

November 2019

Handbok för *therascreen*[®] KRAS RGQ PCR Kit



Version 1



Kvalitativ in vitro-diagnostik

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



874011



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND



1119793SE

Innehåll

QIAGEN Sample and Assay Technologies	5
Avsedd användning	6
Sammanfattning och förklaring	7
Användningsprinciper	8
Material som medföljer	12
Kitinnehåll	12
Material som behövs men inte medföljer	13
Varningar och försiktighetsåtgärder	15
Säkerhetsinformation	15
Allmänna säkerhetsåtgärder	15
Förvaring och hantering av reagenser	17
Provtagning, förberedelse för analys och förvaring	18
Procedur	20
DNA-extraktion	20
Protokoll: Bedömning av DNA-prover	22
Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer	35
Tolkning av resultat	47
Felsökningshandbok	49
Flaggor som genereras av <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	50
Kvalitetskontroll	53
Begränsningar	53
Prestandaegenskaper	54

Analytisk prestanda	54
Cutoff.....	54
Blankgräns (LOB).....	55
Jämförelse med analytisk referensmetod: CRC.....	55
Jämförelse med analytisk referensmetod: NSCLC.....	58
Detektionsgräns (LOD).....	60
DNA-input och linjäritet.....	62
Interfererande ämnen.....	65
Korskontaminering.....	66
Exklusivitet/korsreaktivitet.....	67
Repeterbarhet och reproducerbarhet.....	69
Variabilitet vid provhantering.....	72
Motsvarighet mellan provtagningsmetoder (endast NSCLC).....	73
Referenser.....	74
Symboler	77
Kontaktinformation.....	78
Bilaga 1: Manuellt protokoll för <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit.....	79
Tolkning av resultat (manuellt)	96
Programinställningar för analys.....	96
Analys av provbedömningsdata	97
Provanalys.....	100
Bilaga 2: Installation av <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	105
Beställningsinformation.....	109
Dokumentrevisioner.....	111

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analystekniker som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla biologiska prover. Våra avancerade produkter och tjänster av hög kvalitet garanterar framgång från prov till resultat.

QIAGEN sätter standarden för:

- rening av DNA, RNA och proteiner
- nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vi strävar efter att göra det möjligt för dig att nå stor framgång med din verksamhet. Besök oss gärna på www.qiagen.com.

Avsedd användning

therascreen[®] KRAS RGQ PCR Kit är en kvalitativ realtids-PCR-analys för detektion av 7 somatiska mutationer i kodonerna 12 och 13 i den mänskliga KRAS-onkogenen med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Kitet är avsett för användning med DNA som extraherats från formalinfixerad och paraffininbäddad (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) vävnad från kolorektal cancer (Colorectal Cancer, CRC) eller icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) som tagits med resektion, nålbiopsi (Core Needle Biopsy, CNB) eller finnålspunktion (Fine Needle Aspiration, FNA).

Somatiska mutationer i KRAS-genen är potentiella prediktiva biomarkörer för resistens mot behandlingar inriktade på mänsklig epidermal tillväxtfaktorreceptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) som panitumumab och cetuximab för behandling av CRC. Somatiska mutationer i KRAS-genen kan också användas som en potentiell prediktiv biomarkör för att fatta beslut om vissa typer av behandling av NSCLC.

Patientens mutationsstatus, liksom även andra sjukdomsfaktorer, kommer att bedömas av en läkare för att man ska kunna välja rätt behandling. Beslut om behandling för cancerpatienter får inte enbart baseras på KRAS-mutationsstatus.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit är inte avsett för att diagnostisera CRC, NSCLC eller någon annan sjukdom.

Sammanfattning och förklaring

Mutationer i KRAS-onkogenen förekommer ofta i cancerformer hos människor (1–4). Med teknikerna Scorpions® och ARMS® (Amplification Refractory Mutation System) (5, 6) kan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit möjliggöra detektion av 7 mutationer i kodonerna 12 och 13 i KRAS-onkogenen mot en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA (tabell 1). Baserat på data i databasen COSMIC (2015 v72) svarar de 7 mutationerna som detekteras av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit för > 95 % av alla rapporterade KRAS-mutationer hos CRC-patienter och för > 88 % av alla rapporterade mutationer hos NSCLC-patienter (7).

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter

Mutation	Basskifte	COSMIC-ID*
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

* COSMIC ID har hämtats från databasen *Catalog of Somatic Mutations in Cancer* (7) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Testet är mycket specifikt och känsligt och kan detektera en låg procentandel mutant-DNA i en bakgrund av vildtyps-DNA. Förutsatt att det finns tillräckligt med DNA-kopior är detektion av ca 0,8 % mutant i en bakgrund med vildtyp-genomiskt DNA möjlig (se "Prestandaegenskaper" på sidan 54 för information om detektionsgräns för varje mutation).

therascreen KRAS RGQ PCR Kit används med en PCR-procedur (polymerase chain reaction). Fördelarna med detta kit är att det är mycket specifikt för målet och att det är snabbt och effektivt och inte har någon subjektivitet vid bestämning av resultaten.

Användningsprinciper

I *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit används 2 typer av teknik – ARMS och Scorpions – för detektion av mutationer i real-time PCR.

Mutationsreaktionsmixar

Varje reaktionsmix använder en mutationsspecifik ARMS-primer för att amplifiera det muterade DNA:t selektivt och sedan en Scorpions-primer för att detektera amplifieringsprodukten.

ARMS

Allelespecifik amplifiering uppnås med ARMS som utnyttjar förmågan hos *Taq* DNA-polymeras för att särskilja en matchad och en felmatchad bas vid 3'-ändan av en PCR-primer. När primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3'-basen inte matchar sker eventuellt endast bakgrundsamplifiering på låg nivå. Därför amplifieras en muterad sekvens selektivt även i prover där majoriteten av DNA:t inte bär på mutationen.

Scorpions

Detektion av amplifiering utförs genom att använda Scorpions. Scorpions är bifunktionella molekyler med en PCR-primer som är kovalent bunden till en prob. Proben innehåller fluoroforen karboxyfluorescein (FAM™) och en quencher. Den senare dämpar fluorescensen hos fluoroforen. När proben binder till ARMS-amplikonet under PCR separeras fluoroforen och quenchern, vilket leder till en detekterbar ökning av fluorescensen.

Kitets format

therascreen KRAS RGQ PCR Kit innehåller 8 analyser:

- 1 kontrollanalys (kontrollreaktionsmix; CTRL)
- 7 mutationsanalyser (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Reaktionsmixar är dubbla och innehåller FAM-märkta reagenser för att detektera mål och en HEX™-märkt internkontroll. Reaktionsmixarna och positiv kontroll-reagenserna innehåller Tris EDTA-buffert och den positiva kontrollen innehåller bärar-Poly A RNA.

Analyser

therascreen KRAS RGQ PCR Kit består av en procedur i 2 steg. I det första steget utförs kontrollanalysen för att bedöma den totala mängden amplifierbart KRAS DNA i ett prov. I det andra steget utförs både mutations- och kontrollanalyser för att bestämma förekomst eller frånvaro av mutant-DNA.

Kontrollreaktion

CTRL använder en Scorpions-primer och en omärkt primer för att amplifiera en kort sekvens av exon 4 i KRAS-genen. Kontrollreaktionen används för att bestämma om en lämplig nivå amplifierbart DNA finns i provet och är en faktor som används vid analytiska beräkningar för att bestämma mutationsstatus.

Kontrollanalys

Kontrollanalysen, märkt med FAM, används för att bedöma den totala mängden amplifierbart KRAS DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 4 i KRAS-genen. Primrarna och Scorpions-proben är utformade för att amplifiera oberoende av alla kända KRAS-polymorfismer.

Mutationsanalys

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

Kontroller

Obs! Alla experimentkörningar måste innehålla positiva och negativa kontroller.

Internkontroll

Varje reaktionsmix innehåller en internkontroll utöver målreaktionen. Ett misslyckande indikerar antingen förekomst av hämmare som kan leda till ett felaktigt resultat eller en felaktig hantering av det aktuella röret vid förberedelsen. Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämmarna. Observera dock att detta även leder till spädning av mål-DNA. Ett rör med vatten för spädning av prov (Dil.) ingår i kitet. Spädning av prover måste utföras med vattnet för spädning av prov (Dil.).

Positiv kontroll

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1-5. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit innehåller KRAS-positiv kontroll (Positive Control, PC) som ska användas som mall i den positiva kontrollreaktionen. De positiva kontrollresultaten bedöms för att garantera att kitet fungerar inom de angivna acceptanskriterierna.

Negativ kontroll

Varje körning måste innehålla en negativ kontroll ("kontroll utan mall") i rör 9–13. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit innehåller vatten för NTC (No Template Control, NTC) som ska användas som "mall" i kontrollen utan mall. Kontrollen utan mall används för att bedöma potentiell kontaminering under körningskonfigurationen samt för att bedöma effekten hos internkontrollreaktionen.

Provbedömning

Kontrollreaktionsmixen (CTRL) som medföljer *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit används för att bedöma den totala mängden amplifierbart KRAS DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 4 i KRAS-genen. Vi rekommenderar iordningställande av prover med endast kontrollanalysen och att använda KRAS-positiv kontroll (Positive Control, PC) som en positiv kontroll och vatten för NTC som kontroll utan mall.

Plattform och programvara

therascreen KRAS RGQ PCR Kit är särskilt utformat för att användas med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Programmet Rotor-Gene Q och *therascreen* KRAS Assay Package kan laddas ned från webben och finns även på CD-skiva.

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenten måste underhållas enligt instruktionerna i användarhandboken till instrumentet. I användarhandboken finns information som rör instrumentet.

Instruktioner för installation finns i Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package.

Material som medföljer

Kitinnehåll

therascreen KRAS RGQ PCR Kit				
Katalognr		Röridentifiering		(24)
Antal beredningar				874011
Färg	Identitet			24
				Volym
Röd	Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix)	1	CTRL	2 × 600 µl
Lila	12ALA Reaction Mix (12ALA-reaktionsmix)	2	12ALA	600 µl
Orange	12ASP Reaction Mix (12ASP-reaktionsmix)	3	12ASP	600 µl
Rosa	12ARG Reaction Mix (12ARG-reaktionsmix)	4	12ARG	600 µl
Grön	12CYS Reaction Mix (12CYS-reaktionsmix)	5	12CYS	600 µl
Gul	12SER Reaction Mix (12SER-reaktionsmix)	6	12SER	600 µl
Grå	12VAL Reaction Mix (12VAL-reaktionsmix)	7	12VAL	600 µl
Blå	13ASP Reaction Mix (13ASP-reaktionsmix)	8	13ASP	600 µl
Beige	KRAS Positive Control (KRAS-positiv kontroll)	9	PC	250 µl
Mint	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeras)		Taq	80 µl
Vit	Water for NTC (vatten för NTC)		NTC	1,9 ml
Vit	Water for Sample Dilution (vatten för spädnings av prov)		Dil.	1,9 ml
<i>Handbok för therascreen KRAS RGQ PCR Kit (handbok på engelska)</i>				1

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Reagenser

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 56404; se DNA-extraktion)
- Xylen
- Etanol (96–100 %)*

Förbrukningsprodukter

- Sterila pipettspetsar med filter (för att undvika korskontaminering rekommenderar vi pipettspetsar med aerosolbarriär)
- Sterila mikrocentrifugrör för beredning av huvudmixar
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps för användning med 72-Well Rotor (kat.nr 981103 eller 981106)

Utrustning

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Yellow (detektion av FAM respektive HEX)
- Programmet Rotor-Gene Q version 2.3 med KRAS Assay Package (version 3.1.1) installerat för automatisk mutationsdetektion (se Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package).

* Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon.

Obs! Programmet Rotor-Gene Q kan användas utan KRAS Assay Package för manuell mutationsdetektion. Se Bilaga 1: Manuellt protokoll för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

- Termomixer*, uppvärmd skakinkubator, värmeblock eller vattenbad som klarar inkubering på 56 °C och 90 °C
- Bänkcentrifug† med rotor för 1,5 ml-rör
- Bänkstående vortexblandare†
- Särskilda pipetter (justerbara) för provberedning†
- Särskilda pipetter (justerbara) för beredning av PCR-huvudmix*
- Särskilda pipetter (justerbara) för dosering av DNA-mall*

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

† Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon.

Varningar och försiktighetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

Säkerhetsinformation

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

Allmänna säkerhetsåtgärder

Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- Förvara och extrahera positivt material (prover och positiva kontroller) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem till reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Iakttag största försiktighet för att förhindra att PCR kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial. Vi rekommenderar att separata, för ändamålet avsedda pipetter används för iordningställande av reaktionsmixer och tillsats av DNA-mall. Beredning och fördelning av reaktionsmixer ska utföras i ett område avskilt från området där mallen tillsätts. Rotor-Gene Q-rör får inte öppnas efter att PCR-körningen har avslutats. Detta för att förhindra laboratoriekontaminering från produkter efter PCR-körningen.
- Reagenserna till *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit har spänts ut optimalt. Vi rekommenderar inte ytterligare spädning av reagenser då det kan resultera i förlorad prestanda. Vi rekommenderar inte användning av reaktionsvolymmer mindre än 25 µl då det ökar risken för falskt negativa resultat.
- Alla reagenser i *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit har utformats särskilt för optimal effekt. Alla reagenser som medföljer kitet är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser i samma *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. För att bästa effekt ska kunna garanteras får kitets reagenser inte bytas ut mot något annat reagens.

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

Förvaring och hantering av reagenser

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

therascreen KRAS RGQ PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 till -15 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus. Liksom alla fluorescensmärkta molekyler måste Scorpions skyddas mot ljus för att undvika fotoblekning och förlorad prestanda.

Vid förvaring under de rekommenderade förvaringsvillkoren i originalförpackningen är *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte 6 frys-/upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna.

Provtagning, förberedelse för analys och förvaring

Obs! Alla prover måste behandlas som potentiellt smittbärande material.

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

Tumörprover är olikartade och data från ett tumörprov kanske inte stämmer överens med andra sektioner från samma tumör. Tumörprover kan även innehålla tumörfri vävnad. DNA från tumörfri vävnad förväntas inte innehålla mutationer som detekteras av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Beredning av vävnadsprover

Obs! Använd torra skalpell. Utför inte det här steget i en huv för laminärt flöde eller i ett dragskåp.

- Skrapa ned tumörvävnaden från snitten i märkta mikrocentrifugrör med hjälp av en ny skalpell för varje prov.

Beredning av vävnadsprover för DNA-extraktion (CRC)

- Använd standardmaterial och -metoder och fixera vävnadsprovet i 10 % neutralbuffrat formalin (NBF) och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av en mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- En utbildad person (t.ex. en patolog) ska bedöma tumörinnehåll och utbredning på ett H&E-färgat (Hematoxylin & Eosin) snitt. Markera det färgade objektglaset för att kunna skilja tumörvävnad från normal vävnad. Använd seriesnitt för DNA-extraktion.
- Använd snitt med > 20 % tumörinnehåll för bearbetning utan makrodissektion (se nedan).
- För snitt med < 20 % tumörinnehåll: Makrodissekera ett eller flera snitt. Kassera tumörfri vävnad.

- För snitt med en yta på < 4 mm²: Bearbeta två eller fler snitt för att öka den totala tumörytan till minst 4 mm² (gäller prover både med och utan makrodissektion). Kassera tumörfri vävnad.
- Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnaden med en ny, steril skalpell.

Beredning av vävnadsprover för DNA-extraktion (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC)

- Använd standardmaterial och -metoder och fixera vävnadsprovet i 10 % NBF och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av en mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- En utbildad person (t.ex. en patolog) ska bedöma förekomst av tumör på ett H&E-färgat snitt. Använd seriesnitt för DNA-extraktion.
- Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnaden med en ny, steril skalpell.

Förvaring

Förvara FFPE-block och objektglas i rumstemperatur. Objektglas kan förvaras i rumstemperatur i upp till 4 veckor innan DNA-extraktion.

Genomiskt DNA kan förvaras i 2–8 °C i 1 vecka efter extraktion, och sedan i -25 till -15 °C i upp till 8 veckor innan användning.

Procedur

DNA-extraktion

Testegenskaper för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit togs fram med hjälp av DNA som extraherats med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 56404). Om du använder QIAamp DNA FFPE Tissue Kit utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande.

DNA-extraktion (CRC-prover)

- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit får endast användas manuellt.
- Använd inte RNase-steget som beskrivs i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Använd inte QIAGEN deparaffinization solution (deparaffiniseringslösning). Använd endast xylene-/etanolmetoden för deparaffinisering enligt beskrivningen i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 11 i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) måste utföras i 1 timme.
- Proverna måste elueras med hjälp av 200 µl elueringsbuffert (Buffer ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

DNA-extraktion (NSCLC-prover)

- Använd 2 × 5 µm-snitt per extraktion.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit får endast användas manuellt.
- Använd inte RNase-steget som beskrivs i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Använd inte QIAGENs deparaffineringslösning som medföljer i QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Använd endast xylene-/etanolmetoden för deparaffinering enligt beskrivningen i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 11 i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) måste utföras i 1 timme.
- Tillsätt 60 µl elueringsbuffert (ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit och inkubera i 2,5 minuter i rumstemperatur.
- Centrifugera i full hastighet i 1 minut.
- Tillsätt ytterligare 60 µl elueringsbuffert (ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit och inkubera i 2,5 minuter i rumstemperatur.
- Centrifugera i full hastighet i 1 minut.

Protokoll: Bedömning av DNA-prover

Det här protokollet ska användas vid bedömning av den totala mängden amplifierbart DNA i prover med KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) för automatisk provanalys.

Obs! Information om manuell bedömning av prover finns i Bilaga 1: Manuellt protokoll för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Viktigt att tänka på före start

- Upp till 24 prover kan bedömas med den tillgängliga CTRL:en.
- Använd CTRL för att bedöma DNA innan testning.

Obs! Det är viktigt att använda CTRL enligt beskrivningen nedan för den här bedömningen och inte spektrofotometri eller någon annan metod. Kraftigt nedbrutet DNA kanske inte amplifieras fastän primrarna genererar korta DNA-fragment.

- För effektiv användning av reagenserna i *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ska DNA-proverna indelas i batcher i så stor utsträckning som möjligt för att skapa fullständiga körningar. Testning av enskilda prover eller ett mindre antal prover ökar förbrukningen av reagenser och minskar det totala antal prover som kan testas med ett enda *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Kontrollera att rätt version av programmet *therascreen* KRAS Assay Package som motsvarar versionen på programmet Rotor-Gene Q är installerat innan instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM används första gången (se Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package).

Procedur

1. Tina kontrollreaktionsmixen (CTRL-provröret), nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (No Template Control, NTC) och KRAS-positiv kontroll (Positive Control, PC) i rumstemperatur (15-30 °C) fullständigt i minst 1 timme.

Obs! Se till att Taq DNA-polymeras (Taq) har rumstemperatur (15–30 °C) samtidigt som de andra reagenserna (se Förvaring och hantering av reagenser). Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

Tiderna för upptining av reagenser, PCR-konfiguration och förvaring innan start av körningen anges i tabell 2.

Obs! Utför PCR-konfiguration i rumstemperatur.

Tabell 2. Upptiningstid, tider för PCR-konfiguration och förvaringstemperaturer

Min.	Upptiningstid		Förvaringstemperatur* efter PCR-konfiguration	Maximal tid för PCR- konfiguration och förvaring
		Max		
1 timme		4,5 timmar	Rumstemperatur (15-30 °C)	7 timmar
1 timme		4,5 timmar	2-8 °C	18 timmar

* Termen förvaring avser tiden mellan slutförande av PCR-konfigurationen och start av PCR-körningen på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

2. Blanda de tinade reagenserna genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer, och centrifugera sedan en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.

Obs! Vortexblanda inte Taq DNA-polymeras (Taq) eller någon mix som innehåller Taq, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.

3. Bered tillräckligt med huvudmixar (kontrollreaktionsmix (CTRL) plus Taq DNA-polymeras (Taq)) enligt volymerna som anges i tabell 3 för följande:

- alla DNA-proverna
- 1 KRAS-positiv kontrollreaktion (Positive Control, PC)
- 1 nukleasfritt vatten för kontroll utan mall-reaktion (No Template Control, NTC)
- 1 extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen

Huvudmixen innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Tabell 3. Beredning av huvudmix för kontrollanalys

Komponent	Volym
Kontrollreaktionsmix (CTRL)	19,76 $\mu\text{l} \times (n + 1)^*$
<i>Taq</i> DNA-polymeras (<i>Taq</i>)	0,24 $\mu\text{l} \times (n + 1)^*$
Total volym	20 μl /reaktion

* n = antal reaktioner (prover plus kontroller).

Bered tillräckligt med huvudmix för ett extra prov (n+1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Värdet n ska inte överstiga 24 (plus kontroller) eftersom 24 är det maximala antalet prover som får plats i en körning.

Obs! Vid beredning av huvudmixen tillsätts den volym Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL) som krävs till det aktuella röret först och *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) tillsätts sist.

Obs! Pipettera *Taq* DNA-polymeras genom att försiktigt placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.

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

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

Tabell 4. Körningslayout i laddningsblocket för bedömning av DNA-prover

Analys									
Kontroll	1 (PC)	9	17	25	-	-	-	-	-
Kontroll	2 (NTC)	10	18	26	-	-	-	-	-
Kontroll	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Kontroll	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Kontroll	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Kontroll	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Kontroll	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Kontroll	8	16	24	-	-	-	-	-	-

* Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

- Ställ in en pipett på en volym som är lägre än den totala volymen för reaktionshuvudmixen och blanda noga genom att aspirera upp och ned fullständigt 10 gånger.
- Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje PCR-rör.
Obs! I tabell 4 anges layouten för röret. För bedömning av DNA-prover ska huvudmix för kontrollanalys tillsättas i ett PC-rör, ett NTC-rör och i ett rör för varje DNA-prov.
- Tillsätt omedelbart 5 µl nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (No Template Control, NTC) i NTC-röret (rörposition 2) och förslut röret.
- Tillsätt 5 µl av varje DNA-prov i provrören (rörpositionerna 3–26) och förslut rören.
- Tillsätt 5 µl KRAS-positiv kontroll (Positive Control, PC) i PC-röret (rörposition 1) och förslut röret.

Varje rör ska innehålla en total reaktionsvolym på 25 µl (20 µl huvudmix som har beretts enligt tabell 3, plus 5 µl NTC/prov/PC).

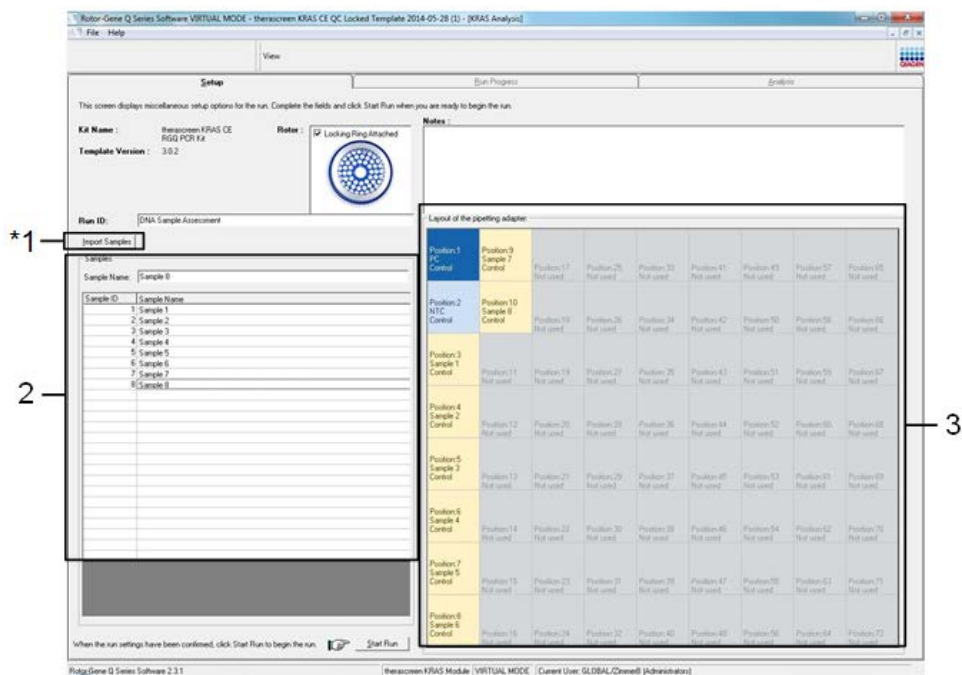
10. Använd en spritpenna och markera locken till de första rören i den lägsta numeriska positionen i varje PCR 4-rör (t.ex. positionerna 1, 5 och 9 etc.) för att visa i vilken riktning rören ska laddas i rotorn med 72 brunnar på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
11. Vänd de förslutna rören 4 gånger för att blanda provet och reaktionsmixen.
12. Placera alla PCR 4-rören i rätt position i rotorn med 72 brunnar enligt körningslayouten (tabell 4) med hjälp av riktningssmarkeringarna.

Obs! Om rotorn inte är fullbelagd måste alla oanvända positioner på rotorn fyllas med ett förslutet, tomt rör. Detta gör att den termiska effektiviteten på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM säkerställs.
13. Placera omedelbart rotorn med 72 brunnar i instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Kontrollera att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.
14. Dubbelklicka på ikonen *therascreen KRAS QC Locked Template* (*therascreen KRAS QC låst mall*) på skrivbordet på den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (bild 1) för att starta Rotor-Gene Q-programvaran.



Figur 1. Ikonen "therascreen KRAS QC Locked Template" (therascreen KRAS QC låst mall).

Fliken "Setup" (Konfiguration) visas som standard (bild 2).



Figur 2. Fliken "Setup" (Konfiguration) och rutan "Locking Ring Attached" (Låsring fast). 1 = fliken "Setup" (Konfiguration), 2 = rutan "Locking Ring Attached" (Låsring fast).

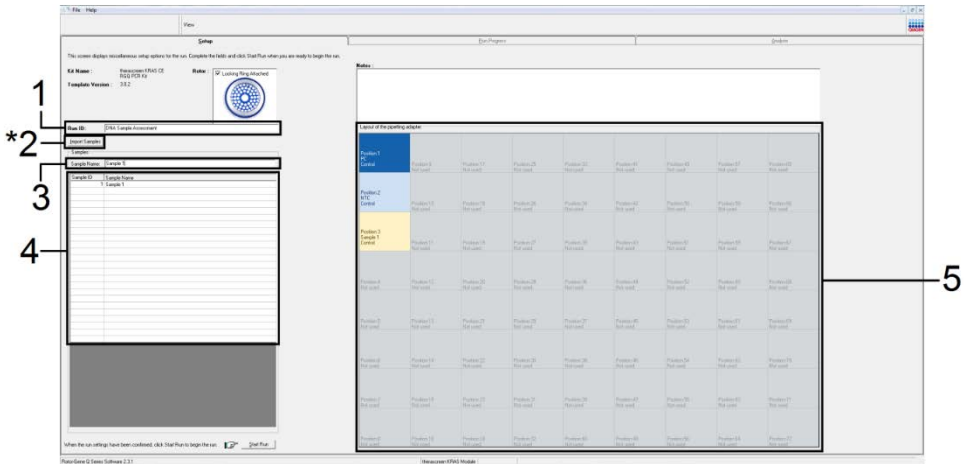
15. Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" (Låsring fast). Stäng locket på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
16. Skriv in körnings-ID i fältet Run ID (Körnings-ID) enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i fältet Sample Name (Provnamn) enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten.

Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" (Prov-ID) (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn) på höger sida med provnamnet (bild 3).

Alternativt kan provnamn som sparats i formatet *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaseparerade värden) importeras via knappen Import Samples (Importera prover). Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden.

Obs! Kontrollera i panelen Layout of the pipetting adapter (Layout för pipetteringsadaptorn) att provnamnet som har lagts till är markerat genom en ändring av färgen och att provnamnet är i provpositionen (Bild 3).

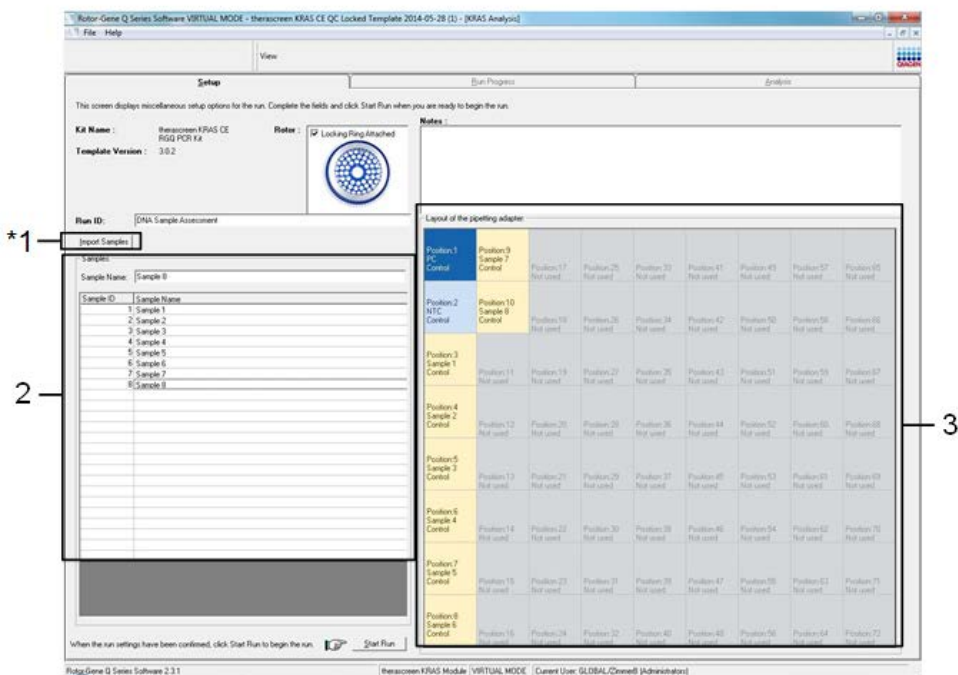
Obs! Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn).



Figur 3. Ange "Run ID" (Körnings-ID) och "Sample Name" (Provnamn). 1 = fältet "Run ID" (Körnings-ID), 2 = knappen "Import Samples" (Importera prover), 3 = fältet "Sample Name" (Provnamn), 4 = Provlista, 5 = panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn).

17. Upprepa steg 16 för att ange namnen på alla ytterligare prover (bild 4).

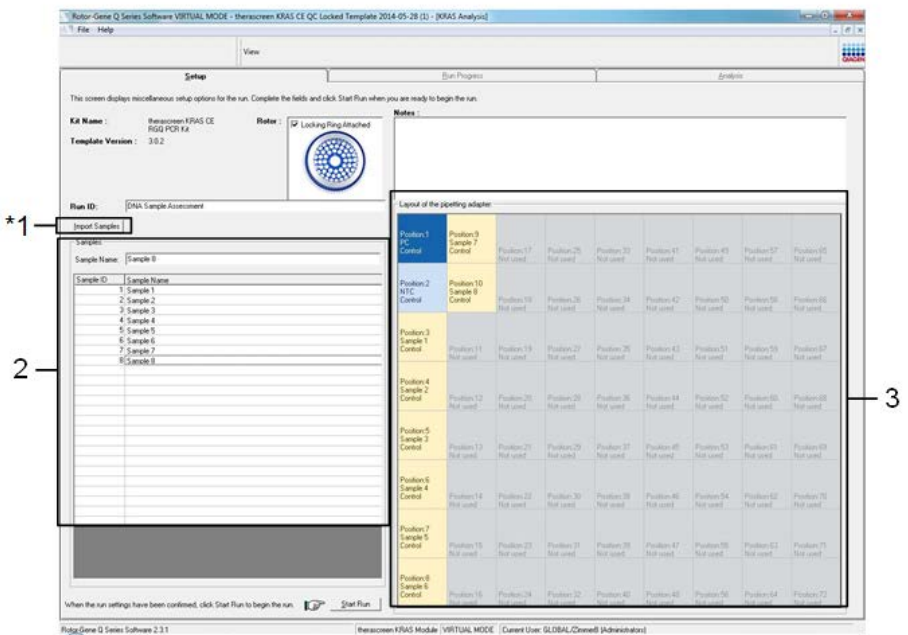
Obs! Om du vill redigera ett provnamn klickar du på "Sample Name" (Provnamn) i provlistan så visas det valda provet i dialogrutan "Sample Name" (Provnamn) ovanför. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten för att uppdatera namnet.



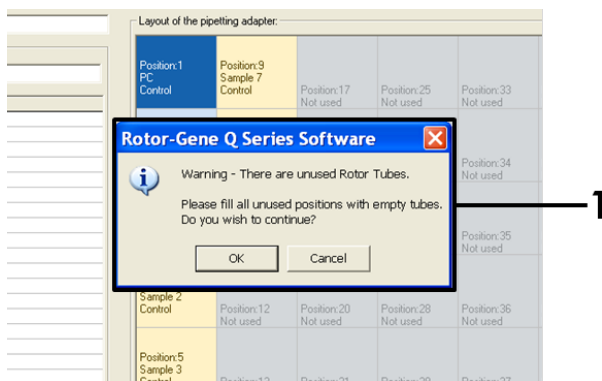
Figur 4. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" (Provnamn). *1 = knappen "Import Samples" (Importera prover), 2 = fältet "Sample Name" (Provnamn) och provlista, 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout av pipetteringsadaptern) med ytterligare provnamn.

18. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i fältet Notes (Anteckningar) om det behövs och klicka sedan på Start Run (Starta körning) (bild 5).

Obs! Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" (Varning) (bild 5 och bild 6) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med ett förslutet, tomt rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med ett förslutet, tomt rör och klicka på OK för att fortsätta.

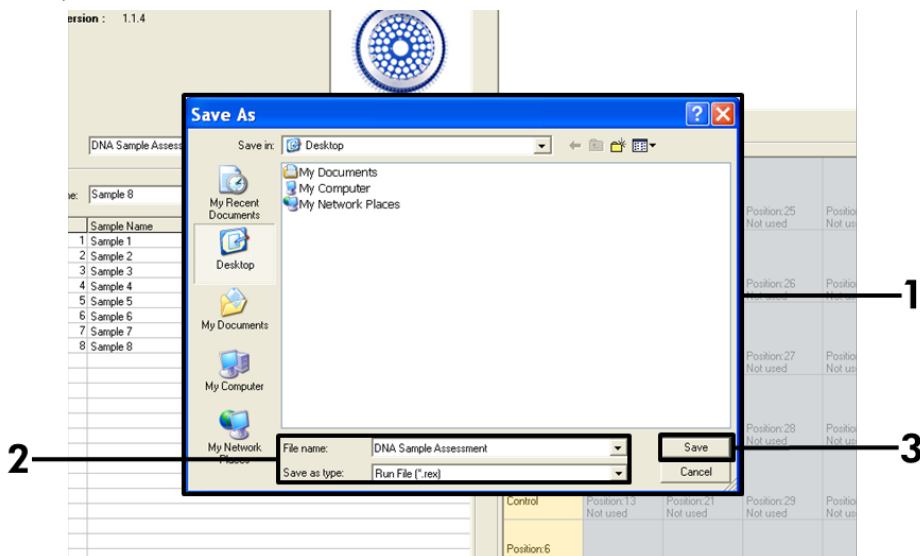


Figur 5. Fältet "Notes" (Anmärkning), "Start Run" (Starta körning) och "Warning" (Varning) för oanvända rotorpositioner.



Figur 6. 1 = "Warning" (Varning) för oanvända rotorpositioner.

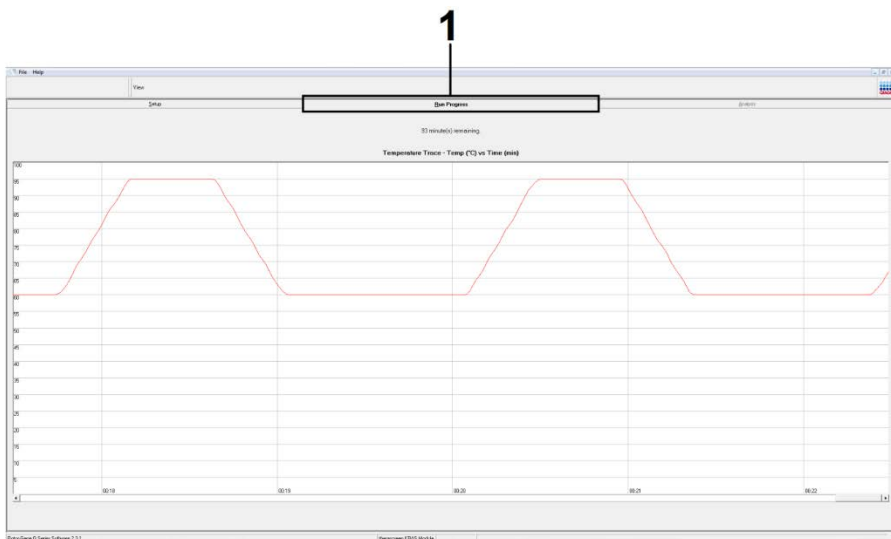
19. Ett "Save As"-fönster (Spara som) visas. Välj ett lämpligt filnamn och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen. Klicka på Save (Spara) (bild 7).



Figur 7. Spara körningsfilen. 1 = fönstret "Save As" (Spara som), 2 = fälten "File name" (Filnamn) och "Save as type" (Spara som typ) (*.rex-fil), 3 = knappen "Save" (Spara).

PCR-körningen startar.

Obs! När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" (Körningsförlopp) automatiskt för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (bild 8).



Figur 8. Fliken "Run Progress" (Körningsförlopp).

När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" (Analys) automatiskt.

Obs! Om fliken "Analysis" (Analys) inte öppnas klickar du på fliken "Analysis" (Analys) (bild 9).

Obs! En förklaring av beräkningsmetoden ges i "Interpretation of Results" (tolkning av resultat).

Tube ID	Sample Name	Control Assay Ct	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	26.50	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	03771070B	29.39	-	Valid
4	03771071B	27.38	-	Valid
5	03771072B	30.07	-	Valid
6	03771073B	25.53	-	Valid
7	03771074B	29.55	-	Valid
8	03771075B	28.45	-	Valid
9	03771076B	29.95	-	Valid
10	03771077B	29.02	-	Valid
11	03771078B	31.42	-	Valid
12	03771079B	28.93	-	Valid
13	03771081B	29.60	-	Valid
14	03771082B	31.44	-	Valid
15	03771083B	31.02	-	Valid
16	03771084B	29.09	-	Valid
17	03771085B	29.91	-	Valid
18	03771087B	30.33	-	Valid
19	03771088B	30.22	-	Valid
20	03771089B	27.17	-	Valid
21	03771090B	29.67	-	Valid
22	03771091B	29.32	-	Valid
23	03771092B	29.22	-	Valid
24	03771093B	29.57	-	Valid
25	03771094B	29.80	-	Valid
26	03771095B	30.41	-	Valid

Figur 9. Fliken "Analysis" (Analys) och rapportering av resultat. 1 = fliken "Analysis" (Analys), 2 = "QC Sample Result Table" (Tabell med QC-provresultat).

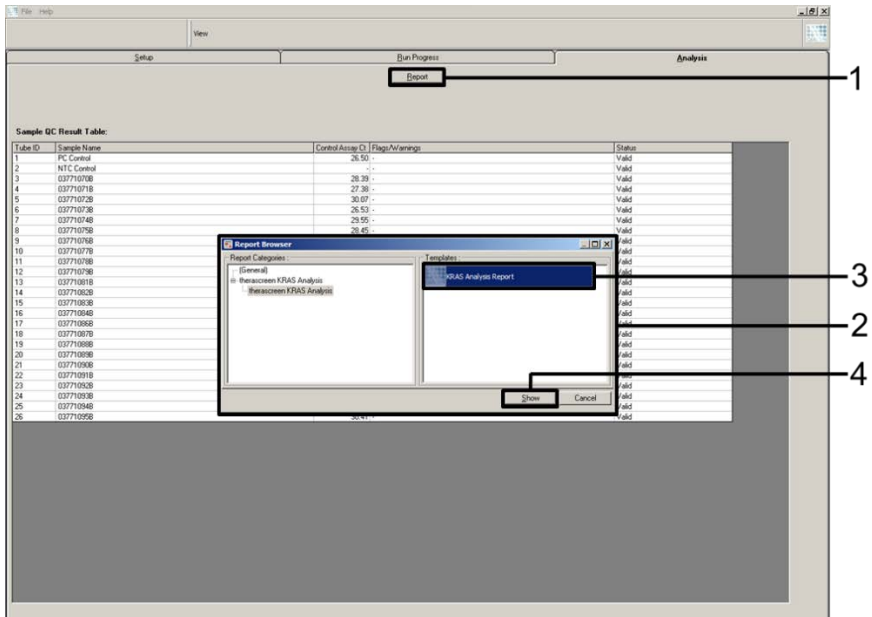
Obs! Kontrollresultat rapporteras på följande sätt i "Sample QC Result Table" (Tabell med QC-provresultat) (2 i bild 9).

- Körningskontroller (PC och NTC, rörpositioner 1 respektive 2): Om resultaten ligger inom acceptabla intervaller visas "Valid" (Giltigt). Annars visas ett resultat med statusen "Invalid" (Ogiltigt).
- C_T -värde för provets kontrollreaktion $> 32,00$: "Invalid" (Ogiltigt) visas. Mängden DNA är inte tillräcklig för mutationsanalys. Testa om provet. Om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du mer tumörvävnad om det finns tillgängligt (se "Felsökningshandbok").
- C_T -värde för provets kontrollreaktion $< 21,92$: "Invalid" (Ogiltigt) visas. DNA-koncentrationen är för hög för mutationsanalys. Späd med nukleasfritt vatten för spädning (Dil.) och gör om testet. Späd till ett C_T -värde på $21,92-32,00$. En 1:1-spädning ökar C_T -värdet med ca 1,0.
- Ett C_T -värde för provets kontrollreaktion på $21,92-32,00$ ($21,92 \leq \text{kontroll-}C_T \leq 32,00$): "Valid" (Giltigt) visas, DNA-koncentrationen är lämplig för mutationsanalys.

Obs! Om det behövs en ny extraktion eller spädning upprepar du kontrollreaktionen för att bekräfta att DNA-koncentrationen är lämplig för användning.

20. Klicka på Report (Rapport) för att skapa rapportfiler. Fönstret "Report Browser" (Rapportmeny) visas. Select KRAS Analysis Report (KRAS-analysrapport) under mallar och klicka på Show (Visa) (bild 10).

Obs! Du kan spara rapporter på en annan plats i formatet Web Archives genom att klicka på Save As (Spara som) i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



Figur 10. Välja "KRAS Analysis Report" (KRAS-analysrapport). 1 = "Report" (Rapport), 2 = fönstret "Report Browser" (Rapportmeny), 3 = alternativet "KRAS Analysis Report" (KRAS-analysrapport), 4 = "Show" (Visa).

Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer

Detta protokoll är avsett för detektion av KRAS-mutationer.

Viktigt att tänka på före start

- Ett prov kan testas med KRAS-mutationsanalyserna när det har klarat provbedömningen.
- För effektiv användning av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit måste prover grupperas i en batchstorlek på 7 (för att fylla rotorn med 72 brunnar). Mindre batchstorlekar innebär att färre prover kan testas med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.
- Kontrollera att rätt version av programmet *therascreen* KRAS Assay Package som motsvarar versionen på programmet Rotor-Gene Q är installerat innan instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM används första gången (se Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package).

Procedur

1. Märk 8 mikrocentrifugrör (medföljer inte) enligt de motsvarande reaktionsmixarna som visas i tabellen nedan. Bered tillräckligt med huvudmixar (kontroll- eller mutationsreaktionsmix (CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL eller 13ASP) plus *Taq* DNA-polymeras (*Taq*)) för DNA-proverna, en KRAS-positiv kontrollreaktion (rör-PC) och en nukleasfritt vatten för kontroll utan mall-reaktion (NTC) enligt volymerna i tabellen. Inkludera reagenser för 1 extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen. Huvudmixarna innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Analys- och reaktionsmixrör	Volym reaktionsmix	Volym av Taq DNA-polymeras
Kontroll (rör-CTRL)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ALA (rör 12ALA)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ASP (rör 12ASP)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12ARG (rör 12ARG)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12CYS (rör 12CYS)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12SER (rör 12SER)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
12VAL (rör 12VAL)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)
13ASP (rör 13ASP)	19,76 µl x (n + 1)	0,24 µl x (n + 1)

* n = antal reaktioner (prover plus kontroller).

Bered tillräckligt med huvudmix för 1 extra prov (n + 1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen. Värdet n ska inte överstiga 7 (plus kontroller) eftersom 7 är det maximala antalet prover som får plats i en körning.

2. Blanda de tinade reagenserna genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer. Centrifugera en kort stund för att samla upp innehållet i botten av röret.
3. Ställ in en pipett på en volym som är lägre än den totala volymen för reaktionsmixen och blanda huvudmixarna noga genom att aspirera upp och ned fullständigt 10 gånger.
4. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje aktuellt PCR-rör.

Obs! I tabell 5 finns layouten för röret vid konfigurering av reaktionsmixarna. För detektion av KRAS-mutationerna ska huvudmixarna läggas till i 8 PC-rör, 8 NTC-rör och 8 rör för varje DNA-prov.

Tabell 5. Körningslayout i laddningsblocket för detektion av KRAS-mutationer

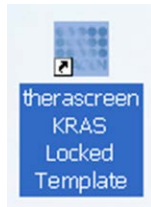
Analys	Kontroller		Provnummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	1*	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
13ASP	8	16	24	32	40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

* Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

5. Tillsätt omedelbart 5 µl nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (No Template Control, NTC) i NTC-rören (rörposition 9–16) och förslut rören.
6. Tillsätt 5 µl av varje DNA-prov i provrören (rörpositionerna 17-72) och förslut rören.
7. Tillsätt 5 µl KRAS-positiv kontroll (Positive Control, PC) i PC-rören (rörpositionerna 1–8) och förslut rören.
8. Använd en spritpenna och markera locken till de första rören i den lägsta numeriska positionen i varje PCR 4-rör (t.ex. positionerna 1, 5 och 9 etc.) för att visa i vilken riktning rören ska laddas i rotorn med 72 brunnar på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Vänd de förslutna rören 4 gånger för att blanda provet och reaktionsmixin.
10. Placera alla PCR 4-rören i rätt position i rotorn med 72 brunnar enligt körningslayouten (tabell 5) med hjälp av riktningsmarkeringarna.

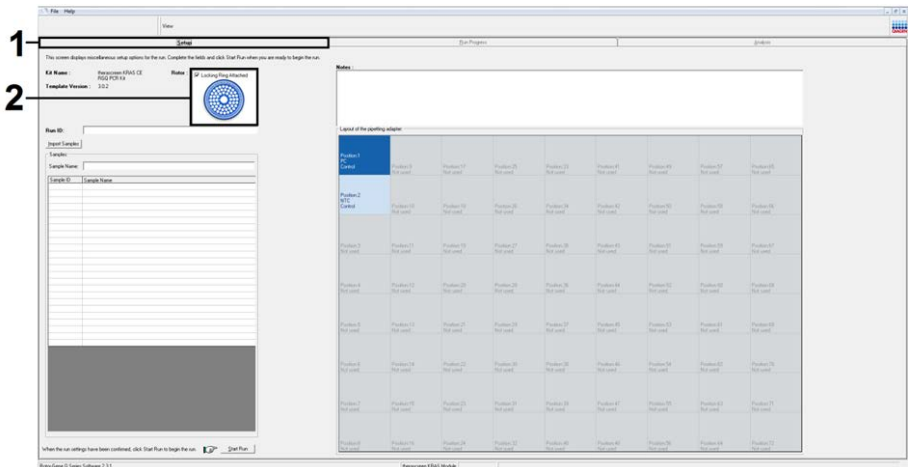
Obs! Maximalt 7 prover kan inkluderas i varje PCR-körning. Om rotorn inte är fullbelagd måste alla oanvända positioner på rotorn fyllas med ett förslutet, tomt rör. Detta gör att den termiska effektiviteten på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM säkerställs.

- 11. Placera omedelbart rotorn med 72 brunnar i instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Se till att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.
- 12. Dubbelklicka på ikonen theascreen KRAS Locked Template (therascreen KRAS låst mall) på skrivbordet till den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (bild 11) för att starta programvaran för Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.



Figur 11. Ikonen "therascreen KRAS Locked Template" (therascreen KRAS låst mall).

Fliken "Setup" (Konfiguration) visas som standard (bild 12).



Figur 12. 1 = fliken "Setup" (Konfiguration), 2 = rutan "Locking Ring Attached" (Låsring fast).

13. Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera kryssrutan Locking Ring Attached (Låsring fast). Stäng locket på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
14. Skriv in körnings-ID i fältet Run ID (Körnings-ID) enligt din lokala namnkonvention.
15. Skriv in provnamnet i fältet Sample Name (Provnamn) enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten.

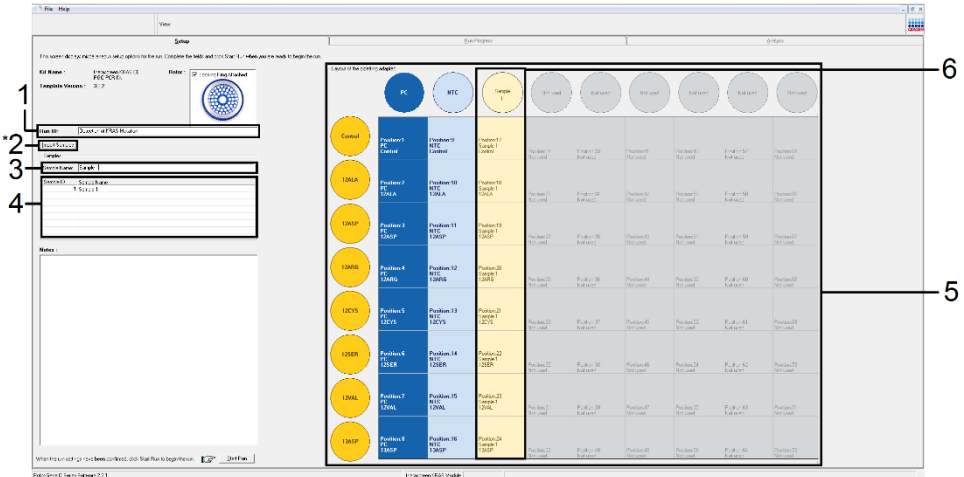
Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" (Prov-ID) (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn) på höger sida med provnamnet (bild 13).

Obs! Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn) att provnamnet som har lagts till är markerat genom en ändring av färgen och att alla 8 analyserna i kolumnen under provcirkeln är markerade (bild 13).

Obs! Maximalt 7 prover kan läggas till. Prov-ID (i provcirkelarna) kommer automatiskt att tilldelas från 1 till 7.

Obs! Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn).

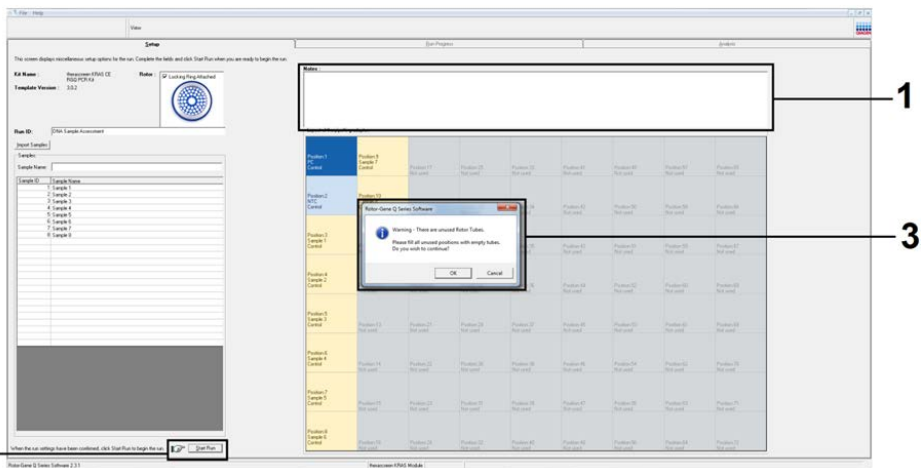
Alternativt kan provnamn som sparats i formatet *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaseparerade värden) importeras via knappen Import Samples (Importera prover). Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden.



Figur 13. Ange "Run ID" (Körnings-ID) och "Sample Name" (Provnamn). 1 = fältet "Run ID" (Körnings-ID), 2 = "Import Samples" (Importera prover) (inte tillgängligt i programversion 2.1), 3 = fältet "Sample Name" (Provnamn), 4 = provlista, 5 = panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn), 6 = markerad provcirkel och kolumn med 8 analyser nedanför.

16. Upprepa steg 14 för att ange namnen på alla ytterligare prover (bild 14).

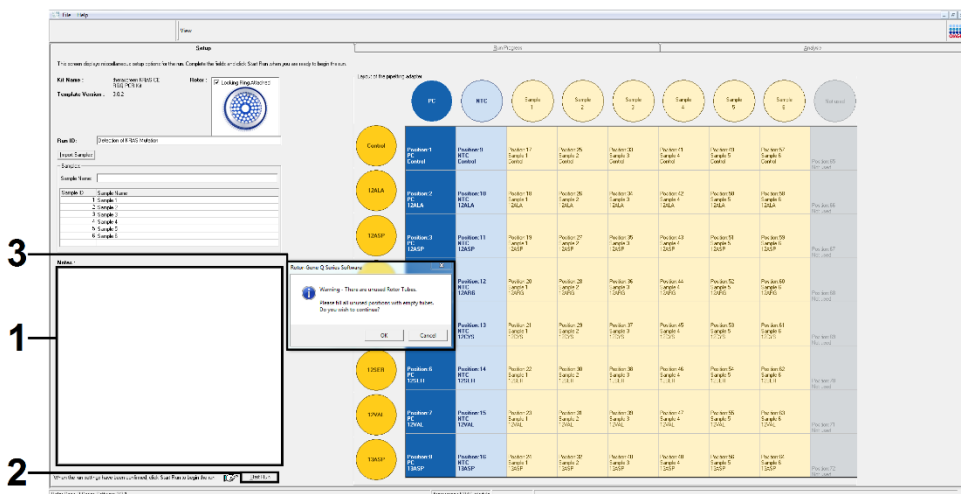
Obs! Om du vill redigera ett provnamn klickar du på Sample Name (Provnamn) i provlistan så visas det valda provet i fältet Sample Name (Provnamn) ovanför. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten för att uppdatera namnet.



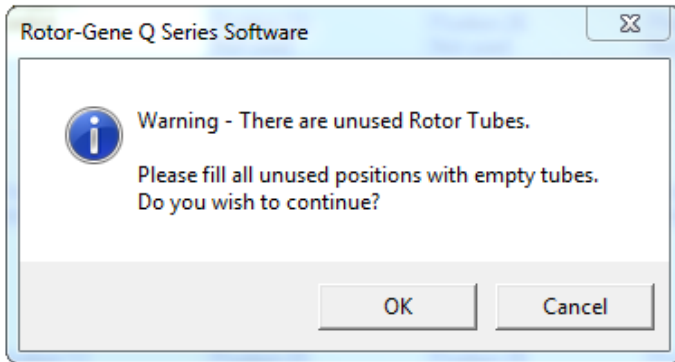
Figur 14. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" (Provnamn). 1 = fältet "Sample Name" (Provnamn), 2 = Provlista, 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" (Layout för pipetteringsadaptorn) med ytterligare provnamn.

17. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i fältet Notes (Anteckningar) om det behövs och klicka sedan på knappen Start Run (Starta körning) (bild 15).

Obs! Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" (Varning) (bild 15 och bild 16) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med ett förslutet, tomt rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med ett förslutet, tomt rör och klicka på OK för att fortsätta.

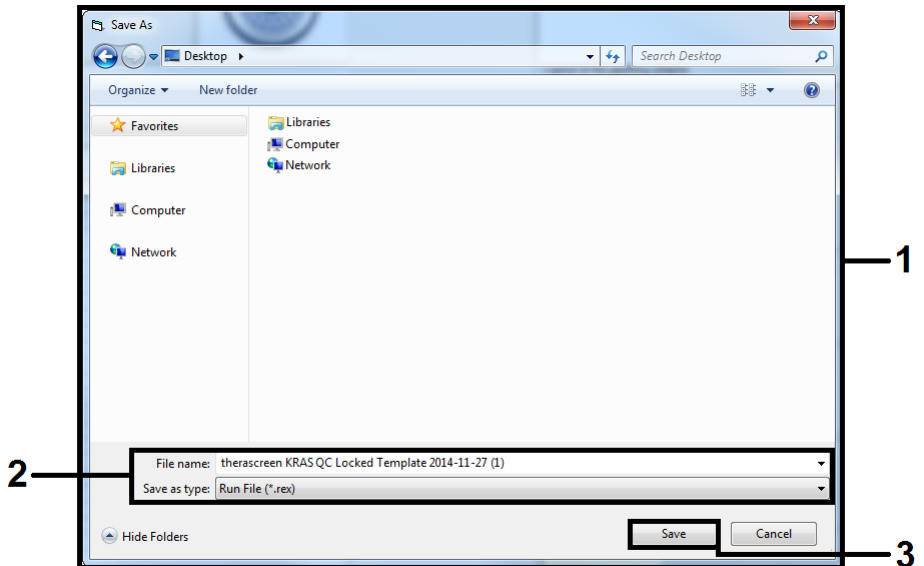


Figur 15. 1 = fältet "Notes" (Anteckningar), 2 = "Start Run" (Starta körning), 3 = "Warning" (Varning) för oanvända rotorpositioner.



Figur 16. "Warning" (Varning) för oanvända rotorpositioner.

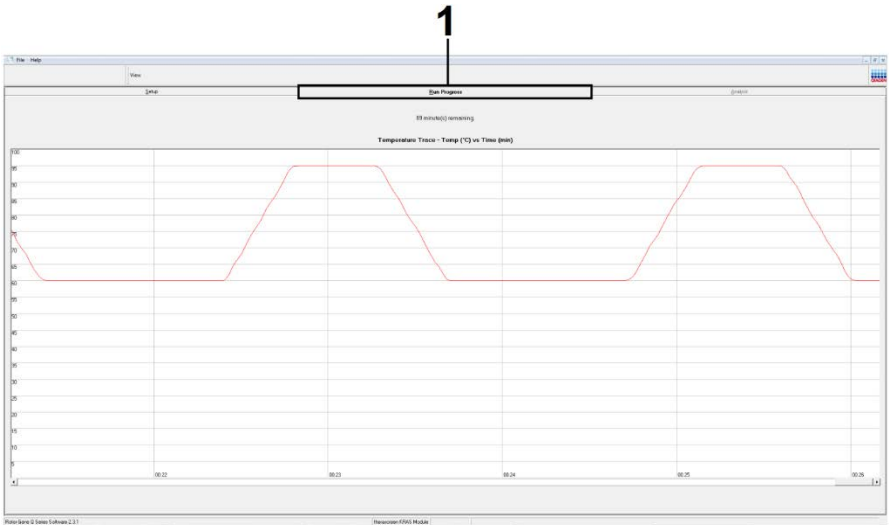
18. Välj ett lämpligt filnamn i fönstret Save As (Spara som) och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen (bild 17).



Figur 17. Spara körningsfilen.

PCR-körningen startar.

Obs! När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" (Körningsförlopp) automatiskt för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (bild 18).

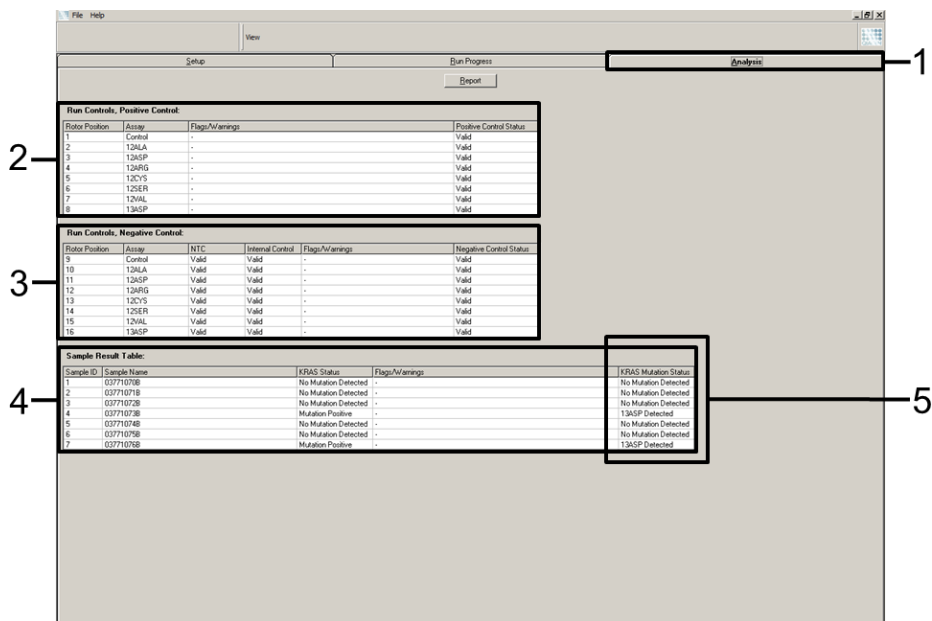


Figur 18. fliken "Run Progress" (Körningsförlopp).

När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" (Analys) automatiskt.

Obs! Om fliken "Analysis" (Analys) inte öppnas klickar du på fliken "Analysis" (Analys) (bild 19).

Obs! En förklaring av beräkningsmetoden ges i avsnittet "Resultattolkning".



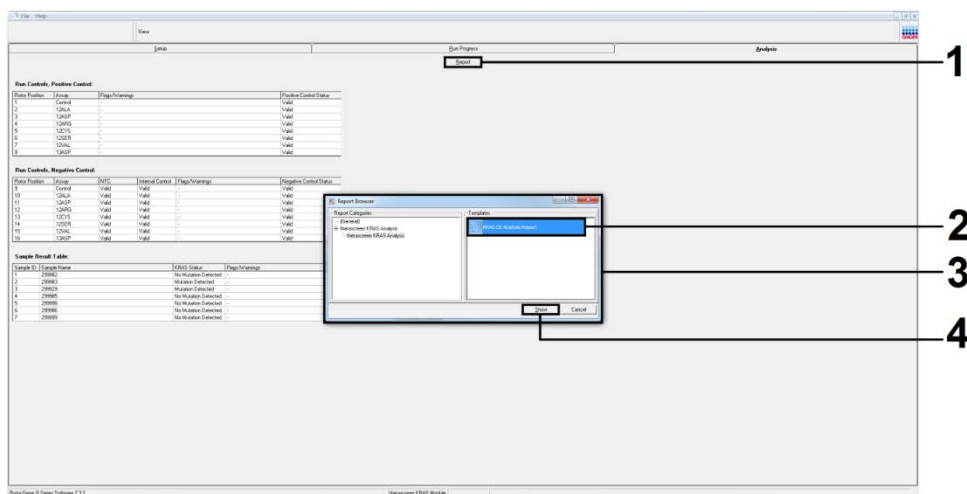
Figur 19. Fliken "Analysis" (Analys) och rapportering av resultat. 1 = fliken "Analysis" (Analys), 2 = panelen "Run Controls, Positive Control" (Körningskontroller, positiv kontroll), 3 = panelen "Run Controls, Negative Control" (Körningskontroller, negativ kontroll), 4 = "Sample Result Table" (Tabell med provresultat), 5 = kolumnen "KRAS Mutation Status" (KRAS-mutationsstatus).

Analysresultat rapporteras på följande sätt (bild 19):

- Panelen "Run Controls, Positive Control" (Körningskontroller, positiv kontroll). Om resultaten ligger inom det acceptabla intervallet visas "Valid" (Giltigt) för "Positive Control Status" (Status för positiv kontroll); annars visas ett resultat med statusen "Invalid" (Ogiltigt).
- Panelen "Run Controls, Negative Control" (Körningskontroller, negativ kontroll). Om både resultatet "NTC" och "Internal Control" (Internkontroll) ligger inom de acceptabla intervallen visas "Valid" (Giltigt) för "Negative Control Status" (Status för negativ kontroll); annars visas ett resultat med statusen "Invalid" (Ogiltigt).
- Panelen "Sample Result Table" (Tabell med provresultat). Specifika mutationer rapporteras för de mutationspositiva proverna i kolumnen "KRAS Mutation Status" (KRAS-mutationsstatus).

19. Klicka på Report (Rapport) för att skapa rapportfiler. Fönstret "Report Browser" (Rapportmeny) visas. Select KRAS Analysis Report (KRAS-analysrapport) under mallar och klicka på Show (Visa) (bild 20).

Obs! Du kan spara rapporter på en annan plats i formatet Web Archives genom att klicka på Save As (Spara som) i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



Figur 20. Välja "KRAS Analysis Report" (KRAS-analysrapport). 1 = "Report" (Rapport), 2 = fönstret "Report Browser" (Rapportmeny), 3 = alternativet "KRAS Analysis Report" (KRAS-analysrapport), 4 = "Show" (Visa).

Tolkning av resultat

Analysen och mutationsbestämningarna utförs automatiskt av *therascreen* KRAS Assay Package när en körning har slutförts. Följande information förklarar hur *therascreen* KRAS Assay Package gör analysen och mutationsbestämningarna.

Obs! Information om manuell analys finns i Bilaga 1: Manuellt *protokoll* för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

PCR-cykeln vid vilken fluorescensen från en viss reaktion går över ett tröskelvärde definieras som C_T -värdet. C_T -värdena indikerar mängden av ett specifikt input-DNA. Låga C_T -värden indikerar högre nivåer av input-DNA och höga C_T -värden indikerar lägre nivåer av input-DNA. Reaktionen med ett C_T -värde klassificeras som positiv amplifiering.

Programmet Rotor-Gene Q interpolerar fluorescenssignaler mellan 2 registrerade värden (vilka som helst). C_T -värdena kan därför vara vilket reellt tal som helst (inte begränsat till heltal) i intervallet från 0 till 40.

För *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit är tröskelvärdet inställt på 0,05 relativa fluorescensenheter. Det här värdet är konfigurerat i *therascreen* KRAS Assay Package för båda fluorescenskanalerna för Green och Yellow. Tröskelvärdet definierades under utvecklingen av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

En beräkning utförs för att bestämma ΔC_T -värdet med hjälp av ekvationen:

$$\Delta C_T = (\text{mutationsanalysens } C_T\text{-värde}) - (\text{kontrollanalysens } C_T\text{-värde})$$

Körningskontrollerna (positiv kontroll, NTC och internkontroller) bedöms för att säkerställa att acceptabla C_T -värden uppfylls och att reaktionerna utförs korrekt.

Provets ΔC_T -värden beräknas som differensen mellan mutationsanalysens C_T och kontrollanalysens C_T från samma prov. Prover klassas som mutationspositiva om de ger ett ΔC_T -värde lägre än eller lika med cutoff ΔC_T -värdet för den analysen. Över det här värdet kan provet antingen innehålla mindre än den procentandel mutation som kan detekteras av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (bortom gränsen för analyserna), eller så är provet mutationsnegativt vilket rapporteras som "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad).

Ingen amplifiering i mutationsreaktioner räknas som "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad). ΔC_T -värden som beräknas genom bakgrundsamplifiering förväntas vara större än cutoff ΔC_T -värdena och provet kommer att klassificeras som "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad).

Analysresultaten visas som "Mutation Positive" (Mutationspositiva), "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad), "Invalid" (Ogiltig) eller, om en körningskontroll misslyckas, "Run Control Failed" (Körningskontrollen misslyckades). För de mutationspositiva proverna rapporteras specifika mutationer.

Andra möjliga resultat som kan visas behandlas i "Protokoll: Bedömning av DNA-prover" i den här handboken.

I sällsynta fall kan en tumör innehålla mer än en mutation. I sådana fall kommer mutationen som ger det lägsta ΔC_T -värdet att identifieras.

Felsökningshandbok

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

Kommentarer och förslag på åtgärd

Ogiltiga resultat

- | | |
|---|---|
| a) Förvaringsvillkoren för en eller flera komponenter överensstämde inte med anvisningarna som gavs i "Förvaring och hantering av reagenser". | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se etiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs. |
| b) Utgångsdatum för <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit har passerat. | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs. |

NTC-proverna visar positiva resultat i FAM-kanalen.

- | | |
|--|---|
| Kontaminering inträffade under beredning av PCR. | Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat.
Stäng om möjligt PCR-rören direkt när du har tillsatt det prov som ska testas.
Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet. |
|--|---|

Flaggor som genereras av *therascreen* KRAS Assay Package

I tabell 6 listas de flaggor som kan genereras av *therascreen* KRAS Assay Package, deras betydelse och vilka åtgärder som kan vidtas.

Table 6. *therascreen* KRAS Assay Package-flaggor

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM CT utanför intervallet för positiv kontroll i kontrollreaktionen.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM CT utanför intervallet för en eller flera mutationskontrollreaktioner.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (kontrollreaktionsmix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (mutationsreaktionsmix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen ovanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen är nedanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INVALID_CT	Ogiltig PCR-körning – ogiltigt FAM (mindre än gränsvärdet) för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i negativ kontroll kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltigt prov – fluorescensdata i provkontrollen kan inte tolkas.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa de relevanta proverna.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Ogiltigt prov – FAM C_T är för lågt i provkontrollen.	Späd provet för att öka kontroll- C_T -värdet. Den här spädnings ska beräknas baserat på antagandet att spädnings 1:1 med vatten som medföljer kitet kommer att öka C_T med 1,0. När provet har spänts ut ska du konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet.

SAMPLE_CTRL_FAIL	Ogiltigt prov – FAM C _T är för högt i provkontrollreaktionen.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T för högt (eller inget C _T) för internkontroll (HEX), FAM-kanalen mutationsnegativ.	<p>Om provet ges statusen giltigt – ingen åtgärd.</p> <p>CRC-prover: Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p> <p>NSCLC-prover: Om provet ges statusen ogiltigt, späd ut det återstående provet 1 till 8 med vatten från röret märkt med DIL och kontrollera att den slutliga volymen är större än 40 µl (t.ex. 10 µl DNA och 70 µl vatten från röret märkt med DIL). Konfigurera sedan en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet är ogiltigt, späd ut det återstående provet 1 till 8 med vatten från röret märkt med DIL och kontrollera att den slutliga volymen är större än 40 µl. Testa sedan den här spädningen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>

SAMPLE_INT_CTRL _EARLY_CT	Mutationsrör ogiltigt – C _T HEX för lågt för provet (internkontroll).	<p>Om provet ges statusen giltigt – ingen åtgärd.</p> <p>Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet.</p> <p>Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurerar en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsrör ogiltigt – fluorescensdata i internkontroll kan inte tolkas.	<p>Om provet ges statusen giltigt – ingen åtgärd.</p> <p>Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurerar en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>
MUTATION_EARLY_CT	Mutationsrör ogiltigt – C _T FAM för lågt för provet.	<p>Om provet ges statusen giltigt – ingen åtgärd.</p> <p>Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurerar en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	En eller flera mutationer för ett prov är giltiga och positiva, och samtidigt är en eller flera mutationer för samma prov ogiltig(a) (varning, inte ett fel).	Ingen.

Kvalitetskontroll

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

Begränsningar

Testet är utformat för att detektera 7 mutationer i kodonerna 12 och 13 i KRAS-genen. Prover med resultat som rapporteras som "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad) kan innehålla KRAS-mutationer som inte detekteras av analysen (t.ex. 13CYS).

Detektion av mutationer beror på provets integritet och på mängden amplifierbart DNA som finns i provet. Proceduren ska upprepas i händelse av att den initiala bedömningen av DNA:t i provet indikerar att mängden antingen inte är tillräcklig eller är för hög för mutationsanalys.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit används med en PCR-procedur (polymerase chain reaction). Precis som vid alla PCR-procedurer kan prover kontamineras av externa DNA-källor i testmiljön och av DNA i den positiva kontrollen. Iaktta försiktighet för att förhindra att prover och reaktionsmixreagenser kontamineras.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit är endast avsett att användas för att skilja mellan vildtyp och mutant. Testet har utformats så att varje mutantreaktion är mest känslig för den specifika mutation som mäts. I prover där en mutation detekteras kan dock korsreaktivitet uppstå med andra mutationsreaktioner. Om mer än en mutantreaktion är positiv blir resultatet det som har lägst ΔC_T -resultat.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit är endast validerat för FFPE CRC- och NSCLC-vävnad.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit är endast validerat för användning med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Endast Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM har validerats för användning med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Prestandaegenskaper

Analytisk prestanda

De specifika prestandaegenskaperna för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit fastställdes med hjälp av studier av FFPE-vävnadsprover tagna från CRC-patienter och NSCLC-patienter. Provtagningsmetoderna för NSCLC-proverna utgjordes av nålbiopsi (Core Needle Biopsy, CNB), finnålspunktion (Fine Needle Aspirate, FNA) och resektion. För varje provtyp användes 8 mänskliga FFPE-cellinjer, av vilka 7 innehåller kända KRAS-mutationer som detekterats av analysen, och en KRAS-vildtyp (dvs. inga mutationer vid kodon 12 och 13). Mutationsstatusen för proverna bekräftades genom bidirektionell Sanger-sekvensering.

Cutoff

225 FFPE-prover testades med en metod enligt instruktionerna i CLSI EP17-A (2004) (8) för att fastställa cutoff-värden för analysen. Kontrollreaktionens C_T -intervall fastställdes från 21,92 till 32,00. Cutoff-värdena, vilka baseras på C_T för kontrollreaktionen subtraherat från C_T för mutantreaktionerna (ΔC_T) visas i tabell 7.

Tabell 7 Fastställda cutoff-värden för varje mutationsanalys.

	Mutationsanalys						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Cutoff ($\leq \Delta C_T$)	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

Blankgräns (LOB)

För att bedöma prestandan för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vid frånvaro av mutant positiv mall och för att säkerställa att ett blankprov inte genererar en analytisk signal som kan indikera en låg koncentration av mutation utvärderades prover utan mall. Resultaten visade ingen detekterbar kontroll eller mutanta C_T-värden i någon av mutations- eller kontrollreaktionsrören (internkontrollens C_T-värden var samtliga giltiga).

Jämförelse med analytisk referensmetod: CRC

Två studier utfördes för att visa överensstämmelse i mutationsstatus för de CRC-prover som testats med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit i relation till bidirektionell sekvensering. Totalt 137 av FFPE-proverna återgav giltiga resultat för både *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit och bidirektionell sekvensering.

De totala resultaten, förutom 6 misslyckade prover med bidirektionell Sanger-sekvensering, visas i tabell 8. Tabell 9 visar analysen av överensstämmelse mellan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit och bidirektionell sekvensering.

Tabell 8. theascreen KRAS RGQ PCR Kit jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering

		Mutationsbestämning med bidirektionell sekvensering								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Totalt
Bestämning med <i>theascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativt	80	–	–	1	–	–	–	1	82
	Positiv 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
	Positiv 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
	Positiv 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
	Positiv 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
	Positiv 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
	Positiv 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	16
	Positiv 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
	Totalt	83	3	0	22	3	0	14	12	137

Tabell 9. Analys av överensstämmelse

Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)	95 % konfidensintervall (KI)
Total överensstämmelse (procent)	152/157 (96,82)	93,69-98,44
Positiv överensstämmelse (procent)	72/74 (96,30)	92,63-98,63
Negativ överensstämmelse (procent)	80/83 (96,39)	91,65-98,19

En andra uppsättning med unika prover utvärderades för att komplettera data från den första studien. En uppsättning med 271 CRC FFPE-prover togs fram; 250 hade okänd mutationsstatus och 21 prover hade känd mutationsstatus för detektion av sällsynta mutationer, och sedan gjordes en jämförelse med bidirektionell Sanger-sekvensering enligt beskrivningen ovan.

En analys av överensstämmelse utfördes på 247 prover med både giltiga resultat från bidirektionell sekvensering och *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Det fanns 9 diskordanta prover. Den totala överensstämmelsen var 96,82 %. Dessa data stöder att prestandan för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit är korrekt (tabell 10 och tabell 11).

Tabell 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering (andra studien)

		Mutationsbestämning med bidirektionell sekvensering								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Totalt
Bestämning med <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativt	132	–	–	–	–	1	–	–	133
	Positiv 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	–	10
	Positiv 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	–	10
	Positiv 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	–	31
	Positiv 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	–	12
	Positiv 12SER	–	–	–	–	–	13	–	–	13
	Positiv 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	–	27
	Positiv 13ASP	–	–	–	–	–	–	–	11	11
	Totalt	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabell 11. Analys av överensstämmelse (andra studien)

Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)	95 % konfidensintervall (KI)
Total överensstämmelse (procent)	238/247 (96,36)	93,73-98,09
Positiv överensstämmelse (procent)	106/107 (99,07)	95,64-99,95
Negativ överensstämmelse (procent)	132/140 (94,29)	89,93-97,13

Jämförelse med analytisk referensmetod: NSCLC

För att visa överensstämmelse i mutationsstatus för de NSCLC-prover som testats med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vid jämförelse med bidirektionell Sanger-sekvensering togs kliniska FFPE NSCLC-prover via resektion, CNB eller FNA. DNA extraherades från varje prov innan testning med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Resultaten från det här testet jämfördes med resultaten som erhöles med bidirektionell Sanger-sekvensering.

Totalt 360 prover återgav ett giltigt resultat med både *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit och bidirektionell Sanger-sekvensering och 340 prover hade överensstämmande resultat.

Överensstämmelse mellan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit och bidirektionell sekvensering visas i tabell 12. Två prover gav dubbla mutationsbestämningar med bidirektionell Sanger-sekvensering. Eftersom en mutation var samma som i resultatet från *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit klassificerades de här proverna som överensstämmande för analysen av total överensstämmelse, positiv överensstämmelse och negativ överensstämmelse (tabell 13).

Tabell 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering

		Mutationsbestämning med bidirektionell sekvensering								
		Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Totalt
Bestämning med <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Negativt	132	-	-	-	-	1	-	-	133
	Positiv 12ALA	-	10	-	-	-	-	-	-	10
	Positiv 12ALA_ 12CYS	5	-	5	-	-	-	-	-	10
	Positiv 12ARG	-	-	-	31	-	-	-	-	31
	Positiv 12ASP									
	Positiv 12CYS	1	-	-	-	11	-	-	-	12
	Positiv 12SER	-	-	-	-	-	13	-	-	13
	Positiv 12VAL	2	-	-	-	-	-	25	-	27
	Positiv 13ASP	-	-	-	-	-	-	-	11	11
	Totalt	140	10	5	31	11	14	25	11	247

Tabell 13. Analys av överensstämmelse

Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)	95 % konfidensintervall (KI)
Total överensstämmelse (procent)	340/360 (94,44)	92,03-96,29
Positiv överensstämmelse (procent)	79/80 (98,75)	94,21-99,94
Negativ överensstämmelse (procent)	261/280 (93,21)	90,20-95,51

Detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)

Arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit är baserat på mängden amplifierbart DNA i provet enligt bestämningen av kontrollreaktionens C_T -värde. Det angivna input-intervallet för analysen definieras av det förspecificerade kontroll- C_T -intervallet på 21,92 till 32,00. LOD är den minimi-procentandel mutant-DNA som kan detekteras i en vildtyp-bakgrund när den totala mängden amplifierbart DNA ligger inom det angivna intervallet men ändå under tröskelvärdet för cutoff ΔC_T .

CRC

En studie utfördes för att avgöra LOD för var och en av de 7 mutationsspecifika reaktionerna som innefattas i *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. För *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit definieras gränsen för detektering av mutant-DNA i en bakgrund med vildtyp-DNA som den lägsta spädningsfaktorn där 95 % av testreplikaten för varje mutationspositivt prov bestämdes som positiva.

Logistiska regressionsmodeller tillämpades individuellt på varje analys för datauppsättningarna med låga och höga DNA-inputnivåer. I de här modellerna var responsvariabeln det binära resultatet av mutation detekterad (detektion = 1) och mutation inte detekterad (detektion = 0); den kontinuerliga förklarande variabeln var \log_2 % mutationsspädning. LOD-värdena beräknades som procentandelen mutationsspädning som gav en förutspädd sannolikhet för detektion på 0,95 (tabell 14).

Tabell 14. LOD-värden för varje mutationsanalys med FFPE-cellinjer

Analys	LOD C₉₅ (procentandel mutant-DNA i vildtyp-DNA)
12ALA	0,77
12ARG	2,56
12ASP	6,43
12CYS	1,47
12SER	5,65
12VAL	1,60
13ASP	6,42

NSCLC

LOD för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit-analyser bestämdes och verifierades med hjälp av CRC-vävnad. De här LOD-resultaten har verifierats på nytt för NSCLC-vävnad.

Studien utfördes i 2 delar. I del 1 späddes 60 replikat av 7 mutanta FFPE NSCLC-cellinjer som representerade varje mutation till LOD för den respektive analysen och testades. Alla 60 giltiga FFPE-cellinjereplikater för varje bedömt prov visade 100 % detektion för respektive mutationsreaktion vid den bedömda LOD:en.

I del 2 testades 96 replikat av kliniska FFPE NSCLC-prover (insamlade med de 3 provtagningsmetoderna resektion, CNB och FNA) som representerade varje mutation efter att de hade spänts till LOD för den respektive analysen.

De 96 giltiga replikaten för 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL och 13ASP visade 100 % korrekt bestämning. Analyserna för 12CYS och 12SER visade 95,8 % detektion vid LOD.

Detta visar att det tidigare fastställda LOD-värdet är verifierat för alla mutationsanalyser vid bedömning av NSCLC-vävnadsprover och kliniska FFPE NSCLC-prover/FFPE-cellinjer/patientmatchade prover.

DNA-input och linjäritet

Effekt av DNA-inputnivå på ΔC_T -värden

När prover med olika nivåer totalt DNA innehåller samma andel mutant-DNA förväntas det att de uppmätta ΔC_T -värdena förblir konsekventa. DNA som extraherats från 8 FFPE-celler användes för att bereda pooler av DNA med det lägsta uppnåeliga C_T -värdet för kontrollreaktionen.

Spädningsintervallet för varje mutationsreaktion och ΔC_T -medelvärdet som erhöles från resultaten visas i tabell 15 och tabell 16. De totala ΔC_T -värdena är konsekventa över hela arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit för alla analyser, vilket visar att DNA-nivån inte påverkar precisionen för mutationsbestämningen.

Tabell 15. Effekten av DNA-input på ΔC_T -värden över input-kontrollreaktion- C_T -intervall (med CRC FFPE-celler-DNA)

Analys	ΔC_T				
	Utspädning 1 ~20-21 C_T	Utspädning 2 ~23-24 C_T	Utspädning 3 ~26-27 C_T	Utspädning 4 ~29-30 C_T	Utspädning 5 ~32-33 C_T
12ALA	1,56	1,25	1,16	1,14	1,27
12ASP*	2,46	2,18	2,11	2,11	1,75
12ARG	1,18	0,63	1,08	0,94	1,06
12VAL	0,29	0,25	0,15	0,26	-0,1
12SER	2,91	2,21	2,15	2,15	2,08
12CYS	0,98	0,71	0,58	0,81	0,67
13ASP	3,57	2,84	2,54	2,46	2,62

* Det totala antalet replikat för 12ASP var 27.

Tabell 16. Effekten av DNA-input på ΔC_T -värden över input-kontrollreaktion- C_T -intervallet – NSCLC FFPE-prover

Analys	ΔC_T				
	Utspädning 1 ~20-21 C_T	Utspädning 2 ~23-24 C_T	Utspädning 3 ~26-27 C_T	Utspädning 4 ~29-30 C_T	Utspädning 5 ~32-33 C_T
12ALA	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
12ASP	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
12ARG	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
12VAL	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
12SER	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
12CYS	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
13ASP	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

* Inget C_T -värde för mutationsreaktionen återgavs på grund av låg koncentration av DNA, och därför beräknades inget delta för C_T -värdet.

Linjäritet/amplifieringseffektivitet som en funktion av DNA-input

Linjäriteten och amplifieringseffektiviteten för PCR för varje mutationsreaktion i relation till kontrollreaktionen över hela arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit påvisades. Amplifieringseffektiviteten för varje mutationsreaktion och kontrollreaktionen beräknades som $(2^{(-1/\text{lutning})}) - 1$.

Amplifieringseffektiviteten för kontrollen jämfört med mutantreaktionen indikerar att ΔC_T , och därmed även mutationsbestämningen, är konsekvent över hela arbetsintervallet för analysen. En sammanfattning av värdena visas i tabell 17 och tabell 18.

Linjäritet/amplifieringseffektivitet som en funktion av procentandelen mutation

Syftet med den här studien var att utvärdera hur amplifieringseffektiviteten påverkas av seriellt utspätt mutant positivt prov över hela arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, med början på input-nivåerna för C_T vid ungefär 22–23 C_T .

DNA-extrakt från CRC FFPE-celler och NSCLC-prover bedömdes först genom OD-avläsningar innan PCR utfördes med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. DNA-stammar beredd sedan till ett kontrollreaktions- C_T motsvarande ungefär 23 C_T . Stammarna spädades seriellt två gånger, båda gångerna med vildtyp-DNA, för att den totala mängden vildtyp-DNA skulle vara konstant medan procentandelen mutant-DNA i provet varierades.

Pooler av DNA som var tillräckligt för 6 replikat per mutation beredd. C_T - och ΔC_T -data för varje mutation vid varje spädningsskritt beräknades. I en linjär regressionsmodell jämfördes mutationsreaktions- C_T med \log_2 DNA-inputspädning. Studien visade att spädning av mutationer i en bakgrund med konstant koncentration av vildtyp-DNA resulterade i amplifieringseffektiviteter som inte varierade signifikativt utanför värdena som bestämdes i linjäritetsstudien ovan.

Tabell 17. Amplifieringseffektivitet i kontroll- och mutationsreaktioner: CRC-celler-DNA

Prov		Standardfel för Intercept		Beräknad lutning	Standardfel (lutning)	Nedre dubbelsidig 95 % konfidensgräns (lutning)	Övre dubbelsidig 95 % konfidensgräns (lutning)	Amplifierings-effektivitet	Skillnad i amplifierings-effektiviteter
		Intercept	intercept						
12ALA	Kontroll C_T	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	0,989	0,03
	12ALA C_T	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	1,019	
12ARG	Kontroll C_T	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	0,954	0,056
	12ARG C_T	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	1,01	
12ASP	Kontroll C_T	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	0,982	-0,003
	12ASP C_T	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	0,979	
12CYS	Kontroll C_T	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	1,026	0,032
	12CYS C_T	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	1,058	
12SER	Kontroll C_T	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	0,996	0,105
	12SER C_T	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	1,101	
12VAL	Kontroll C_T	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	1,007	0,033
	12VAL C_T	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	1,04	
13ASP	Kontroll C_T	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	0,999	0,145
	12ASP C_T	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	1,144	

Tabell 18. Amplifieringseffektivitet i kontroll- och mutationsreaktioner: NSCLC-prover

Prov		Intercept	Standardfel för intercept	Beräknad lutning	Standardfel (lutning)	Nedre dubbelsidig 95 % konfidens-gräns (lutning)	Övre dubbelsidig 95 % konfidens-gräns (lutning)	Amplifierings-effektivitet	Skillnad i amplifierings-effektiviteter
12ALA	Kontroll C _T	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	0,94	0,069
	12ALA C _T	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	1,01	
12ARG	Kontroll C _T	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94	0,093
	12ARG C _T	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04	
12ASP	Kontroll C _T	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96	-0,001
	12ASP C _T	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96	
12CYS	Kontroll C _T	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98	0,019
	12CYS C _T	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00	
12SER	Kontroll C _T	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97	0,127
	12SER C _T	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09	
12VAL	Kontroll C _T	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92	0,011
	12VAL C _T	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91	
13ASP	Kontroll C _T	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066
	12ASP C _T	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01	

Interfererande ämnen

Syftet med den här studien var att utvärdera huruvida potentiellt interfererande ämnen påverkar effekten hos *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Detta utfördes genom att analysera varje ämnes inverkan på ΔC_T -värdena och mutationsstatusen för testprov genom att spetsa experiment vid olika koncentrationer. Potentiellt interfererande ämnen från DNA-extraktionsprocessen som testades var: Buffer AL, Buffer ATL, , paraffinvax, proteinas K, Wash Buffer AW1, Wash Buffer AW2 och xylene. Den slutliga elueringsbufferten i kitet, Buffer ATE, testades också som blankkontroll.

Ingen av de potentiellt interfererande ämnen som utvärderats vid koncentrationer som kan förväntas påträffas vid normal användning påverkar förmågan hos *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit att skilja mellan mutationspositiva och mutationsnegativa prover.

Förutom studien av interfererande ämnen bedömdes den potentiella effekten av nekros i kliniska prover för att avgöra om höga nivåer av nekrotisk vävnad i tumörprover påverkar förmågan att generera giltiga data. Av totalt 421 prover som bedömdes som en del av studierna för jämförelse med analytisk referensmetod hade 29 prover nekros på en nivå > 50 % enligt den patologiska granskningen. Av de här 29 proverna gav 28 giltiga resultat som överensstämde med resultaten från bidirektionell Sanger-sekvensering. Ett resultat var ogiltigt på grund av otillräcklig mängd DNA.

Korskontaminering

Syftet med studien var att avgöra utsträckningen av korskontamination mellan DNA-prover med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, vilket kan leda till falskt positiva resultat. Potentiella källor till korskontaminering inkluderar följande:

- Provextraktion (t.ex. skrapning av objektglas)
- Pipettering av prover
- Förslutning av provrör
- Kontaminering av kitreagenser under användning
- Laddning av analysrör på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Vid den här studien användes FFPE-standarder: vildtyp-standard och 12ALA-standard (eftersom 12ALA-reaktionen är den reaktion med lägst LOD i kitet).

Studien bestod av 10 PCR-körningar utformade för att undersöka risken för kontaminering både inom och mellan körningar på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Vid dessa testkörningar användes rör innehållande vildtyp-DNA för att söka efter kontaminering från mutant-DNA.

I resultaten för studien påvisades ingen detekterbar kontaminering i något av de vildtyp-DNA-extrakt som var avsedda att detektera korskontaminering.

Exklusivitet/korsreaktivitet

I *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ingår 8 separata reaktioner; en enskild kontrollreaktion som detekterar ett icke-polymorft område av KRAS-genen och sju mutationsspecifika reaktioner. Det finns ingen reaktion som specifikt mäter vildtyp-KRAS-sekvensen vid kodon 12 eller 13. KRAS-resultatet "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterades) (dvs. vildtyp) bestäms baserat på att någon av de 7 mutationerna saknas, vilket resulterar i ett positivt mutationsresultat.

Därför är det nödvändigt att påvisa storleken på den icke-specifika amplifieringen, eller korsreaktiviteten som uppstår i varje reaktion med för stora mängder KRAS vildtyp-DNA för att säkerställa att inga falskt positiva resultat uppstår. På samma sätt utvärderas icke-specifik amplifiering för KRAS-mutationer som inte är avsedda att detekteras av analysen. Detta visar att mängden korsreaktivitet mellan mutantreaktioner inte resulterar i felaktiga mutationsbestämningar vid förekomst av stora mängder mutant-DNA. Eftersom DNA-input för den här analysen är baserad på kontroll- C_T -intervallet (21,92–32,00) är den högsta koncentrationen av DNA-input baserad på att den har ett kontroll- C_T -värde på ungefär 22.

Icke-specifik amplifiering/korsreaktivitet: vildtyp-KRAS DNA

Mängden icke-specifik amplifiering av vildtyp-DNA med reaktionsmixar utformade för amplifiering av specifika mutationer hanterades på följande sätt. Totalt 60 replikat av vildtyp-FFPE-cellinje-DNA och 60 NSCLC-prover utvärderades vid den högsta koncentrationen av amplifierbart input-DNA med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Kontroll C_T -värdena var ungefär 22–23. Resultaten visade att ΔC_T -värdena överskred de fastställda cutoff-värdena och minst 95 % av vildtyps-replikaten bestämdes korrekt.

Icke-specifik amplifiering/korsreaktivitet/exklusivitet: mutationspositivt KRAS DNA

Mutanta prover med en hög koncentration av input-DNA testades mot alla reaktionsmixar. DNA-prover bereddes från var och en av CRC- och NSCLC FFPE-cellinjerna så att kontrollreaktionens C_T -värde motsvarade ungefär 23. Av de här spädningarna utvärderades 6 replikat för varje mutationsprov. Procentandelen mutation i provet styrdes av procentandelen mutant i cellinje-DNA:t.

ΔC_T -medelvärdena presenteras i tabell 19 och tabell 20 och visar att det finns korsreaktivitet mellan mutantreaktioner. I samtliga fall visade resultaten att den korrekta mutationen fastställdes med den matchade mutationsreaktionen (dvs. det minsta ΔC_T -värdet var den korrekta mutationsbestämningen). Alla andra testfall detekterades inte eller låg utanför ΔC_T -tröskeln.

Tabell 19. Korsreaktivitet (ΔC_T) mellan mutationsreaktioner som använder CRC FFPE-cellinje-DNA i det högre input-intervallet

Mutant-DNA	Cutoff	Analys- ΔC_T						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,42*	12,66	NA	5,81†	2,78†	6,31†	13,21
12ASP	6,6	12,56	2,42*	NA	NA	13,44	11,21	13,55
12ARG	8	13,12	11,56	1,12*	11,42	NA	13,43	12,66
12CYS	8	14,2	12,48	9,23	0,98*	NA	7,96†	12,88
12SER	8	NA	13,39	13,31	NA	3,02*	12,99	13,97
12VAL	7,5	6,83†	NA	NA	NA	13,38	0,28*	13,74
13ASP	7,5	NA	13,29	13,89	NA	NA	14,36	4,5*

NA: Ingen korsreaktion.

* ΔC_T -värden från matchade reaktioner.

† ΔC_T från korsreaktiva reaktioner nedanför cutoff-värdet.

Tabell 20. Korsreaktivitet (ΔC_T) mellan mutationsreaktioner som använder NSCLC FFPE-celinje-DNA i det högre input-intervallet

Mutant-DNA	Cutoff	Analys- ΔC_T						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1,31*	12,8	NA	5,01[†]	2,26[†]	5,57[†]	12,65
12ASP	6,6	12,61	1,66*	NA	NA	NA	10,3	12,60
12ARG	8	12,98	11,08	0,81*	11,24	NA	12,66	12,62
12CYS	8	NA	12,22	7,84[†]	0,56*	NA	13,06	11,84
12SER	8	NA	12,87	13,21	NA	1,93*	13,25	12,93
12VAL	7,5	5,93[†]	14,29	NA	NA	13,14	0,45*	12,39
13ASP	7,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,02*

NA: Ingen korsreaktion.

* ΔC_T -värden från matchade reaktioner.

[†] ΔC_T från korsreaktiva reaktioner nedanför cutoff-värdet.

Repeterbarhet och reproducerbarhet

Syftet med den här studien var att påvisa precisionen hos *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit inom laboratoriet (repeterbarhet) och mellan laboratorier (reproducerbarhet). Både korrektheten hos resultaten från mutationsbestämningen och precisionen hos ΔC_T -värdena (skillnaden i C_T -värden mellan en mutationsreaktion och kontrollreaktionen) rapporteras.

CRC

Kliniska CRC-prover användes för den här utvärderingen. Ett vildtyp-prov och ett prov för varje mutation testades med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, där 2 operatörer på var och en av 3 platser testade alla prover och kontroller på 3 loter av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit, varje dag i 5 dagar, med 2 körningar per dag och med 2 replikat av varje prov på varje körning. De C_T - och ΔC_T -värden som erhöles för varje reaktion i varje prov analyserades också med en varianskomponentanalys.

Reproducerbarheten hos *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit påvisades för lågnivå-mutant (3 × LOD) och vildtyp-prover, med minst 39/40 korrekta mutationsbestämningar för alla analyser med flera loter, plattformar och operatörer, både inom och mellan laboratorier. Den uppskattade andelen 3 × LOD-prover vid testning av mutantprover och vildtyp-prover rapporterades totalt och på var och en av testplatserna. För alla analyser och provkombinationer gav minst 79 av 80 replikat korrekt mutationsbestämning (tabell 21).

Tabell 21. Totalt antal korrekta bestämningar

Prov	Korrekta mutationsbestämningar						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
Mutant 3 × LOD	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
Vildtyp (låg)	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

NSCLC

För var och en av de 7 KRAS NSCLC-mutationerna användes 3 prover som representerade var och en av de 3 provtagningsmetoderna (resektion, CNB och FNA). Ytterligare 6 kliniska vildtyp-prover, med 2 prover vardera som representerade de 3 provtagningsmetoderna, användes för att skapa spädningsspooler med vildtyp-DNA.

De olika extrakten poolades för vart och ett av mutationsproverna för att skapa en enskild provpool per mutation. Varje mutationsprovpool späddes för att generera testprover vid mutationsnivåer på 1 × LOD och 3 × LOD.

Laboratorierna som användes i den här studien fanns på 3 olika platser. Arbetsförhållandena varierades på de olika laboratorierna genom att man använde 2 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument, 2 operatörer, 2 partier av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit och gjorde 2 körningar per dag (per operatör) under 16 dagar (ej i följd).

För alla analyser och provkombinationer gav minst 284 av 288 replikat korrekt mutationsbestämning. Den totala andelen korrekta bestämningar vid alla analyskombinationer för 1 × LOD-gruppen var 100 %. Den totala andelen korrekta bestämningar vid alla analyskombinationer för 3 × LOD-gruppen var 99,6 %. Den totala andelen korrekta bestämningar för proverna där ingen mutation detekterades (vildtyp) var 100 % (tabell 22).

Tabell 22. Korrekta bestämningar för 1 × LOD, 3 × LOD och vildtyp

Mutationsnivå	Analys	Korrekta bestämningar	Korrekta bestämningar, %	Nedre tvåsidigt 90 % KI
1 × LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
3 × LOD	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
Vildtyp		285/285	100	98,95

Variabilitet vid provhantering

Syftet med den här studien var att bedöma effekten vid variationer i provhanteringen (specifikt vid DNA-extraktion) för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. Den här studien kompletterar studien av upprepbarhet och reproducerbarhet genom att analysera variationer i provhanteringen när samma kliniska FFPE-snitt och FFPE-cellinjesnitt bearbetades på 3 platser efter att ha testats med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

CRC

Trettio sekventiella 5 µm-snitt togs ut från vart och ett av 10 FFPE CRC-prover (3 vildtyp och 1 per mutation). Snitten randomiserades till någon av de 3 testplatserna så att varje plats fick 10 snitt per FFPE-prov (totalt 100 snitt). Av 300 DNA-extraktioner som testades var 298 prover giltiga. Det fanns 99,33 % överensstämmelse avseende KRAS-mutationsbestämningar mellan de 3 testplatserna.

En jämförelse per plats av ΔC_T -medelvärden för mutantprover och vildtyp-prover visade en mycket stor överensstämmelse för resultaten. Resultaten visade överensstämmelse för DNA-extraktionsproceduren och provbearbetningen tillsammans med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

NSCLC

I den här studien användes 13 kliniska NSCLC-prover (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL och 3 vildtyp) och 4 FFPE-cellinjesprover (12ALA, 12ARG, 12SER och 13ASP). Proverna representerade de olika provtagningsmetoderna: kirurgisk resektion, FNA och CNB. Cellinjer användes för att representera sällsynta mutationer där klinisk NSCLC-vävnad inte var tillgänglig.

De 3 batcherna med 20 FFPE-snitt fördelades sedan slumpvis på de 3 platserna. DNA-extraktion utfördes på var och en av de 3 platserna på en batch med 20 FFPE-snitt (10 par) per mutation och vildtyp.

När alla provberedningar testades med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit på 3 enskilda testplatser identifierades var och en av de 7 mutationerna och vildtyp-proverna med korrekt mutationsbestämning. Den totala bestämningsandelen för var och en av de 7 mutationerna och vildtyp-proverna var 100 %, vilket visade på konsekvens mellan platser för DNA-extraktion och mutationsdetektion med *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit.

Motsvarighet mellan provtagningsmetoder (endast NSCLC)

Syftet med den här studien var att bedöma om mutationsbestämningen för NSCLC-prover som fastställdes av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit påverkades av provtagningsmetoden. De 3 provtagningsmetoderna som bedömdes i den här studien var resektion, FNA och CNB.

För att samma tumör skulle samlas in med 3 olika provtagningsmetoder användes för den här studien "patientmatchade" CNB- och FNA-prover som erhöles från tumörprover tagna med kirurgisk resektion. Totalt 169 resektionsprover, 169 CNB-prover och 169 FNA-prover var tillgängliga för studien.

Varje prov extraherades och testades med KRAS-kontrollanalysen. Varje prov som gav ett giltigt resultat (169 resektioner, 169 CNB och 164 FNA) testades med alla 8 KRAS-analyser.

För vart och ett av de kliniska FFPE NSCLC-proverna bedömdes dessutom det extraherade DNA:t som användes för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit-analysen med bidirektionell Sanger-sekvensering för att fastställa nivån på överensstämmelsen mellan *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit och bidirektionell Sanger-sekvensering. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit bestämmer korrekt mutationsstatus jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering för alla provtyper med en total överensstämmelse i procent på 96,96 %.

Resultaten från den här studien visade att *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit ger likvärdiga resultat med de 3 studerade provtagningsmetoderna, vilket indikeras genom procentandelarna för den parvisa totala överensstämmelsen:

- CNB jämfört med FNA 97,52 (konfidensgränser 94,41–99,15)
- CNB jämfört med resektion 96,39 (konfidensgränser 92,99–98,41)
- FNA jämfört med resektion 98,76 (konfidensgränser 96,14–99,78)

Referenser

Citerade referenser

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25, 511.
2. Bachireddy, P., et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* 11, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* 12, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2, 57.
5. Newton, C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503.
6. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Användbara referenser

Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.

Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.

Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.

De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.

Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.

Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.

Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.

Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.

Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.

Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.

-
- Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.
- Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.
- Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* **120**, 1145.
- Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).
- Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
- Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:



<N>

Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner



Utgångsdatum



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Innehåller



Antal

Rn

R betyder revidering av handboken och n är revisionsnumret



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Läs bruksanvisningen innan användning



Försiktighet

Kontaktinformation

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

Bilaga 1: Manuellt protokoll för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

I det här avsnittet finns instruktioner om användning av *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit med programmet RGQ version 2.3 i öppet läge (dvs. utan KRAS Assay Package).

Allmän information

- Information om material som behövs finns i på sidan Material som behövs men inte medföljer.
- Fullständiga instruktioner om provberedning och provlayout finns i avsnitten Protokoll: Bedömning av DNA-prover och Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer.

Protokoll: Skapa en temperaturprofil

Innan du börjar ska du skapa en temperaturprofil för KRAS-analysen. Cykelparametrarna är desamma för både provbedömning och mutationsbedömning.

Procedur

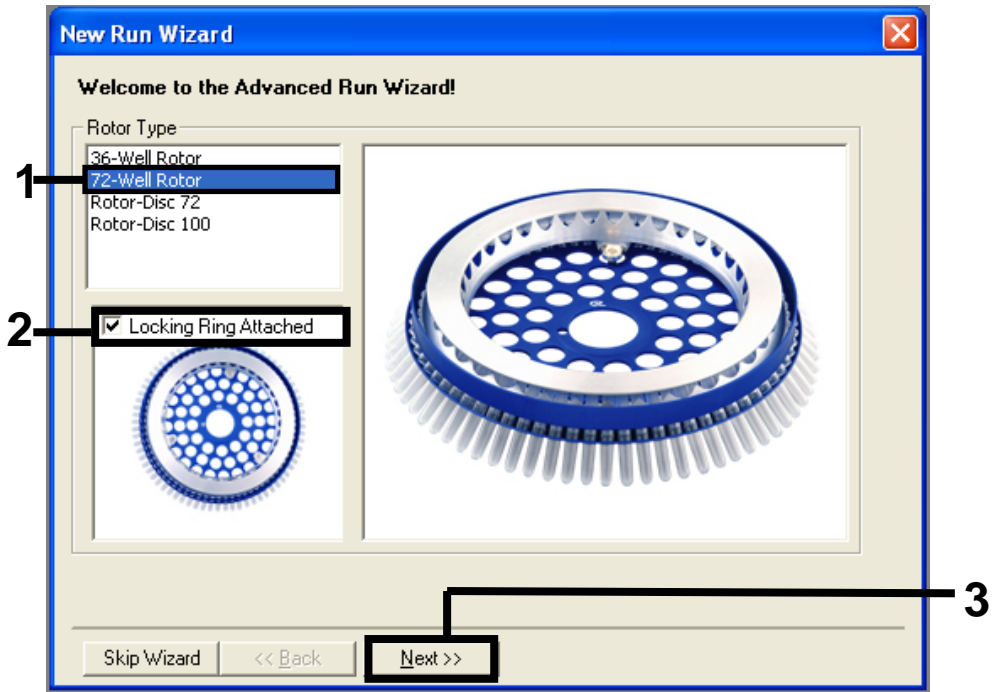
Cykelparametrarna visas i tabell 23.

Tabell 23. Cykelparametrar

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

1. Dubbelklicka på programikonen för Rotor-Gene Q-programmet 2.3 på skrivbordet på den dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Välj fliken "Advanced" (Avancerat) i fönstret New Run" (Ny körning) som visas.

2. För att skapa en ny mall väljer du Empty Run (Tom körning) och klickar sedan på New (Ny) för att komma till "New Run Wizard" (Guide för ny körning).
3. Välj 72-Well Rotor (rotorn med 72 brunnar) som rotortyp. Bekräfta att låsringen sitter fast och markera kryssrutan Locking Ring Attached (Låsring fast). Klicka på Next (Nästa) (bild 21).



Figur 21. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning). 1 = "Rotor Type" (Rotortyp), 2 = "Locking Ring Attached" (Låsring fast), 3 = "Next" (Nästa).

4. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och ange reaktionsvolymen 25. Kontrollera att fältet Sample Layout (provlayout) innehåller värdet 1, 2, 3.... Klicka på Next (Nästa) (bild 22).

New Run Wizard

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

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

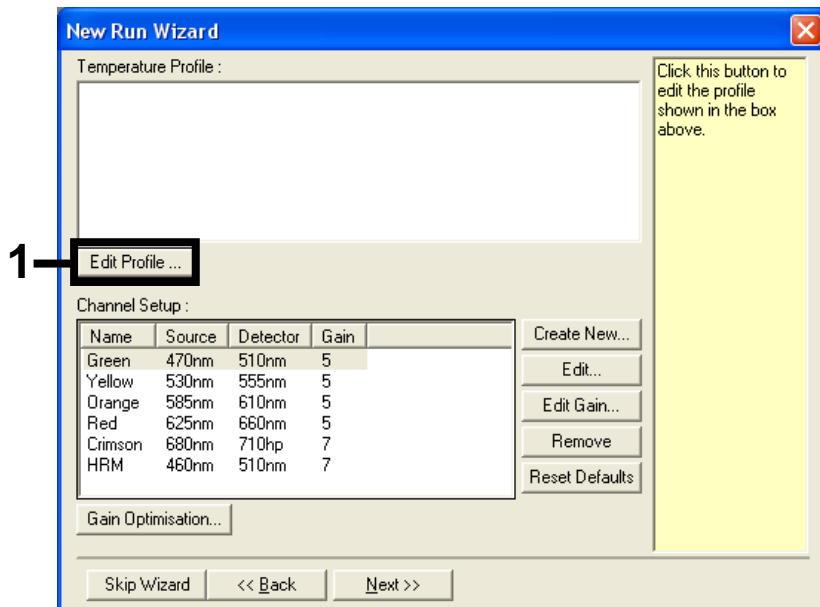
Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

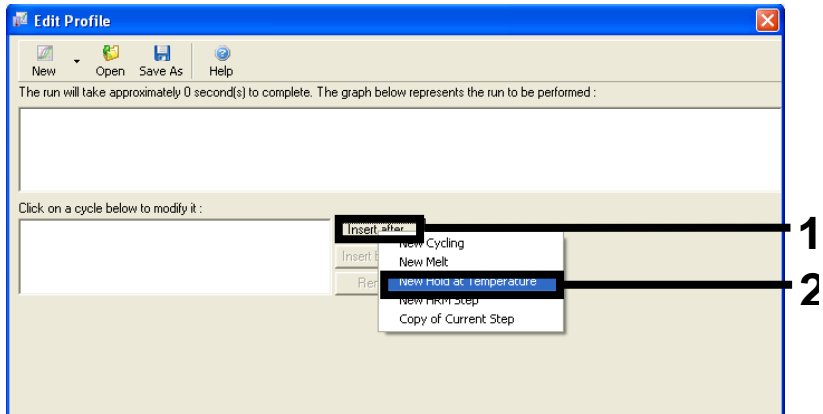
Figur 22. Ange namn på operatör och reaktionsvolym. 1 = fältet "Operator" (Användare), 2 = fältet "Notes" (Anteckningar), 3 = fältet "Reaction Volume" (Reaktionsvolym), 4 = "Sample Layout" (Provlayout), 5 = "Next" (Nästa).

5. Klicka på Edit Profile (Ändra profil) i dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning) (bild 23) och programmera temperaturprofilen enligt informationen i följande steg.



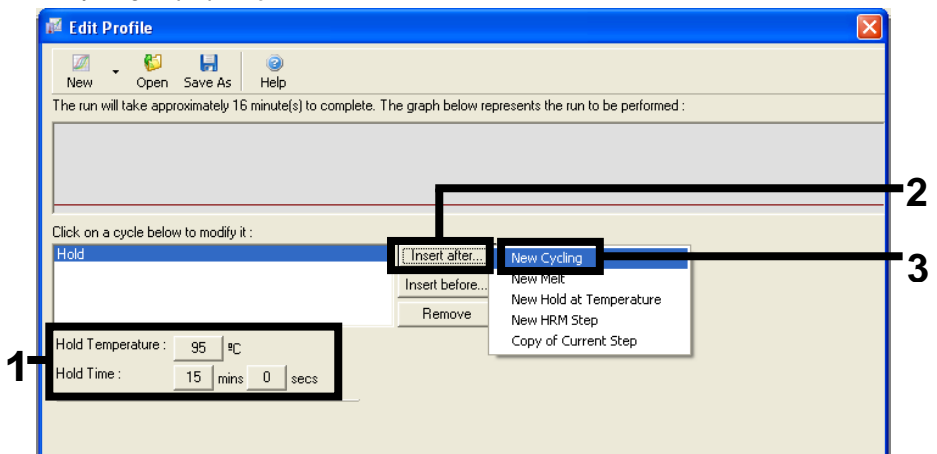
Figur 23. Ändra profilen.

6. Klicka på **Insert after** (Sätt in efter) och välj **New Hold at Temperature** (Ny bibehållning vid temperatur) (bild 24).



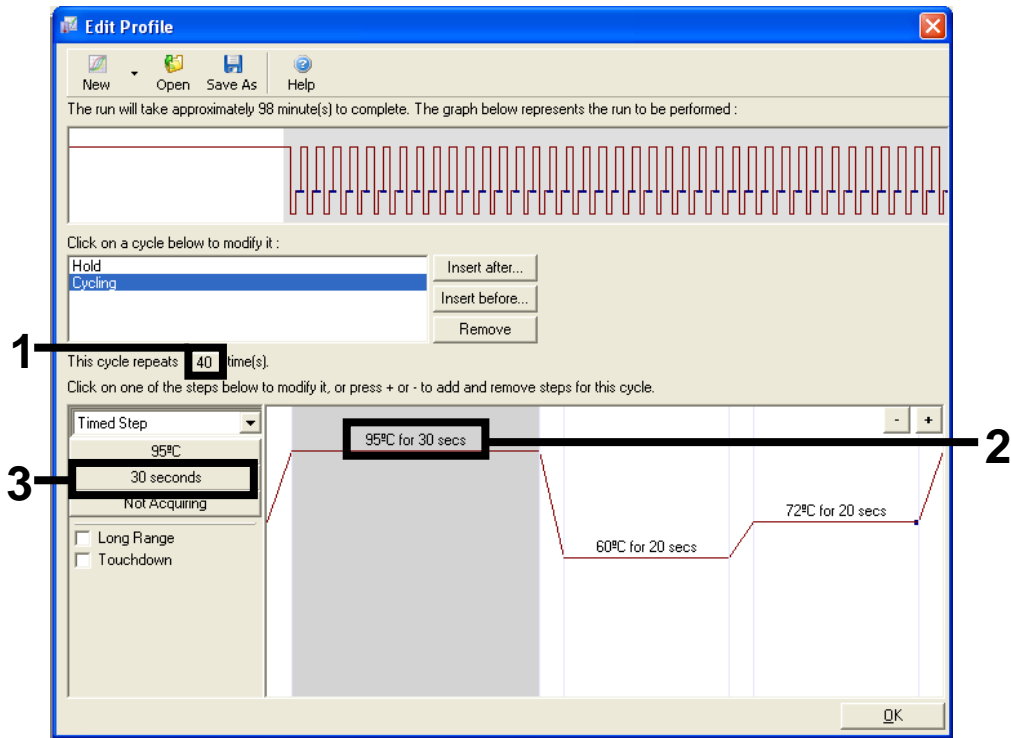
Figur 24. Infoga ett initialt inkubationssteg. 1 = "Insert after" (Sätt in efter), 2 = "New Hold at Temperature" (Ny bibehållning vid temperatur).

7. Ställ in värdet efter fältet **Hold Temperature** (bibehållen temperatur) på **95 °C** **Hold Time** (Bibehållen tid) på **15 minuter** och **0 sekunder**. Klicka på **Insert after** (Sätt in efter) och välj **New Cycling** (Ny cykling) (bild 25).



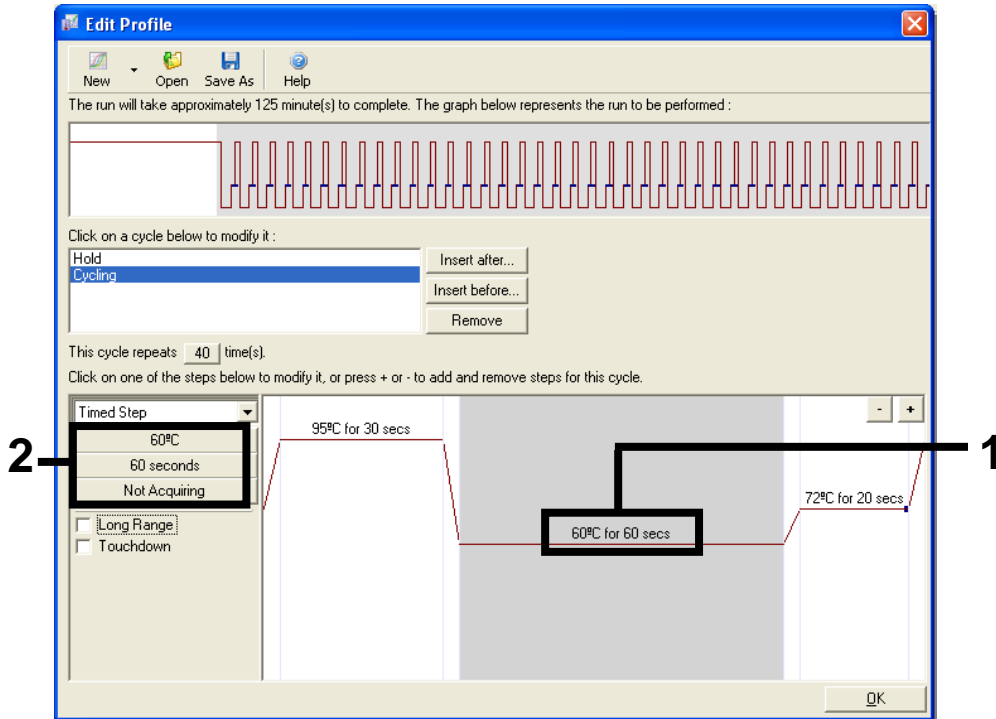
Figur 25. Initialt inkubationssteg vid 95 °C. 1 = "Hold Temperature" (Bibehållen temperatur) och "Hold Time" (Bibehållen tid), 2 = "Insert after" (Sätt in efter), 3 = "New Cycling" (Ny cykling).

8. Ändra antalet cykelrepetitioner till 40. Välj det första steget och ställ in på 95°C for 30 secs (95 °C i 30 sekunder) (bild 26).



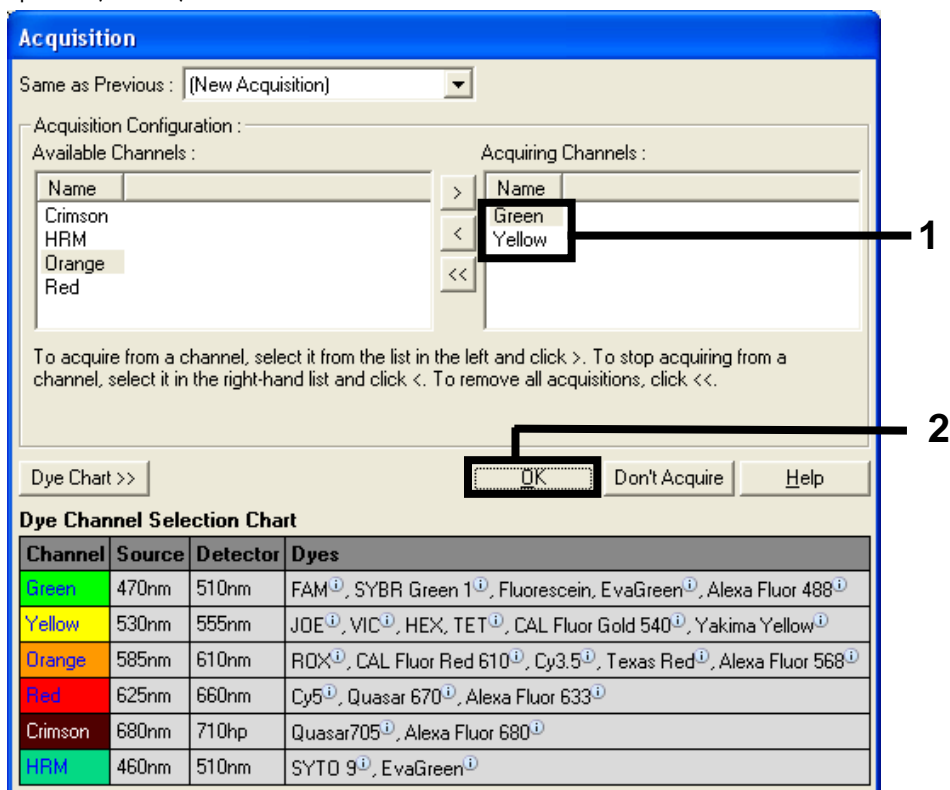
Figur 26. Cyklingssteg vid 95°C. 1 = ruta för cykelrepetitioner, 2 = temperaturinställning för steg ett, 3 = tidsinställning för steg ett.

9. Markera det andra steget och ställ in på 60°C for 60 secs (60 °C i 60 sekunder). Aktivera datahämtning under det här steget genom att välja Not Acquiring (Hämtar inte) (bild 27).



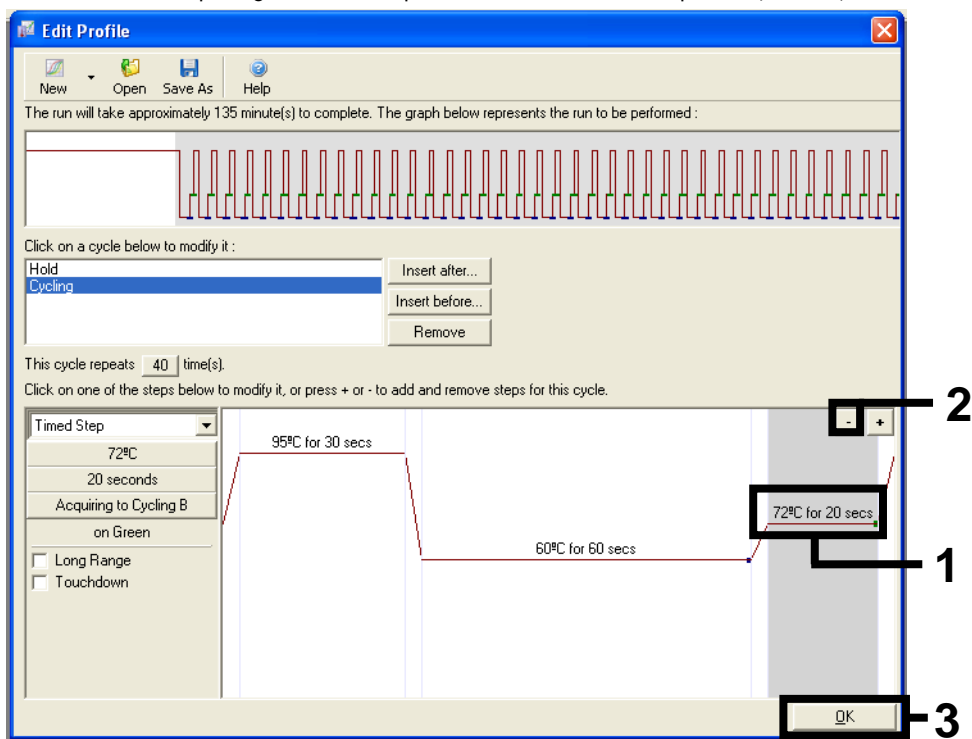
Figur 27. Cyklingssteg vid 60 °C. 1 = temperatur- och tidsinställning för andra steget, 2 = "Not Acquiring" (Hämtar inte).

10. I listan över Available Channels (tillgängliga kanaler) väljer du Green och Yellow och klickar på > för att flytta dem till listan över Acquiring Channels (hämtningskanaler). Klicka på OK (bild 28).



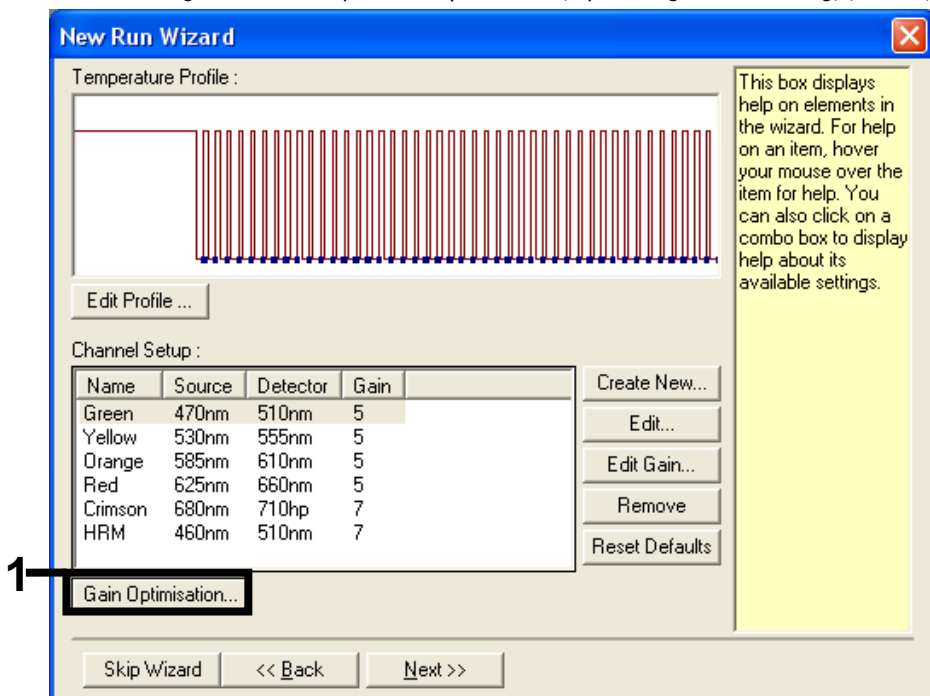
Figur 28. Hämtning vid cyklingssteg vid 60 °C.

11. Markera det tredje steget och klicka på – för att ta bort. Klicka på OK (bild 29).



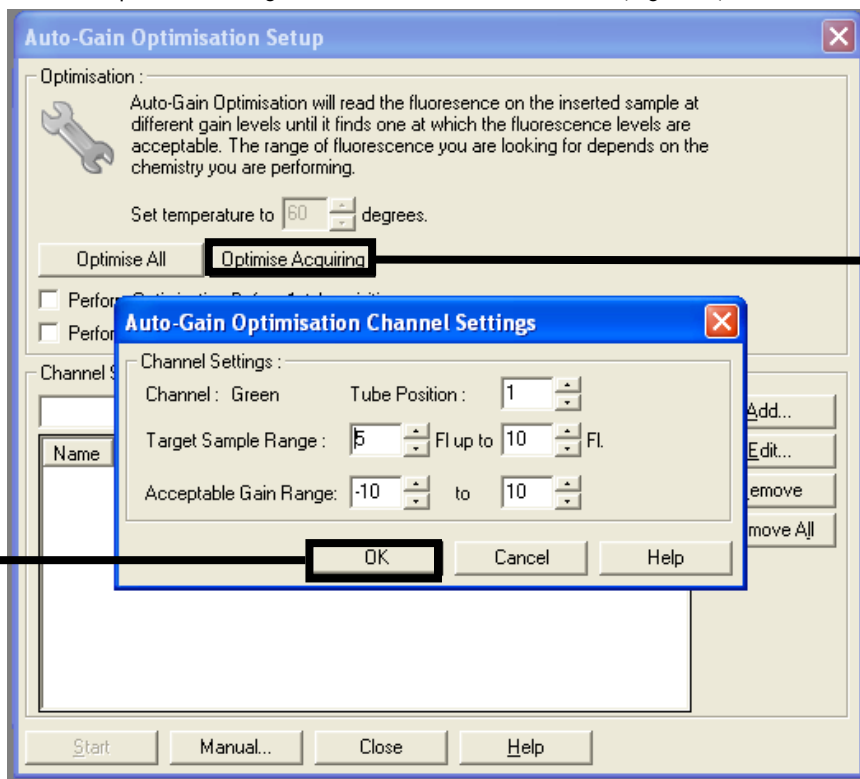
Figur 29. Ta bort förlängningssteg.

12. I nästa dialogruta klickar du på Gain Optimisation (Optimering av förstärkning) (bild 30).



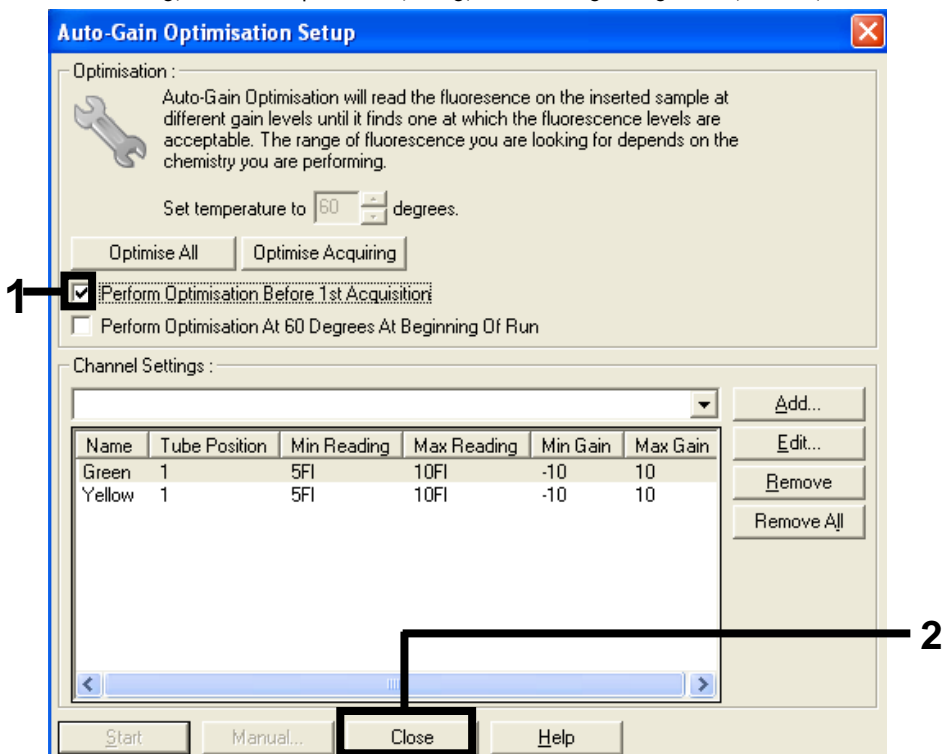
Figur 30. "Gain Optimisation" (Förstärkningsoptimering).

13. Klicka på **Optimise Acquiring** (Optimera hämtning). Kanalinställningarna för varje kanal visas. Klicka på **OK** för att godkänna dessa standardvärden. (Figur 31).



Figur 31. "Auto-gain Optimisation" (Automatisk nivåoptimering) för grön kanal.

14. Markera kryssrutan Perform Optimisation before 1st Acquisition (Utför optimering före första hämtning) och klicka på Close (Stäng) för att återgå till guiden (bild 32).



Figur 32. Val av gröna och gula kanaler.

15. Klicka på Next (Nästa). Klicka sedan på Save (Spara) för att spara dessa mallar på en lämplig plats.

Protokoll: Provbedömning (manuell)

Det här protokollet används för att bedöma den totala mängden amplifierbart DNA i prover och ska utföras innan KRAS-mutationsanalys.

- Förbered proverna enligt beskrivningen i Protokoll: Bedömning av DNA-prover.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet enligt beskrivningen i avsnittet på sidan Protokoll: Förberedelse av *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet Analys av provbedömningsdata.

Protokoll: KRAS-mutationsdetektion (manuell)

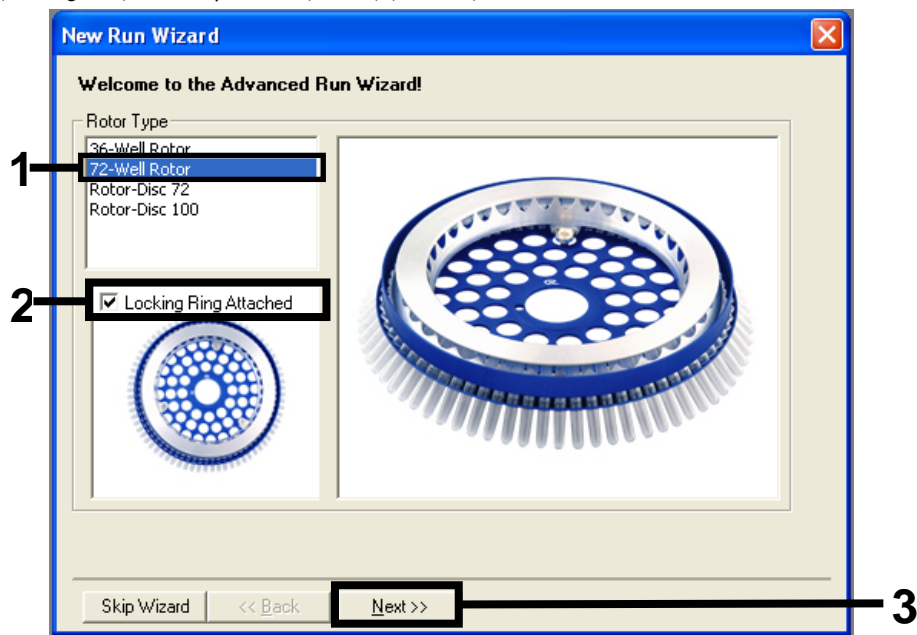
När ett prov har klarat provbedömningen kan det testas för att detektera KRAS-mutationer.

- Förbered proverna enligt beskrivningen i Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet enligt beskrivningen i Protokoll: Förberedelse av *therascreen* KRAS RGQ PCR.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet Analys av KRAS-mutationsdetektion.

Protokoll: Förberedelse av *therascreen* KRAS RGQ PCR

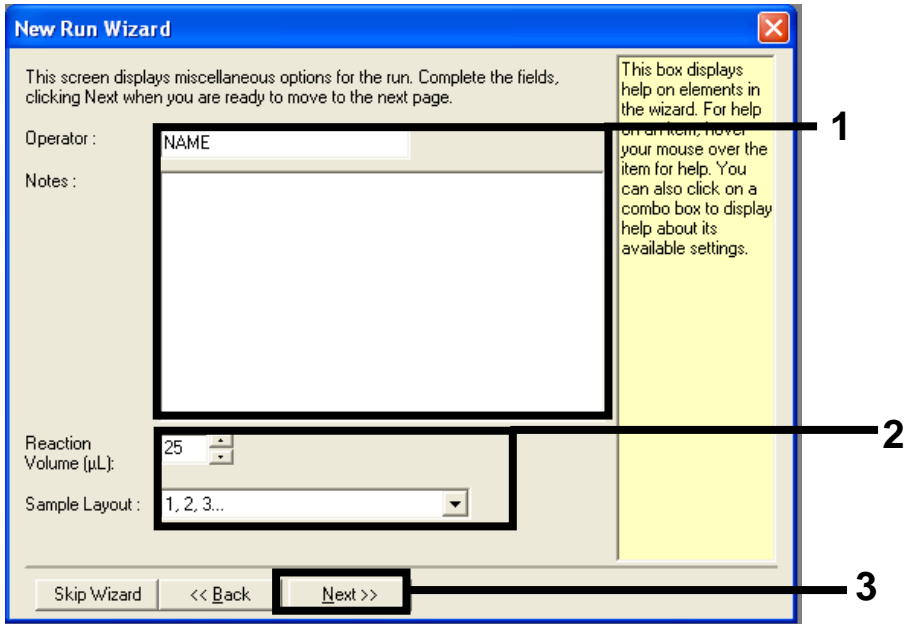
1. Öppna Rotor-Gene Q-programmet 2.3 samt den motsvarande temperaturprofil som skapats.
2. Skapa temperaturprofilen enligt Protokoll: Skapa en temperaturprofil.

Bekräfta att rätt rotor har valts och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" (Låsring fast). Klicka på Next (Nästa) (bild 33).



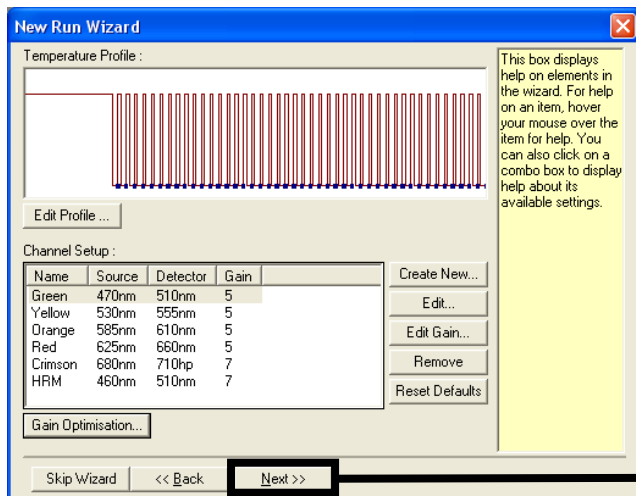
Figur 33. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning) och välkomstfönstret. 1 = "Rotor Type" (Rotortyp), 2 = "Locking Ring Attached" (Låsring fast), 3 = "Next" (Nästa).

3. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och kontrollera att Reaction volume (Reaktionsvolym) är inställd på 25 och att det står "1, 2, 3..." i rutan Sample Layout (Provlayout). Klicka på Next (Nästa) (bild 34).



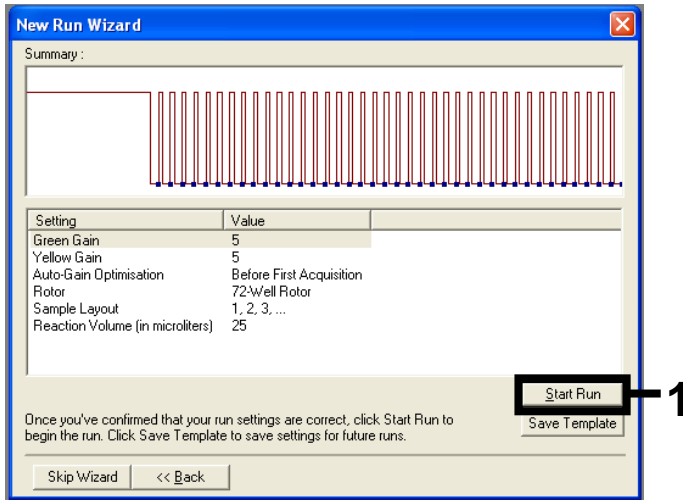
Figur 34. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning). 1 = fälten "Operator" (Användare) och "Notes" (Anteckningar), 2 = fälten "Reaction Volume" (Reaktionsvolym) och "Sample Layout" (Provlayout), 3 = "Next" (Nästa).

4. Lämna alla värden oförändrade i nästa fönster. Ingen redigering krävs om temperaturprofilen har skapats enligt instruktionerna i "", sidan . Skapa en temperaturprofil. Klicka på Next (Nästa) (bild 35).



Figur 35. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning) och fönstret för temperaturredigering. 1 = "Next" (Nästa).

5. Kontrollera sammanfattningen och klicka på Start Run (Starta körning) för att spara körningsfilen och starta körningen (bild 36).



Figur 36. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning). 1 = "Start Run" (Starta körning).

Obs! När körningen har startats visas ett nytt fönster där du antingen kan ange provnamn nu eller klicka på Finish (Slutför) och ange namnen senare genom att välja knappen Sample (Prov) under körningen eller när körningen är avslutad.

Om du klickar på Finish and Lock Samples (Avsluta och läs prover) kan provnamnen inte redigeras. Iaktta särskild försiktighet när du anger provnamn för att säkerställa korrekt provtestning och analys.

Obs! Vid namngivning av prover ska kolumnen "Name" (Namn) lämnas tom för tomma brunnar.

6. När körningen är avslutad analyserar du data enligt avsnitten Analys av provbedömningsdata eller Analys av KRAS-mutationsdetektion.
7. Om du behöver kvantifieringsrapporter klickar du på ikonen Reports (Rapporter) i verktygsfältet i Rotor-Gene Q-körningsfilen.

Tolkning av resultat (manuellt)

När provbedömningskörningen eller mutationsanalysen är avslutad analyserar du data enligt följande procedur.

Programinställningar för analys

1. Öppna aktuell fil med Rotor-Gene Q-programmet 2.3.
2. Om du inte har namngett proverna innan körningen ska utföras klickar du på Edit Samples (Redigera prover).
3. Skriv in namnen på proverna i kolumnen Name (Namn).
4. Klicka på Analysis (Analys). På analysidan klickar du på Cycling A. Yellow för att visa HEX-kanalen.
5. Klicka på Named On (Namngiven).
Obs! Detta säkerställer att inga tomma brunnar ingår i analysen.
6. Välj Dynamic Tube (Dynamiskt rör).
7. Välj Linear scale (Linjär skala).
8. Klicka på Outlier Removal (Ta bort extremvärde) och ange 10 % för NTC Threshold (NTC-tröskelvärde).
9. Ställ in tröskeln på 0.05 (0,05) och bekräfta HEX CT-värdena.
10. På analysidan klickar du på Cycling A. Green för att visa FAM-kanalen.
11. Kontrollera att Dynamic Tube (Dynamiskt rör) är markerat. Klicka på Linear scale (Linjär skala).
12. Klicka på Outlier Removal (Ta bort extremvärde) och ange 10 % för NTC Threshold (NTC-tröskelvärde).
13. Ställ in tröskeln på 0.05 (0,05) och bekräfta FAM CT-värdena.

Analys av provbedömningsdata

Kör kontrollanalys

Se flödesdiagrammet "Kör kontrollanalys" i bild 37.

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen kontaminering av reaktionsmixarna förekommer får kontrollen utan mall inte generera ett C_T -värde i grön kanal under 40. För att garantera att plattan konfigurerades korrekt måste kontrollen utan mall visa amplifiering mellan 31,91–35,16 i gul kanal. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.
- **Positiv kontroll:** Den KRAS-positiva kontrollen (Positive Control, PC) måste ge ett C_T -värde på 23,5–29,5 i grön kanal i var och en av de 8 analyserna. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och anses därför som en misslyckad körning.

Obs! Om någon av de här två körningskontrollerna har misslyckats bör provdata inte användas.

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga måste varje prov- C_T -värde ligga inom intervallet 21,92–32,00 i grön kanal. Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

Provanalys – kontrollanalys

- Provkontrollanalysens C_T är $< 21,92$: Prover med ett kontroll- C_T på $< 21,92$ måste spädas eftersom detta representerar den lägsta nivån för det validerade analysintervallet. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom intervallet ovan baserat på att spädning till hälften kommer att öka C_T med 1. Om provet ligger nära 21,92 rekommenderas spädning för att garantera att ett resultat erhålls från provtestkörningen (KRAS-mutationsdetektion). Prover ska spädas med det vatten som medföljer kitet (nukleasfritt vatten för spädning (Dil.)).

- Provkontrollanalysens C_T är > 32 : Omextraktion av provet rekommenderas eftersom det inte kommer att finnas tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

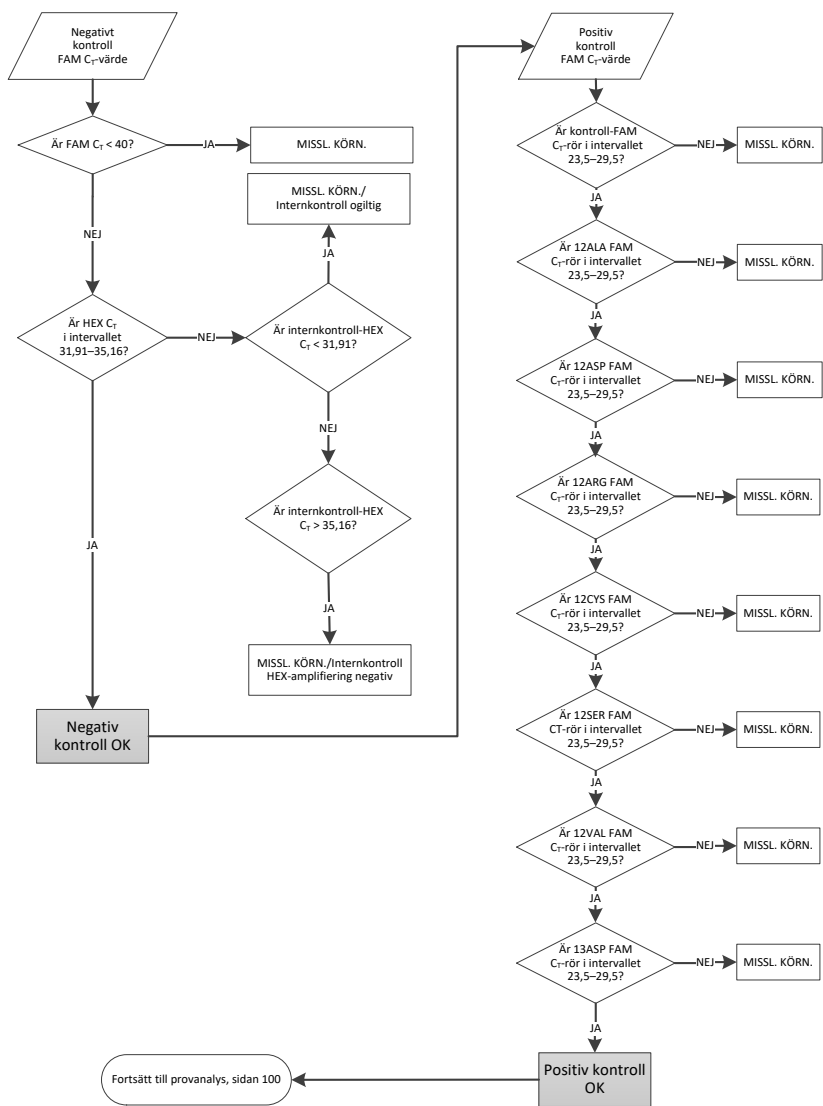
Analys av KRAS-mutationsdetektion

Kör kontrollanalys

Se flödesdiagrammet "Kör kontrollanalys" (bild 37).

- Negativ kontroll: För att garantera att ingen kontaminering av reaktionsmixarna förekommer får kontrollen utan mall inte generera ett C_T -värde i grön kanal under 40. För att garantera att plattan konfigurerades korrekt måste kontrollen utan mall visa amplifiering mellan 31,91–35,16 i gul kanal. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.
- Positiv kontroll: Den KRAS-positiva kontrollen (Positive Control, PC) måste ge ett C_T -värde på 23,5–29,5 i grön kanal i var och en av de 8 analyserna. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och anses därför som en misslyckad körning.

Obs! Om någon av de här 2 körningskontrollerna har misslyckats bör provdata inte användas.



Figur 37. Flödesschema för körning av kontrollanalys.

Provanalys

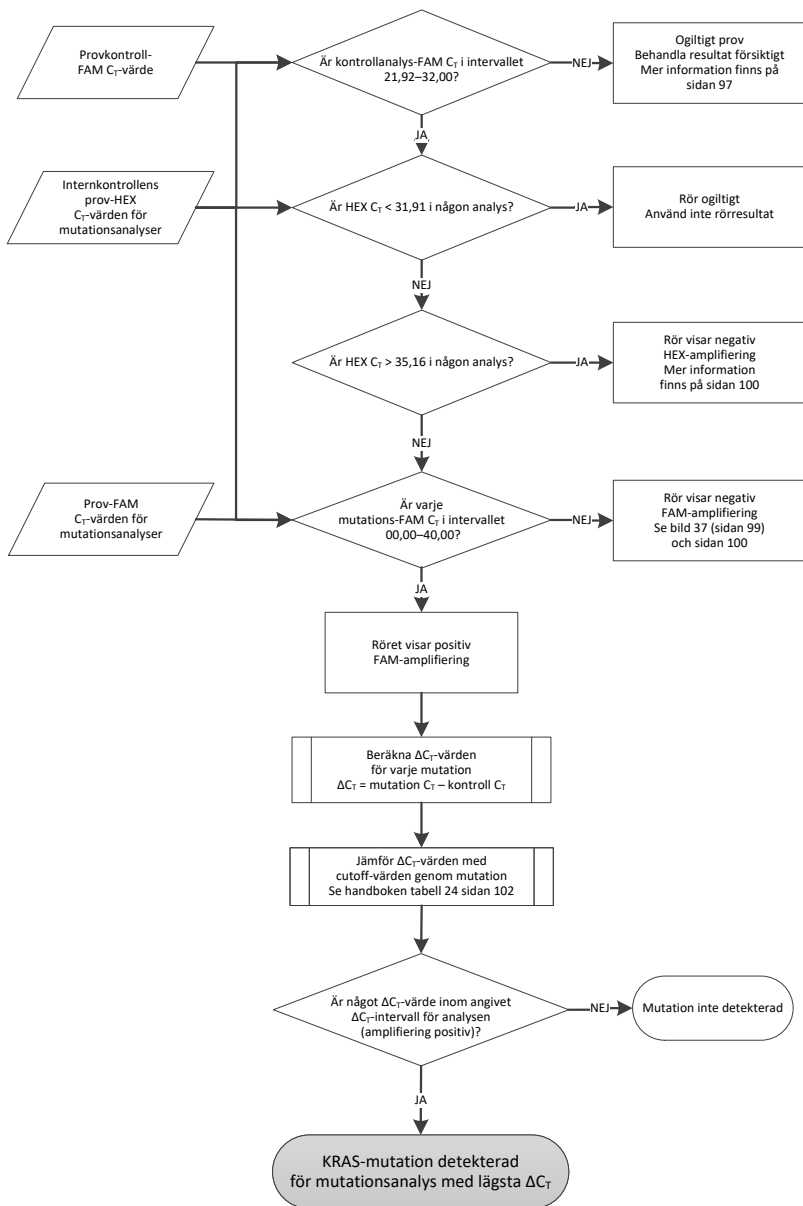
Se flödesdiagrammet "Provanalys" i bild 38.

Provkontroll-FAM CT-värde

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga för kontrollanalysen måste C_T -värdet för varje provkontroll ligga inom intervallet 21,92–32,00 i grön kanal.

Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

- Provkontrollanalysens $C_T < 21,92$: Prover med ett kontroll- C_T på $< 21,92$ skulle överbelasta mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom intervallet ovan baserat på att spädning till hälften kommer att öka C_T med 1. Prover ska spädas med det vatten som medföljer kitet (nukleasfritt vatten för spädning (Dil.)).
- Provkontrollanalysens $C_T > 32$: Gör försiktiga tolkningar, eftersom mutationer med väldigt låg nivå inte kan upptäckas.



Figur 38. Flödesschema för provanalys.

Internkontrollens prov-HEX CT-värde för mutationsanalyser

Se flödesdiagrammet "Provanalys" i bild 38.

Alla brunnar i varje prov måste analyseras. Kontrollera att varje brunn genererar en HEX-signal från internkontrollen. Det finns 3 möjliga slutresultat.

- Om internkontrollens C_T hamnar inom angivet intervall (31,91–35,16) är HEX-amplifieringen positiv.
- Om internkontrollens C_T hamnar ovanför angivet intervall ($> 35,16$) är HEX-amplifieringen negativ.
- Om internkontrollens C_T hamnar under angivet intervall ($< 31,91$) är den ogiltig.

Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämnarna, men det leder även till spädning av mål-DNA. Ett rör med vatten för spädning av prov (Dil.) ingår i kitet.

Prov-FAM CT-värde för mutationsanalyser

FAM-värdena för alla 7 reaktionsmixarna ska kontrolleras mot värdena som finns angivna i tabell 24.

Tabell 24. Acceptabla provvärden för mutationsreaktion (FAM)*

Analys	Acceptabelt C_T -intervall	ΔC_T -intervall
12ALA	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12ASP	0,00-40,00	$\leq 6,60$
12ARG	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12CYS	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12SER	0,00-40,00	$\leq 8,00$
12VAL	0,00-40,00	$\leq 7,50$
13ASP	0,00-40,00	$\leq 7,50$

* Acceptabla värden är inom och inklusive de värden som visas.

- Om FAM C_T hamnar inom angivet intervall är FAM-amplifieringen positiv.
- Om FAM C_T hamnar ovanför angivet intervall eller om amplifiering saknas är FAM-amplifieringen negativ.

Beräkna ΔC_T -värdet för varje mutationsrör med positiv FAM-amplifiering enligt nedan, för att garantera att mutations- och kontroll-C_T-värdena kommer från samma prov.

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

Jämför provets ΔC_T -värde med cutoff-punkten för den aktuella analysen (tabell 24) och se till att korrekt cutoff-punkt tillämpas för varje analys.

Cutoff-punkten är den punkt ovanför vilken en positiv signal eventuellt kan bero på bakgrundssignal för ARMS-primern i vildtyps-DNA. Om provets ΔC_T -värde är högre än cutoff-punkten klassas det som negativt eller som liggande utanför kitets detektionsgräns.

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

Mutation detekterad:

- FAM-amplifiering positiv och ΔC_T vid eller under cutoff-värdet. Om flera mutationer detekterats ska mutationen som rapporteras vara den med lägst ΔC_T -värde.

Mutation inte detekterad:

- FAM-amplifiering positiv och ΔC_T ovanför cutoff-värdet.
- FAM-amplifiering negativ och HEX-amplifiering (internkontroll) positiv.

Ogiltig:

- HEX (internkontroll) är ogiltig.
- FAM-amplifiering negativ och HEX-amplifiering negativ.

Om ett prov visar negativ HEX-amplifiering i ett rör men positiv FAM-amplifiering i ett annat rör kan resultatet "mutation detekterad" i det andra röret fortfarande betraktas som giltigt men den särskilda mutationen som identifierats kanske inte har tilldelats korrekt.

- Om ett prov visar negativ HEX-amplifiering och positiv FAM-amplifiering i samma rör ska resultatet "mutation detekterad" betraktas som giltigt.
- Om ett rör visar ogiltig HEX (internkontroll) får resultatet från det röret inte användas.

Tilldela provmutationsstatus

När alla mutationsreaktionsrör har bedömts fastställs provets mutationsstatus enligt nedan.

- Mutation detekterad: En eller flera av de 7 mutationsreaktionerna är positiva. Om flera mutationer detekterats ska mutationen som rapporteras vara den med lägst ΔC_T -värde.
- Mutation inte detekterad: Alla 7 mutationsreaktionerna är negativa.
- Ogiltig: Ingen mutationsreaktion är positiv och en eller flera mutationsreaktioner är ogiltiga.

Obs! *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit är avsett att detektera mutationer i KRAS-genen i ett DNA-prov. Om ett prov är fastställt som "KRAS-mutation detekterad" ska endast en specifik mutation rapporteras. Om flera mutationer detekterats ska mutationen som rapporteras vara den med lägst ΔC_T -värde.

Viss korsreaktivitet kan förekomma mellan mutationsreaktioner. Om till exempel en högnivå-12ALA-mutation observeras kan vissa av de andra mutationsreaktionerna också visa upp ett positivt resultat. Detta beror på att ARMS-primrar detekterar andra mutationer med liknande sekvens. Om en andra mutationsanalys ger ett positivt svar är detta troligen korsreaktivitet. Dubbla mutationer har observerats, men är ovanliga.

Om en eller flera av mutationsreaktionerna är ogiltiga men en eller flera är positiva kan provet fortfarande fastställas som "KRAS-mutation detekterad", eftersom en mutation förekommer. Den specifika mutation som rapporteras kan emellertid vara felaktig och kan vara ett resultat av korsreaktivitet. Därför bör provet endast fastställas som "KRAS-mutation detekterad".

Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package

therascreen KRAS RGQ PCR Kit är avsett för användning med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med en rotor med 72 brunnar. *therascreen* KRAS Assay Package är tillgängligt separat på CD (kat.nr 9022641).

therascreen KRAS Assay Package kan laddas ned från den motsvarande produktsidan för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit på adressen www.qiagen.com. Nedladdningsinformationen finns i sektionen "Product Resources" (Produktresurser) på fliken "Supplementary Protocols" (Tilläggsprotokoll). Analyspaketprogramvaran kan även beställas på CD.

I paketet ingår "*therascreen* KRAS CE QC Locked Template" och "*therascreen* KRAS CE Locked Template".

Obs! *therascreen* KRAS Assay Package version 3.1.1 (QIAGEN, kat.nr 9023675) fungerar endast med motsvarande version 2.3 av programmet Rotor-Gene Q med *therascreen* KRAS Assay Package. Se till att rätt version av programmet Rotor-Gene Q är installerat innan du fortsätter med installationen av *therascreen* KRAS Assay Package.

Procedur (nedladdning)

1. Ladda ned *therascreen* KRAS RGQ Assay Package från den motsvarande produktsidan för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit på adressen www.qiagen.com.
2. Öppna den nedladdade zip-filen genom att dubbelklicka på filen och packa upp den.
3. Dubbelklicka på `therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe` för att starta installationen.

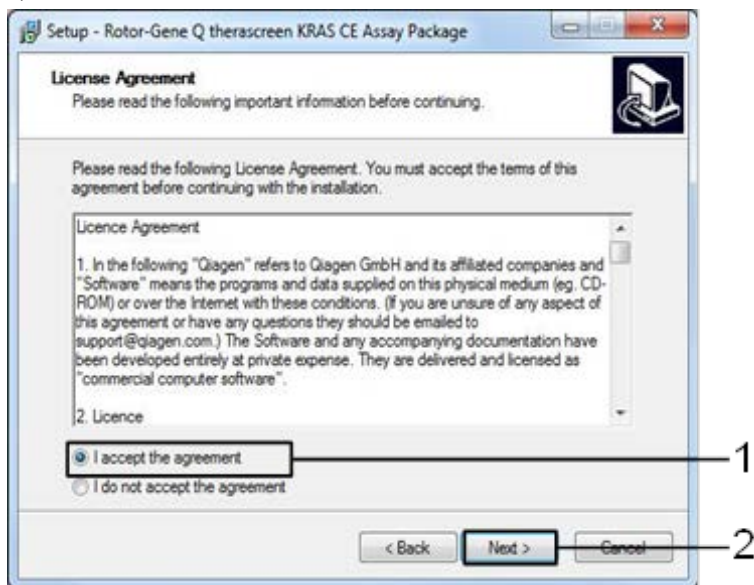
Procedur (CD)

1. Beställ theascreen KRAS RGQ Assay Package CE CD som är kompatibel med det installerade programmet Rotor-Gene Q (se ovan). Den beställs separat från QIAGEN. Version 3.1.1. Kat.nr 9023675.
2. Sätt in CD:n i CD-enheten på den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
3. Dubbelklicka på theascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe eller theascreen_KRAS_Assay_Package_1.0.12.exe för att starta installationen. Installationsguiden startar.
4. Klicka på Next (Nästa) för att fortsätta (bild 39).



Figur 39. Dialogrutan "Setup" (Installera). 1 = "Next" (Nästa).

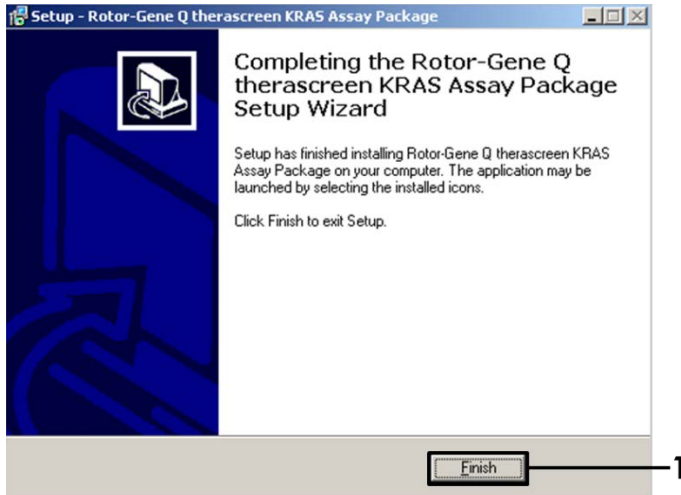
5. Läs licensavtalet i dialogrutan "License Agreement" (Licensavtal) och markera rutan I accept the agreement (Jag godkänner avtalet). Klicka på Next (Nästa) för att fortsätta (bild 40).



Figur 40. Dialogrutan "License Agreement" (Licensavtal). 1 = "I accept the agreement" (Jag godkänner avtalet), 2 = "Next" (Nästa).

Mallkonfigurationen startar automatiskt.

6. I det sista konfigurationsfönstret klickar du på Finish (Slutför) för att slutföra guiden. (Figur 41).



Figur 41. Slutföra installationsguiden.

7. Starta om datorn. Genvägar till både "therascreen KRAS QC Locked Template" (therascreen KRAS QC låst mall) och "therascreen KRAS Locked Template" (therascreen KRAS låst mall) skapas automatiskt på skrivbordet.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: 1 kontrollanalys, 7 mutationsanalyser, positiv kontroll, vatten, <i>Taq</i> DNA-polymeras	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1)	Programprotokollpaket för användning med <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit och instrumentet QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med en rotor med 72 brunnar.	9023675
Rotor-Gene Q och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901

Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – för rening av genomiskt DNA från paraffininbäddad vävnad		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA förberedelser: QIAamp MinElute®-kolumner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	56404

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

Dokumentrevisjoner

Datum	Ändringar
R4, januari 2019	Tillägg av auktoriserad representant (framsida) Uppdaterade avsnittet Symboler. Uppdaterade mallen.
R5 november 2019	Ändring av laglig tillverkare (framsida) Tog bort EC + REP-symbolen från framsidan och avsnittet Symboler Anpassade instrumentnamnet från Rotor-Gene Q MDx till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, vilket överensstämmer med namnet på instrumentetiketten Uppdaterade protokoll för detektering av KRAS-mutationer med ytterligare steg för beredning av masterblandning Korrigerade värden i kolumnerna frekvenser och 95 % konfidensintervall tabell 9. Uppdaterade övergripande överensstämmelse i procent för CRC från 96,4 % till 96,82 % Korrigerade värden i kolumnen LOD C ₉₅ i tabell 14

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Avtal om begränsad licens för *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

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

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN-gruppen); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Registrerade namn, varumärken med mera som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

Får inte användas med avföringsprov.

Får inte användas med urinprov.

Får inte användas med extracellulär nukleinsyra från blodprov.

Får inte användas med cellfritt benmärgsprov.

Får inte användas med salivprov.

KÖPET AV DEN HÄR PRODUKTEN GER ANVÄNDAREN RÄTT ATT ANVÄNDA DEN ENBART FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKA ÅTGÄRDER UNDER VISSA ROCHE-PATENT. INGET ALLMÄNT PATENT ELLER LICENS AV NÅGOT SLAG FÖRUTOM DEN HÄR SPECIFIKA RÄTTIGHETEN INGÅR I KÖPET.

1119793 HB-1861-005 11-2019 © 2019 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com