

Juni 2020

Handbok för *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Version 1



För in vitro-diagnostisk användning

För användning med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrument



870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND



R5 1121934SE

Innehåll

Avsedd användning.....	4
Sammanfattning och förklaring.....	5
Användningsprinciper.....	6
Kitets format.....	7
Analyser.....	7
Kontroller.....	8
Material som medföljer.....	9
Kitinnehåll.....	9
Material som behövs men inte medföljer.....	10
Varningar och försiktighetsåtgärder.....	11
Säkerhetsinformation.....	11
Allmänna säkerhetsåtgärder.....	11
Förvaring och hantering av reagenser.....	13
Förvaring och hantering av prover.....	15
Procedur.....	16
Protokoll: Detektering av EGFR-mutationer.....	17
Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-konfiguration.....	21
Analys av mutationsbedömningsdata.....	28
Felsökningsguide.....	35
Kvalitetskontroll.....	37
Begränsningar.....	37
Prestandaegenskaper.....	39

Analytisk sensitivitet – blankgräns (Limit of Blank, LOB)	39
Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD).....	39
Analytisk sensitivitet – ΔC_T -cutoff-värden och ΔC_T -cutoff-intervall	41
Repeterbarhet och reproducerbarhet.....	41
Effekt av DNA-input på C_T -värden.....	42
Interfererande ämnen.....	42
Klinisk prestanda.....	46
Referenser.....	47
Kontaktinformation	47
Symboler	48
Bilaga A: Information om mutationer	49
Beställningsinformation.....	50
Dokumentrevisioner	52

Avsedd användning

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit är ett in vitro-diagnostiskt test för detektion av exon 19-borttagningar, exon 20- och 21-substitutioner (T790M respektive L858R) i genen för epidermal tillväxtfaktorreceptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) och ger en kvalitativ bedömning av mutationsstatusen. Resultaten ska hjälpa läkarna att identifiera patienter med NSCLC som är sannolikt lämpade för behandling med IRESSA® (gefitinib) när ett vävnadsprov inte kan utvärderas.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit ska användas av utbildad personal i en professionell laboratoriemiljö med DNA-prover som har extraherats ur plasma som erhållits från blod hos patienter med icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning.

Sammanfattning och förklaring

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit är färdigt för användning för detektion av mutationer i den cancerrelaterade EGFR-genen med PCR-teknik (Polymerase Chain Reaction, PCR) på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.

Tack vare Scorpions®- och ARMS-teknik möjliggör *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit detektion av följande EGFR-genmutationer mot en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA.

- Borttagningar i exon 19
- T790M
- L858R

De metoder som används är mycket selektiva, och beroende på den totala mängden förekommande DNA kan en låg procentandel mutant detekteras i en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA. Selektiviteten och detektionsgränserna är överlägsna annan teknik, t.ex. färgsekvensering.

Användningsprinciper

I *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit används två typer av teknik – ARMS och Scorpions – för detektion av mutationer i real-time PCR.

ARMS

Allel- eller mutationsspecifik amplifiering uppnås genom att använda ARMS (Amplification Refractory Mutation System). *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) är effektivt när det gäller att skilja på en matchning och en felmatchning vid 3'-ändan av en PCR-primer. Specifikt muterade sekvenser amplifieras selektivt, även i prover där majoriteten av sekvenserna inte bär på mutationen. När primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3' basen inte matchar sker endast bakgrundsamplifiering på låg nivå.

Scorpions

Detektion av amplifiering utförs genom att använda Scorpions. Scorpions är bifunktionella molekyler med en PCR-primer som är kovalent bunden till en prob. Fluoroforen i den här proben samverkar med en quencher, även den integrerad i proben, som minskar fluorescensen. Medan PCR pågår när proben binds till amplikon separeras fluoroforen och quenchern. Detta leder till en ökning av fluorescens från reaktionsröret.

Kitets format

Fyra analyser ingår i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit:

- En kontrollanalys (Ctrl)
- Tre mutationsanalyser

Samtliga reaktionsmixar innehåller reagenser för att detektera mål som är märkta med FAM™, och en intern kontrollanalys som är märkt med HEX™. Den interna kontrollanalysen möjliggör detektion av hämmare, vilka kan leda till att ett falskt-negativt resultat uppstår. FAM-amplifiering kan konkurrera ut internkontrollamplifieringen och syftet med internkontrollen är helt enkelt att visa att om det inte finns någon FAM-amplifiering är resultatet sant negativt och inte en misslyckad PCR-reaktion.

Analyser

Kontrollanalys

Kontrollanalysen, märkt med FAM, används för att bedöma den totala mängden DNA i ett prov. Denna analys amplifierar ett område av exon 2 i EGFR-genen. Primern och proben har utformats så att de undviker kända EGFR-polymorfismer.

Mutationsanalys

Varje mutationsanalys innehåller en FAM-märkt Scorpions-prob och en ARMS-primer för urskiljning mellan vildtyps-DNA och ett specifikt mutant-DNA.

Kontroller

Alla experimentkörningar måste innehålla följande kontroller:

Positiv kontroll

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1-4. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit innehåller EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) som ska användas som mall i den positiva kontrollreaktionen. De positiva kontrollresultaten bedöms för att garantera att kitet fungerar inom de angivna acceptanskriterierna.

Negativ kontroll

Varje körning måste innehålla en negativ kontroll (kontroll utan mall; No-Template Control, NTC) i rör 9–12. NTC består av nukleasfritt vatten (H₂O) som ska användas som "mall" i kontrollen utan mall. Kontrollen utan mall används för att bedöma potentiell kontaminering under körningskonfigurationen samt för att bedöma effekten hos internkontrollreaktionen.

Bedömning av internkontrollreaktion

Varje reaktionsmix innehåller en internkontroll utöver målreaktionen. Ett misslyckande indikerar antingen förekomst av hämmare som kan leda till falskt negativa resultat eller en felaktig hantering av det aktuella röret vid förberedelsen.

Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämmarna, men det leder även till spädning av mål-DNA. FAM-amplifiering kan konkurrera ut internkontrollamplifieringen så att det genererade IC C_T (HEX)-värdet kan hamna utanför angivet intervall. FAM-resultaten är fortfarande giltiga för dessa prover.

Material som medföljer

Kitinnehåll

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Katalognr.			870311
Antal reaktioner			24
Röd	Control Reaction Mix (Kontrollreaktionsmix)	Ctrl	2 × 600 µl
Lila	T790M Reaction Mix (T790M-reaktionsmix)	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (Reaktionsmix för borttagningar)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R-reaktionsmix)	L858R	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-positiv kontroll)	PC	300 µl
Mint	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeras)	Taq	2 × 80 µl
Vit	Nuclease-Free Water for No Template Control (Nukleasfritt vatten för kontroll utan mall)	NTC	1 × 1,9 ml
Vit	Nuclease-Free Water for Dilution (Nukleasfritt vatten för spädning)	Dil	1 × 1,9 ml
Bruksanvisning för <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (Handbok)			1

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

- DNA-extraktionskit (se "Procedur", sidan 16)
- Särskilda pipetter* (justerbara) för provberedning
- Särskilda pipetter* (justerbara) för beredning av PCR-huvudmix
- Särskilda pipetter* (justerbara) för dosering av DNA-mall
- DNase-, RNase- och DNA-fria pipettspetsar med filter (för att undvika korskontaminering rekommenderar vi pipettspetsar med aerosolbarriär)
- Vattenbad eller liknande produkt som har kapacitet för 50 ml-centrifugrör i 60 °C.
- Värmeblock eller liknande produkt som har kapacitet för inkubering i 56 °C†
- Krossad is
- Bänkcentrifug* med rotor för 2 ml-reaktionsrör
- Vortexblandare
- Instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM*† med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Yellow (detektion av FAM respektive HEX)
- Programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, för användning med 72-Well Rotor (kat.nr 981103 eller 981106)
- DNase-, RNase- och DNA-fria mikrocentrifugrör för beredning av huvudmixar
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett (QIAGEN kat.nr 9018901)

* Säkerställ att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

† I vissa länder kan instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum maj 2011 eller senare användas. Tillverkningsdatumet kan utläsas från serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret har formatet "mmyynn" där "mm" anger månaden i tillverkningsdatumet med siffror, "yy" anger de två sista siffrorna i tillverkningsåret och "nnn" är en unik identifieringskod för instrumentet.

Varningar och försiktighetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

För professionell användning

Säkerhetsinformation

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- Använd DNase-, RNase- och DNA-fria pipettspetsar med filter och kontrollera att pipetterna har kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.
- Förvara och extrahera positivt material (prover och positiva kontroller) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem i reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Tina alla komponenter omsorgsfullt i rumstemperatur (15–25 °C) innan analysen påbörjas.
- När komponenterna tinats ska de blandas genom att vända varje rör 10 gånger och centrifugeras en kort stund.

Obs! Iakttag största försiktighet för att förhindra att PCR kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial. Vi rekommenderar att separata, för ändamålet avsedda, pipetter används för iordningställande av reaktionsmixar och tillsats av DNA-mall. Beredning och fördelning av reaktionsmixar måste utföras i ett område avskilt från området där mall tillsätts. Rotor-Gene Q-rör får inte öppnas efter att PCR-körningen har avslutats. Detta för att förhindra laboratoriekontaminering från produkter efter PCR-körningen.

Obs! Reagenserna är validerade för manuellt iordningställande. Om en automatisk metod används kan antalet möjliga reaktioner minska eftersom reagenserna måste fylla "dödvolym" på dessa instrument.

Obs! Alla reagenser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit har utformats särskilt för att användas med de angivna testerna. Alla reagenser som medföljer *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser i samma *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

För att bästa effekt ska kunna garanteras får kitets reagenser inte bytas ut mot något annat reagens.

Obs! Använd endast det *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) som medföljer i kitet. Byt inte ut det mot *Taq* DNA-polymeras från andra kit av samma typ eller annan typ, och byt inte heller ut det mot *Taq* DNA-polymeras från en annan leverantör.

Obs! Reagenser till *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit har spätts ut optimalt. Vi rekommenderar inte ytterligare spädning av reagenser då det kan resultera i förlorad prestanda. Vi rekommenderar inte användning av reaktionsvolym mindre än 25 µl då det ökar risken för falskt negativa resultat.

Förvaring och hantering av reagenser

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit levereras på torris. Om någon komponent i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit inte är fryst vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, bruksanvisning eller reagenser i leveransen ska du kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se www.qiagen.com).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 till -15 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus. Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15 °C i 12 månader eller som längst fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte högst åtta frys-/upptiningscyklar.

Reagenserna måste tinas i rumstemperatur i minst 1 timme och högst 4,5 timmar. När reagenserna är klara för användning kan PCR-reaktionerna göras i ordning och Rotor-Gene Q-rören som innehåller huvudmixarna och DNA-provet ska omgående laddas i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Den totala tiden från start av PCR-konfigurationen till körningens start ska inte överskrida:

- 6 timmar vid förvaring i rumstemperatur
Obs! Den här tiden inkluderar både PCR-konfiguration och förvaring.
- 18 timmar vid förvaring i kyl (2–8 °C)
Obs! Den här tiden inkluderar både PCR-konfiguration och förvaring.

Obs! Scorpions (liksom alla fluorescensmärkta molekyler) i reaktionsmixreagenserna är ljuskänsliga. Skydda kontroll- och reaktionsmixreagenserna mot ljus för att undvika fotoblekning.

Reagenserna i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit är optimalt utspädda och de behöver inte renas eller behandlas ytterligare innan de används i analys enligt instruktionerna i *bruksanvisningen (handboken) till theascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit*.

Var uppmärksam på de utgångsdatum och förvaringsvillkor som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Förvaring och hantering av prover

Obs! Alla prover måste behandlas som potentiellt smittsamt material.

Provmaterialet måste vara mänskligt, genomiskt DNA extraherat från plasma. Proverna måste transporteras enligt standardmässig patologisk metod för att garantera provets kvalitet.

Procedur

DNA-extrahering

Testegenskaper för kitet togs fram med hjälp av DNA som extraherats med QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (kat.nr 55114). Om du använder QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit ska du utföra DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observera följande:

- Startvolymen för plasma är 2 ml.
- Innan DNA-extraktion utförs ska 2 ml plasma centrifugeras i 3 000 rpm i 2 minuter och supernatanten överförs till ett rent rör.
- Volymen proteinas K ska vara 250 µl.
- Nedbrytning av proteinas K ska utföras i 1 timme i 60 °C.
- Renat genomiskt DNA måste elueras i 55 µl AVE-buffert (medföljer i QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Förvara renat genomiskt DNA i -30 till -15 °C.

Obs! Alla analyser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ger korta PCR-produkter. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit fungerar emellertid inte på mycket fragmenterat DNA.

Protokoll: Detektering av EGFR-mutationer

Viktigt att tänka på före start

- För att erhålla korrekta resultat, se till att den beskrivna blandningsproceduren utförs vid varje blandningssteg av analyskonfigurationsprocessen.
- Upp till 16 prover kan analyseras i varje körning.
- Innan du börjar med proceduren ska du läsa "Allmänna säkerhetsåtgärder" på sidan 11.
- Ta dig tid att bekanta dig med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM innan du startar protokollet. Se bruksanvisningen till instrumentet.
- Vortexa inte *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) eller någon mix som innehåller *Taq* DNA-polymeras, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* genom att placera pipettspetsen precis under vätskans yta för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.
- För varje DNA-prov måste kontroll- och mutationsanalyserna analyseras i samma PCR-körning för att undvika variationer mellan körningarna.
- För effektiv användning av reagenserna i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ska DNA-proverna indelas i batcher i så stor utsträckning som möjligt för att skapa fullständiga körningar. Testning av enskilda prover eller ett mindre antal prover ökar förbrukningen av reagenser och minskar det totala antal prover som kan testas med ett enda *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Saker som måste göras före start

- Före varje användning måste alla reagenser finas ordentligt i minst 1 timme och högst 4,5 timmar i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom att vända 10 gånger och centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Se till att *Taq* håller rumstemperatur (15–25 °C) före varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.
- Blanda genom att vända 10 gånger och centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.

Procedur

1. Tina alla reaktionsmixar, nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (No Template Control, NTC) och EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme (Tabell 1). När reagenserna har tinat ska du blanda dem genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer och sedan centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.

Tabell 1. Uppfrysningstider för PCR-konfiguration och förvaringstemperaturer

Minsta uppfrysningstid	Maximal uppfrysningstid	Förvaringstemperatur efter PCR-konfiguration	Maximal tid för PCR-konfiguration och förvaring
1 timme	4,5 timmar	Rumstemperatur (15–25 °C)	6 timmar
1 timme	4,5 timmar	2–8 °C	18 timmar

Obs! PCR-konfiguration ska utföras i rumstemperatur. Förvaring avser tiden mellan slutförande av PCR-konfigurationen och start av PCR-körningen på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Obs! Se till att *Taq* DNA-polymeras (*Taq*-rör) har rumstemperatur (15–25 °C) samtidigt som de andra reagenserna (se "Förvaring och hantering av reagenser" på sidan 13). Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

2. Utför följande steg:

- 2a. Märk fyra mikrocentrifugrör (medföljer inte) enligt motsvarande reaktionsmix som visas i tabell 2.
- 2b. Bered tillräckligt med huvudmixar (kontroll- eller mutationsreaktionsmix [CTRL-rör, T790M, borttagningar, L858R] plus *Taq* DNA-polymeras [*Taq*]) för DNA-proverna, en EGFR-positiv kontrollreaktion (PC-rör) och en nukleasfritt vatten för kontroll utan mall-reaktion (NTC-rör) enligt volymerna i tabell 2.

Obs! Inkludera reagenser för ett extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Huvudmixarna innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Tabell 2. Beredning av huvudmix*

Analys	Reaktionsmixrör	Volym reaktionsmix	Volym Taq DNA-polymeras (Taq-rör)
Kontroll	CTRL	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
T790M	T790M	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
Borttagningar	Del	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)
L858R	L858R	19,50 µl × (n + 1)	0,50 µl × (n + 1)

* Vid beredning av huvudmixen ska du bereda tillräckligt för ett extra prov för att ha ett tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Obs! Vid beredning av huvudmixen läggs den volym kontroll- eller mutationsreaktionsmix som krävs till i det aktuella röret först och Taq DNA-polymeras läggs till sist.

3. Placera det korrekta antalet PCR 4-rör (varje remsa har 4 rör) i laddningsblocket enligt layouten i tabell 3. Förslut inte rören.

Obs! Låt locken ligga kvar i plastbehållaren tills de behövs.

4. Förslut röret för huvudmixen och blanda genom att vända 10 gånger följt av en kort centrifugering så att all mix hamnar i botten av röret. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje aktuellt PCR-rör.

5. Tillsätt omedelbart 5 µl nukleasfritt vatten (H₂O) i PCR-rören med kontroll utan mall (PCR-rör 9–12) och förslut rören.

6. Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (PCR-rör 5–8, 13–16 och 17–22) och förslut rören.

7. Tillsätt 5 µl EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) i rören med positiv kontroll (PCR-rör 1–4). Varje DNA-prov måste testas med kontrollen och alla mutationsanalyser. Layouten för detta visas i tabell 3.

Tabell 3. Layout för kontroll- och mutationsanalyser

	Kontroller		Provnummer							
Analys	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7	
Ctrl	1	9	17	25	33	41	49	57	65	
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66	
Borttagningar	3	11	19	27	35	43	51	59	67	
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68	
					Provnummer					
Analys	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Ctrl	5	13	21	29	37	45	53	61	69	
T790M	6	14	22	30	38	46	54	62	70	
Borttagningar	7	15	23	31	39	47	55	63	71	
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72	

8. Använd en spritpenna och markera locken till de första rören i den lägsta numeriska positionen i varje PCR 4-rör (t.ex. Positionerna 1, 5 och 9 etc.) för att visa i vilken riktning rören ska laddas i rotorn med 72 brunnar på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Vänd de förslutna rören 4 gånger för att blanda provet och reaktionsmixen.
10. Placera alla PCR 4-rör i sina korrekta positioner i rotorn med 72 brunnar och kontrollera visuellt att alla rör innehåller samma volym.
Obs! Säkerställ att rören inte förväxlas när de överförs till rotorn.
11. Om rotorn inte fylls ska tomrummen fyllas med förslutna tomma rör.
12. Sätt omedelbart in rotorn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Se till att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q MDx) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.
13. I avsnittet om konfiguration av Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (se "Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-konfiguration" sidan 21) finns information om hur du skapar en temperaturprofil och startar körningen.

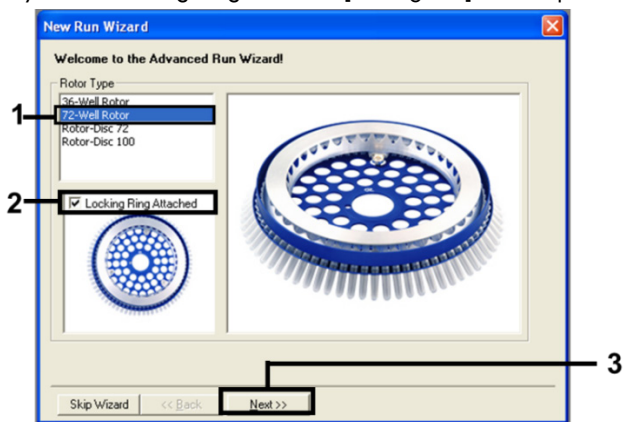
Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-konfiguration

Cykelparametrarna visas i tabell 4.

Tabell 4. Cykelparametrar

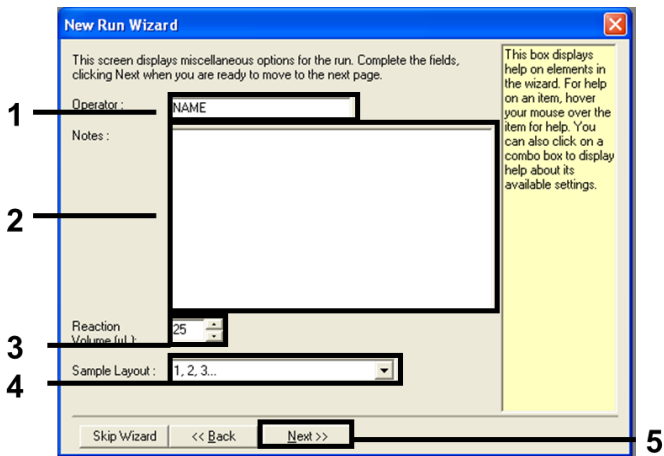
Cykler	Temperatur	Tid	Datahämtning
1	95 °C	15 minuter	Ingen
40	95 °C	30 sekunder	Ingen
	60 °C	60 sekunder	Green och Yellow

1. Dubbelklicka på programikonen för Rotor-Gene Q Series programversion 2.3 på skrivbordet på den bärbara dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Välj fliken "Advanced" [Avancerat] i dialogrutan "New Run" [Ny körning] som visas.
2. För att skapa en ny mall väljer du Empty Run [Tom körning] och klickar sedan på New [Ny]. Fönstret "New Run Wizard" [Guide för ny körning] visas.
3. Välj "72-Well Rotor" [Rotor med 72 brunnar] som rotortyp. Kontrollera att låsringen är fäst och markera kryssrutan Locking Ring Attached [Låsring fäst]. Klicka på Nästa (Figur 1).



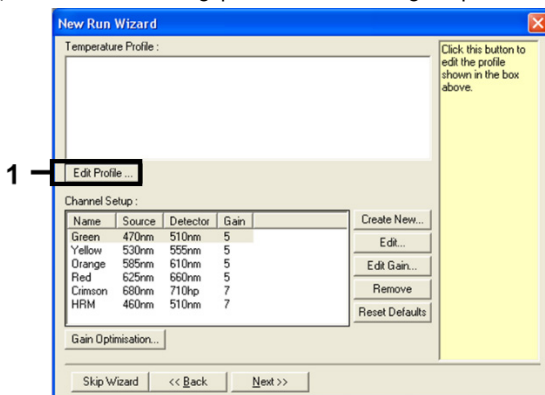
Figur 1. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning).

4. Ange operatörens namn i fältet Operator [Operatör]. Lägg till eventuella anteckningar och ställ in värdet i fältet Reaction Volume [Reaktionsvolym] på 25. Kontrollera att värdena i fältet Sample Layout [Provlayout] är inställda på 1, 2, 3.... Klicka på Next [Nästa] (Figur 2).



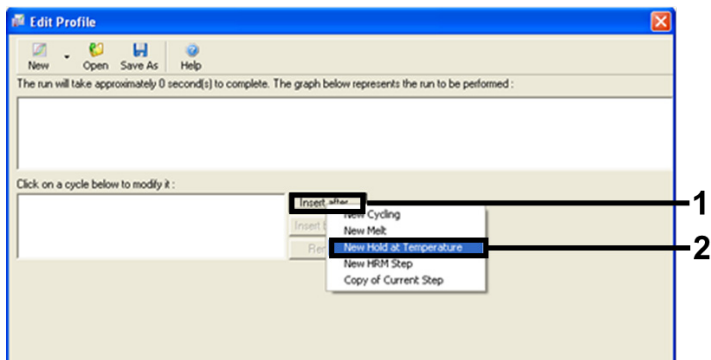
Figur 2. Ange namn på operatör och reaktionsvolym.

5. Klicka på Edit Profile [Ändra profil] i dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] (Figur 3) och ställ in körningsparametrarna enligt följande steg.



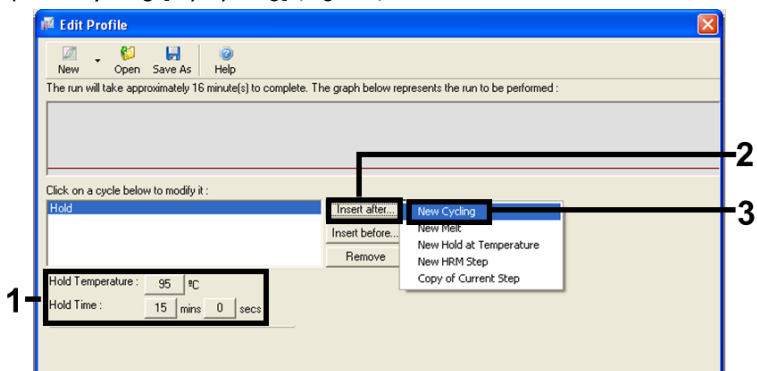
Figur 3. Ändra profilen.

6. Klicka på **Insert after** [Sätt in efter] och välj **New Hold at Temperature** [Ny bibehållning vid temperatur] (Figur 4).



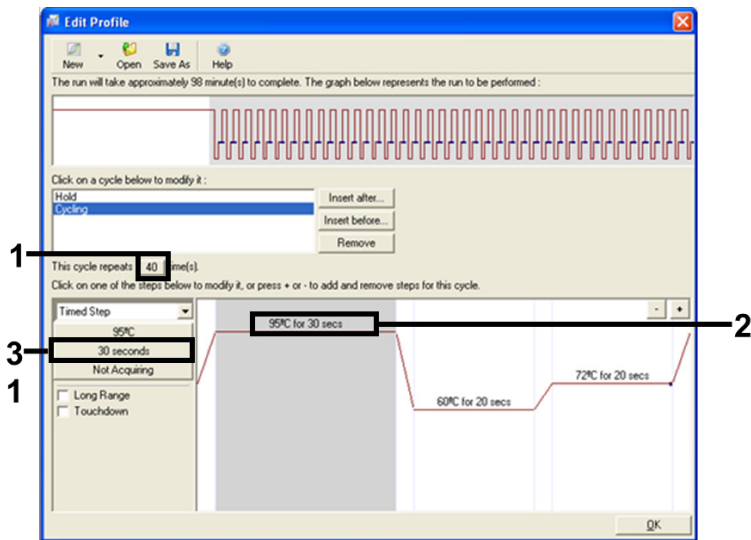
Figur 4. Infoga ett initialt inkuberingssteg.

7. Ställ in värdet i fältet **Hold Temperature** [Hålltemperatur] på **95 °C** och värdet i fältet **Hold Time** [Hålltid] på **15 mins 0 secs** [15 min 0 sekunder]. Klicka på **Insert after** [Sätt in efter] och välj **New Cycling** [Ny cykling] (Figur 5).



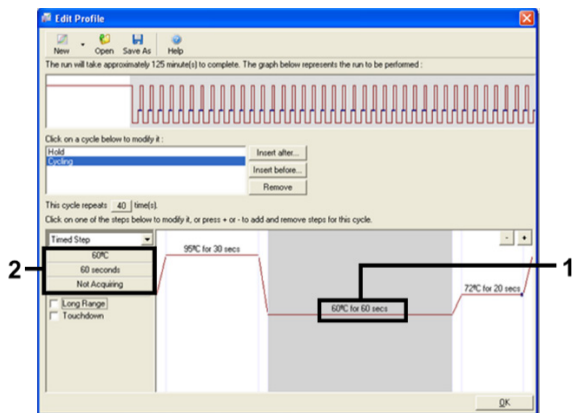
Figur 5. Initialt inkuberingssteg vid 95 °C.

8. Ställ in antalet cykelrepetitioner till 40. Välj det första steget och ställ in på 95 °C i 30 sekunder (se Figur 6).



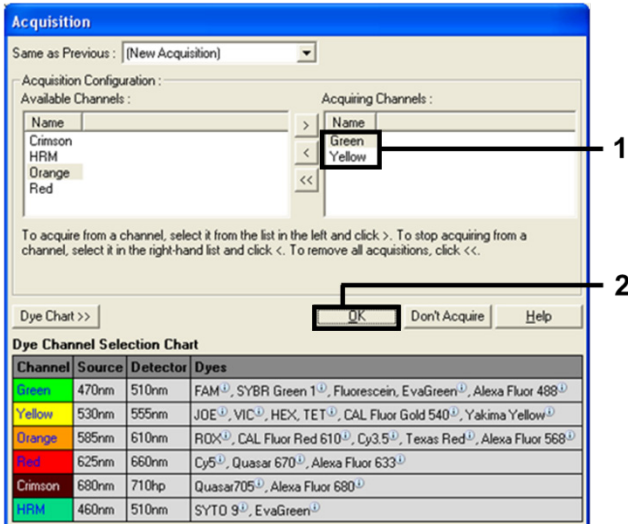
Figur 6. Cyklingssteg vid 95 °C.

9. Markera det andra steget och ställ in på 60 °C i 60 sekunder. Klicka på Not Acquiring [Hämtar inte] för att aktivera datainhämtning i detta steg. (Figur 7).



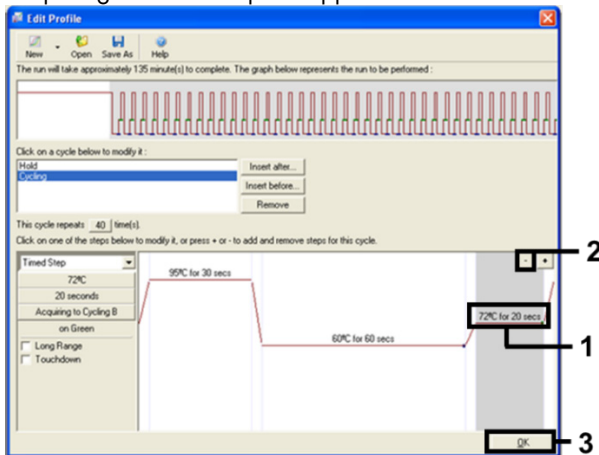
Figur 7. Cyklingssteg vid 60 °C.

10. Välj Green och Yellow i listan Available Channels [Tillgängliga kanaler] och klicka sedan på > för att överföra dem till listan Acquiring Channels [Hämtningskanaler]. Klicka på OK (Figur 8).



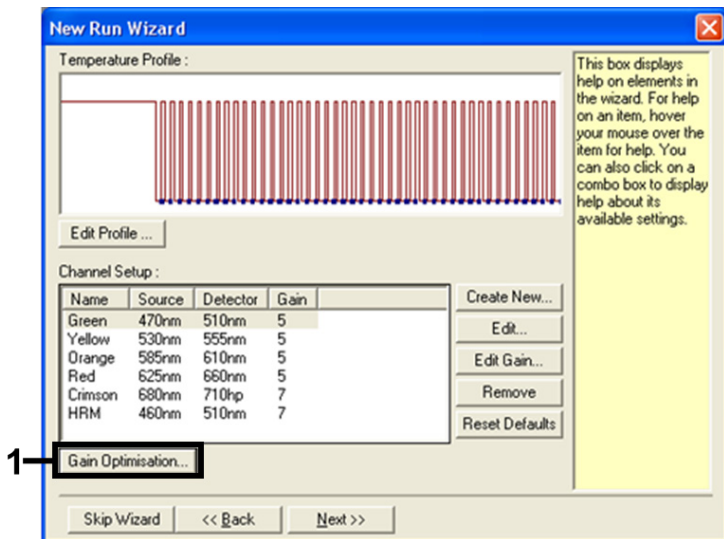
Figur 8. Hämtning vid cyklingsteg vid 60 °C.

11. Markera det tredje steget och klicka på knappen - för att ta bort. Klicka på OK (Figur 9).



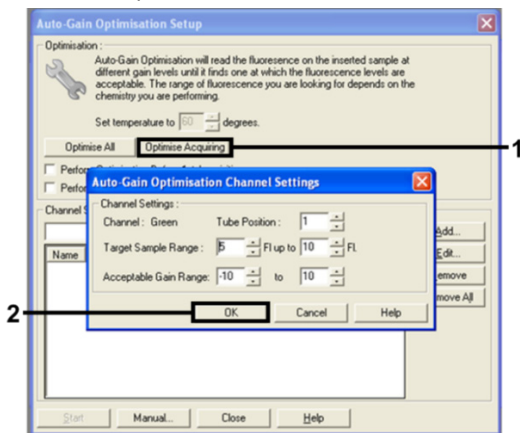
Figur 9. Ta bort förlängningsteg.

12. I nästa dialogruta klickar du på Gain Optimisation [Optimering av förstärkning] (Figur 10).



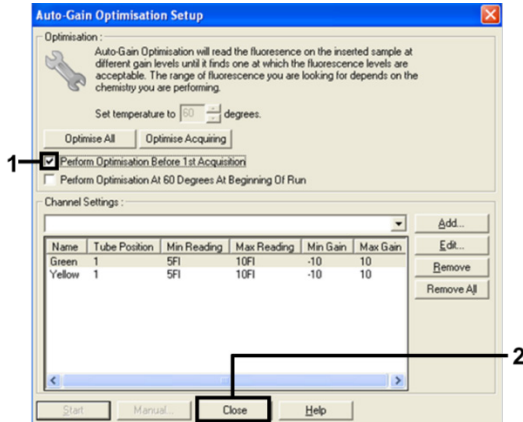
Figur 10. Optimering av förstärkning.

13. Klicka på Optimise Acquiring [Optimera hämtning]. Kanalinställningarna för varje kanal visas. Klicka på OK för att acceptera dessa standardvärden för båda kanalerna. (Figur 11).



Figur 11. Automatisk nivåoptimering för den gröna kanalen.

14. Markera kryssrutan Perform Optimisation before 1st Acquisition [Utför optimering före första hämtning] och klicka på Close [Stäng] för att återgå till guiden (Figur 12).



Figur 12. Val av gröna och gula kanaler.

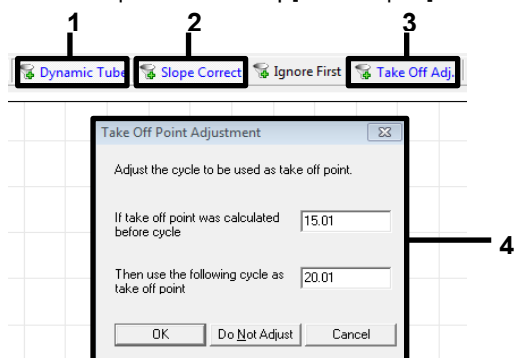
15. Klicka på Next [Nästa] för att spara mallen på en lämplig plats genom att välja "Save Template" [Spara mall].

Analys av mutationsbedömningsdata

När körningen är avslutad analyserar du data enligt följande procedur.

Konfigurera programanalys

1. Öppna den aktuella filen med Rotor-Gene Q Series-programmet 2.3.5 eller högre.
2. Om proverna inte har namngetts innan körningen ska utföras klickar du på Edit Samples [Redigera prover].
3. Skriv in namnen på proverna i kolumnen Name [Namn].
Obs! Ange inget namn för tomma brunnar.
4. Klicka på Analysis [Analys]. På analysidan klickar du på Cycling A Yellow för att kontrollera HEX-kanalen.
5. Kontrollera att alternativet Dynamic Tube [Dynamiskt rör] är markerat. Klicka på Slope Correct [Lutning korrekt] och Linear Scale [Linjär skala].
6. Klicka på Take Off Adj [Take off-just.] och ange 15,01 och 20,01 enligt Figur 13.



Figur 13. Inställningar för EGFR-analysnormalisering. 1 = "Dynamic Tube" [Dynamiskt rör], 2 = "Slope Correct" [Lutning korrekt] 3 = "Take Off Adj," [Take off-just.] 4 = dialogrutan "Take Off Point Adjustment" [Justering av take off-punkt] med parametervärden.

7. Ställ in tröskeln på 0.02 och kontrollera HEX C_T -värdena.
8. På analysidan klickar du på Cycling A, Green för att visa FAM-kanalen. Ställ in parametrarna enligt Figur 13 ovan.
Det dynamiska röret ska vara markerat.
9. Klicka på Slope Correct [Lutning korrekt] och Linear Scale [Linjär skala].
10. Ställ in tröskeln på 0.075 och bekräfta FAM C_T -värdena.

Kör kontrollanalys

När körningen har avslutats ska data analyseras enligt nedan.

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får NTC inte generera ett C_T -värde i den gröna (FAM) kanalen under 40. För att garantera att körningen konfigurerades korrekt måste NTC visa amplifiering i intervallet 29,85–35,84 i den gula kanalen (HEX) (internkontroll).

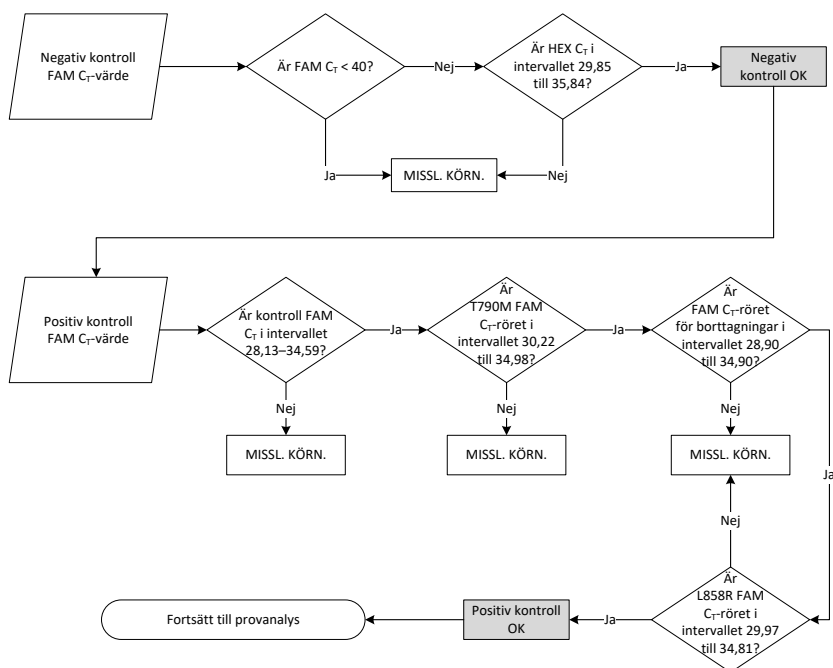
Om det finns en positiv amplifiering i den gröna kanalen och/eller amplifiering utanför intervallet 29,85–35,84 i den gula signalen är körningen ogiltig.

- **Positiv kontroll:** Den EGFR-positiva kontrollen (Positive Control, PC) måste ge ett C_T för varje reaktionsblandning inom och inklusive det intervall som anges i tabell 5. En körning med ett värde för positiv kontroll utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och ska anses som misslyckad. Om den positiva kontrollen ger ett C_T inom intervallet (FAM) men internkontrollens C_T (HEX) ligger utanför intervallet 29,85–35,84 fortsätter du med analysen.

Obs! Om antingen den negativa eller den positiva kontrollen misslyckas bör provdata inte användas.

Tabell 5. Acceptabelt C_T -intervall för körningskontroller

Reaktionskontroll	Analys	Kanal	C_T -intervall
Positiv kontroll	Kontroll	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Borttagningar	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Kontroll utan mall	Alla fyra reaktionsmixar	Green (FAM)	$\geq 40,00$
	Alla fyra reaktionsmixar	Yellow (HEX)	29,85-35,84



Figur 14. Arbetsflöde för körning av kontrollanalys.

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga måste varje C_T -värde för provkontrollanalys ligga inom intervallet 23,70–31,10 i den gröna kanalen (FAM) (Tabell 6).

Tabell 6. Acceptabelt FAM C_T-intervall för provets kontrollreaktion

Reaktionsmix	Kanal	Acceptabelt C _T -intervall
Kontroll	Green (FAM)	23,70–31,10

Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

- Provkontrollanalysens C_T är < 23,70: Prover med ett kontroll-C_T på < 23,70 skulle överbelasta mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom intervallet ovan baserat på att spädning till hälften kommer att öka C_T med 1.
- Provkontrollanalysens C_T > 31,10: Provet innehåller inte tillräckligt med DNA för att kunna analyseras.

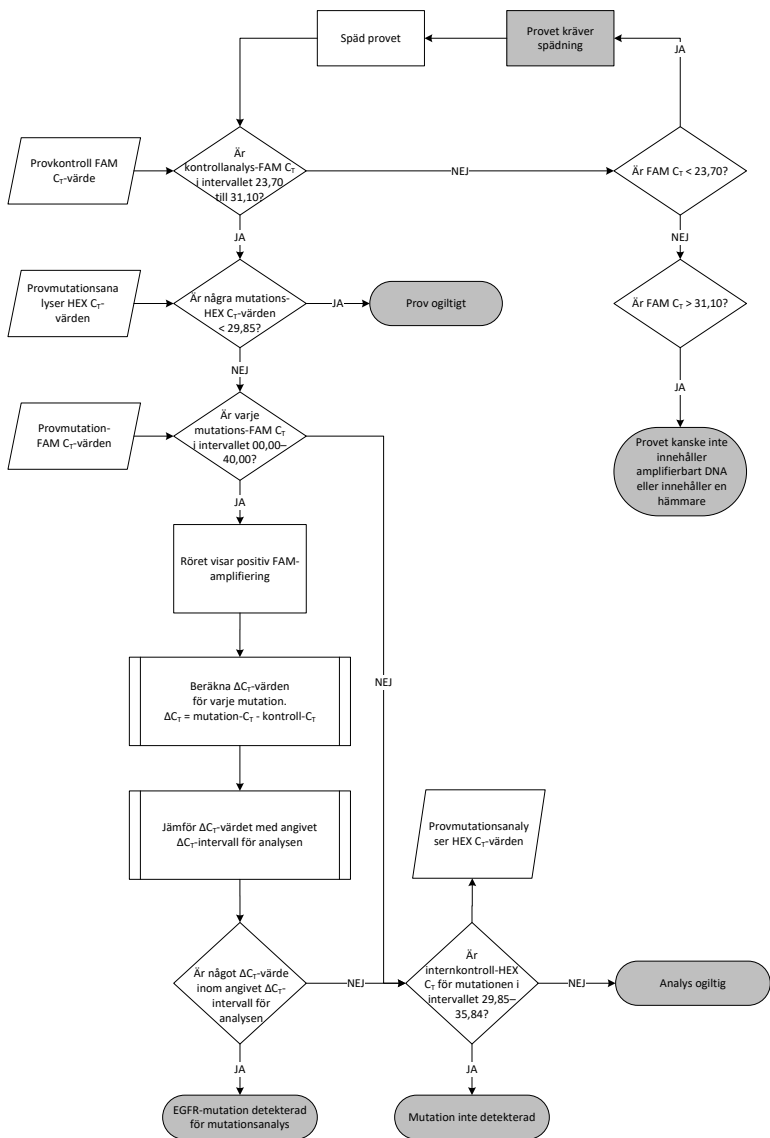
Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga och kontrollanalysen ligger inom det intervall som anges i tabell 6, måste varje prov-C_T-värde för mutationer ligga inom det intervall som anges i tabell 7 i den gröna kanalen (FAM). Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

Tabell 7. Acceptabla provvärden för mutationsreaktion

Reaktion	Reaktionsmix	Kanal	C _T -intervall
Mutationsreaktion	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Borttagningar	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Alla tre mutationer	Yellow (HEX)	29,85-35,84

Obs! Om ett prov inte genererar ett C_T (dvs. C_T > 40) kan det bero på förekomst av hämmare, ett fel i analyskonfigurationen eller att det inte finns något amplifierbart EGFR DNA.

- Internkontrollens C_T-värde ligger inom intervallet 29,85–35,84: Det finns inget amplifierbart EGFR DNA.
- Internkontrollens C_T-värde ligger inte inom intervallet 29,85–35,84: Det kan bero på ett fel i analyskonfigurationen eller på förekomst av hämmare. Det är möjligt att minska effekten av en hämmare genom att späda provet, även om detta också leder till spädning av DNA.



Figur 15. Flödesdiagram för mutationsanalys.

Prov-FAM C_T-värde för mutationsanalyser

FAM-värdena för alla tre mutationsreaktionsmixarna ska kontrolleras mot värdena som finns angivna i tabell 8.

Beräkna ΔC_T -cutoff-värdet för varje mutationsprov som visar positiv amplifiering enligt nedan för att garantera att mutations- och kontroll-C_T kommer från samma prov.

$$\Delta C_T = \text{mutation-C}_T - \text{kontroll-C}_T$$

Jämför ΔC_T -värdet för provet med ΔC_T -cutoff-intervallet för den aktuella analysen (tabell 8) för att säkerställa att korrekt cutoff-punkt tillämpas för varje analys.

Tabell 8. ΔC_T -cutoff-intervall för mutationsanalys

Mutationsanalys	ΔC_T -cutoff-intervall
T790M	$\geq -10,00$ till $\leq 7,40$
Borttagningar	$\geq -10,00$ till $\leq 8,00$
L858R	$\geq -10,00$ till $\leq 8,90$

Den övre gränsen för ΔC_T -cutoff-intervallet är den punkt ovanför vilken en positiv signal eventuellt kan bero på bakgrundssignal för ARMS-primern i vildtyps-DNA. Om provets ΔC_T -värde är högre än den övre punkten för ΔC_T -cutoff-intervallet klassas det som "Mutation not detected" [Mutation inte detekterad] eller som liggande utanför kitets detektionsgräns. Om provvärdet ligger inom ΔC_T -cutoff-punkterna bedöms provet som positivt för en mutation som detekterats av den aktuella analysen. Om provvärdet ligger under den nedre gränsen för ΔC_T -cutoff-intervallet kan detta potentiellt bero på en fluorescensartefakt.

Obs! För prover som inte visar någon FAM-mutation-C_T krävs en utvärdering av internkontrollens (HEX) C_T för att avgöra om mutationen inte är detekterad eller om analysen är ogiltig. Om HEX C_T-värdet är mellan 29,85 och 35,84 är mutationen inte detekterad. Om HEX ΔC_T -cutoff-värdet ligger utanför detta intervall är provet ogiltigt.

Sammanfattningsvis för alla prover kommer varje mutationsreaktion att tilldelas statusen mutation detekterad, mutation inte detekterad eller ogiltig med hjälp av kriterierna nedan.

- **Mutation detekterad:** FAM-amplifiering positiv och ΔC_T är inom cutoff-intervallet för ΔC_T .
Om flera mutationer detekteras kan alla rapporteras.
- **Mutation inte detekterad:**
 - FAM-amplifiering positiv, ΔC_T -cutoff-värdet ligger över ΔC_T -cutoff-intervallet och HEX (intern kontroll) ligger inom intervallet 29,85–35,84.
 - FAM-amplifiering negativ och HEX (intern kontroll) är inom 29,85–35,84.
- **Ogiltig:** FAM-amplifiering negativ och HEX-amplifiering utanför specifikationerna.
 - Det beräknade ΔC_T -värdet ligger under ΔC_T -cutoff-intervallet och HEX (intern kontroll) ligger inom det förväntade intervallet. Ett ΔC_T värde lägre än $-10,00$ indikerar att en fluorescensartefakt kan ha uppstått.

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan vanliga frågor (Frequently Asked Questions, FAQs) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGENs tekniska service alltid gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag på åtgärd

Ingen signal med EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) i fluorescenskanalen Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) Den valda fluorescenskanalen för PCR-dataanalysen överensstämmer inte med protokollet. | För dataanalys väljer du fluorescenskanalen Cycling Green för analytisk EGFR PCR och fluorescenskanalen Cycling Yellow för internkontroll-PCR. |
| b) Felaktig programmering av temperaturprofilen för Rotor Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet | Jämför temperaturprofilen med protokollet och upprepa körningen vid felaktighet. |
| c) Felaktig konfiguration av PCR | Kontrollera dina arbetssteg med hjälp av pipetteringsschemat och upprepa PCR om det behövs. |
| d) Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaring och hantering av reagenser" (sidan 13) | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på kitet) för reagenserna och använd ett nytt kit vid behov. |
| e) Utgångsdatum för <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit har passerats | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på kitet) för reagenserna och använd ett nytt kit vid behov. |

Kommentarer och förslag på åtgärd

Signaler med de negativa kontrollerna i fluorescenskanalen Cycling Green för analytisk PCR

Kontaminering inträffade under beredning av PCR

Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat.

Stäng om möjligt PCR-rören direkt när du har tillsatt det prov som ska testas.

Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet.

Flerfaldigt tröskelöverskridande eller ΔC_T -värde under cutoff-intervallet

Felaktig blandning under analyskonfiguration

Upprepa PCR om detta påverkar en kontroll eller testa om misslyckat prov.

Följ bruksanvisningen och var uppmärksam på blandningsstegen.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringsystem.

Begränsningar

Enbart resultaten från produkten ska inte ligga till grund för diagnos, utan de måste tolkas med hänsyn till resultat från alla relevanta kliniska studier eller laboratoriestudier.

Produkten är avsedd att användas endast av personal som fått särskild utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer och instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Analytiska valideringsstudier inkluderade humant DNA som extraherats från plasmaprover.

Produkten är endast avsedd för användning på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cyklar.

För optimalt resultat krävs att anvisningarna i handboken för *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrad prestanda.

Var uppmärksam på de utgångsdatum och förvaringsvillkor som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Primrarna i EGFR-reaktionsmixen för borttagningar har utformats för att rikta in sig på flera Exon 19-borttagningar och omfatta nukleotid 55174772 till 55174795 (GRCh38 chr7), ett intervall på 23 bp.

Exon 19-borttagningsanalysen har validerats analytiskt och visat sig detektera specificerade borttagningar inom Exon 19 (se tabell 13 i denna handbok), men det är dock möjligt att ytterligare mutationer (inklusive, men inte begränsat till ytterligare Exon 19-borttagningar, Exon 19-tillägg och L747P-mutationen) förstärks av reaktionsmixen för borttagningar.

Om ytterligare mutationer förekommer kommer det att leda till resultatet "Deletions Detected" [Borttagningar detekterade] för ett givet patientprov.

Det är dessutom möjligt att L858Q-mutationen detekteras av L858R-reaktionsmixen. Om den förekommer i ett patientprov kan L858Q-mutationen därmed leda till resultatet "L858R Mutation Detected" [L858R-mutation detekterad].

Prestandaegenskaper

Analytisk sensitivitet – blankgräns (Limit of Blank, LOB)

För att bedöma prestandan för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit vid frånvaro av mall och för att säkerställa att ett blankprov eller ett prov med vildtyps-DNA inte genererar en analytisk signal som kan indikera en låg koncentration av mutation EGFR-vildtyps-DNA i plasmaprover från NSCLC-patienter från 59 olika prover. Kriterierna för godkännande av studien (minst 95 % av vildtyps-proverna måste ha ett ΔC_T -cutoff-värde som ligger över respektive cutoff-intervall.

Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)

LOD är den minimi-procentandel mutant-DNA som kan detekteras i en vildtyps-DNA-bakgrund när den totala mängden amplifierbart DNA (inom input-intervallet) gav korrekt mutationsbestämningar till 95 % för varje mutationspositivt prov (C95). Analysens angivna arbetsintervall för DNA-input definieras av kontroll- C_T vid det förspecifierade intervallet 23,70 till 31,10.

LOD bestämdes vid låga nivåer DNA-input (kontroll- C_T omkring 30,10) med hjälp av DNA taget från FFPE-vävnad för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD bestämdes med hjälp av både FFPE-kliniska prover och FFPE-cellinjier vid låga DNA-inputnivåer för dessa EGFR-mutationer.

De LOD-värden som fastställdes med FFPE-vävnad verifierades för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit med DNA taget från artificiella mutationspositiva plasmaprover.

De slutliga LOD-anspråken som visas i tabell 9 på nästa sida indikerar procentandelen mutation som gav en förutspädd sannolikhet för korrekta bestämningar, för 95 % för var och en av mutationerna.

Tabell 9. LOD för var och en av EGFR-mutationsanalyserna

Exon	Mutation	COSMIC-ID*	LOD-anspråk i %
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43†
		12419	16,87†
		12422	3,24†
		6218	9,83†
		6210	7,44†
		6254	10,2*
		12370	8,1*
19	Borttagningar	12678	10,40†
		12367	4,39†
		12384	7,54†
		6225	6,5*
		6220	2,7*
		6255	0,81*
		12382	1,45*
		12383	4,58*
		12387	4,91†
	12369	4,94*	
21	L858R	6224	5,94*

* LOD-anspråk som verifierats i plasma som en del i LOD-bekräftelsestudien för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

† Dessa mutationer bekräftades inte i plasma.

Analytisk sensitivitet – ΔC_T -cutoff-värden och ΔC_T -cutoff-intervall

När analysens cutoff-värden konfigurerades användes en riskbaserad metod med hänsyn till falskt positiva svar. Uppskattade LOB-värden var en av komponenterna som användes vid utvecklandet av cutoff-värden.

De respektive ΔC_T -cutoff-intervall som fastställts för varje mutationsanalys i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit anges i tabell 10.

Tabell 10. ΔC_T -cutoff-intervall för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Mutationsanalys	ΔC_T -cutoff-intervall
T790M	$-10,00 \geq \text{till} \leq 7,40$
Borttagning	$-10,00 \geq \text{till} \leq 8,00$
L858R	$-10,00 \geq \text{till} \leq 8,90$

Repeterbarhet och reproducerbarhet

Repeterbarhet och reproducerbarhet uppnåddes genom att testa mutationsnivå i $3 \times \text{LOD}$ -prover i en bakgrund med genomiskt vildtyps-DNA på tre platser med flera kitbatchar, användare och körningar på olika dagar, med två replikat av varje prov. För tre mutationsanalyser testades 100 % av mutant-DNA-proverna som mutationspositiva. Vildtyps-proverna testades som mutationsnegativa i alla analyser på alla platser.

Effekt av DNA-input på C_T-värden

DNA-inputnivå definieras som den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov enligt bestämningen av kontrollreaktionens C_T-värden. För att påvisa att prestandan för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit är konsekvent över intervallet för kontrollreaktionens C_T-värde (23,70–31,10) testades alla tre EGFR-mutationsanalyser mot en sexpunkters, 1 till 3-spädningsserie (DNA som extraherats från FFPE-cellinjert). C_T-målvärdet för spädning ett, för varje mutation, var ca 24,70. Den slutliga spädningen, som gav ett C_T på ca 32–33, låg utanför kontrollreaktionens C_T-intervall. Generellt var de ΔC_T -cutoff-värden som mättes upp vid olika nivåer av total DNA-input konsekventa över hela arbetsintervallet för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Interfererande ämnen

Interfererande endogena ämnen

De potentiellt interfererande ämnena spikades med artificiella mutationspositiva plasmaprover (3 × LOD). Proverna testades därefter med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Proverna som innehöll de potentiellt interfererande ämnena jämfördes med de artificiella mutationspositiva plasmaproverna (3 × LOD) som inte innehöll några spikade interfererande ämnen. Varje interfererande ämne testades med 4 replikat.

En differens mellan "test"- och "kontroll"- ΔC_T med $> 2 \times$ standardavvikelser (dvs. inget interfererande ämne) (taget från precisionsstudie) bedömdes indikera en potentiell interferens. I sådana fall tillhandahålls den observerade skillnaden i ΔC_T .

De testkoncentrationer som visas i tabell 11 valdes ut baserat på informationen i CLSI-riktlinjen EP07-A2 och är representativa för de maxkoncentrationer som förväntas observeras i ett kliniskt prov.

Obs! Dessa endogena sammansättningar spikades med artificiella mutationspositiva plasmaprover som innehöll plasma från friska personer. Därför hade dessa endogena ämnen varit naturligt närvarande med okänd koncentration i proverna före spikningen. Den slutliga koncentrationen av varje potentiellt interfererande endogen ämne som testades hade sannolikt varit högre än testkoncentrationen.

Tabell 11. Potentiellt interfererande endogena ämnen

Potentiellt interfererande ämne (Interfering Substance, IS)	Testkoncentration
Okonjugerat bilirubin	150 mg/dl
Hemoglobin (humant)	0,2 g/dl
Triglycerider	3 g/dl

T790M-analys

Följande endogena sammansättningar vid de koncentrationer som anges i tabell 11 visade sig ha effekten $> 2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) på prestandan hos T790M-analysen:

- Triglycerider, differens $1,37 \Delta C_T$

Analys av borttagningar

Följande endogena sammansättningar vid de koncentrationer som anges i tabell 11 visade sig ha effekten $> 2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) på prestandan hos analysen av borttagningar:

- Hemoglobin, differens $0,80 \Delta C_T$

L858R-analys

Följande endogena sammansättningar vid de koncentrationer som anges i tabell 11 visade sig ha effekten $> 2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) på prestandan hos L858R-analysen:

- Bilirubin, differens 1,13 ΔC_T
- Triglycerider, differens 1,53 ΔC_T

Interfererande exogena ämnen

De potentiellt interfererande ämnena spikades med artificiella mutationspositiva plasmaprover ($3 \times \text{LOD}$). Proverna testades därefter med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Proverna som innehöll de potentiellt interfererande ämnena jämfördes med de artificiella mutationspositiva plasmaproverna ($3 \times \text{LOD}$) som inte innehåll några spikade interfererande ämnen. Varje interfererande ämne testades med 4 replikat.

En differens mellan "test"- ΔC_T och "kontroll"- ΔC_T med $> 2 \times$ standardavvikelse (dvs. inget interfererande ämne), hämtade från precisionsstudien, bedömdes indikera en potentiell interferens. I sådana fall tillhandahålls den observerade skillnaden i ΔC_T .

De testkoncentrationer som visas i tabell 12 valdes ut baserat på informationen i CLSI-riktlinjen EP07-A2 och är högre än den terapeutiska koncentrationen i samtliga fall.

Tabell 12. Potentiellt interfererande endogena ämnen

Potentiellt interfererande ämne (Interfering Substance, IS)	Testkoncentration ($\mu\text{g/ml}$)
Citalopramhydrobromid	0,75
Paroxetinhydrokloridhemihydrat	1,14
Sertralinhydroklorid	0,67
Fluoxetinhydroklorid	3,87
Acetaminofen	200,7
K ₂ EDTA	3600

T790M-analys

Följande exogena sammansättningar vid de koncentrationer som anges i tabell 12 visade sig ha effekten $> 2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) på prestandan hos T790M-analysen:

- Citalopramhydrobromid, differens $0,52 \Delta C_T$
- Sertralinhydroklorid, differens $0,47 \Delta C_T$
- Fluoxetinhydroklorid, differens $0,48 \Delta C_T$

Analys av borttagningar

Följande exogena sammansättningar vid de koncentrationer som anges i tabell 12 visade sig ha effekten $> 2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) på prestandan hos analysen av borttagningar:

- Fluoxetin, differens $0,73 \Delta C_T$

L858R-analys

Följande exogena sammansättningar vid de koncentrationer som anges i tabell 12 visade sig ha effekten $> 2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) på prestandan hos L858R-analysen:

- Citalopramhydrobromid, differens $0,72 \Delta C_T$
- Paroxetinhydrokloridhemihydrat, differens $0,92 \Delta C_T$
- Sertralinhydroklorid, differens $0,82 \Delta C_T$
- Fluoxetinhydroklorid, differens $0,98 \Delta C_T$
- Acetaminofen, differens $0,81 \Delta C_T$
- K_2 EDTA, differens $0,57 \Delta C_T$

Klinisk prestanda

Den kliniska undersökningen NCT01203917 var en fas IV, öppen engrupsstudie för att bedöma effekten och säkerheten/toleransen för gefitinib som första linjens behandling av kaukasiska patienter med mutationspositiv EGFR-NSCLC fas IIIA/B/IV.

Lämpligheten för patienter för deltagande i den kliniska undersökningen NCT01203917 bestämdes genom förekomst av EGFR-sensitiserande mutationer. EGFR-mutationsstatusen hos NSCLC-patienter bedömdes med hjälp av analys vid klinisk undersökning (Clinical Trial Assay, CTA) med DNA från matchade vävnads- och plasmaprover. Studien omfattade ett förberett provobjekt i form av en biomarkör för att fastställa om plasmaprover eventuellt kunde användas för mutationsanalys om det inte fanns några tillgängliga vävnadsprover. Resultaten visade höga värden för överensstämmelse mellan matchade vävnads- och plasmaprover på 94,3 % en analyspecificitet på 99,8 % och en sensitivitet på 65,7 %.

Retrospektiva tester av plasmaprover från patienter som screenats för den kliniska NCT01203917-undersökningen genomfördes med hjälp av *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. En överbryggande studie genomfördes för att bedöma överensstämmelsen för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit med CTA-analysen som användes för att välja ut patienter till den kliniska NCT01203917-undersökningen. Ekvivalensen mellan CTA-analysen och *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit påvisades.

Referenser















1. Douillard, J.Y., et al. (2014). First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 110(1), 55.
16. Walsh, K., et. al. (2014) A cautionary lesson on the use of targeted methods for EGFR mutation analysis; a case report. *J. Clin. Pathol.* 67, 734
17. Huang, J., Wang, Y., Zhai, Y., and Wang, J. (2018) Non-small cell lung cancer harboring a rare EGFR L747P mutation showing intrinsic resistance to both gefinitib and osimertinib (AZD9291): A case report. *Thorac. Cancer.* 9, 745

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800-22-44-6000 eller kontakta någon av QIAGEN:s tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
 Σ <N>	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
	GSI-artikelnnummer
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Läs bruksanvisningen innan användning
	Försiktighet

Bilaga A: Information om mutationer

Tabell 13 visar COSMIC-ID som hämtats från databasen Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabell 13. Lista med mutationer och COSMIC-ID

Mutation	Exon	Basskifte	COSMIC-ID
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
		2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (komplex)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (komplex)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (komplex)	12422
Borttagningar	19	2238_2252>GCA (komplex)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (komplex)	12382
		2239_2258>CA (komplex)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (komplex)	12383

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – för detektering av mutationer i EGFR-genen		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: 1 kontrollanalys, 3 mutationsanalyser, positiv kontroll, Taq DNA-polymeras	870311
Rotor-Gene Q MDx och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanals-pipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106

Produkt	Innehåll	Kat. nr
Relaterade produkter		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	För 50 beredningar: QIAamp Mini-kolonner, provrörsförlängningar (20 ml), QIAGEN Proteinase K, Carrier RNA, buffertar, VacConnectors och Collection Tubes (1.5 ml och 2 ml)	55114

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller bruksanvisningen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och bruksanvisningar till QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska support eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

Dokument	Ändringar
R3, januari 2019	Tillägg av auktoriserad representant (framsida). "Symboler"-avsnittet uppdaterat.
R4, oktober 2019	Juridisk tillverkare ändrad (framsida) Anpassning av instrumentnamnet från Rotor-Gene Q MDx till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM för att överensstämna med namnet på instrumentetiketten Korrigerade förvaringsanvisningar för reagens från 90 dagar till 12 månader eller till utgångsdatum Avsnittet Begränsningar uppdaterades med information om exon 19-borttagningsanalysen och L858R-analysen Tabell 9 korrigerades för att ta bort duplicerad exon 21 L858R med exon 19-borttagningar EC + REP-symbol togs bort från framsidan och symbolavsnittet
R5, juni 2020	Uppdaterade referenserna till RGQ-programversion från 2.3 till 2.3.5 eller senare Uppdaterade tabell 8 och 10 för att implementera det nya ΔC_T -cutoff-intervallet och justerade alla relevanta beskrivningar i handboken i enlighet med detta Uppdaterade alla Protokoll-kapitel för att inkludera information om vikten av blandning i avsnitten Viktigt att tänka på före start, markerade blandningsinformationen för alla blandningssteg Lade till ett blandningssteg till avsnittet "Protokoll: Detektering av EGFR-mutationer" Uppdaterade avsnittet Felsökning för att lägga till en lösning för flerfaldigt tröskelöverskridande

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Avtal om begränsad licens för *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

1. Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:
2. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit, förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
4. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
5. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, än de uttryckligen angivna.
6. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta, eller tillåta att någon annan vidtar, steg som kan leda till eller underlätta åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *therascreen*®, Rotor-Gene®, Scorpions® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group). Registrerade namn, varumärken med mera som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

1121934 06-2020 HB-1898-006 © 2020 QIAGEN, med ensamrätt

