s enzymem a primery/sondami obsahuje v pufru syntetický oligonukleotid. Zabraňte styku činidla s kůží, očima a sliznicemi, což by mohlo způsobit kožní podráždění. Při styku s těmito činidly omyjte postižené místo vodou. Při rozlití těchto činidel postupujte podle vhodných postupů pro zvládání rozlití.
- NEZAMĚŇUJTE, NEMÍCHEJTE ani nekombinujte činidla ze souprav s různými čísly šarží.
- Zabraňte mikrobiální a nukleázové kontaminaci činidel a zajistěte, aby byly případné sraženiny rozpuštěny.
- Všechny testované vzorky musí být považovány za potenciálně infekční nebo biologicky nebezpečné a při manipulaci se vzorky a přístroji musí být dodržována všechna nezbytná opatření v souladu s bezpečnými laboratorními postupy.
- Podmínky uchovávání činidel musí být striktně dodržovány, aby byla zajištěna deklarovaná funkčnost soupravy.

Omezení

- Pro dosažení optimálních výsledků je nezbytné důsledně dodržovat příbalový leták soupravy neboli návod k použití (IFU). Výsledky tohoto testu jsou citlivé na způsob odběru, transportu, uchovávání a zpracování vzorku a jakékoli nesrovnalosti mohou vést k nepřesným výsledkům. Například křížová kontaminace, pokud není během zpracování vzorku řádně kontrolována, může vést k falešně pozitivním výsledkům.
- Test je omezen na specifikovaná extrakční činidla, typy vzorků a příslušné přístroje.
- Pro optimální provedení tohoto testu je nezbytné důsledné dodržování správné laboratorní praxe (GLP).
- Případné mutace v cílových oblastech genomu, na které se váží primery/sondy použité při návrhu soupravy, mohou vést k nekonzistentním výsledkům.
- Stejně jako u jakéhokoli diagnostického testu musí být výsledky testu této soupravy interpretovány podle části „interpretace výsledků“ tohoto návodu, s ohledem na všechny klinické a laboratorní nálezy.

Symboly použité na označení	
Symboly	Definice
	CHRAŇTE PŘED SLUNEČNÍM ZÁŘENÍM
	TEPLOTNÍ OMEZENÍ
	DIAGNOSTICKÝ ZDRAVOTNICKÝ PROSTŘEDEK IN VITRO
	TOUTO STRANOU NAHORU
	ŘÍDTE SE NÁVODEM K POUŽITÍ
	KÓD ŠARŽE
	KATALOGOVÉ ČÍSLO
	DATUM POUŽITELNOSTI
	DATUM VÝROBY
	VÝROBCE
	OBSAH DOSTAČUJÍCÍ PRO <n> TESTŮ
	UPOZORNĚNÍ
	NEPOUŽÍVEJTE, POKUD JE OBAL POŠKOZEN
	ZPLNOMOCNĚNÝ ZÁSTUPCE PRO EVROPSKÉ SPOLEČENSTVÍ / EVROPSKOU UNII
	EVROPSKÁ SHODA



Genes 2Me Private Limited Plot No - 33 Sector-5, IMT Manesar, Gurugram, Haryana - 122052 (India), Telefonní čísla: +91 18001 214030 / +91 88000 23600 / +91 8800821778, E-mail: contact@genes2me.com



OBELIS S.A. Bd General Wahis 53 B-1030 Brussels Belgium, Tel: +3227325954, Fax: +3227326003, E-mail: mail@obelis.net