

Oktober 2021

Gebruiksaanwijzing *therascreen*[®] FGFR RGQ RT-PCR Kit



Versie 2



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik in combinatie met RNeasy[®] DSP FFPE Kit

Voor gebruik in combinatie met Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex
HRM-instrumenten



876711



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
DUITSLAND



R1 1125704NL



Contents

Beoogd gebruik.....	5
Samenvatting en uitleg van de test.....	6
Uitgangspunt van de procedure	8
Platform en software	13
Meegeleverde materialen	14
Inhoud van de kit	14
Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen	15
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	17
Algemene voorzorgsmaatregelen	19
Opslag en hantering van reagentia	21
Leveringsvoorwaarden	21
Opslagomstandigheden	21
Stabiliteit.....	21
Opslag en verwerking van specimen s	22
FFPE-specimens	22
RNA-monsters	22
Procedure	24
Extractie en voorbereiding van RNA.....	24
Kwantificatie en normalisatie van RNA	25
Omgekeerde transcriptie.....	26
Real-time PCR op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.....	30

Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1 gebruiken	34
Analyse	46
Beperkingen van de procedure.....	49
Gids voor problemen oplossen	52
Kwaliteitscontrole.....	53
Prestatiekenmerken	54
Blancolimiet (Limit of Blank; LoB)	54
Assay-cut-off en kruisreactiviteit	55
Kruisreactiviteit en analytische specificiteit van de assay	56
Detectielimiet (Limit of Detection; LoD)	57
Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid	58
Hantering van specimens	62
Onderlinge uitwisselbaarheid tussen partijen	62
Kruisbesmetting/analytische carry-over	63
Interfererende stoffen	63
Klinische prestaties	64
Correlatie met de referentiemethode	64
Klinische uitkomstgegevens	66
Referenties	70
Symbolen	71
Contactgegevens	73
Bestelgegevens	74
Revisiegeschiedenis van document.....	76

Beoogd gebruik

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is een realtime PCR-test op basis van omgekeerde transcriptie voor de kwalitatieve detectie van tweepunts mutaties in exon 7 [p.R248C (c.742C>T) en p.S249C (c.746C>G)], tweepunts mutaties in exon 10 [p.G370C (c.1108G>T) en p.Y373C (c.1118A>G)] en twee fusies [FGFR3-TACC3v1 en FGFR3-TACC3v3] in het fibroblast-groefactorreceptor 3 (FGFR3)-gen in RNA-monsters afkomstig van in formaline gefixeerd, paraffine ingebed (FFPE) urotheliaal tumorweefsel. De test is bedoeld voor gebruik als hulpmiddel bij het bij patiënten vaststellen van urotheliale kanker (UC) die deze afwijkingen bevat, waardoor deze patiënten in aanmerking komen voor behandeling met BALVERSA™ (erdafitinib).

Specimens worden verwerkt met behulp van de RNeasy DSP FFPE Kit voor handmatige monsterbereiding, gevolgd door omgekeerde transcriptie en vervolgens geautomatiseerde amplificatie en detectie op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.

Samenvatting en uitleg van de test

Fibroblast-groefactorreceptoren (FGFR's) zijn tyrosine-kinasen (transmembrane receptoren) die op veel typen cellen in het lichaam aanwezig zijn. Wanneer FGFR's worden geactiveerd, worden ze gefosforyleerd op specifieke tyrosineresten die de interactie met cytosolische adaptorproteïnen en de RAS-MAPK-, PI3K-AKT-, PLC γ - en STAT-intracellulaire signaleringsroutes ondersteunen. Van deze signaleringsroute is bekend dat deze een belangrijke rol speelt in de beheersing van celgroei, -overleving en -migratie (1) waardoor deze een aantrekkelijk doelwit voor kankertherapieën is.

Activerende afwijkingen van FGFR-genen zijn aangetroffen in een subset van UC-patiënten (2, 3), wat het belang van dit type genetische defect als drijfveer voor tumorontwikkeling en -progressie aantoont.

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is een realtime PCR-test op basis van omgekeerde transcriptie voor de kwalitatieve detectie van tweepunts mutaties in exon 7 [p.R248C (c.742C>T) en p.S249C (c.746C>G)], tweepunts mutaties in exon 10 [p.G370C (c.1108G>T) en p.Y373C (c.1118A>G)] en twee fusies [FGFR3-TACC3v1 en FGFR3-TACC3v3] in het fibroblast-groefactorreceptor 3 (FGFR3)-gen in RNA-monsters afkomstig van in formaline gefixeerd, paraffine ingebed (FFPE) urotheliaal tumorweefsel. De test is bedoeld voor gebruik als hulpmiddel bij het bij patiënten vaststellen van UC die deze afwijkingen bevat, waardoor deze patiënten in aanmerking komen voor behandeling met BALVERSA (erdafitinib).

Specimens worden verwerkt met behulp van de RNeasy DSP FFPE Kit voor handmatige monsterbereiding, gevolgd door omgekeerde transcriptie en vervolgens geautomatiseerde amplificatie en detectie op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is ook ontwikkeld om de FGFR3-fusie FGFR3-BAIAP2L1 en de FGFR2-fusies FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7 te identificeren, omdat patiënten met deze FGFR-fusies in aanmerking kwamen voor het klinisch onderzoek 42756493-BLC2001 naar BALVERSA (erdafitinib). De test is echter niet klinisch gevalideerd om deze drie fusies te detecteren. De veiligheid en werkzaamheid van geneesmiddelen is niet vastgesteld voor gevallen van UC die deze fusies bevat en er kunnen geen conclusies worden getrokken over

het gebruik van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit als hulpmiddel voor het selecteren van dergelijke patiënten voor behandeling met BALVERSA (erdafitinib).

De FGFR-afwijkingsdoelwitten van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit-assays staan gedetailleerd omschreven in tabel 1 en tabel 2.

Tabel 1. Doelwitten voor de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit-assays: Puntmutaties

Gen	Aminozuurvariant	CDS-mutatie	Cosmic ID	Exons
FGFR3	p.R248C	c.742C>T	COSM714	7
FGFR3	p.S249C	c.746C>G	COSM715	7
FGFR3	p.G370C	c.1108G>T	COSM716	10
FGFR3	p.Y373C	c.1118A>G	COSM718	10

Tabel 2. Doelwitten voor de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit-assay: Fusies

Fusie-ID	Betrokken genen	Genomische breekpunten	Exons
FGFR3-TACC3v1	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	TACC3	G chr4:1741428	11
FGFR3-TACC3v3	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	TACC3	G chr4:1739324	10
FGFR3-BAIAP2L1*	FGFR3	chr4:1808661 C	17
	BAIAP2L1	A chr7:97991744	2
FGFR2-BICC1*	FGFR2	chr10:123243211 G	17
	BICC1	A chr10:60461834	3
FGFR2-CASP7*	FGFR2	chr10:123243211 G	17
	CASP7	A chr10:115457252	2

* De test is ontwikkeld om de FGFR3-fusie FGFR3-BAIAP2L1 en de FGFR2-fusies FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7 te identificeren, omdat deze FGFR-fusiepatiënten in aanmerking kwamen voor het onderzoek 42756493-BLC2001 naar BALVERSA (erdafitinib). De QIAGEN-test is echter niet klinisch gevalideerd om deze drie fusies te detecteren.

Uitgangspunt van de procedure

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is gebaseerd op de detectie door middel van selectieve amplificatie van drie FGFR3-afwijkingen in RNA dat is geëxtraheerd uit FFPE UC-specimens met behulp van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System. Allelspecifieke technologie maakt een nauwkeurige en zeer reproduceerbare detectie van doel-FGFR-afwijkingen mogelijk op basis van het gebruik van specifieke forward en reverse primer- en probesets; uitsluitend bij een perfecte overeenkomst tussen de primers en probes met het doel-cDNA is extensie en amplificatie in de PCR-reactie mogelijk. Het rapporteren van resultaten is volledig geautomatiseerd. Indien zowel de runcontroles als de monsterresultaten geldig zijn en er voldoende amplificatie van de assaydoelen plaatsvindt onder de vooraf bepaalde cut-offdrempelwaarde voor het aantal cycli, worden in het rapport de FGFR-afwijkingen vermeld die in elk monster zijn gedetecteerd.

RNA-zuivering

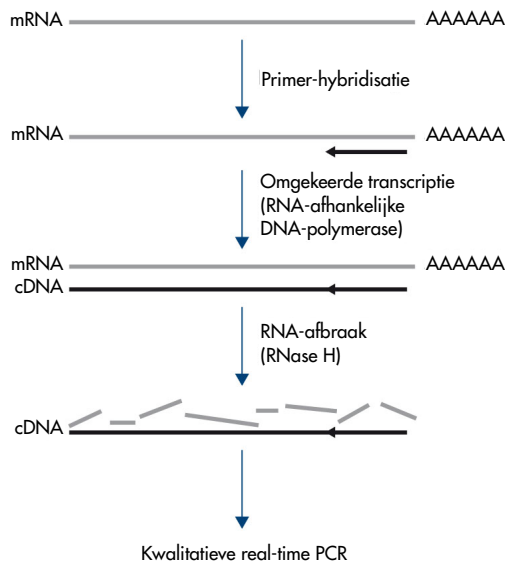
In formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE)-monsters zijn de meest beschikbare vorm van vast tumormateriaal. Hoewel ze stabiel en eenvoudig te transporteren en bewaren zijn, beschadigt het fixeer- en inbedproces de nucleïnezuren en worden deze gemengd met wasachtige koolwaterstofmaterialen. Daarom moeten specialistische zuiveringstechnieken worden gebruikt om geschikte monsters voor in-vitrodiagnostische analyse te verkrijgen. De RNeasy DSP FFPE Kit is specifiek ontwikkeld om met de uitdagingen van RNA-zuivering uit FFPE-materiaal om te gaan en deze moet worden gebruikt om RNA te bereiden dat met behulp van deze kit wordt getest.

Omgekeerde transcriptie

Om de testprocedure uit te voeren, wordt complementair DNA (cDNA) eerst gesynthetiseerd uit monster-RNA met behulp van omgekeerde transcriptase. Dit cDNA treedt vervolgens op als de initiële template in een analytische PCR-reactie.

Omgekeerde transcriptie (reverse transcription, RT) wordt uitgevoerd door gebruik te maken van een mastermix van het enzym van omgekeerde transcriptase, RT-buffers en RT Primer Mix, die alle deel uitmaken van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. De RT-reactie vindt plaats bij 42 °C en wordt vervolgens door incubatie gestopt bij 95 °C.

Omgekeerd transcriptase is een multifunctioneel enzym met drie afzonderlijke enzymatische activiteiten: een RNA-afhankelijke DNA-polymerase, een hybrideafhankelijke exoribonuclease (RNase H) en een DNA-afhankelijke DNA-polymerase. Voor omgekeerde transcriptie in-vitro worden de eerste twee activiteiten gebruikt om enkelstrengs cDNA te produceren. Ten eerste wordt door de activiteit van de RNA-afhankelijke DNA-polymerase (omgekeerde transcriptie) cDNA getranscribeerd uit een RNA-template, zodat er een DNA-RNA-hybride wordt gevormd. Vervolgens breekt de RNase H-exonucleaseactiviteit specifiek alleen de RNA-streng van deze hybriden af (afbeelding 1). Deze activiteit beïnvloedt daarom RNA dat is gehybridiseerd naar cDNA, maar heeft geen invloed op zuiver RNA. Een afzonderlijke stap voor het afbreken van RNA met behulp van het RNase H-enzym hoeft niet noodzakelijk vooraf te gaan aan real-time PCR.



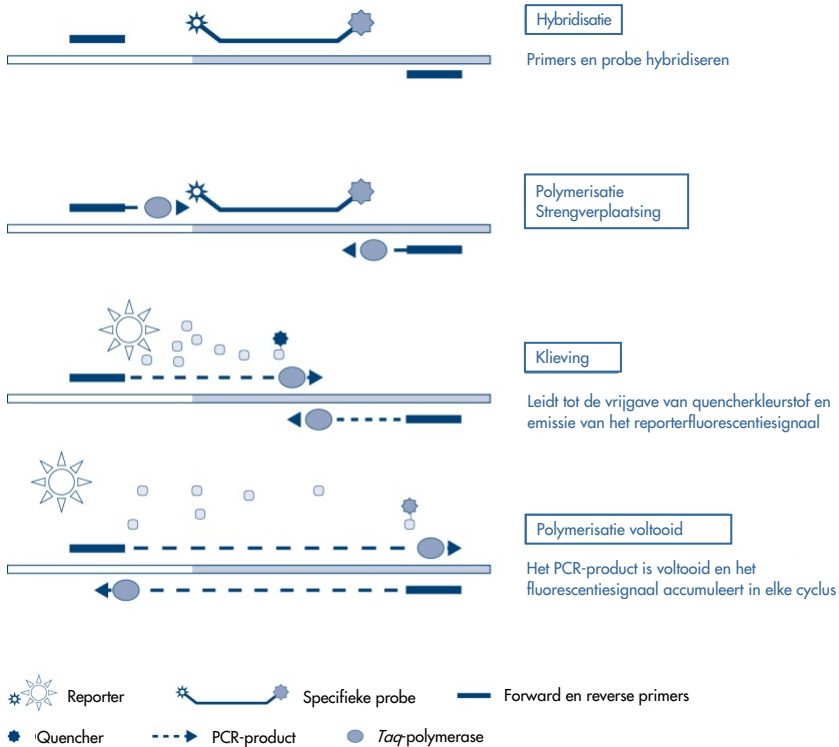
Afbeelding 1. cDNA-synthese. Omgekeerde transcriptie en cDNA-synthese van de eerste streng.

Real-time PCR

Het gebruik van real-time PCR maakt de detectie van reactieproducten mogelijk tijdens de exponentiële fase van het PCR-amplificatieproces in plaats van aan het einde, zoals tevens het geval is bij eindpunt-PCR. Hierdoor wordt de testspecificiteit verbeterd en neemt de benodigde tijd voor het uitvoeren van het testproces af.

De assay maakt gebruik van het hydrolyse-reactie-principe van real-time PCR-oligonucleotiden met TaqMan[®]-probes (4). Er worden drie typen oligonucleotiden gebruikt om elke doel-basesequentie te detecteren; een paar conventionele PCR-primers, die complementair zijn voor sequenties up- en downstream van de doelsequentie en die een PCR-amplicon vormen, en een probemolecuul dat complementair is voor de nauwkeurige doelsequentie en zowel een fluorescentie-reporterkleurstof als een fluorescentie-quencher in directe nabijheid omvat. Het 3'-einde van de probe is een di-deoxybase, om zijn extensie te voorkomen en dus te vermijden dat deze optreedt als een andere PCR-primer in de reactie.

Indien er tijdens PCR een gewenste doelsequentie aanwezig is, zal de oligonucleotide eraan hybridiseren, terwijl de PCR-primers aan hun complementaire sequenties up- en downstream van het probe-bindingsgebied hybridiseren. Tijdens de primer-extensiefase van de reactie, klieft de 5'- tot 3'-exonucleaseactiviteit van *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-polymerase de probe-oligonucleotide, zodat zowel de fluorescentiereporter- als de quencher-moleculen vrijkomen. Naarmate deze van elkaar worden verspreid in de oplossing, neemt de invloed van de quencher op de reporter af, wat tot een toename in de detecteerbare fluorescentie leidt. Dit proces vindt plaats in elke PCR-cyclus en verstoort de exponentiële accumulatie van het product niet (afbeelding 2).



Afbeelding 2. Het TaqMan realtime reactieprincipe.

Een toename van het fluorescentiesignaal wordt alleen gedetecteerd als de doelsequentie, die complementair is met zowel de primers als de probe, aanwezig is in de reactie. Indien de doelsequentie afwezig is, vindt er geen klieving plaats, is er geen verspreiding van fluorescentiereporter van de quencher, en wordt er dus geen toename in fluorescentie waargenomen. Het aantal PCR-cycli dat nodig is om een fluorescentiesignaal boven een vooraf bepaalde drempelwaarde te detecteren, wordt de drempelcyclus (C_T) genoemd. Dit aantal is direct evenredig aan de doelhoeveelheid die aan het begin van de reactie aanwezig is en maakt het mogelijk om een gevoeligheidslimiet in te stellen voor de test.

De PCR-reactiemengsels uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit bevatten HotStarTaq® DNA Polymerase, een gemodificeerde vorm van QIAGEN *Taq* DNA Polymerase. Deze wordt in een inactieve staat geleverd en bevat geen enzymactiviteit bij omgevingstemperatuur. Hierdoor wordt de vorming van verkeerd geprimeerde producten en primer-dimeren voorkomen tijdens de opstelling van de reactie en de eerste denaturatiestap. De competitie voor PCR-artefacten wordt derhalve vermeden, zodat een hoge PCR-specificiteit mogelijk wordt. Het enzym wordt aan het begin van een reactie geactiveerd, in een incubatiestap van 15 minuten bij 95 °C. De hot-start maakt het mogelijk om snel en eenvoudig reacties op te stellen bij kamertemperatuur.

De PCR-reactiemengsels uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit bevatten ook een PCR-buffer, die specifiek is ontwikkeld voor multiplexe, real-time PCR met behulp van sequentiespecifieke probes. Deze buffer bevat een speciaal geoptimaliseerde combinatie van KCl en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, die een hoge verhouding van specifieke naar niet-specifieke primerbinding bevordert tijdens de hybridisatiestap van elke PCR-cyclus. Hierdoor ontstaan strikte omstandigheden voor primerhybridisatie, wat tot een toename in de PCR-specificiteit leidt. Bij gebruik van deze buffer wordt de primerhybridisatie slechts marginaal beïnvloed door de MgCl_2 -concentratie, waardoor optimalisatie bij titratie van Mg^{2+} niet vereist is. De buffer bevat tevens synthetische Factor MP, die multiplexe PCR bevordert. Factor MP verhoogt de plaatselijke concentratie van primers en probes in de cDNA-template en stabiliseert specifiek gebonden primers en probes, zodat efficiënte hybridisatie en extensie mogelijk worden. De combinatie van deze verschillende bestanddelen in de PCR-buffer voorkomen dat de meervoudige amplificatiereacties elkaar verstoren.

Platform en software

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is specifiek ontwikkeld voor gebruik met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument dat in combinatie met het volgende is geïnstalleerd.

- Rotor-Gene AssayManager® versie 2.1
- Gamma Plug-in versie 1.0.0
- *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile versie 1.0.4

Raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene Q MDx* voor meer informatie over het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument moet worden onderhouden aan de hand van de vereisten in de gebruiksaanwijzing.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

<i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit		(24)
Catalogusnr.		876711
Aantal reacties		24
Inhoud	Dopkleur	Volume
RT Buffer 1* (RT-buffer 1)	Wit	200 µl
RT Buffer 2† (RT-buffer 2)	Bruin	100 µl
RT Primer Mix (RT-primermix)	Paars	50 µl
Reverse Transcriptase (Omgekeerde transcriptase)	Blauw	50 µl
Positive control (Positieve controle)	Rood	100 µl
PC Diluent (PC-verdunningsmiddel)	Rood	200 µl
Mutations-1 Reaction Mix‡ (Reactiemengsel voor mutaties-1)	Oranje	720 µl
Mutations-2 Reaction Mix‡ (Reactiemengsel voor mutaties-2)	Paars	720 µl
Fusions-1 Reaction Mix‡ (Reactiemengsel voor fusies-1)	Geel	720 µl
Fusions-2 Reaction Mix‡ (Reactiemengsel voor fusies-2)	Groen	720 µl
Water for Sample Dil. (Water voor verdunning van monsters)	Transparant	1,9 ml
Water for NTC (Water voor NTC)	Transparant	1,9 ml
Gebruiksaanwijzing (handleiding) <i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit	–	1

* Bevat poly(ethyleen-glycol). Zie pagina 17 voor meer informatie.

† Bevat deoxyribonuclease. Zie pagina 17 voor meer informatie.

‡ PCR-reactiemengsel dat alle vereiste bestanddelen bevat, met uitzondering van het te analyseren monster.

Benodigde, maar niet-meegeleverde materialen

Apparatuur, verbruiksartikelen en reagentia voor RNA-zuivering

- RNeasy DSP FFPE Kit (cat.nr. 73604)
- Gekalibreerde, speciale pipetten* (verstelbaar) voor monsterverwerking (20 µl, 200 µl en 1 ml)
- RNase- en nucleasevrije, aerosolbestendige, steriele PCR-pipettips met hydrofobe filters
- Tafelcentrifuge* met rotor voor buisjes van 2 ml
- Vortexmixer*
- 100%-ethanol geschikt voor de moleculaire biologie†
- Wegwerpscalpels
- Gekalibreerd verwarmblok, geschikt voor incubatie tussen 56 °C en 80 °C en schudden bij 1100 tpm

Apparatuur en verbruiksartikelen voor omgekeerde transcriptie en real-time PCR

- Gekalibreerde, speciale pipetten* (verstelbaar) voor monsterbereiding, mastermix-bereiding en afvoer van RNA en cDNA (20 µl, 200 µl en 1 ml)
- RNase- en nucleasevrije, aerosolbestendige, steriele PCR-pipettips met hydrofobe filters
- Nucleasevrije PCR-buisjes met laag bindingsvermogen van 1,5 ml of 2,0 ml
- 0.2 ml PCR Tubes (cat.nr. 981005)
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (cat.nr. 981103 of 981106)

* Zorg ervoor dat instrumenten en apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

- Verwarmblok*, waterbad* of thermocycler* geschikt voor het incuberen dan PCR-buisjes van 0,2 ml bij 42-95 °C
- Koelsysteem* geschikt voor het opslaan van buisjes van 1,5 ml en 2,0 ml bij 0-8 °C
- Tafelcentrifuge* met rotor voor buisjes van 0,2 ml, 1,5ml en 2,0 ml
- Vortexmixer
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR tubes, aluminium blok voor handmatige reactieopstelling (cat.nr. 9018905)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminium blok voor handmatige reactieopstelling (cat.nr. 9018901)
- 72-Well Rotor (cat.nr. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor (cat.nr. 9018904)
- Rotor-Disc® 72 (cat.nr. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (cat.nr. 9018900)
- Rotor Holder (cat.nr. 9018908)
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (cat.nr. 9002032) of Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (cat.nr. 9002033)*†
- Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in versie 1.0.0
- *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile versie 1.0.4

* Zorg ervoor dat instrumenten en apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Indien van toepassing kan in sommige landen het Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument met een productiedatum vanaf mei 2011 worden gebruikt. De productiedatum kan worden achterhaald via het serienummer op de achterkant van het instrument. Het serienummer heeft de vorm 'mmjjnnn', waarbij 'mm' staat voor de cijfers van de productiemaand, 'jj' voor de laatste twee cijfers van het productiejaar en 'nnn' voor de unieke identificatiecode van het instrument.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB's). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

Raadpleeg voor veiligheidsinformatie over het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument de gebruikershandleiding bij het instrument.


Raadpleeg voor veiligheidsinformatie over de RNeasy DSP FFPE Kit (cat.nr. 73604) de *Handleiding van de RNeasy DSP FFPE Kit*.

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit dient te worden gebruikt door daartoe opgeleid personeel in een professionele laboratoriumomgeving.

Voor gebruik in combinatie met het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument

Voor gebruik in combinatie met de RNeasy DSP FFPE Kit.

Het algehele percentage van runcontrolefouten (PC en NTC) dat werd waargenomen bij gebruik van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is circa 5,2% (1% voor de PC en 4,2% voor NTC). In het geval dat een ongeldig runresultaat wordt verkregen, moeten de monstertests worden herhaald, zoals beschreven in de Gids voor problemen oplossen, op pagina 52, met behulp van beschikbaar monster-RNA. Indien er onvoldoende RNA beschikbaar is voor het opnieuw testen met de oorspronkelijke FFPE-extractie, is een nieuwe extractie van FFPE-materiaal vereist.

<p>VOORZICHTIG</p> 	<p>Voeg GEEN bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.</p>
---	--

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de onderdelen van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.

RT Buffer 1



Bevat: poly(ethyleen-glycol). Waarschuwing! Kan irritatie aan de luchtwegen veroorzaken. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming.

RT Buffer 2



Bevat: deoxyribonuclease. Gevaar! Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Vermijd het inademen van stof/rook/gas/damp/nevel/spray. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gezichtsbescherming. Draag ademhalingsbescherming. Bij blootstelling of zorgen: Schakel hulp van een GIFICENTRUM of arts in. Breng de persoon in de frisse lucht, in een houding die het ademen vergemakkelijkt.

Algemene voorzorgsmaatregelen

Besteed altijd aandacht aan het volgende.

Voor het functioneren van RT-PCR-tests zijn goede laboratoriumtechnieken vereist, waaronder onderhoud van de apparatuur, die geschikt zijn voor moleculaire biologie en die voldoen aan de geldende regelgeving en relevante normen.

- Deze test is uitsluitend bedoeld voor klinische FFPE UC-specimens.
- Alle chemische en biologische materialen zijn potentieel gevaarlijk en moeten als zodanig worden beschouwd. FFPE-specimenmateriaal en nucleïnezuren die hieruit worden bereid, leveren zeer waarschijnlijk geen infectiegevaar op, maar lokale institutionele gezondheids- en veiligheidsprocedures moeten altijd worden nageleefd.
- Gooi afval van het monster en de assay weg conform uw lokale veiligheidsprocedures.
- Reagentia die zijn meegeleverd in de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit zijn optimaal verdund. Verdun reagentia niet verder, omdat dit tot prestatieverlies kan leiden.
- Gebruik geen reactievolumes (reactiemengsel plus monster) van onder de 25 µl.
- De reagentia in de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit zijn uitsluitend bestemd voor gebruik met andere reagentia uit dezelfde kit. Vervang meegeleverde reagentia niet door dezelfde reagentia uit een andere productiepartij van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, aangezien dit de prestaties kan beïnvloeden.
- Raadpleeg de gebruikershandleidingen van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument voor aanvullende waarschuwingen, voorzorgsmaatregelen en procedures.
- Het hanteren van andere incubatietijden of temperaturen kan leiden tot foutieve of strijdige gegevens.
- Gebruik geen componenten waarvan de uiterste gebruiksdatum is verstreken of die onjuist zijn opgeslagen.

- Reactiemengsels kunnen afbreken als ze worden blootgesteld aan licht.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door achtergebleven RNA, cDNA of PCR-product, die kan leiden tot een fout-positief signaal.
- Wees uiterst voorzichtig ter voorkoming van contaminatie door RNase, die kan leiden tot afbraak van het template-RNA en testfouten.
- Gebruik afzonderlijke, speciale pipetten om reactiemengsels te maken en templates toe te voegen.
- Open het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument niet totdat de run is voltooid.
- Open Rotor-Gene Q-buisjes niet nadat de real-time PCR-run is voltooid.
- Let goed op dat de monsters op de juiste manier worden getest, met bijzondere nadruk op het voorkomen van verkeerde plaatsing van monsters, laadfouten en pipetteerfouten.
- Verwerk de monsters systematisch en label ze duidelijk, zodat ze gedurende het hele proces kunnen worden geïdentificeerd en traceerbaar zijn.

We raden aan om de volgende voorzorgsmaatregelen te treffen:

- Gebruik nucleasevrije laboratoriumbenodigdheden (zoals pipetten, pipettips, reactieflacons) en draag handschoenen wanneer u de assay uitvoert.
- Gebruik bij alle stappen van het pipetteren ongebruikte aerosolresistente pipettips ter voorkoming van kruisbesmetting van de monsters en reagentia.
- Hanteer de RT- en PCR-reagentia met speciaal daarvoor bestemde laboratoriumbenodigdheden (pipetten, tips, etc.) in een speciaal daarvoor bestemde ruimte waar geen RNA- of DNA-matrixen (RNA, DNA, cDNA, plasmiden of PCR-producten) kunnen worden geïntroduceerd. Voeg monsters die geanalyseerd moeten worden in een afgezonderd gebied toe (bij voorkeur in een afzonderlijke ruimte of een bereidingskast voor PCR-monsters) met speciaal hiervoor bestemde apparatuur (pipetten, tips, etc.).

Opslag en hantering van reagentia

Leveringsvoorwaarden

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit wordt op droogijs verzonden en moet bij aankomst nog steeds bevroren zijn. Als een component van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit bij aankomst niet bevroren is, als de buitenverpakking tijdens het vervoer open is geraakt of als de verzending geen pakbon, gebruiksaanwijzing of reagentia bevat, neemt u contact op met een van de afdelingen voor technische diensten van QIAGEN of met de lokale distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Opslagomstandigheden

Na ontvangst moet de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit onmiddellijk worden opgeslagen tussen -30 en -15 °C in een vriezer met constante temperatuur en worden beschermd tegen licht, met uitzondering van het PC-verdunningsmiddel, dat uit de kitverpakking moet worden verwijderd en onmiddellijk tussen -90 en -65 °C moet worden opgeslagen tot de vermelde uiterste gebruiksdatum.

Raadpleeg voor opslaginformatie over de RNeasy DSP FFPE Kit (cat.nr. 73604) de *Handleiding voor RNeasy DSP FFPE-kit*.

Stabiliteit

Reagentia kunnen in hun oorspronkelijke verpakking tussen -30 en -15 °C worden bewaard (met uitzondering van het PC-verdunningsmiddel, dat altijd moet worden bewaard tussen -90 en -65 °C) tot de vermelde uiterste gebruiksdatum. Houd een maximum van vijf cycli van invriezen en ontdooien aan.

Reagentia uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit moeten gedurende minimaal 30 minuten en maximaal 3 uur worden ontdooid. Zodra de reagentia gereed zijn voor gebruik, kunnen de RT- of PCR-reacties worden opgesteld. De totale opsteluur voorafgaand aan de RT- of PCR-run mag niet langer zijn dan 4 uur.

Opslag en verwerking van specimens

FFPE-specimens

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is bedoeld voor gebruik met RNA-monsters, geëxtraheerd van FFPE UC-specimens met behulp van de RNeasy DSP FFPE Kit.

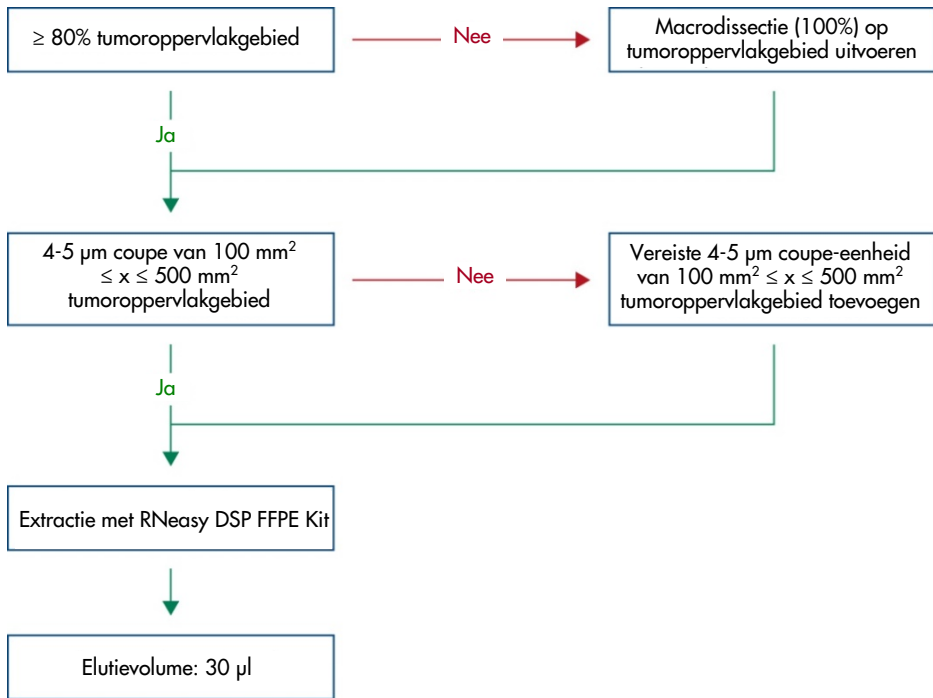
RNA-monsters

Zodra ze zijn geëxtraheerd, moeten RNA-monsters ofwel onmiddellijk worden getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit of tussen -90 en -65 °C worden opgeslagen. Overschrijd het maximum van vijf vries-dooicycli niet.

Preparatie van weefselmonsters voor RNA-extractie:

- Snij met behulp van een microtoom seriecoupes van 4-5 µm van het FFPE-monsterblok en plaats deze op objectglasjes.
- Een daartoe opgeleide persoon (bijvoorbeeld een patholoog) moet een met hematoxilyne en eosine (H&E) gekleurde coupe beoordelen om te bevestigen dat er tumorweefsel aanwezig is en moet de grenzen ervan markeren. Er is een objectglasje naast de te extraheren coupe vereist om het gebied van het tumoroppervlak te identificeren en ondersteuning te bieden bij de macrodissectie, indien vereist.
- De met H&E gekleurde coupes mogen niet worden gebruikt voor RNA-extractie.
- Bewaar alle FFPE-blokken en objectglazen bij kamertemperatuur (15-25 °C).

De vereiste FFPE-invoer is equivalent aan een objectglasje met een dikte van 4-5 µm met een totaal tumoroppervlakgebied tussen 100 mm² en 500 mm² (inclusief). Dit kan worden bewerkstelligd door het materiaal van meerdere objectglasjes te combineren (afbeelding 3).



Afbeelding 3. Zuiveringsworkflow van klinische FFPE UC-monsters voor gebruik met het *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR System.

- Macrodissectie moet worden uitgevoerd om een tumoroppervlakgebied van minimaal 80% te bereiken. Indien het tumoroppervlakgebied onder 100 mm² ligt en/of het tumoroppervlakgebied lager is dan 80%, moeten aanvullende coupes worden gebruikt om aan de minimale monstervereisten te voldoen.

Opmerking: Wees voorzichtig en aandachtig wanneer u scalpels hanteert, en zorg dat het blad van de scalpel te allen tijde van het lichaam weg is gericht.

Procedure

Extractie en voorbereiding van RNA

RNA moet worden gezuiverd met behulp van de RNeasy DSP FFPE Kit (cat.nr. 73604).

Zorg ervoor dat de vervaldatum van de reagentia niet is verstreken en dat deze zijn vervoerd en bewaard onder de juiste condities.

Opmerking: De prestaties van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit zijn uitsluitend in combinatie met de RNeasy DSP FFPE Kit (cat.nr. 73604) gevalideerd. Gebruik geen ander RNA-zuiveringsproduct.

Wat u moet weten voordat u begint

- Indien de RNeasy DSP FFPE Kit voor het eerst wordt gebruikt, dient u de 'Belangrijke opmerkingen' in de *Handleiding van de RNeasy DSP FFPE Kit* te lezen.
- Indien u voor het eerst met RNA werkt, dient u de 'Bijlage: algemene opmerkingen voor het hanteren van RNA' in de *Handleiding van de RNeasy DSP FFPE Kit* te lezen.
- Buffer RBC bevat een guanidinezout en mag daarom niet worden samengevoegd met desinfectiereagentia die bleek bevatten. Raadpleeg de *Handleiding van de RNeasy DSP FFPE Kit* voor veiligheidsinformatie.
- Tenzij anders vermeld, voert u alle proceduredstappen uit bij kamertemperatuur (15-25 °C). Tijdens de procedure, dient u snel te werken en mag u niet tussen stappen in stoppen.
- Voer alle centrifugestappen uit met behulp van een centrifuge bij 15-25 °C. Indien u een gekoelde microcentrifuge gebruikt, stelt u het instrument op kamertemperatuur in, anders kan significante koeling onder 15 °C plaatsvinden.
- Indien u Buffer RPE en RNase-vrije DNase I voor het eerst gebruikt, dient u ze te reconstitueren zoals beschreven in de *Handleiding van de RNeasy DSP FFPE Kit*.

- Equilibreer alle buffers op kamertemperatuur (15-25 °C). Meng de gereconstitueerde Buffer RPE door deze te schudden.
- Stel een verwarmblok met schudfunctie in op 56 °C voor gebruik in stap 5 en 9. Om de wachttijd te verminderen, stelt u een tweede verwarmblok met schudfunctie in op 80 °C voor gebruik in stap 9.

Opmerking: Stop de zuiveringsprocedure niet tussen incubaties in, aangezien langere incubatietijden tot verlies of afbraak van RNA kunnen leiden.

Procedure

- Volg de RNA-zuiveringsprocedure zoals beschreven in de *Handleiding van de Rneasy DSP FFPE Kit*. In het protocol 'Zuivering van totaal RNA uit FFPE-weefselcoupes', dient u ervoor te zorgen dat de volumes die voor verwerking worden gebruikt > 3-4 coupes (gemarkeerd met ●) worden opgevolgd.
- Elueer RNA in 30 µl RNase-vrij water dat bij de RNeasy DSP FFPE Kit wordt meegeleverd.
- Aliquoteer 3 µl geëluëerd RNA voor kwantificatie.
- Bewaar RNA-eluatens tussen -90 en -65 °C.

Kwantificatie en normalisatie van RNA

Procedure

- Leeg de spectrofotometer met het RNase-vrije water dat in de RNeasy DSP FFPE Kit is meegeleverd en werd gebruikt om RNA te elueren.
- De RNA-kwantiteit wordt bepaald door de optische dichtheid te meten bij 260 nm.
- Totale hoeveelheid gezuiverd RNA = concentratie x volume van het monster in µl.
- Indien de RNA-concentratie onder 16,67 ng/µl ligt, mag het monster niet verder worden verwerkt. Een verse RNA-extractie van een nieuw FFPE-specimen moet worden gebruikt voor verdere analyse.

- RNA moet verdund zijn naar 16,67 ng/μl met behulp van het water voor monsterverdunding dat in de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is meegeleverd.
- De omgekeerde transcriptiereactie is geoptimaliseerd voor 250 ng gezuiverd RNA, verdund in een uiteindelijk volume van 15 μl ($15 \mu\text{l} \times 16,67 \text{ ng}/\mu\text{l} = 250 \text{ ng RNA-invoer}$).

Omgekeerde transcriptie

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit biedt hoge cDNA-opbrengsten voor de gevoelige detectie van alle doel-transcripten, zelfs degene die aanwezig zijn bij een lage hoeveelheid. Bij omgekeerde transcriptie wordt gebruikgemaakt van een RNA-template en een mengsel van primers die complementair zijn aan het 3'- en 5'-uiteinde van het RNA om cDNA te produceren. Het omgekeerde transcriptase (RT)-enzym synthetiseert het cDNA van de eerste streng, die vervolgens wordt gebruikt als invoer voor de PCR-reactie uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.

Wat u moet weten voordat u begint

- Stel alle reacties op bij 0-8 °C om het risico op RNA-afbraak te minimaliseren.
- RNase-remmer en dNTP's zijn al opgenomen in de bestanddelen van de kit. Voeg geen aanvullende RNase-remmer en dNTP's toe.
- RT Primer Mix (meegeleverd) moet worden gebruikt. RT Primer Mix is geoptimaliseerd om hoge cDNA-opbrengsten op te leveren voor alle regio's RNA-transcripten.
- Afzonderlijke stappen voor denaturatie en hybridisatie zijn niet noodzakelijk voordat de omgekeerde transcriptiereactie van start gaat.
- Na omgekeerde transcriptie moet de reactie worden gestopt door middel van incubatie bij 95 °C gedurende 3 minuten om de omgekeerde transcriptase te deactiveren.

Procedure

1. Plaats een laadblok dat geschikt is voor 96 PCR-buisjes van 0,2 ml en een koelblok dat 12 of meer buisjes van 2 ml kan bevatten bij 0-8 °C gedurende minimaal 60 minuten voorafgaand aan de reactieopstelling.
2. Ontdooi RT-buffer 1, RT-buffer 2, omgekeerde transcriptase, RT Primer Mix en water voor NTC die met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit zijn meegeleverd bij kamertemperatuur gedurende tussen 30 minuten en 3 uur voorafgaand aan het starten van de RT-reactieopstelling.
3. Ontdooi de testmonsters, PC en het PC-verdunningsmiddel bij 0-8 °C gedurende tussen 30 minuten en 3 uur voorafgaand aan het starten van de RT-reactieopstelling.
4. Controleer alle RT-reagentia zorgvuldig om er zeker van te zijn dat ze volledig zijn ontdooid en zijn opgelost in de oplossing. Los eventuele precipitaten op in RT-buffer 2 door te vortexen. Incubeer de buffer, indien nodig, kort bij 37 °C tot het precipitaat is opgelost.
5. Puls-vortex alle RT-reagentia driemaal gedurende elke keer 3 seconden om te garanderen dat alle reagentia goed gemengd zijn.
6. Centrifugeer alle RT-reagentia kort om resterende vloeistoffen van de deksels en zijkanen van de buisjes te verzamelen.
7. Bereid voldoende mastermix voor omgekeerde transcriptie voor het aantal monsters dat moet worden getest, plus twee voor de runcontroles, positieve controle (PC) en controle zonder template (No Template Control, NTC). De mastermix voor omgekeerde transcriptie moet bereid worden bij 0-8 °C, in overeenstemming met tabel 3.

Opmerking: Bereid voldoende mastermix voor 2 aanvullende reacties ($n + 2$) indien $u \leq 16$ monsters gebruikt en vier aanvullende reacties ($n + 4$) indien $u > 16$ monsters gebruikt, zodat er voldoende aanvullend volume voor de RT-opstelling beschikbaar is.

Opmerking: RT-buffer 1 en omgekeerde transcriptase zijn viskeuze bestanddelen. U wordt daarom aangeraden om ze langzaam te pipetteren.

Tabel 3. Reactiemengsel voor omgekeerde transcriptie

Bestanddeel	Volume per RT-reactie
RT Buffer 1 *	5 µl
RT Buffer 2	2,5 µl
RT Primer Mix (RT-primermix)	1,25 µl
Reverse Transcriptase [†] (Omgekeerde transcriptase)	1,25 µl
Totaal volume van mastermix	10 µl

* Omvat Mg²⁺ en dNTPs.

† Bevat tevens RNase-remmer.

8. Puls-vortex het RT-reactiemengsel driemaal gedurende elke keer 3 seconden om te garanderen dat elk reagens goed gemengd is.
9. Centrifugeer het RT-reactiemengsel kort om resterende vloeistoffen van het deksel en de zijkanten van het buisje te verzamelen.
10. Bewaar het RT-reactiemengsel in het koelblok.
11. Vul het laadblok met het vereiste aantal PCR-buisjes van 0,2 ml.
12. Aliquoteer 10 µl van het RT-reactiemengsel in elk buisje van 0,2 ml.
13. Puls-vortex het water voor NTC, het PC-verdunningsmiddel en de PC die met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit zijn meegeleverd en genormaliseerde RNA-monsters driemaal gedurende elke keer 3 seconden om te zorgen dat ze allemaal grondig gemengd zijn.
14. Centrifugeer het water voor NTC, het PC-verdunningsmiddel, de PC en genormaliseerde RNA-monsters kort om resterende vloeistoffen van de deksels en zijkanten van de buisjes te verzamelen.
15. Voeg de monsters aan elk buisje met mastermix voor omgekeerde transcriptie toe, in overeenstemming met tabel 4. Pipetteer elk monster rechtstreeks in het RT-reactiemengsel van het buisje. Voor het PC-monster pipetteert u eerst de PC, gevolgd door het PC-verdunningsmiddel. Nadat elk monster is toegevoegd, stelt u de pipet in op 15 µl, pipetteert u 5-10 maal omhoog en omlaag om te mengen en plaatst u onmiddellijk doppen op de buisjes.

Opmerking: Het RT-reactiemengsel en monster (PC-, NTC- of testmonster) moet grondig worden gemengd om de RT-reactie efficiënt te laten verlopen.

Tabel 4. Monster toegevoegd aan elk reactiemengsel voor omgekeerde transcriptie

Naam van het monster	Monstertype	Volume
Controle zonder template	Water for NTC (Water voor NTC)	15 µl
Testmonster	Monster	15 µl
Positieve controle	Positieve controle (PC)	5 µl
	PC-verdunningsmiddel	10 µl

16. Puls-vortex alle buisjes gedurende 3 seconden om te garanderen dat de RT-reagentia en template gemengd zijn.
17. Zorg dat alle bellen zijn verwijderd en dat de RT-reagentia en template onderin het buisje liggen.
18. Laat de buisjes gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur achter in het laadblok.
19. Incubeer de monsters in een verwarmblok, waterbad of thermocycler gedurende 30 minuten bij 42 °C voor een omgekeerde transcriptie van het RNA.
20. Incubeer de monsters in een verwarmblok, waterbad of thermocycler gedurende 3 minuten bij 95 °C voor het deactiveren van het omgekeerde transcriptase-enzym.
21. Bewaar de cDNA-monsters tot ze worden gebruikt als invoer tijdens de PCR-stap. Voor bewaring op korte termijn kunnen monsters bij 2-8 °C worden bewaard gedurende maximaal 5 dagen of bij -30 tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen.

Real-time PCR op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit biedt nauwkeurige real-time PCR-detectie van de gespecificeerde FGFR-afwijkingen in een multiplexe indeling. De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit bevat vier PCR-reactiemengsels die in een gebruiksklare indeling worden meegeleverd, met inbegrip van HotStarTaq DNA Polymerase en PCR Buffer.

Wat u moet weten voordat u begint

- De PCR moet met een initiële incubatiestap van 15 minuten bij 95 °C starten om de HotStarTaq DNA Polymerase te activeren.

Procedure

1. Houd een laadblok bij de hand dat geschikt is voor 72 buisjes van 0,1 ml bij 0-8 °C gedurende minimaal 60 minuten voorafgaand aan de reactieopstelling.
2. Ontdooi PCR-reactiemengsels uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit bij kamertemperatuur tussen 30 minuten en 3 uur voorafgaand aan de PCR-reactieopstelling.
3. Puls-vortex alle PCR-reactiemengsels driemaal gedurende elke keer 3 seconden om te garanderen dat ze allemaal goed gemengd zijn.
4. Centrifugeer alle PCR-reactiemengsels kort om resterende vloeistoffen van de deksels en zijkanten van de buisjes te verzamelen.
5. Vul het laadblok met het vereiste aantal PCR-stripbuisjes van 0,1 ml.
6. Dien 20 µl PCR-reactiemengsel toe aan de PCR-stripbuisjes van 0,1 ml, in overeenstemming met het pipetteerschema in afbeelding 4.

Plaat met 72 putjes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Buisje 1 Mut-1	Buisje 9 Mut-1	Buisje 17 Mut-1	Buisje 25 Mut-1	Buisje 33 Mut-1	Buisje 41 Mut-1	Buisje 49 Mut-1	Buisje 57 Mut-1	Buisje 65 Mut-1
B	Buisje 2 Mut-2	Buisje 10 Mut-2	Buisje 18 Mut-2	Buisje 26 Mut-2	Buisje 34 Mut-2	Buisje 42 Mut-2	Buisje 50 Mut-2	Buisje 58 Mut-2	Buisje 66 Mut-2
C	Buisje 3 Fus-1	Buisje 11 Fus-1	Buisje 19 Fus-1	Buisje 27 Fus-1	Buisje 35 Fus-1	Buisje 43 Fus-1	Buisje 51 Fus-1	Buisje 59 Fus-1	Buisje 67 Fus-1
D	Buisje 4 Fus-2	Buisje 12 Fus-2	Buisje 20 Fus-2	Buisje 28 Fus-2	Buisje 36 Fus-2	Buisje 44 Fus-2	Buisje 52 Fus-2	Buisje 60 Fus-2	Buisje 68 Fus-2
E	Buisje 5 Mut-1	Buisje 13 Mut-1	Buisje 21 Mut-1	Buisje 29 Mut-1	Buisje 37 Mut-1	Buisje 45 Mut-1	Buisje 53 Mut-1	Buisje 61 Mut-1	Buisje 69 Mut-1
F	Buisje 6 Mut-2	Buisje 14 Mut-2	Buisje 22 Mut-2	Buisje 30 Mut-2	Buisje 38 Mut-2	Buisje 46 Mut-2	Buisje 54 Mut-2	Buisje 62 Mut-2	Buisje 70 Mut-2
G	Buisje 7 Fus-1	Buisje 15 Fus-1	Buisje 23 Fus-1	Buisje 31 Fus-1	Buisje 39 Fus-1	Buisje 47 Fus-1	Buisje 55 Fus-1	Buisje 63 Fus-1	Buisje 71 Fus-1
H	Buisje 8 Fus-2	Buisje 16 Fus-2	Buisje 24 Fus-2	Buisje 32 Fus-2	Buisje 40 Fus-2	Buisje 48 Fus-2	Buisje 56 Fus-2	Buisje 64 Fus-2	Buisje 72 Fus-2

Afbeelding 4. Pipetteerschema van PCR-reactiemengsel. Rij A en E (oranje): Reactiemengsel voor mutatie-1. Rij B en F (paars): Reactiemengsel voor mutatie-2, Rij C en G (geel): Reactiemengsel voor fusie-1. Rij D en H (groen): Reactiemengsel voor fusie-2. De kleuren komen overeen met de doppen van de PCR-buisjes in de kit.

- Vortex de cDNA-monsters gedurende 3 seconden. Centrifugeer ze vervolgens kort om de druppels van de deksels en zijkanten van de buisjes op te vangen.
- Voeg 5 µl NTC, testmonster of PC toe aan de PCR-stribbuisjes van 0,1 ml vanuit de omgekeerde transcriptiereactie, in overeenstemming met het pipetteerschema in afbeelding 5. Stel de pipet in op 5 µl en pipetteer elk monster 5-10 maal omhoog en omlaag om te mengen; plaats onmiddellijk doppen op de buisjes.

Opmerking: Indien mogelijk moet de toevoeging van PC-cDNA-template aan de buisjes in een andere ruimte of ander laboratorium plaatsvinden, op afstand van de ruimte of het laboratorium die/dat werd gebruikt om de NTC en het monster-cDNA toe te voegen. Hierdoor kan het risico op contaminatie van het monster worden geminimaliseerd.

Plaat met 72 putjes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Buisje 1 PC	Buisje 9 Monster 1	Buisje 17 Monster 3	Buisje 25 Monster 5	Buisje 33 Monster 7	Buisje 41 Monster 9	Buisje 49 Monster 11	Buisje 57 Monster 13	Buisje 65 Monster 15
B	Buisje 2 PC	Buisje 10 Monster 1	Buisje 18 Monster 3	Buisje 26 Monster 5	Buisje 34 Monster 7	Buisje 42 Monster 9	Buisje 50 Monster 11	Buisje 58 Monster 13	Buisje 66 Monster 15
C	Buisje 3 PC	Buisje 11 Monster 1	Buisje 19 Monster 3	Buisje 27 Monster 5	Buisje 35 Monster 7	Buisje 43 Monster 9	Buisje 51 Monster 11	Buisje 59 Monster 13	Buisje 67 Monster 15
D	Buisje 4 PC	Buisje 12 Monster 1	Buisje 20 Monster 3	Buisje 28 Monster 5	Buisje 36 Monster 7	Buisje 44 Monster 9	Buisje 52 Monster 11	Buisje 60 Monster 13	Buisje 68 Monster 15
E	Buisje 5 NTC	Buisje 13 Monster 2	Buisje 21 Monster 4	Buisje 29 Monster 6	Buisje 37 Monster 8	Buisje 45 Monster 10	Buisje 53 Monster 12	Buisje 61 Monster 14	Buisje 69 Monster 16
F	Buisje 6 NTC	Buisje 14 Monster 2	Buisje 22 Monster 4	Buisje 30 Monster 6	Buisje 38 Monster 8	Buisje 46 Monster 10	Buisje 54 Monster 12	Buisje 62 Monster 14	Buisje 70 Monster 16
G	Buisje 7 NTC	Buisje 15 Monster 2	Buisje 23 Monster 4	Buisje 31 Monster 6	Buisje 39 Monster 8	Buisje 47 Monster 10	Buisje 55 Monster 12	Buisje 63 Monster 14	Buisje 71 Monster 16
H	Buisje 8 NTC	Buisje 16 Monster 2	Buisje 24 Monster 4	Buisje 32 Monster 6	Buisje 40 Monster 8	Buisje 48 Monster 10	Buisje 56 Monster 12	Buisje 64 Monster 14	Buisje 72 Monster 16

Afbeelding 5. Pipetteerschema van monsters die zijn getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.

De kleuren komen overeen met de doppen van de PCR-buisjes in de kit.

9. Zorg dat het PCR-reactiemengsel is verzameld op de bodem van de PCR-stripsbuisjes van 0,1 ml.
10. Open de *therascreen* FGFR FFPE Assay Profile versie 1.0.4 in de Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1. Zie tabel 5 voor de cyclusvoorwaarden.
11. Plaats alle vier de PCR-stripsbuisjes in de rotor met 72 putjes. Let extra goed op of de buisjes zijn overgebracht naar de juiste posities in de rotor met 72 putjes (buisjespositie in rotor met 72 putjes moet gelijk zijn aan de buisjespositie in het laadblok).

Opmerking: Zet een leeg buisje met dop in elke ongebruikte plek. Op deze manier blijft de thermische efficiëntie van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument behouden.

12. Plaats de rotor met 72 putjes meteen in het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Zorg ervoor dat de borging (meegeleverd bij het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument) op de rotor is geplaatst zodat de buisjes gedurende de run op hun plaats worden gehouden.
13. Om de real-time PCR-run te starten, volgt u de instructies in 'Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1 gebruiken' op pagina 34.

Opmerking: De cyclusvoorwaarden van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument voor gebruik met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit staan vermeld in tabel 5.


Tabel 5. Cyclusvoorwaarden

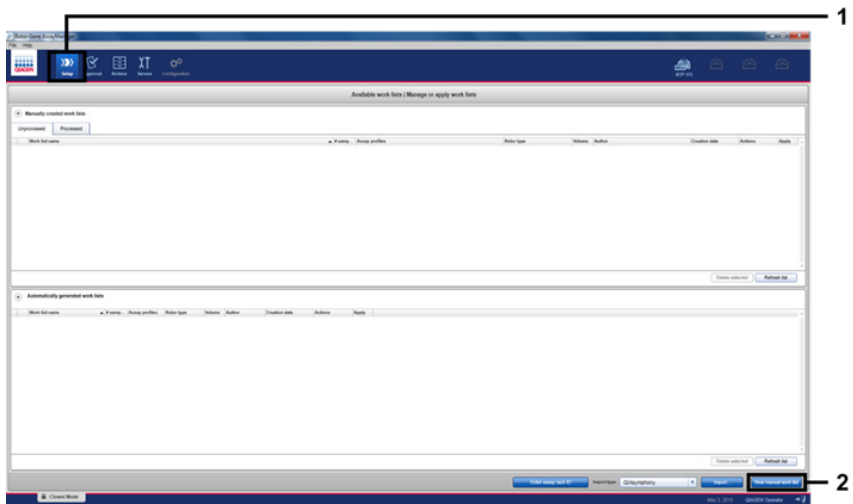
Stap	Tijd	Temperatuur	Aanvullende opmerkingen
Initiële PCR-activatiestap	15 min	95 °C	Door deze verhittingsstap wordt HotStarTaq DNA Polymerase geactiveerd.
2-stapscyclus*:			
Denaturatie	60 sec	94 °C	Gecombineerde stap van hybridisatie/extensie met verzameling van fluorescentiegegevens.
Hybridisatie/extensie	90 sec	60 °C	
Aantal cycli	45		

* Optimale prestaties worden alleen onder deze cyclusvoorwaarden gegarandeerd.

Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1 gebruiken

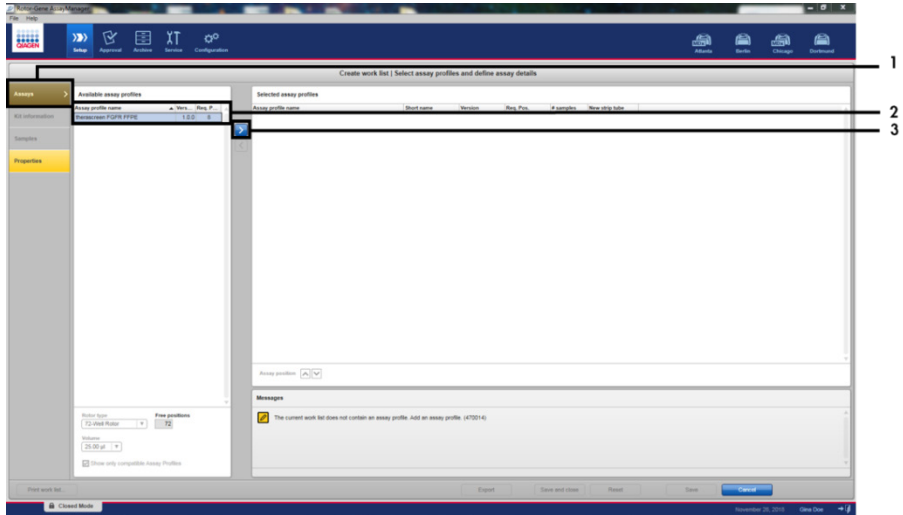
Procedure

1. Dubbelklik op het pictogram van de Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1 op het bureaublad van de laptop die is aangesloten op het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. 
2. Standaard verschijnt de omgeving 'Setup' (Instelling). Klik op 'New manual work list' (Nieuwe handmatige werklĳst) om een nieuwe werklĳst aan te maken (afbeelding 6).



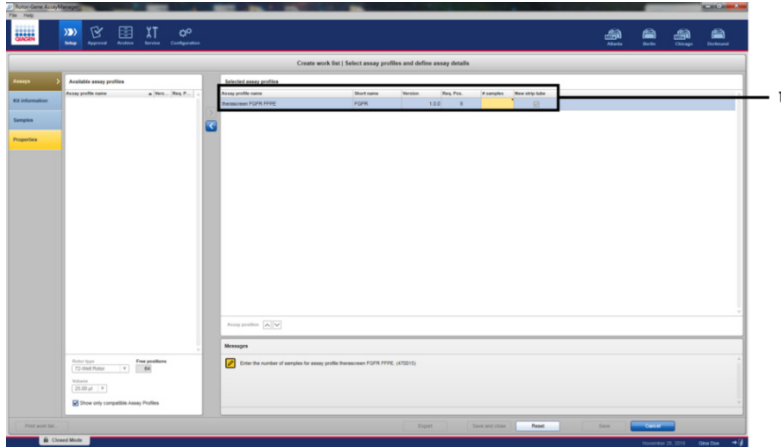
Afbeelding 6. Nieuwe handmatige werklĳst instellen. 1 = omgeving 'Setup' (Instelling) selecteren, 2 = 'New manual work list' (Nieuwe handmatige werklĳst).

Selecteer het tabblad 'Assays' aan de linkerkant van het hoofdvenster. Selecteer '*therascreen* FGFR FFPE Assay Profile' uit de lijst met beschikbare assayprofielen en klik op de blauwe pijl om het assayprofiel te selecteren. Indien de naam van het assayprofiel is ingekort, plaatst u de muisaanwijzer op het assayprofiel om de volledige naam te bekijken (afbeelding 7).



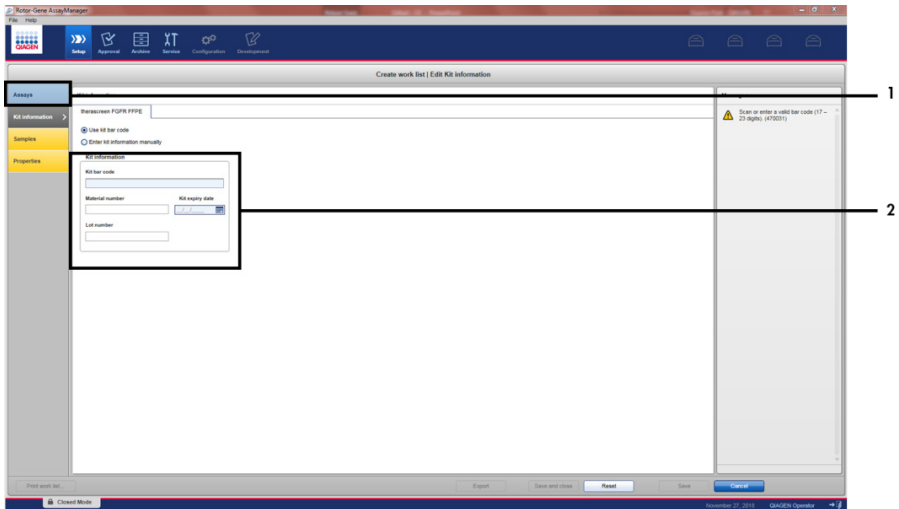
Afbeelding 7. Nieuwe handmatige werklĳst instellen; profielnaam voor assay kiezen. 1 = tabblad 'Assays', 2 = '*therascreen*_FGFR_FFPE' uit de beschikbare assayprofielen selecteren, 3 = op de pijl klikken.

3. Voer in het venster 'Selected assay profiles' (Geselecteerde assayprofielen) het aantal testmonsters in dat moet worden getest, uitgezonderd het aantal runcontroles (afbeelding 8).



Afbeelding 8. Hoofdvenster voor maken van werkljst. 1 = het aantal monsters toevoegen aan de 'Assay profile name' (Profielnaam voor assay).

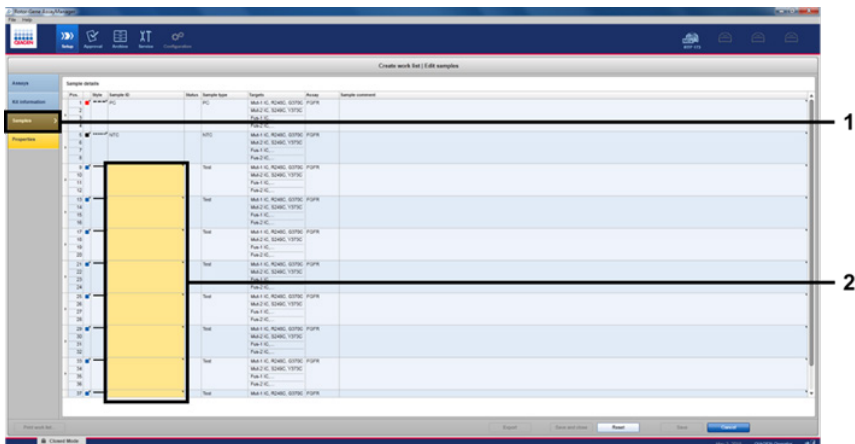
4. Klik op het tabblad 'Kit information' (Informatie over de kit). Selecteer 'Enter kit information manually' (Informatie over kit handmatig invoeren) en voer de informatie over de kit in (afbeelding 9):



Afbeelding 9. Hoofdvenster voor maken van werkljst. 1 = tabblad 'Kit information' (Informatie over de kit), 2 = informatie over de kit invoeren.

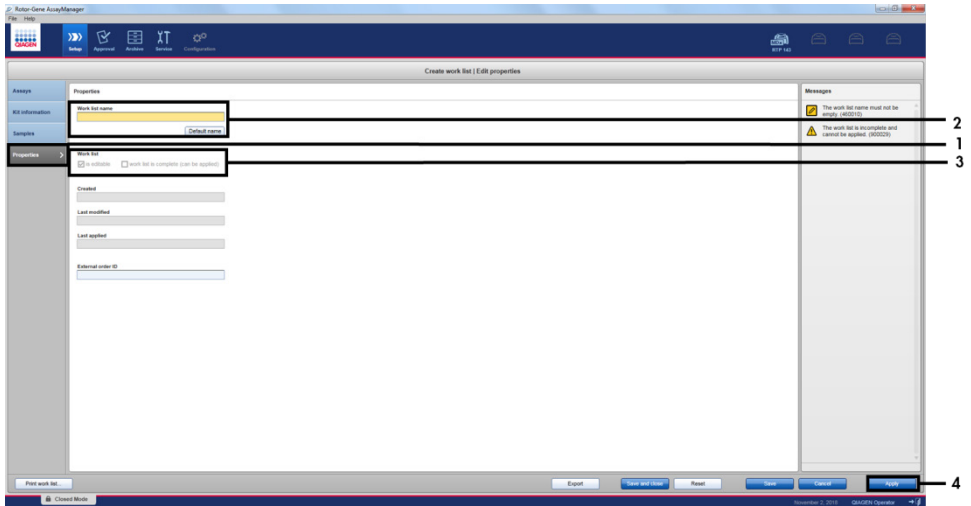
5. Klik op het tabblad 'Samples' (Monsters) om informatie over de monsters in te voeren. Voer de monsternamen handmatig in (afbeelding 10).

Belangrijk: Controleer of de juiste monsternamen zijn ingevoerd indien u een werkljst gebruikt die voor een eerdere run van de Rotor-Gene AssayManager is gegenereerd.

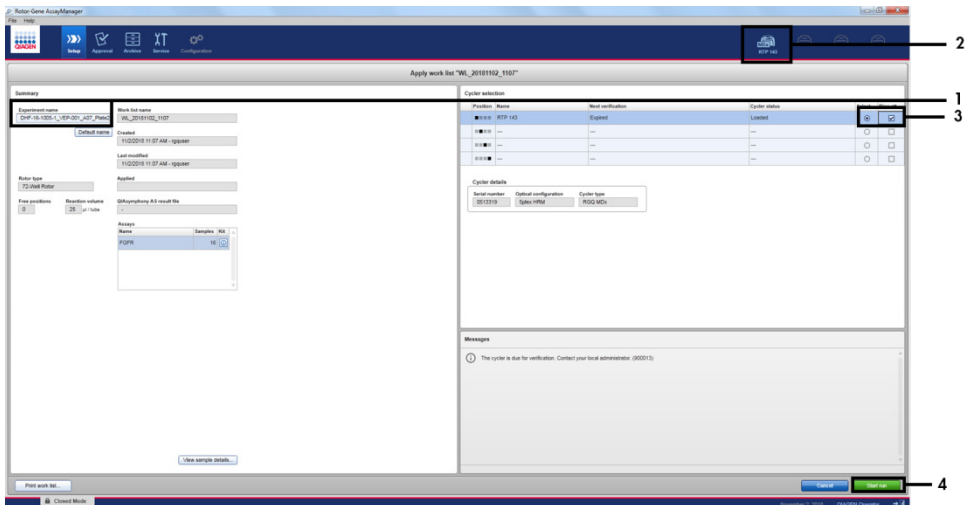


Afbeelding 10. Hoofdvenster voor maken van werklĳst. 1 = tabblad 'Samples' (Monsters),
2 = monsternamen invoeren.

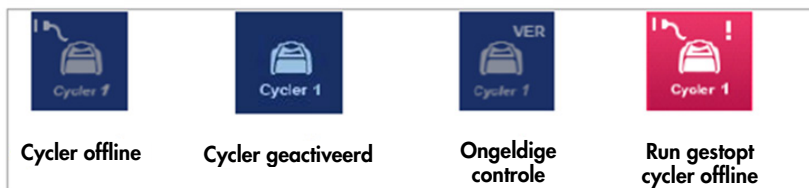
6. Klik op het tabblad 'Properties' (Eigenschappen) en voer de naam van de werklĳst in. Nadat de naam van de werklĳst is ingevoerd, controleert u of de selectievakjes 'is editable' (kan worden bewerkt) en 'work list is complete' (werklĳst is voltooid) zijn aangevinkt. Klik vervolgens in de hoek rechtsonder op 'Apply' (Toepassen) om de werklĳst toe te passen (afbeelding 11).
7. Voer een naam in voor het experiment in het veld 'Experiment name' (Naam experiment). Selecteer een cyclier in de lijst met beschikbare cycliers en controleer of het selectievakje 'Ring attached' (Ring aangebracht) is aangevinkt. Zodra alle stappen zijn uitgevoerd, klikt u op 'Start run' (Run starten). Onder het pictogram van de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM rechtsboven in het scherm wordt een voortgangsindicator weergegeven om aan te geven dat de run is gestart (afbeelding 12).
8. Opmerking: Het pictogram 'Cycler' krijgt afhankelijk van de voortgang en het resultaat van de run een ander uiterlijk (afbeelding 13). Volledige beschrijvingen van deze cyclierpictogrammen vindt u in de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.



Afbeelding 11. Hoofdvenster voor maken van werkljst. 1 = tabblad 'Properties' (Eigenschappen), 2 = naam van de werkljst invoeren, 3 = 'is editable' (kan worden bewerkt) en 'work list is complete' (werkljst is voltooid) selecteren, 4 = 'Apply' (Toepassen).



Afbeelding 12. Werkljst toepassen en run starten. 1 = naam experiment invoeren, 2 = huidige status van instrument, 3 = het instrument selecteren, 4 = run starten.



Afbeelding 13. Pictogrammen van de Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Cycler die mogelijk worden weergegeven.

9. Zodra de run voltooid is, klikt u op 'Finish run' (Run beëindigen), waarna het dialoogvenster 'Finish run' (Run beëindigen) wordt weergegeven (afbeelding 14).

Opmerking: Tijdens de run worden de amplificatiecurven in real-time weergegeven en bijgewerkt. Linksonder wordt de resterende tijd aangeduid met een voortgangsindicator.

Belangrijk: Sluit het venster niet terwijl de run wordt uitgevoerd, omdat u hierdoor gegevens kunt verliezen!



Afbeelding 14. Beëindigen van een run. 1 - 'Finish run' (Run beëindigen).

10. Klik op 'Release and go to approval' (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan) om de omgeving 'Approval' (Goedkeuring) te openen en het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument vrij te geven. Het RGQ-pictogram rechtsboven in het scherm verandert van groen in blauw om aan te geven dat het RGQ-instrument gereed is voor een volgende run. Ongeacht of een run wel of niet geslaagd is, moet het RGQ-instrument worden vrijgegeven (afbeelding 15).

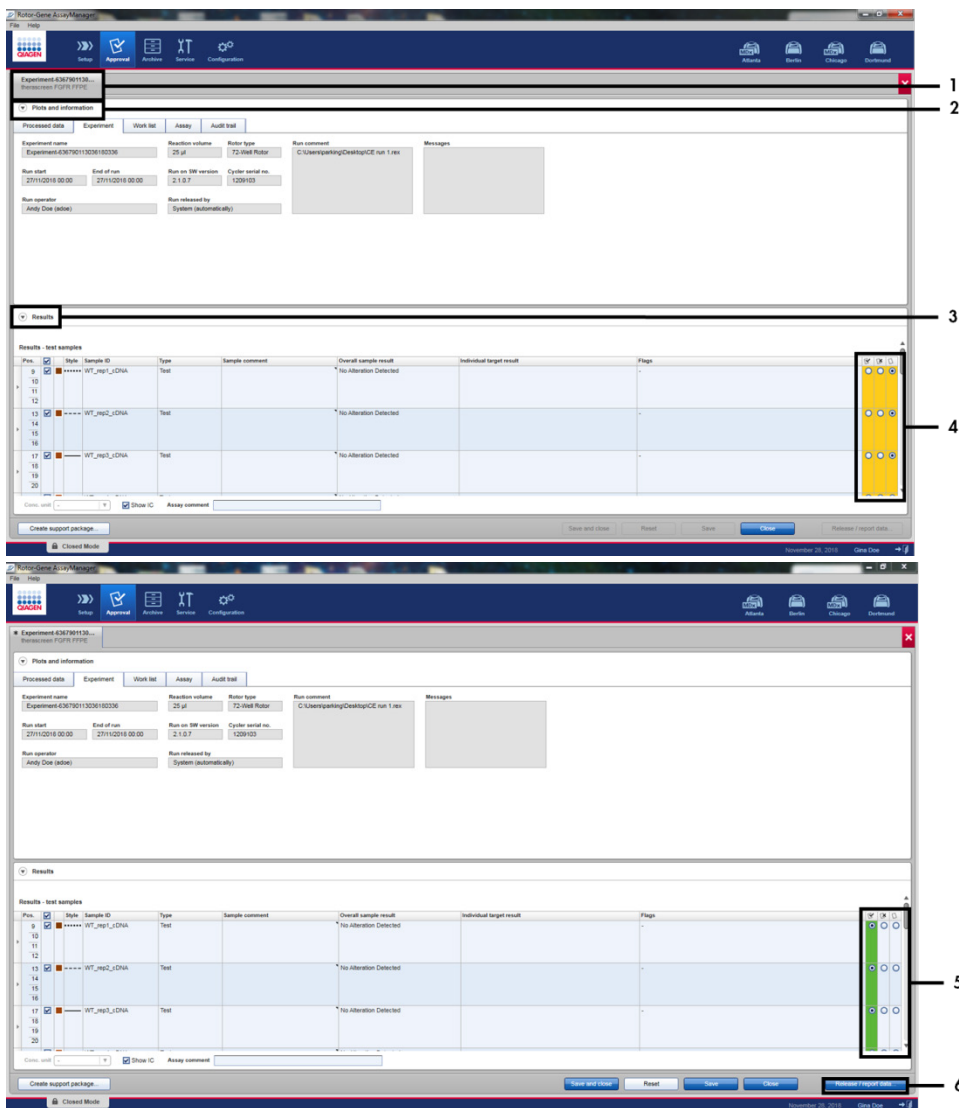


Afbeelding 15. Pop-upvenster 'Finish Run' (Run beëindigen). 1 = 'Release and go to approval' (Vrijgeven en naar goedkeuring gaan).

Informatie over 'Raw data' (Onbewerkte gegevens), 'Processed data' (Verwerkte gegevens), 'Experiment', 'Assay' en 'Audit trail' (Audittrail) vindt u in het gedeelte 'Plots and information' (Plots en informatie). Assayresultaten vindt u in het gedeelte 'Results' (Resultaten) (afbeelding 16).

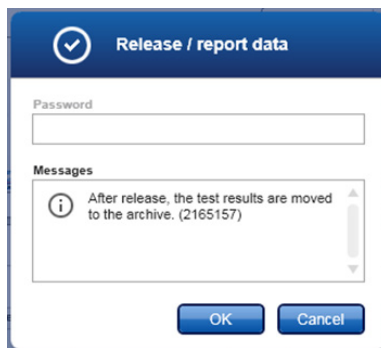
Opmerking: Het '*therascreen* FGFR FFPE'-assayprofielbestand dat bij de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit hoort, bevat alle software-instructies die vereist zijn voor automatische monsteranalyse en de interpretatie van de resultaten. Na de PCR-cyclus evalueert de Rotor-Gene AssayManager-software automatisch de geldigheid van de runcontroles en monsters. Indien de gegevens van de positieve controle en controle zonder template binnen het vooraf ingestelde, aanvaardbare bereik voor de test liggen, worden

de runcontroles als 'Valid' (Geldig) gerapporteerd. Indien beide runcontroles geldig zijn, worden de monsters op individuele basis geanalyseerd; indien de gegevens van de interne controle binnen het vooraf ingestelde, aanvaardbare bereik voor de test liggen, wordt het monster als 'Valid' (Geldig) gerapporteerd; indien ze buiten het vooraf ingestelde, aanvaardbare bereik voor de test liggen, wordt het monster als 'Invalid' (Ongeldig) gerapporteerd. Indien de externe controles buiten het vooraf ingestelde, aanvaardbare bereik voor de test liggen, wordt een algeheel 'Invalid' (Ongeldig) monsterresultaat gerapporteerd. Als een van de runcontroles mislukt, wordt de gehele run hierdoor ongeldig. Alle monsters worden dan aangemerkt als 'ASSAY_INVALID' (ASSAY_ONGELDIG). Indien dit zich voordoet, raadpleegt u 'Analyse' op pagina 46 voor instructies over hoe u moet verdergaan.



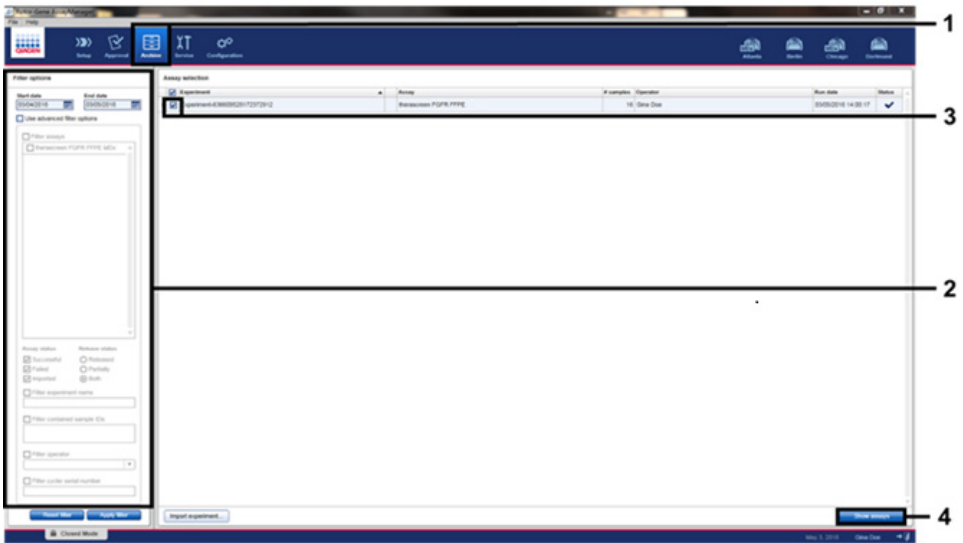
Afbeelding 16. Voorbeeld van hoofdvensters met assayresultaten. 1 = tabblad 'Experiment' 2 = gebied 'Plots and information' (Grafieken en informatie). 3 = gebied 'Results' (Resultaten). 4 = 'Release/report data' (Gegevens vrijgeven/rapporteren). 5 = keuzerondjes voor accepteren en weigeren. 6 = Release/report data (Gegevens vrijgeven/rapporteren).

11. De resultaten van alle monsters moeten worden goedgekeurd (geaccepteerd of verworpen) in het gebied 'Results' (Resultaten) van de omgeving 'Approval' (Goedkeuring) en worden vrijgegeven.
12. Klik op 'Release/report data' (Gegevens vrijgeven/rapporteren). Het dialoogvenster 'Release/report data' (Gegevens vrijgeven/rapporteren) wordt weergegeven, zoals getoond in afbeelding 17.
13. Klik op 'OK' om het experiment in het archief op te slaan en een LIMS-output en runrapport maken. Runrapporten en LIMS-exporten worden in de standaarddirectory voor rapporten opgeslagen. De standaarddirectory vindt u in 'Default data export directories' (Standaard gegevensexportdirectory's) in het gedeelte 'Configuration' (Configuratie) van de softwareomgeving.



Afbeelding 17. Het dialoogvenster 'Release/report data' (Gegevens vrijgeven/rapporteren).

14. Als u een experiment wilt bekijken dat is opgeslagen in het experimentarchief, klikt u op de omgeving 'Archive' (Archief) en zoekt u het experiment met behulp van de zoekcriteria in het gedeelte 'Filter Options' (Filteropties). Klik op 'Apply filter' (Filter toepassen) om de zoekopdracht te starten. Selecteer een experiment door het selectievakje ernaast aan te vinken en klik op 'Show assays' (Assays tonen) (afbeelding 18).
15. Indien een experiment mislukt en een foutcode wordt weergegeven, wordt er een lijst met potentiële fouten en foutcodes die door Rotor-Gene AssayManager gegenereerd kunnen worden, opgenomen in de *Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager v2.1* en/of de *Gebruikershandleiding van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.



Afbeelding 18. Voorbeeld van hoofdvenster 'Experiment Archive' (Experimentarchief). 1 = selectie van omgeving 'Archive' (Archief), 2 = zoekopties, 3 = selectie van experimentnaam, 4 = bedieningselement 'Show assays' (Assays tonen).

Analyse

Alle stappen van gegevensanalyse worden automatisch uitgevoerd, zonder dat er handmatige interpretatie benodigd is. De validiteit van de run en validiteitscriteria van monsters worden automatisch gecontroleerd door de Rotor-Gene AssayManager en er worden geen mutatiestatusresultaten gerapporteerd in het geval van een ongeldige run of een ongeldig monster. Het analytische resultaat wordt vastgesteld door alle relevante PCR-gegevens te combineren in overeenstemming met de kernanalyse-algoritmen die gedefinieerd zijn in het *therascreen* FGFR FFPE-assayprofiel.

Eerst worden de analyses van de runcontrole uitgevoerd:

- De PC-reactie wordt gecontroleerd op de aanwezigheid van amplificatie binnen de positieve controleassays en de IC-assays. Deze runcontrole is geldig indien de C_T -waarde van elke PC binnen de relevante PC-specificaties ligt.
- De NTC-reactie wordt gecontroleerd op de afwezigheid van specifieke amplificatie binnen de controleassays zonder template en de IC-assays. Deze runcontrole is geldig indien er geen C_T -waarde is geobserveerd of indien de C_T -waarde boven de NTC-specificatie ligt.

Indien een of meerdere van deze runcontroles niet aan de specificaties voldoen, wordt de run ongeldig verklaard en moet de analyse opnieuw worden uitgevoerd vanaf de stap voor omgekeerde transcriptie.

Indien alle runcontrole-analyses aan de specificaties voldoen, wordt de analyse van de monsterreacties uitgevoerd. Op basis van de vooraf bepaalde C_T -waarden, wordt de afwijkingsstatus van het FGFR-gen van elk cDNA-monster kwalitatief vastgesteld en gerapporteerd.

De volgende resultaten kunnen aan één monster worden toegewezen:

- FGFR Alteration Detected ("Valid") (FGFR-afwijking gedetecteerd ('Valid' [Geldig]))
- No Alteration Detected ("Valid") (Geen afwijking gedetecteerd ('Valid' [Geldig]))

- INVALID (ONGELDIG): Als er tijdens de analyse door de Rotor-Gene AssayManager v2.1 een of meerdere waarschuwingsberichten aan het monster worden toegewezen die zo zijn gedefinieerd dat zij het resultaat van de FGFR-afwijking op 'INVALID' (ONGELDIG) zetten

Opmerking: Een tumor kan meerdere FGFR-afwijkingen bevatten. In dat geval wordt er meer dan één FGFR-afwijking gerapporteerd.

Opmerking: Het rapport dat aan het einde van de run wordt gegenereerd, toont de resultaten die zijn verkregen met de experimentele monsters en runcontroles. Eventuele ongeldige resultaten worden gemarkeerd. Indien er een fout optreedt tijdens de Rotor-Gene Q-run, dan moeten de monsters in het instrument worden afgevoerd en moet de test opnieuw worden uitgevoerd met het geëxtraheerde RNA-monster.

Alle mogelijke waarschuwingsberichten die bij de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in horen, worden vermeld in de *Gebruiksaanwijzing van de Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*. Aanvullende waarschuwingsberichten die specifiek betrekking hebben op het '*therascreen_FGFR_FFPE*'-assayprofiel, staan vermeld in tabel 6.

Tabel 6. Voorbeelden van softwarewaarschuwingsberichten die weergegeven kunnen worden

Softwarewaarschuwingsberichten	Wanneer dit waarschuwingsbericht wordt weergegeven	Te nemen maatregelen
PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	PC ligt boven het specificatiebereik	Ongeldige run. Test moet worden herhaald met het geëxtraheerde RNA, indien beschikbaar, of opnieuw worden geëxtraheerd indien het niet beschikbaar is.
PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	PC ligt onder het specificatiebereik	Ongeldige run. Test moet worden herhaald met het geëxtraheerde RNA.
PC_NO_CT_VALUE	Geen C _T -waarde voor PC in PC-buisjes	Ongeldige run. Test moet worden herhaald met het geëxtraheerde RNA.
NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE	C _T -waarde gedetecteerd in NTC	Ongeldige run. Test moet worden herhaald met het geëxtraheerde RNA.
(Afwijking) IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Monster ligt boven het specificatiebereik	Ongeldig monster. Monster moet opnieuw worden geëxtraheerd.
(Afwijking) IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Monster ligt onder het specificatiebereik	Ongeldig monster. Monster moet opnieuw worden geëxtraheerd.
(Afwijking) IC_NO_CT_VALUE	Geen C _T -waarde voor monster	Ongeldig monster. Test kan worden herhaald met het geëxtraheerde RNA of monster moet opnieuw worden geëxtraheerd.
(Afwijking) UNEXPECTED_EARLY_CT	Amplificatiecurve heeft de drempelwaarde vroegtijdig in de cyclus gekruist	Afwijkend resultaat van monster. Test herhalen met het geëxtraheerde RNA.

Opmerking: Indien er herhaaldelijk ongeldige runs worden verkregen, dient u contact op te nemen met de technische diensten van QIAGEN.

Beperkingen van de procedure

De resultaten van het product moeten worden geïnterpreteerd met inachtneming van alle relevante klinische bevindingen en laboratoriumuitslagen en mogen niet afzonderlijk worden gebruikt voor diagnose.

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit mag uitsluitend worden gebruikt om RNA afkomstig uit specimen van FFPE UC-tumoren te testen.

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit mag uitsluitend worden gebruikt om RNA te testen dat bereid is met de RNeasy DSP FFPE Kit (cat.nr. 73604).

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is ook ontwikkeld om de FGFR3-fusie FGFR3-BAL2L1 en de FGFR2-fusies FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7 te identificeren, omdat patiënten met deze FGFR-fusie in aanmerking kwamen voor het klinisch onderzoek 42756493-BLC2001 naar BALVERSA (erdafitinib). De test is echter niet klinisch gevalideerd om deze drie fusies te detecteren, vanwege een gebrek aan vereiste klinische specimen. De veiligheid en werkzaamheid van geneesmiddelen is niet vastgesteld voor gevallen van UC die deze fusies bevat en er kunnen geen conclusies worden getrokken over het gebruik van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit als hulpmiddel voor het selecteren van dergelijke patiënten voor behandeling met BALVERSA (erdafitinib).

Monsters waarbij resultaten worden gerapporteerd als 'No Alteration Detected' (Geen afwijking gedetecteerd), kunnen FGFR-afwijking bevatten die niet door de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit zijn gedetecteerd.

Detectie van FGFR-afwijkingen is afhankelijk van de monsterintegriteit en de hoeveelheid amplificeerbaar cDNA dat uit het monster kan worden onttrokken.

Indien de interne controle (IC)-assay voor een specifiek monster geen C_T-waarde heeft of buiten het gespecificeerde bereik ligt, moet de testprocedure voor dit monster worden herhaald.

Het product dient uitsluitend te worden gebruikt door personeel dat specifiek is geïnstrueerd en getraind op het gebied van procedures voor in-vitrodiagnostiek en bediening van het Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.

Het product is uitsluitend bedoeld voor gebruik op een Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cycler.

Voor optimale resultaten dienen de aanwijzingen in de gebruiksaanwijzing van de *therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* strikt te worden opgevolgd. Verdere verdunning van de reagentia dan de verdunning zoals die in deze handleiding wordt aangegeven, wordt niet aanbevolen en leidt tot slechtere prestaties.

De instructies die in deze handleiding staan vermeld moeten worden gebruikt met de Rotor-Gene AssayManager-software versie 2.1 met geautomatiseerd statusresultaat voor FGFR-afwijkingen, samen met de Gamma Plug-in versie 1.0.0 en *therascreen FGFR FFPE Assay Profile* versie 1.0.4.

De *therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* toont geen detecteerbare kruisreactiviteit aan (die leidt tot het rapporteren van 'Alteration Detected' [Afwijking gedetecteerd]) tussen de assays voor afwijkingen van het FGFR-gen die hier deel van uitmaken.

De *therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* biedt een kwalitatief testresultaat, en genereert ofwel een positief of negatief resultaat voor elke FGFR-afwijking.

De *therascreen FGFR RGQ RT-PCR Kit* maakt gebruik van een tweestaps RT-PCR-procedure. Zoals bij alle vergelijkbare procedures, kunnen monsters worden gecontamineerd door externe bronnen in de testomgeving of potentieel door de positieve controle. Laboranten die tests uitvoeren moeten voorzichtig zijn om contaminatie van monsters en kitreagentia te voorkomen.

De impact van microbiële contaminatie op de prestaties van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is onbekend. Laboranten moeten opletten dat er tijdens de testprocedures geen microbiële contaminanten worden geïntroduceerd en mogen geen bestanddelen uit de kit gebruiken als er bewijs van microbiële groei is waargenomen.

Er moet worden gelet op de uiterste gebruiksdata en opslagomstandigheden die op de verpakking en etiketten van alle bestanddelen staan vermeld. Gebruik geen componenten waarvan de uiterste gebruiksdatum is verstreken of die onjuist zijn opgeslagen.

Gids voor problemen oplossen

Deze gids voor problemen oplossen kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg ook de pagina Veelgestelde vragen (Frequently Asked Questions, FAQ) in ons centrum voor technische ondersteuning voor meer informatie: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische diensten van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie voor contactgegevens de achterzijde van deze handleiding of ga naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties

NTC-monster toont ongeldig resultaat aan

Er heeft een detectie van een assaydoelwit plaatsgevonden bij afwezigheid van templatemateriaal

Herhaal de test vanaf de RT-stap met monster-RNA, indien beschikbaar. Indien monster-RNA niet beschikbaar is, herhaalt u de test vanaf de stap voor RNA-extractie.

Sluit indien mogelijk de PCR-buisjes direct na toevoeging van het te testen monster af.

Zorg ervoor dat de werkruimte en apparaten regelmatig gedecontamineerd worden.

PC-monster toont ongeldig resultaat aan

- | | |
|--|--|
| a) Onjuiste configuratie van de RT of PCR | Controleer uw werkstappen aan de hand van het pipetteerschema en herhaal zo nodig vanaf de RT-stap. |
| b) De bewaarcondities voor een of meer kitcomponenten voldeden niet aan de instructies die worden gegeven in 'Opslag en hantering van reagentia' (pagina 21) | Controleer de opslagomstandigheden en de uiterste gebruiksdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en gebruik indien nodig een nieuwe kit. |
| c) De uiterste gebruiksdatum van de <i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit is verstrekt | Controleer de opslagomstandigheden en de uiterste gebruiksdatum (zie het etiket van de kit) van de reagentia en gebruik indien nodig een nieuwe kit. |

Opmerkingen en suggesties

IC toont ongeldig resultaat aan

IC ligt buiten het vooraf ingestelde, aanvaardbare bereik; kwaliteit van RNA-monster is ongeschikt om te testen met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit

Herhaal de RNA-extractie indien er voldoende FFPE-weefsel beschikbaar is.

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN (ISO 13485) wordt elke partij van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit getest ten opzichte van vooraf vastgestelde specificaties om een consistente productkwaliteit te garanderen.

Prestatiekenmerken

Blancolimiet (Limit of Blank; LoB)

De blancolimiet (Limit of Blanc; LoB) wordt in de CLSI-richtlijn EP17-A2 gedefinieerd als 'het hoogste resultaat dat redelijkerwijs kan worden verwacht van een blanco monster (d.w.z. een monster met een concentratie van nul of bijna nul) voor een bepaalde foutkans α '. Voor de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is dit het gegevenspunt dat overeenkomt met het bovenste 95^e percentiel in FGFR-afwijkingsnegatieve monsters. De LoB is vastgesteld door de doorbraakniveaus voor elk van de negen FGFR-afwijkingsassays van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit te meten, waarbij doorbraak wordt gedefinieerd als de niet-specifieke amplificatie op laag niveau van een FGFR-afwijkingsnegatief RNA-monster. De LoB is vastgesteld door 60 klinische wild-type monsters te analyseren met behulp van 180 gegevenspunten per assay, met drie partijen van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en op drie instrumenten. De LoB voor elke assay in de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit staat vermeld in tabel 7.

Tabel 7. Overzicht van LoB-resultaten

FGFR-assay	LoB (C _t -waarde)
p.R248C (c.742C>T)	39,64
p.S249C (c.746C>G)	Geen amplificatie
p.G370C (c.1108G>T)	Geen amplificatie
p.Y373C (c.1118A>G)	Geen amplificatie
FGFR3-TACC3v1	Geen amplificatie
FGFR3-TACC3v3	Geen amplificatie
FGFR3-BAIAP2L1 *	Geen amplificatie
FGFR2-BICC1 *	Geen amplificatie
FGFR2-CASP7*	Geen amplificatie

* FGFR3-fusie FGFR3-BAIAP2L1 en FGFR2-fusies FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7 zijn niet analytisch gevalideerd met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en klinische specimens.

Assay-cut-off en kruisreactiviteit

Assay-cut-off

De assay-cut-offwaarde is een specifieke C_T -waarde die wordt gebruikt om te bepalen of een monster wordt geclassificeerd als positief of negatief voor een FGFR-afwijking. Monsters die een C_T -waarde genereren op of onder de cut-off, worden geclassificeerd als FGFR-afwijkingsspositief (d.w.z. FGFR Alteration Detected [FGFR-afwijking gedetecteerd]) en monsters die een C_T -waarde genereren boven de cut-off, worden geclassificeerd als FGFR-afwijkingssnegatief (d.w.z. No Alteration Detected [Geen afwijking gedetecteerd]). De percentages fout-negatief en fout-positief werden voor elke assay gebruikt om een cut-offwaarde voor elke FGFR-afwijkingsspecifieke assay vast te stellen, dermate dat een resultaat gelijk aan of minder dan de cut-off tot de classificatie FGFR Alteration Detected (FGFR-afwijking gedetecteerd) leidt. De cut-off voor elke assay in de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit staat vermeld in tabel 8.

Tabel 8. Overzicht van assay-cut-offresultaten

FGFR-assay	Assay-cut-off (C_T -waarde)
p.R248C (c.742C>T)	36,00
p.S249C (c.746C>G)	39,09
p.G370C (c.1108G>T)	41,00
p.Y373C (c.1118A>G)	43,00
FGFR3-TACC3v1	43,00
FGFR3-TACC3v3	43,00
FGFR3-BAIAP2L1 *	43,00
FGFR2-BICC1 *	43,00
FGFR2-CASP7*	42,00

* FGFR3-fusie FGFR3-BAIAP2L1 en FGFR2-fusies FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7 zijn niet analytisch gevalideerd met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en klinische specimens.

Kruisreactiviteit en analytische specificiteit van de assay

Kruisreactiviteit van de assay

De kruisreactiviteit van een assay wordt gedefinieerd als de niet-specifieke amplificatie van een FGFR-afwijking door de reagentia uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, anders dan het beoogde doelwit van een assay, die een C_T -waarde onder de geselecteerde cut-off voor die assay oplevert. Monsters met een hoog FGFR-afwijkningsniveau zijn getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en in geen van de assays werd een off-target-amplificatie onder de cut-off geconstateerd. Dit wil zeggen dat er geen kruisreactiviteit voor FGFR-afwijkingen is geconstateerd die de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit aantast.

Analytische specificiteit

Het niveau van potentiële kruisreactiviteit tussen primers, probes en blokkers die voor de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit werden gebruikt, niet-FGFR-doelwitten in humane en niet-humane genomen en het niveau van potentiële heterodimeervorming werden onderzocht. Er is een in-silico analyse uitgevoerd om vast te stellen of de primers, probes en blokkers die met assays uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit werden gebruikt zich niet-specifiek binnen een genoom binden, met inbegrip van het humane genoom. Er is een aanvullende in-silico analyse uitgevoerd om vast te stellen of de oligonucleotiden die in elke multiplexe assay werden gebruikt zich niet-specifiek aan elkaar binden.

De in-silico analyse van oligo-heterodimeren heeft uitgewezen dat er een lage prevalentie van heterodimeervorming aanwezig was. De primers en probes kruisreageren niet met ofwel wild-type *FGFR*-allelen of eventuele FGFR-afwijkingen die niet gedetecteerd zijn door de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en genereren daarom geen foutief signaal.

Detectielimiet (Limit of Detection; LoD)

De LoD wordt gedefinieerd als het laagste aantal *FGFR*-afwijking-RNA-kopieën/ μ l voor elk doelwit waarvan het 95% van de tijd mogelijk is om deze te detecteren. Voor de *FGFR*-afwijkingsspecifieke assays van de *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit wordt de LoD gerapporteerd als *FGFR*-afwijking-RNA-kopieën/ μ l. Individuele in-vitro transcripten van de *FGFR*-afwijking, een voor elke afwijking, werden verrijkt in een pool van genormaliseerd RNA, geëxtraheerd uit wild-type klinische monsters en serieel verdund bij de bovenstaande niveaus, op en onder de geschatte LoD voor elke assay.

Zestig replicaten van elk verdunningspunt in de reeks werden getest met behulp van drie partijen van de *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit. De LoD voor elke assay werd vastgesteld met behulp van een Probit-model en gerapporteerd als het hoogste aantal RNA-kopieën/ μ l (d.w.z. in het ergste geval) LoD, gedetecteerd met drie geteste partijen uit de *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit (tabel 9).

Tabel 9. Overzicht van LoD-resultaten

FGFR-assay	LoD (kopieën/ μ l)
p.R248C (c.742C>T)	75,80
p.S249C (c.746C>G)	289,82
p.G370C (c.1108G>T)	141,57
p.Y373C (c.1118A>G)	274,71
FGFR3-TACC3v1	25,26
FGFR3-TACC3v3	45,75
FGFR3-BAIAP2L1 *	9,07
FGFR2-BICC1 *	14,34
FGFR2-CASP7*	27,18

* FGFR3-fusie FGFR3-BAIAP2L1 en FGFR2-fusies FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7 zijn niet analytisch gevalideerd met de *therascreen* *FGFR* RGQ RT-PCR Kit en klinische specimens.

De LoD's van de assays p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G), p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v1 en FGFR3-TACC3v3 werden geverifieerd met FGFR-afwijkingspositieve klinische UC-monsters.

Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

De herhaalbaarheid (binnen het laboratorium) van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit werd geëvalueerd door kunstmatige monsters bij 3x LoD te testen, wat de negen afwijkingen vertegenwoordigt die door de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit zijn gedetecteerd en een *FGFR*-afwijkingsnegatief monster.

De herhaalbaarheid werd geëvalueerd door deze monsters op één locatie en op meerdere dagen te testen, met Rotor-Gene Q-instrumenten en door laboranten om in totaal 60 replicaten per monster te genereren (tabel 10).

Tabel 10. Herhaalbaarheid van de assay: Aantal correcte resultaten en tweezijdige 95%-betrouwbaarheidslimieten voor elke FGFR-afwijking bij 3x LoD en wild-type monsters die op één locatie zijn getest

Template	Aantal correcte resultaten	Percentage van correcte resultaten	Lagere tweezijdige betrouwbaarheidslimiet van 95%	Hogere tweezijdige betrouwbaarheidslimiet van 95%
p.R248C (c.742C>T)	60/60	100%	94,04%	100,00%
p.S249C (c.746C>G)	60/60	100%	94,04%	100,00%
p.G370C (c.1108G>T)	60/60	100%	94,04%	100,00%
p.Y373C (c.1118A>G)	60/60	100%	94,04%	100,00%
FGFR3-TACC3v1 *	59/60	98,3%	91,06%	99,96%
FGFR3-TACC3v3	59/60	98,3%	91,06%	99,96%
FGFR3-BAIAP2L1	60/60	100%	94,04%	100,00%
FGFR2-BICC1	60/60	100%	94,04%	100,00%
FGFR2-CASP7	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (reactiemengsel voor Mut-1)	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (reactiemengsel voor Mut-2)	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (reactiemengsel voor Fus-1)	60/60	100%	94,04%	100,00%
WT (reactiemengsel voor Fus-2)	59/60	98,3%	91,06%	99,96%

* Uit 1x LoD-monsters.

De reproduceerbaarheid werd gemeten door kunstmatige monsters te testen bij niveau 3x LoD, klinische monsters nabij de LoD en wild-type monsters op drie verschillende locaties (één locatie van QIAGEN in het Verenigd Koninkrijk en twee aanvullende externe locaties in de Verenigde Staten). De kunstmatige monsters voor alle FGFR-afwijkingen bij 3x LoD en de wild-type monsters werden door drie laboranten (per locatie) gedurende vijf dagen getest, met behulp van drie Rotor-Gene Q MDx-instrumenten op elke externe locatie. Daarnaast werd RNA, geëxtraheerd uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) klinische UC-monsters, gebruikt om de reproduceerbaarheid van het apparaat te testen. De tests werden uitgevoerd op het LoD-niveau voor elk doelwit [p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G), p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v1 en FGFR3-TACC3v3] waarbij gebruik werd gemaakt van klinische monsters. Klinische monsters konden niet worden verkregen voor FGFR3-BAIAP2L1, FGFR2-BICC1 of FGFR2-CASP7. Tijdens de analyse werd de variabiliteit tussen partijen ook gecombineerd in de onderzoeksopzet. Alle klinische 1x LoD-monsters werden op elk van de drie locaties getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (twee biologische replicaten x twee partijen uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit x twee laboranten x drie dagen = 24 replicaten op elke locatie). Dit totaal aantal replicaten werd getest met drie Rotor-Gene Q MDx-instrumenten op elke locatie, en er werden afwisselend twee van de drie partijen uit de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit gebruikt op elke locatie (tabel 11).

Tabel 11. Reproduceerbaarheid van de assay: Aantal correcte resultaten en tweezijdige 95%-betrouwbaarheidslimieten voor elke FGFR-afwijking bij LoD, 3x LoD en wild-type monsters die op alle locaties zijn getest

Mutatie	Doelniveau	Type specimen	Aantal correcte resultaten	Percentage correcte resultaten	Lagere tweezijdige betrouwbaarheidslimiet van 95%	Hogere tweezijdige betrouwbaarheidslimiet van 95%
p.R248C (c.742C>T)	3x LoD	Kunstmatig	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1x LoD	Klinisch	72/72	100,00%	95,01%	100,00%
p.S249C (c.746C>G)	3x LoD	Kunstmatig	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1x LoD	Klinisch	72/72	100,00%	95,01%	100,00%
p.G370C (c.1108G>T)	3x LoD	Kunstmatig	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1x LoD	Klinisch	71/72	98,61%	92,50%	99,96%
p.Y373C (c.1118A>G)	3x LoD	Kunstmatig	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1x LoD	Klinisch	71/72	98,61%	92,50%	99,96%
FGFR3- TACC3v1	1x LoD	Kunstmatig	119/120	99,17%	95,44%	99,98%
	1/3x LoD	Klinisch	63/72	87,50%	77,59%	94,12%
FGFR3- TACC3v3	3x LoD	Kunstmatig	119/120	99,17%	95,44%	99,98%
	1x LoD	Klinisch	71/72	98,61%	92,50%	99,96%
FGFR3- BAIAP2L1 *	3x LoD	Kunstmatig	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1x LoD	Klinisch	N.g.	N.g.	N.g.	N.g.
FGFR2- BICC1 *	3x LoD	Kunstmatig	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1x LoD	Klinisch	N.g.	N.g.	N.g.	N.g.
FGFR2- CASP7*	3x LoD	Kunstmatig	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
	1x LoD	Klinisch	N.g.	N.g.	N.g.	N.g.
WT (Mut-1)	N.g.	Klinisch	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
WT (Mut-2)	N.g.	Klinisch	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
WT (Fus-1)	N.g.	Klinisch	120/120	100,00%	96,97%	100,00%
WT (Fus-2)	N.g.	Klinisch	116/120	96,67%	91,69%	99,08%

*Klinische UC FFPE-monsters konden niet worden verkregen voor deze afwijkingen. N.g.: Niet geëvalueerd.

Hantering van specimens

Tijdens dit onderzoek werd variabiliteit in de hantering van monsters geëvalueerd, voornamelijk tijdens de RNA-extractiestap. Klinische FFPE UC-specimens werden onderverdeeld in drie onafhankelijke sets die geëxtraheerd worden met de RNeasy DSP FFPE Kit in drie onafhankelijke laboratoria. Elke set bevatte een vooraf bepaald aantal FGFR wild-type en FGFR-positieve (d.w.z. FGFR Alteration Detected [FGFR-afwijking gedetecteerd]) specimens. Alle specimens werden voorafgaand aan extractie geblindeerd. Elke set werd driemaal door twee laboranten op drie locaties geëxtraheerd. Alle RNA-monsters werden vervolgens op één locatie getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit.

Voor alle FGFR-afwijkingen, was het aandeel van correcte resultaten 96,22%. Dit bevestigt de reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid voor het *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR System bij de pre-analytische stap van RNA-isolatie.

Onderlinge uitwisselbaarheid tussen partijen

Tijdens dit onderzoek werd het potentieel voor variabiliteit tussen partijen geëvalueerd om de detectie van *FGFR*-afwijking met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit te beïnvloeden. Het FGFR System maakt gebruik van twee afzonderlijke kits: de RNeasy DSP FFPE Kit voor isolatie van RNA uit klinische UC FFPE-specimens en de *therascreen* FGFR RGQ-RT-PCR Kit voor de amplificatie en detectie van FGFR-afwijkingen.

De uitwisselbaarheid tussen partijen werd aangetoond met drie partijen van de RNeasy DSP FFPE Kit en drie partijen van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. Voor dit onderzoek werd een combinatie van klinische en kunstmatige monsters gebruikt. Vier klinische FFPE-specimens met de afwijkingen p.R248C (c.742C>T), p.S249C (c.746C>G) en FGFR3-TACC3v1 en een klinisch wild-type FFPE-specimen werden dubbel geëxtraheerd met drie partijen van de RNeasy DSP FFPE Kit en getest met drie verschillende partijen van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. Daarnaast werden kunstmatige monsters voor de afwijkingen p.G370C (c.1108G>T), p.Y373C (c.1118A>G), FGFR3-TACC3v3, FGFR3-BAIA2PL1, FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7 op 3x LoD-niveau geproduceerd en getest met de drie partijen van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. Alle monsters werden genormaliseerd en verdund naar 3x

LoD-niveau voor elke assay. In totaal werden er 36 replicaten voor elk monster gegenereerd. Het totale percentage van correcte resultaten voor alle monsters met alle partijen van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en RNeasy DSP FFPE Kit was 99,65% (286/287 monsters).

Kruisbesmetting/analytische carry-over

Het doel van dit onderzoek was om de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit te evalueren op carry-over bij het testen van hoge *FGFR*-afwijkingspositieve monsters naast *FGFR*-afwijkingsnegatieve monsters. Tijdens het onderzoek werd het gehele FGFR System vanaf extractie tot PCR-amplificatie geëvalueerd en werd er onderzocht of er carry-over plaatsvond tussen monsters, extracties en binnen of tussen runs.

Klinische UC FFPE-monsters werden onderverdeeld in twee onafhankelijke sets. Beide sets bestonden uit 18 wild-type monsters en 12 *FGFR*-afwijkingspositieve monsters. De RNA-extractie, en de RT- en PCR-reactieopstelling werden gebaseerd op een matrix die is ontwikkeld om het risico op kruisbesmetting van monsters te introduceren. Elke set werd door een andere laborant getest met dezelfde partij van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. In totaal werden 128 wild-type replicaten getest en het percentage van fout-positieve resultaten voor de wild-type monsters was 3,13% (4/128 monsters).

Interfererende stoffen

Tijdens dit onderzoek werd de invloed van potentieel endogene en exogene interfererende stoffen op de detectie van de *FGFR*-afwijkingsstatus onderzocht bij gebruik van de RNeasy DSP FFPE Kit en de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit. Monsters werden verrijkt met een van de vier interfererende stoffen (hemoglobine, Buffer RPE, Deparaffinization Solution of paraffinewas), ofwel tijdens de extractiestap of de normalisatiestap van het RNA-monster. Er werden in totaal 60 replicaten per interfererende stof getest voor elk van de negen *FGFR*-afwijkingspositieve monsters en wild-type monsters. De vier interfererende stoffen toonden geen statistisch significant verschil in resultaten tussen de controlemonsters en testmonsters aan, waaruit blijkt dat de aanwezigheid van interfererende stoffen de assayprestaties of het doelresultaat niet beïnvloedt.

Klinische prestaties

In gevallen waarbij de UC een afwijking van de FGFR vertoonde, had het pan-FGFR TKI-geneesmiddel BALVERSA (erdafitinib) een algehele mate van respons bij 34,3% van de patiënten, zoals onderzocht door het Blinded Independent Review Committee (BIRC) (5).

De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit is bedoeld voor gebruik als diagnostische test en als hulpmiddel bij het bij patiënten vaststellen van urotheliale kanker (UC) die specifieke FGFR-genafwijkingen bevat, waardoor de patiënt in aanmerking komt voor behandeling met BALVERSA (erdafitinib).

Correlatie met de referentiemethode

Om de nauwkeurigheid van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (in verhouding tot RT digitale druppel-PCR [RT-ddPCR]), is er een nauwkeurigheidsonderzoek uitgevoerd met specimens uit het klinische onderzoek 42756493-BLC2001, aangevuld met specimens die waren verkregen uit dezelfde beoogde populatie (intentie om te diagnosticeren) waar het product voor bedoeld is. De *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en ddPCR-tests voor FGFR-afwijkingen werden gebruikt op dezelfde monsters die geëxtraheerd waren van 307 specimens (271 klinische onderzoeksspecimens en 36 verworven specimens).

Monsters met geldige resultaten voor zowel de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit als ddPCR (n = 306) werden geanalyseerd om het percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement; PPA), percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement; NPA) en percentage totale overeenstemming (Overall Percent Agreement; OPA) te evalueren op basis van de overeenstemming tussen de twee methoden voor de algehele FGFR-afwijkingsstatus (FGFR Alteration Detected [FGFR-afwijking gedetecteerd] of No Alteration Detected [Geen afwijking gedetecteerd]). U vindt een overzicht van deze percentages en de bijbehorende tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI) in tabel 12.

Tabel 12. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ten opzichte van ddPCR (met ddPCR als orthogonale methode)

Mate van overeenstemming	Percentage overeenstemming (N)	Tweezijdig 95%-BI
Percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA)	99,04% (103/104)	94,76, 99,98
Percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA)	97,52% (197/202)	94,32, 99,19
Totaal percentage overeenstemming (Overall Percent Agreement, OPA)	98,04% (300/306)	95,78, 99,28

Voor de zes algemene strijdige resultaten van de *FGFR*-afwijkingsstatus, gaf één monster het resultaat No Alteration Detected (Geen afwijking gedetecteerd) met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit en werd het resultaat FGFR Alteration Detected (FGFR-afwijking gedetecteerd) verkregen met ddPCR terwijl vijf monsters het resultaat FGFR Alteration Detected (FGFR-afwijking gedetecteerd) gaven met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, die het resultaat No Alteration Detected (Geen afwijking gedetecteerd) gaven met ddPCR. In tabel 13 wordt het PPA van het doelwit met ddPCR als referentiemethode weergegeven.

Tabel 13. PPA met ddPCR als orthogonale methode, evenals met de tweezijdige 95%-betrouwbaarheidsintervallen met afwijkingen

Afwijking	Percentage overeenstemming (N correct/N totaal)	Tweezijdig 95%-BI
p.R248C (c.742C>T)	93,33% (14/15)	68,05, 99,83
p.S249C (c.746C>G)	100,00% (56/56)	93,62, 100,00
p.G370C (c.1108G>T)	100,00% (2/2)	15,81, 100,00
p.Y373C (c.1118A>G)	100,00% (18/18)	81,47, 100,00
FGFR3-TACC3v1	100,00% (16/16)	79,41, 100,00
FGFR3-TACC3v3	100,00% (5/5)	47,82, 100,00
FGFR3-BAIAP2L1	100,00% (1/1)	2,50, 100,00

Klinische uitkomstgegevens

Regimen 3 van het 42756493-BLC2001-onderzoek was een fase 2-onderzoek om de efficiëntie en veiligheid van de geselecteerde dosis (8 mg eenmaal daags) of BALVERSA (erdafitinib) vast te stellen bij personen met metastatische of chirurgisch onbehandelbare UC met FGFR-genomische afwijkingen. Patiënten die in aanmerking kwamen moesten specifieke afwijkingen in de FGFR2- of FGFR3-genen hebben, zoals prospectief vastgesteld met behulp van de Clinical Trial Assay (CTA). De specimina van patiënten die voor het klinisch onderzoek 42756493-BLC2001 waren gescreend, werden retrospectief getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ter diagnostische ondersteuning.

Er is een overbruggingsstudie uitgevoerd voor beoordeling van de overeenstemming van de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit met de CTA zoals gebruikt voor selectie van patiënten voor het 42756493-BLC2001 klinische onderzoek. De overbruggingsstudie behandelde 300 patiëntmonsters.

Monsters met geldige resultaten voor zowel de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit als CTA (n = 292) werden geanalyseerd om het percentage PPA, NPA en OPA te evalueren op basis van de overeenstemming tussen de twee methoden voor de algehele *FGFR*-genafwijkingsstatus (FGFR Alteration Detected [FGFR-afwijking gedetecteerd] of No Alteration Detected [Geen afwijking gedetecteerd]). U vindt een overzicht van deze percentages en de bijbehorende tweezijdige 95%-BI in tabel 14.

Tabel 14. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ten opzichte van CTA (met CTA als referentiemethode)

Mate van overeenstemming	Percentage overeenstemming (N)	Tweezijdig 95%-BI
Percentage positieve overeenstemming (Positive Percent Agreement, PPA)	87,2% (82/94)	79,0, 92,5
Percentage negatieve overeenstemming (Negative Percent Agreement, NPA)	97,0% (192/198)	93,5, 98,6
Totaal percentage overeenstemming (Overall Percent Agreement, OPA)	93,8% (274/292)	90,5, 96,1

Voor de 18 algemene strijdige resultaten van de *FGFR*-afwijkingsstatus, gaven 12 monsters het resultaat 'No Alteration Detected' (Geen afwijking gedetecteerd) met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, maar werd het resultaat 'FGFR Alteration Detected' (FGFR-afwijking gedetecteerd) verkregen met de CTA, terwijl zes monsters het resultaat 'FGFR Alteration Detected' (FGFR-afwijking gedetecteerd) gaven met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, die het resultaat 'No Alteration Detected' (Geen afwijking gedetecteerd) gaven met de CTA. Let op dat van de 94 CTA-positieve monsters er 81 waren afgenomen bij patiënten met chemo-relaps/refractaire patiënten. De positieve overeenstemming in deze groep wordt weergegeven in tabel 15.

Tabel 15. Positieve overeenstemming tussen *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit ten opzichte van CTA (met CTA als referentiemethode); proefpersonen met chemo-relaps/refractaire patiënten

		CTA FGFR+
GIAGEN-assay	FGFR +	69
	FGFR –	12
	Totaal	81
	PPA (95%-BI)	85,2% (75,9-91,3%)

Het primaire doel van het onderzoek 42756493-BLC2001 was om de objectieve mate van respons (objectieve mate van respons [Objective Response Rate; ORR] = complete respons

[Complete Response; CR] + gedeeltelijke respons [Partial Response; PR]) te evalueren met RECIST-criteria zoals geëvalueerd volgens de onderzoeker. De ORR met BIRC werd ook vastgesteld. Het waargenomen klinische voordeel in de subset patiënten met de uitslag FGFR Alteration Detected (FGFR-afwijking gedetecteerd) met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (n = 81), was vergelijkbaar met het voordeel dat werd waargenomen in de volledige onderzoekspopulatie (n = 99). Aangezien er geen ORR-gegevens beschikbaar waren voor de fusies FGFR3-BAIAP2L1, FGFR2-BICC1 en FGFR2-CASP7, is het niet mogelijk aan te tonen dat de klinische validiteit voor deze afwijkingen is geobserveerd. De volledige werkzaamheidsresultaten worden weergegeven in tabel 16.

Tabel 16. Klinisch voordeel van patiënten getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit in de populatie van het klinisch onderzoek 42756493-BLC2001 Regimen 3

Parameter	<i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit+-populatie, n = 81	CTA+-populatie, n = 99
Objectieve mate van respons (Objective Response Rate, ORR) volgens BIRC		
Aantal responsen	29	34
ORR, % (95%-BI)	35,8% (26,2-46,7%)	34,3% (25,0-43,7%)
Objectieve mate van respons (Objective Response Rate; ORR) volgens onderzoekers		
Aantal responsen	37	40
ORR, % (95%-BI)	45,7% (35,3-56,5%)	40,4% (30,7-50,1%)

BIRC: Blinded Independent Review Committee; BI: betrouwbaarheidsinterval; CTA: Clinical trial assay. Kit+: FGFR-afwijking gedetecteerd door de CDx; CTA+: FGFR-afwijking gedetecteerd door de CTA. Vanwege het feit dat de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit niet werd gebruikt om patiënten voor het klinisch onderzoek 42756493-BLC2001 te selecteren, zijn er aanvullende werkzaamheidsanalyses uitgevoerd om patiënten te overwegen die niet deelnamen aan het onderzoek, omdat de monstertests met de CTA het resultaat No Alteration Detected (Geen afwijking gedetecteerd) opleverden, maar waaraan mogelijk het resultaat FGFR Alteration Detected (FGFR-afwijking gedetecteerd) was toegewezen als het monster was getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit (d.w.z. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit+/CTA-).














Patiënten die deelnamen aan het onderzoek, maar voor wie er geen geldige resultaten waren nadat ze opnieuw waren getest met de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit, werden tevens overwogen (d.w.z. *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit onbekend/CTA+). De resultaten uit alle hypothetische analyses waren in het algemeen vergelijkbaar met die bij de primaire werkzaamheidsanalyse werden geconstateerd.

Referenties

1. Ornitz, D.M. and Itoh, N. (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 4, 215.
2. Knowles, M.A. and Hurst, C.D. (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. Nat. Rev. Cancer 15, 25.
3. Rodriguez-Vida, A., Saggese, M., Hughes, S., et al. (2015) Complexity of FGFR signaling in metastatic urothelial cancer. J. Hematol. Oncol. 24, 119.
4. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 7276.
5. BALVERSA (Erdafitinib) Prescribing Information.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakkingen en etiketten worden weergegeven:

Symbol	Symbooldefinitie
	Markering voor Europese regelgeving
	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer
	Componenten
	Bevat
	Nummer
	Bescherm tegen licht
	Global Trade Item Number
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing (Handleiding); 'n' is het revisienummer
	Temperatuurbepering

Symbool**Symbooldefinitie**



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Voorzichtig

Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via www.qiagen.com/Support. U kunt ook bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met de afdeling voor technische klantenservice van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>therascreen</i> FGFR RGQ RT-PCR Kit (24)	Voor 24 reacties: RT-buffer 1, RT-buffer 2, RT-primermix, omgekeerde transcriptase, positieve controle, PC-verdunningsmiddel, reactiemengsel mutatie-1, reactiemengsel mutatie-2, reactiemengsel fusie-1, reactiemengsel fusie-2, water voor monsterverdunningsmiddel, water voor NTC	876711
RNeasy DSP FFPE Tissue Kit		
RNeasy DSP FFPE Kit	Voor 50 RNA-preparaten: RNeasy MinElute®-spinkolommen, verzamelbuisje, elutiebusjes, Deparaffinization Solution, Proteinase K, RNase-vrije DNase I, DNase-boosterbuffer, RNase-vrije buffers en RNase-vrij water.	73604
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM en accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, karmijnrood) plus HRM-kanaal, laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training niet inbegrepen	9002032

Product	Inhoud	Cat.nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler en High Resolution Melt-analysator met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, karmijnrood) plus HRM-kanaal, laptopcomputer, software, accessoires: met 1 jaar garantie op onderdelen en arbeidsloon, installatie en training	9002033
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 dunwandige buisjes voor 1000 reacties van 20-50 µl	981005
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium blok voor het handmatig instellen van reactiemengsel met een eenkanaalspipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	Aluminium blok voor handmatig opzetten van reacties met een enkelkanaals pipet in 96 PCR-buisjes van 0,2 ml	9018905
72-Well Rotor	Voor het vasthouden van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, met reactievolumes van 10-50 µl; vereist Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Voor het vergrendelen van Strip Tubes and Caps, 0.1 ml in de 72-Well Rotor	9018904

Raadpleeg de handleiding of gebruiksaanwijzing van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruiksaanwijzingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Revisiegeschiedenis van document

Revisie	Beschrijving
R1, oktober 2021	Eerste uitgave

Deze pagina is met opzet leeg gelaten.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten.

Beperkte licentieovereenkomst voor de *therascreen* FGFR RGQ RT-PCR Kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van het product zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product zijn meegeleverd en deze handleiding, en mag alleen worden gebruikt met componenten in het paneel. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van dit paneel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij het paneel zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat dit paneel en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Dit paneel en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van het paneel gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen en niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN kan de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht met betrekking tot de kit en/of de componenten ervan af te dwingen.

Zie www.qiagen.com voor de bijgewerkte licentievoorwaarden en productspecifieke vrijwaringsclausules.

Handelsmerken: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], HotStarTaq[®], MinElute[®], Rotor-Disc[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®], RNeasy[®], *therascreen*[®] (QIAGEN Group); Balversa[™] (Janssen Research & Development, LLC); TaqMan[®] (Roche Group). De gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, moeten altijd als wettelijk beschermd worden beschouwd, zelfs als ze niet specifiek als zodanig zijn aangegeven.

1125704 10-21 HB-2952-001 © 2021 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com