

Juni 2020

Håndbok for *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Versjon 1



Til bruk i in vitro-diagnostikk

Til bruk sammen med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrumenter



870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND



R5 1121934NO

Innhold

Tiltenkt bruk.....	4
Sammendrag og forklaring	5
Prinsippene for prosedyren	6
Settformat	7
Analyser	7
Kontroller	8
Materialer som medfølger.....	9
Settets innhold	9
Materialer som er nødvendige, men ikke følger med	10
Advarsler og forholdsregler.....	11
Sikkerhetsinformasjon	11
Generelle forholdsregler	11
Oppbevaring og håndtering av reagenser.....	13
Oppbevaring og håndtering av prøver	15
Prosedyre	16
Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner	17
Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett.....	21
Dataanalyse av mutasjonsvurdering	28
Feilsøkingsveiledning	36
Kvalitetskontroll.....	38
Begrensninger	38
Ytelsesegenskaper	40

Analytisk sensitivitet – blankgrense (Limit of Blank, LOB)	40
Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD)	40
Analytisk sensitivitet – ΔC_T -cutoff og ΔC_T -cutoff-område	42
Repeterbarhet og reproduserbarhet	42
Effekt av DNA-input på C_T -verdier	42
Interfererende stoffer	43
Klinisk ytelse	47
Referanser	48
Kontaktinformasjon	48
Symboler	49
Vedlegg A: Mutasjonsdetaljer	50
Bestillingsinformasjon	51
Endringshistorikk for dokument	53

Tiltenkt bruk

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er en in vitro-diagnostisk test for påvisning av exon 19-slettinger, exon 20- og 21-substitusjoner (henholdsvis T790M og L858R) genet for overhudsvekstfaktorreseptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), og gir en kvalitativ evaluering av mutasjonsstatusen. Resultater er beregnet på å bistå klinikerer i å identifisere pasienter med NSCLC som kan ha nytte av behandling med IRESSA® (gefitinib) når en vevsprøve ikke kan evalueres.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit skal brukes av øvet personale i et profesjonelt laboratoriemiljø med DNA-prøver ekstrahert fra blodplasma fra pasienter med ikke-småcellet lungekreft (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er beregnet på bruk i in vitro-diagnostikk.

Sammendrag og forklaring

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er et kit som er klart til bruk for påvisning av mutasjoner i det kreftrelaterte EGFR-genet ved bruk av polymerasekjedereaksjon (Polymerase Chain Reaction, PCR) på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter.

Ved hjelp av Scorpions®- og ARMS-teknologier gjør *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit det mulig å detektere følgende mutasjoner i EGFR-genet mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA.

- Delesjoner i ekson 19
- T790M
- L858R

Metodene i dette settet er svært selektive, og avhengig av total mengde DNA som er til stede, kan en lav mutasjonsprosent detekteres mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA. Selektivitets- og deteksjonsgrensene er bedre enn teknologier som f.eks. fluoroforterminatorsekvensering.

Prinsippene for prosedyren

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit benytter to teknologier – ARMS og Scorpions – for påvisning av mutasjoner under real-time PCR.

ARMS

Allel- eller mutasjonsspesifikk amplifikasjon oppnås ved bruk av ARMS (Amplification Refractory Mutation System). *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) er effektiv til å skille mellom en match og en mismatch ved 3'-enden av en PCR-primer. Spesifikt muterte sekvenser kan også amplifiseres selektivt, også i prøver der hoveddelen av sekvensene ikke bærer mutasjonen. Når primeren har full match, utføres amplifikasjonen med full effektivitet. Når 3'-basen ikke matcher, oppstår kun et lavt nivå bakgrunnsamplifikasjon.

Scorpions

Deteksjon av amplifikasjon utføres med Scorpions. Scorpions er bifunksjonelle molekyler som inneholder en PCR-primer kovalent bundet til en probe. Fluoroforen i denne proben interagerer med en slukker som også er innlemmet i proben, og som reduserer fluorescens. Under polymerasekjedereaksjonen separeres fluoroforen og slukkeren når proben bindes til applikonet. Dette fører til en økning i fluorescens fra reaksjonsrøret.

Settformat

Fire analyser leveres i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit:

- Én kontrollanalyse (Ctrl)
- Tre mutasjonsanalyser

Alle reaksjonsblandinger inneholder reagenser for å påvise mål som er merket med FAM™, og en internkontrollanalyse som er merket med HEX™. Den interne kontrollanalysen kan påvise forekomsten av hemmere som kan føre til falskt negative resultater. FAM-amplifisering kan utkonkurrere den interne kontrollamplifiseringen, og formålet med internkontroll er helt enkelt å vise at i tilfeller der det ikke forekommer FAM-amplifisering er dette et sant negativt resultat og ikke en mislykket PCR-reaksjon.

Analyser

Kontrollanalyse

Kontrollanalysen merket med FAM brukes til å bestemme den totale mengden DNA i en prøve. Denne analysen amplifiserer et område av ekson 2 på EGFR-genet. Primeren og proben er utformet for å unngå kjente EGFR-polymorfismer.

Mutasjonsanalyser

Hver mutasjonsanalyse inneholder en FAM-merket Scorpion-probe og en ARMS-primer for å skille mellom villtype-DNA og spesifikt mutant DNA.

Kontroller

Alle forsøksanalyseringer må inneholde følgende kontroller:

Positiv kontroll

Hver analysering må inneholde en positiv kontroll i rør 1 – 4. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit inneholder EGFR positiv kontroll (Positive Control, PC) som skal brukes som templat i reaksjonen for positiv kontroll. Resultatene for positiv kontroll vil bli vurdert for å sikre at settet fungerer i henhold til angitte akseptkriterier.

Negativ kontroll

Hver kjøring må inneholde en negativ kontroll (ingen-malkontroll; NTC) i rør 9-12. NTC består av nukleasefritt vann (H₂O) som skal brukes som «mal» for ikke-malkontroll. Ikke-malkontrollen brukes for å vurdere potensiell kontaminering under oppsett av kjøringen, og for å vurdere ytelsen til internkontrollreaksjonen.

Vurdering av internkontrollreaksjon

Hver reaksjonsblanding inneholder en intern kontroll i tillegg til målreaksjonen. Hvis det oppstår feil, kan dette innebære at det enten finnes hemmere som kan føre til falske negative resultater, eller at det har oppstått en operatørfeil i oppsettet for det aktuelle røret.

Hvis det oppstår feil ved bruk av intern kontroll pga. PCR-hemming, kan en fortykning av prøven redusere effekten av hemmerne, men det er viktig å merke seg at dette også vil fortykke mål-DNA-et. FAM-amplifisering kan utkonkurrere intern kontrollamplifisering slik at IC_{C_T} (HEX)-verdien som genereres kan falle utenfor det spesifiserte området. FAM-resultatene er fremdeles gyldige for disse prøvene.

Materialer som medfølger

Settets innhold

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Katalognr.			870311
Antall reaksjoner			24
Rød	Control Reaction Mix (Kontrollreaksjonsblanding)	Ctrl	2 x 600 µl
Lilla	T790M Reaction Mix (T790M reaksjonsblanding)	T790M	600 µl
Oransje	Deletions Reaction Mix (Delesjonreaksjonsblanding)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R reaksjonsblanding)	L858R	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR positiv kontroll)	PC	300 µl
Mint	<i>Taq</i> DNA polymerase (<i>Taq</i> DNA-polymerase)	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Hvit	Nuclease-Free Water for No Template Control (Nukleasefritt vann for ikke-templatkontroll)	NTC	1 x 1,9 ml
Hvit	Nuclease-Free Water for Dilution (Nukleasefritt vann til fortykning)	Dil	1 x 1,9 ml
Bruksanvisning (håndbok) for <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			1

Materialer som er nødvendige, men ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

- DNA-ekstraksjonssett (se «Prosedyre,» side 16)
- Dedikerte pipetter* (justerbare) for klargjøring av prøver
- Dedikerte pipetter* (justerbare) til klargjøring av PCR-mastermiks
- Dedikerte pipetter* (justerbare) til pipettering av templat-DNA
- DNase-, RNase- og DNA-frie pipettespisser med filter (for å unngå krysskontaminasjon, vi anbefaler pipettespisser med aerosolbarrierer)
- Vannbad eller lignende enhet med plass til 50 ml-sentrifugerør ved 60° C.
- Varmebløkk eller lignende enhet som kan inkubere ved 56° C†
- Knust is
- Arbeidsbenksentrifuge* med rotor til 2 ml-reaksjonsrør
- Vorteksmikser
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument*† med fluorescenskanaler for Cycling Green og Cycling Yellow (påvisning av henholdsvis FAM og HEX)
- Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3.5 eller nyere
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, til bruk med 72-well rotor (kat. nr. 981103 eller 981106)
- DNase-, RNase- og DNA-frie mikrosentrifugerør til fremstilling av Master Mix
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumsbløkk for manuelt reaksjonsoppsett med en pipette med enkeltkanal (QIAGEN, kat. nr. 9018901)

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

† I enkelte land er det eventuelt mulig å bruke Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumentet som er produsert i mai 2011 eller senere. Serienummeret på baksiden av instrumentet inneholder produksjonsdatoen. Serienummeret er i formatet «mmåånn» der «mm» angir produksjonsmåned i tall, «åå» angir de siste to tallene i produksjonsåret og «nnn» angir den unike instrument-ID-en.

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Til profesjonell bruk

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Generelle forholdsregler

Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Bruk DNase-, RNase- og DNA-frie pipettespisser med filter, og pass på at pipettene er kalibrert i henhold til produsentens anvisninger.
- Positivt materiell (prøver og positive kontroller) skal oppbevares og ekstraheres atskilt fra alle andre reagenser og tilsettes i reaksjonsblandingen i et eget avgrenset område.
- Tin alle komponentene grundig ved romtemperatur (15 – 25° C) før igangsetting av en analyse.
- Når komponentene er tint, kan de blandes ved å snu hvert rør 10 ganger og sentrifugere det en kort stund.

Merk: Vær svært forsiktig med tanke på å forhindre kontaminering av polymerasekjedereaksjoner (Polymerase Chain Reaction, PCR) med syntetisk kontrollmateriale. Vi anbefaler at du bruker egne, tilpassede pipetter til å klargjøre reaksjonsblandinger og tilsette DNA-templat. Klargjøringen og pipetteringen av reaksjonsblandinger må utføres i et annet område enn området som brukes til tilsetning av templat. Rotor-Gene Q-rør må ikke åpnes etter at PCR-analyseringen er fullført. Dette for å forhindre laboratoriekontaminering med materiale etter PCR-analysen.

Merk: Reagensene valideres for manuelt oppsett. Dersom en automatisert metode brukes, kan det redusere antallet mulige reaksjoner grunnet reagenser som er påkrevd for å fylle «dødvolum» på disse instrumentene.

Merk: Alle reagenser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit settes sammen spesifikt til bruk sammen med de bestemte testene. Alle reagenser som følger med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, skal bare brukes med de andre reagensene i det samme *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reagensene i settet må ikke erstattes med andre produkter dersom optimal ytelse skal opprettholdes.

Merk: Kun *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) vedlagt i settet skal benyttes. Bytt ikke ut med *Taq* DNA-polymerase fra andre sett av samme eller en annen type, eller med *Taq* DNA-polymerase fra en annen leverandør.

Merk: Reagenser for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er optimalt fortynnet. Videre fortynninger av reagenser anbefales ikke, da dette vil påvirke ytelsen negativt. Det er ikke anbefalt å bruke mindre enn 25 µl reaksjonsvolum, da dette vil øke risikoen for falske negative resultater.

Oppbevaring og håndtering av reagenser

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit sendes på tørris. Hvis en komponent i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ikke er frosset ved ankomst, hvis ytteremballasjen har blitt åpnet under frakt, eller hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkeseddel, bruksanvisning eller reagenser, må du kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren (se www.qiagen.com).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit må oppbevares umiddelbart etter mottak ved -30 til -15°C i en mørk fryser med konstant temperatur. Når *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit oppbevares under de spesifiserte oppbevaringsforholdene, er settet stabilt frem til angitt utløpsdato.

Når reagenser først er åpnet, kan de oppbevares i originalemballasjen ved -30 til -15°C i 12 måneder eller frem til utløpsdatoen som oppgis på emballasjen, det som kommer først. Gjentatt tining og frysing bør unngås. Maks. åtte fryse-tine-sykluser kan benyttes.

Reagensene må tines ved omgivelsestemperatur i minst 1 time og maks 4,5 timer. Når reagensene er klare til bruk, kan PCR-reaksjonene settes opp og Rotor-Gene Q-rørene, som inneholder hovedblandingene og DNA-prøven, kan lastes over på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet umiddelbart. Den totale tiden fra start av PCR-oppsett til start av kjøringen bør ikke overskride:

- 6 timer hvis oppbevart ved romtemperatur
Merk: Denne tiden inkluderer både PCR-oppsett og -oppbevaring.
- 18 timer hvis oppbevart i kjøleskap ($2 - 8^{\circ}\text{C}$)
Merk: Denne tiden inkluderer både PCR-oppsett og -oppbevaring.

Merk: Scorpions (i likhet med alle fluorescensmerkede molekyler) i reaksjonsblandingsreagensene er lyssensitive. Beskytt kontroll- og reaksjonsblandingsreagenser mot lys for å unngå fotobleking.

Reagensene i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er optimalt fortynnet og trenger ingen videre rensing eller behandling før de brukes i analysen i henhold til *bruksanvisningen (håndbok) for theascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.

Oppbevaring og håndtering av prøver

Merk: Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

Prøvematerialet må være humant genomisk DNA, ekstrahert fra plasma. Prøvene må transporteres i henhold til standard patologimetodologi for å sikre prøvekvallitet.

Prosedyre

DNA-ekstraksjon

Ytelseskaraktistikkene for dette settet er opprettet ved å bruke DNA ekstrahert med QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (kat. nr. 55114). Når QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit brukes, må DNA-ekstraksjonen skje i henhold til instruksjonene i håndboken med spesielt fokus på følgende:

- Startvolumet for plasma er 2 ml.
- Før DNA-ekstraksjon skal 2 ml plasma sentrifugeres ved 3000 o/min i 2 minutter og supernatanten overføres til et rent rør.
- Proteinase K-volumet bør være på 250 µl.
- Proteinase K-nedbrytning bør pågå i 1 time ved 60° C.
- Renset genomisk DNA skal elueres i 55 µl Buffer AVE (følger med i QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Renset genomisk DNA skal oppbevares ved –30° C til –15° C.

Merk: Alle analyser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit genererer korte PCR-produkter. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit vil imidlertid ikke virke på kraftig fragmentert DNA.

Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner

Viktige punkter før du starter

- For å oppnå korrekte resultater må du sørge for at den beskrevne blandingsprosedyren utføres ved hvert blandetrinn i analyseoppsettsprosessen.
- Opptil 16 prøver kan vurderes på hver kjøring.
- Før du starter prosedyren, les «Generelle forholdsregler» på side 11.
- Ta deg god tid til å bli kjent med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM før du starter protokollen. Se instrumentets bruksanvisning.
- Bruk ikke vorteksmikser på *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) eller enhver blanding som inneholder *Taq* DNA-polymerase, siden dette kan forårsake inaktivering av enzymet.
- Pipetter *Taq* ved å plassere pipettespissen rett under væskeoverflaten for å unngå at spissen dekkes av overskytende enzym.
- For hver DNA-prøve må kontroll og mutasjonsanalyser analyseres i samme PCR-serie for å unngå variasjoner mellom kjøringene i de ulike analyseseriene.
- For å sikre effektiv bruk av reagensene i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, må DNA-prøver samles i den grad det er mulig for å opprette fulle analyseringer. Testing av prøver enkeltvis eller i små antall bruker opp mer reagens, og reduserer det totale antall prøver som kan testes med et enkelt *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Dette må du gjøre før du starter

- Før bruk må alle reagenser tines helt i minst 1 time og maks 4,5 timer ved romtemperatur (15 – 25° C), blandes ved å vende rørene 10 ganger, og sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet i bunnen av røret.
- Se til at *Taq* holder romtemperatur (15 – 25° C) før hver bruk. Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet i bunnen av røret.
- Bland alle prøver ved å snu dem 10 ganger, og sentrifuger dem en kort stund for å samle innholdet i bunnen av røret.

Prosedyre

1. Tin helt alle reaksjonsblandinger, nukleasefritt vann for ikke-templatkontroll (No Template Control, NTC) og EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) skal tines helt ved romtemperatur (15 – 25° C) i minst 1 time (Tabell 1). Når reagensene er tint, skal de blandes ved å vende hvert rør 10 ganger for å unngå lokale konsentrasjoner av salter. Sentrifuger deretter rørene en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.

Tabell 1. Tinetider, PCR-oppsettider og oppbevaringstemperaturer

Min. optimingstid	Maks. optimingstid	Oppbevaringstemperatur etter PCR-oppsett	Maks. tid for PCR-oppsett og oppbevaring
1 time	4,5 timer	Romtemperatur (15 – 25° C)	6 timer
1 time	4,5 timer	2 – 8° C	18 timer

Merk: PCR-oppsett skal utføres ved omgivelsestemperatur. Begrepet «Oppbevaring» viser til tiden mellom fullføringen av PCR-oppsett og starten av PCR-kjøringen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Merk: Få *Taq* DNA-polymerase (*Taq* i rør) til å oppnå romtemperatur (15 – 25° C) samtidig med de andre reagensene (se «Oppbevaring og håndtering av reagenser» på side 13). Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet i bunnen av røret.

2. Utfør følgende trinn:

- 2a. Merk fire mikrosentrifugerør (medfølger ikke) i henhold til hver tilhørende reaksjonsblanding vist i Tabell 2.
- 2b. Klargjør tilstrekkelige hovedblandinger (kontroll eller mutasjonsreaksjonsblanding [rør CTRL, T790M, Slettinger, L858R] pluss *Taq* DNA-polymerase [*Taq*]) for DNA-prøvene, én EGFR-positiv kontrollreaksjon (rør-PC) og én nuklease-fritt vann for ikke-templatkontroll (rør NTC)-reaksjon i henhold til volumet i Tabell 2.

Merk: Inkluder reagenser for 1 prøve, slik at det vil være nok til PCR-oppsettet.

Mastermiksen inneholder alle komponentene som er nødvendige for PCR, unntatt prøven.

Tabell 2. Klargjøring av Master Mix*

Analyse	Reaksjonsmiksrør	Reaksjonsblandingsvolum	Mengde Taq DNA-polymerase (Taq i rør)
Kontroll	CTRL	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
T790M	T790M	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
Delesjoner	Del	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
L858R	L858R	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)

* Når hovedblandingen skal klargjøres, må du klargjøre nok til én ekstra prøve for å ha nok til PCR-oppsettet.

Merk: Ved klargjøring av Master Mix tilsettes den påkrevde mengden kontroll- eller mutasjonsreaksjonsblanding først og Taq DNA-polymerasen til slutt.

3. Plasser riktig antall PCR 4-rør (hver remse inneholder fire rør) i lasteblokken i henhold til oppsettet i Tabell 3. Ikke sett på lokkene.

Merk: La hettene ligge i plastbeholderen til de skal brukes.

4. Sett korken på røret for Master Mix, og vend røret 10 ganger for å blande Master Mix. Sentrifuger kort etterpå for å sikre at blandingen faller til bunnen av røret. Tilsett 20 µl Master Mix i hvert relevant PCR-rør umiddelbart.
5. Tilsett 5 µl nukleasefritt vann (H₂O) umiddelbart til ikke-templatkontrollens PCR-rør (PCR-rør nr. 9 – 12), og sett lokk på rørene.
6. Tilsett 5 µl av hver prøve til prøverørene (PCR-rør nr. 5 – 8, 13 – 16 og 17 – 72), og sett lokk på rørene.
7. Tilsett 5 µl EGFR positiv kontroll (Positive Control, PC) til de positive kontrollrørene (PCR-rør nr. 1 – 4). Hver DNA-prøve må kontrolleres med både kontrollen og alle mutasjonsanalysene. Oppsettet vises i Tabell 3.

Tabell 3. Oppsett for kontroll- og mutasjonsanalyser

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

8. Bruk en permanent tusj, og merk lokkene på de første rørene i den laveste tallposisjonen i hvert PCR 4-rør (f.eks. posisjon 1, 5 og 9, osv.) for å vise hvilken retning rørene skal lastes inn i 72-brønnersrotoren i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Vend rør med påsatt lokk 4 ganger for å blande prøven og reaksjonsblandingen.
10. Plasser alle PCR 4-rør i riktige posisjoner i 72-brønners rotoren, og kontroller visuelt at alle rørene inneholder likt volum.
Merk: Forsikre deg om at rørremmene ikke har omvendt rekkefølge når du overfører dem til rotoren.
11. Dersom rotoren ikke er full, fyll gjenværende ledige plasser med tomme rør med påsatt lokk.
12. Sett umiddelbart rotoren inn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Se til at låseringen (Rotor-Gene Q MDx-tilbehør) er plassert øverst på rotoren for å sikre rørene under kjøringen.
13. Se instrumentoppsettet for Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (se «Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett» på side 21) for å opprette en temperaturprofil og starte kjøringen.

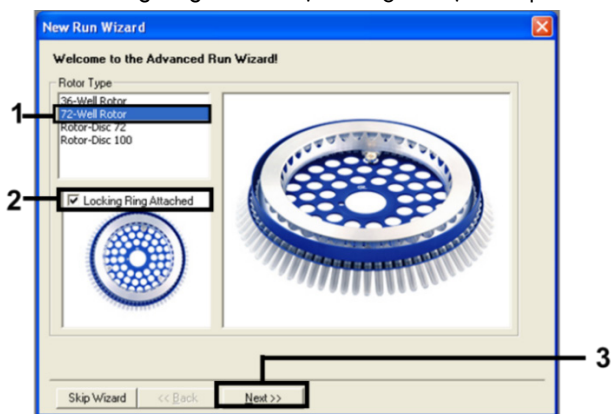
Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett

Detaljene vises i Tabell 4.

Tabell 4. Syklusparametere

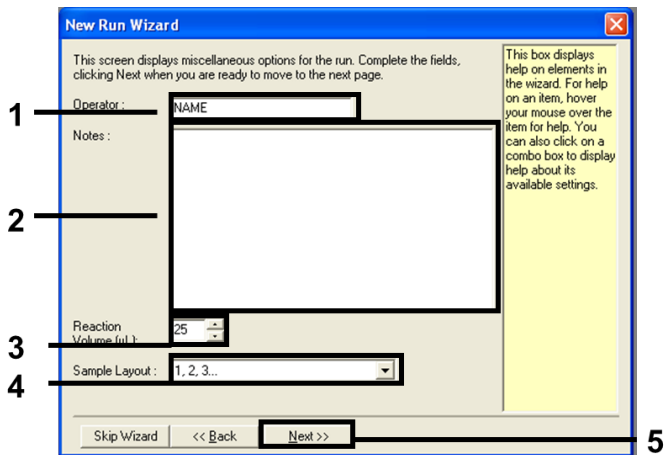
Sykluser	Temperatur	Tid	Dataavlesning
1	95° C	15 minutter	Ingen
40	95° C	30 sekunder	Ingen
	60° C	60 sekunder	Green and Yellow

1. Dobbeltklikk på programvareikonet til Rotor-Gene Q-seriens programvareversjon 2.3 på datamaskinens skrivebord som er tilkoblet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Velg fanen «Advanced» (Avansert) i dialogboksen «New Run» (Ny analyse) som vises.
2. Opprett et nytt templat ved å velge Empty Run (Nullstill analyse), og klikk deretter på New (Ny).
Dialogboksen «New Run Wizard» (Veiviser for ny kjøring).
3. Velg "72-Well Rotor" (72 brønners rotor) som rotortype. Kontroller at låseringen er festet, og merk av i boksen Locking Ring Attached (Låsering festet). Klikk på Next (Neste) (Figur 1).



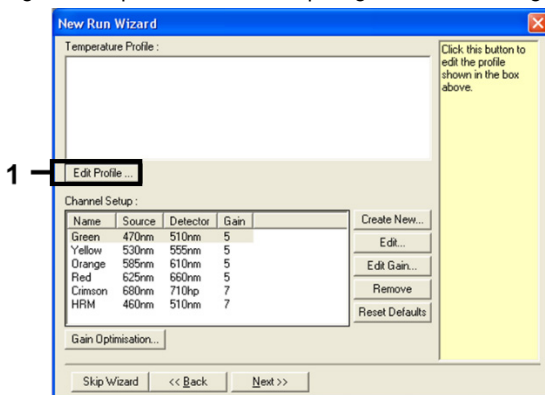
Figur 1. Dialogboksen «New Run Wizard» (Veiviser for ny kjøring)

4. Skriv inn navnet på operatøren i feltet Operator (Operatør). Legg inn eventuelle kommentarer, og angi verdien i feltet Reaction Volume (Reaksjonsvolum) til 25. Påse at verdiene i feltet Sample Layout (Prøveoppsett) er 1, 2, 3 Klikk på Next (Neste) (Figur 2).



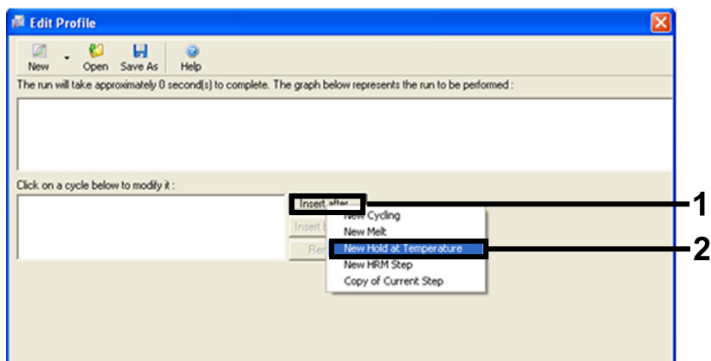
Figur 2. Innlegging av operatørnavn og reaksjonsmengder.

5. Klikk på Edit Profile (Rediger profil) i dialogboksen «New Run Wizard» (Veiviser for ny kjøring) (Figur 3) og still inn parameterne for kjøring i henhold til følgende prosedyre.



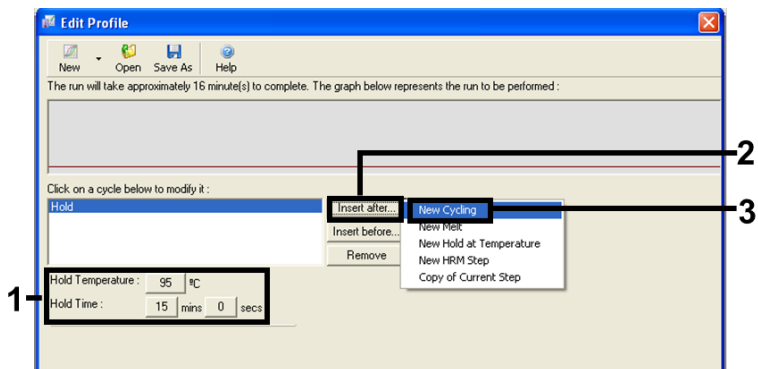
Figur 3. Redigering av profilen.

6. Klikk på Insett after (Sett inn etter) og velg New Hold at Temperature (Nytt hold ved temperatur) (Figur 4).



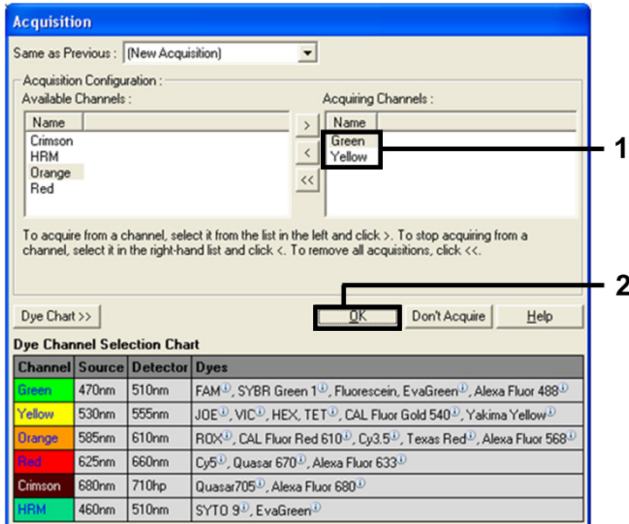
Figur 4. Innsetting av et innledende inkubasjonstrinn.

7. Endre verdien i feltet Hold Temperature (Pausetemperatur) til 95° C og verdien i Hold Time (Pausetid) til 15 mins 0 secs (15 min. 0 sek). Klikk på Insett After (Sett inn etter) og velg deretter New Cycling (Ny syklus) (Figur 5).



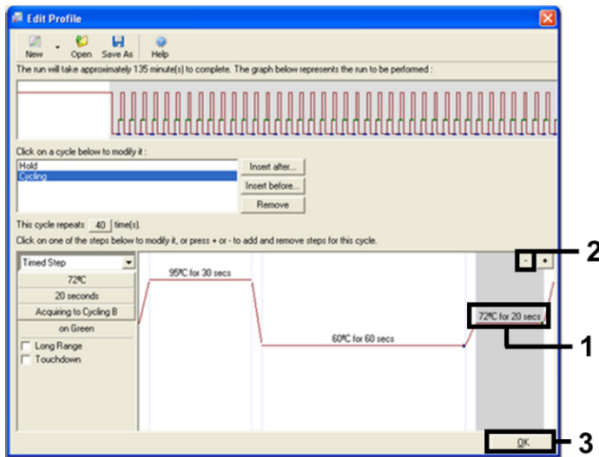
Figur 5. Innledende inkubasjonstrinn ved 95° C.

10. Velg Green og Yellow fra listen Available Channels (Tilgjengelige kanaler), og klikk deretter på > for å overføre dem til listen Acquiring Channels (Kanaler som skal avleses). Klikk på OK (Figur 8).



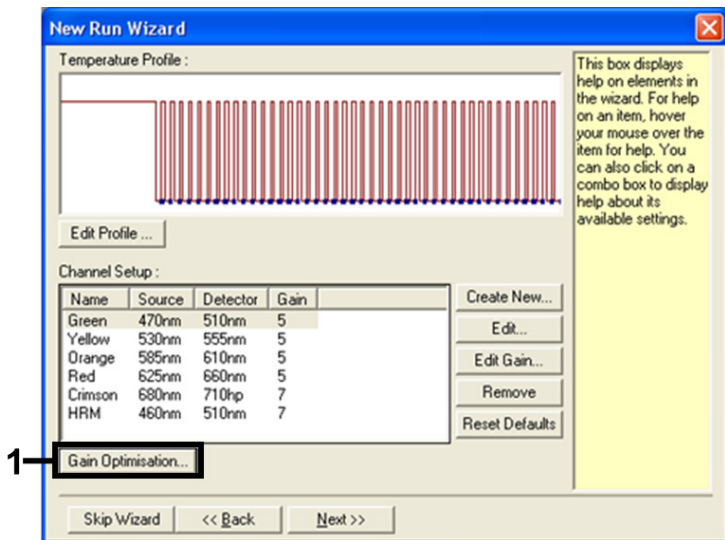
Figur 8. Avlesning ved syklustrinn på 60° C.

11. Marker det tredje trinnet og klikk på knappen - for å slette. Klikk OK (Figur 9).



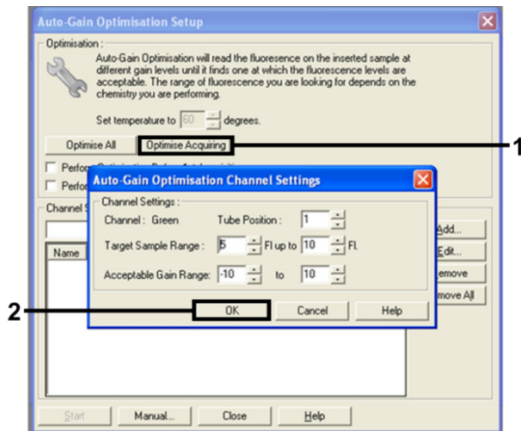
Figur 9. Fjerning av forlengelsestrinn.

12. I neste dialogboks klikker du på Gain Optimisation (Optimal forsterkning) (Figur 10).



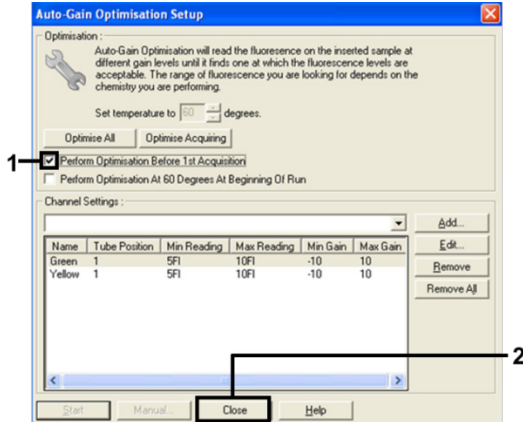
Figur 10. Optimal forsterkning.

13. Klikk på Optimise Acquiring (Optimaliser avlesning). Kanalinnstillinger vises for hver kanal. Klikk OK for å akseptere disse standardverdiene for begge kanaler. (Figur 11).



Figur 11. Automatisk optimal forsterkning for den grønne kanalen.

14. Kryss av i boksen Perform Optimisation before 1st Acquisition (Utfør optimalisering før 1. avlesning) og klikk deretter på Close (Lukk) for å gå tilbake til veiviseren (Figur 12).



Figur 12. Valg av Green og Yellow kanaler.

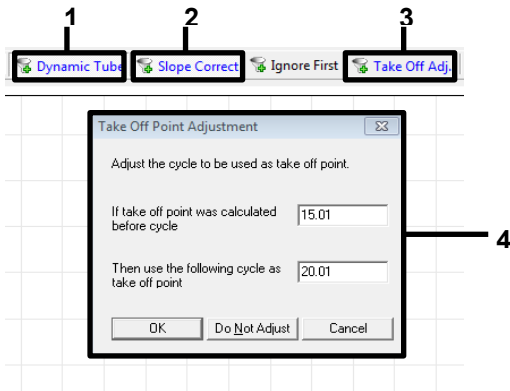
15. Klikk på Next (Neste) for å lagre templatene på riktig sted ved å velge «Save Template» (Lagre templat).

Dataanalyse av mutasjonsvurdering

Når analyseserien er fullført, må dataene analyseres med følgende prosedyre.

Sette opp programvareanalysen

1. Åpne den riktige filen ved hjelp av programvaren for Rotor-Gene Q-serien 2.3.5 eller nyere.
2. Klikk på Edit Samples (Rediger prøver) hvis prøvene ikke allerede har fått navn før kjøringen har startet.
3. Angi prøvenavnene i kolonnen Name (Navn).
Merk: La navnefeltene stå tomme for de tomme brønnene.
4. Klikk på Analysis (Analyse). Klikk på Cycling A Yellow på analysesiden for å merke av HEX-kanalen.
5. Kontroller at alternativet Dynamic Tube (Dynamisk rør) er merket. Klikk på Slope Correct (Riktig helning) og Linear scale (Lineær skala).
6. Klikk på Take Off Adj (Utgangspunktjust.), og legg inn 15.01 og 20.01 som vist i Figur 13.



Figur 13. Normaliseringsinnstillinger for EGFR-analyse. 1 = "Dynamic Tube," (Dynamisk rør,) 2 = "Slope Correct," (Riktig helling) 3 = "Take Off Adj.," (Fjern punktering) 4 = dialogvinduet «Take Off Point Adjustment» (Start punktjustering) med parameterverdier.

7. Angi terskelen til 0.02 og kontroller HEX C_T -verdiene.

8. Klikk på Cycling A, Green for å vise FAM-kanalen. Angi parametere som i Figur 13 over.
Det dynamiske røret merkes.
9. Klikk på Slope Correct (Riktig helning) og Linear scale (Lineær skala).
10. Angi terskelen til 0.075 og kontroller FAM C_T verdiene.

Seriekontrollanalyse

Når analyseringen er ferdig, kan dataene analyseres på følgende måte.

- **Negativ kontroll:** Hvis du vil sikre at det ikke er noen templatkontaminering, kan ikke NTC generere en C_T -verdi på under 40 i den grønne kanalen (FAM). NTC må vise amplifikasjon på 29,85 – 35,84 i den gule (HEX)-kanalen (internkontroll) for å sikre at analyseserien er satt opp korrekt.

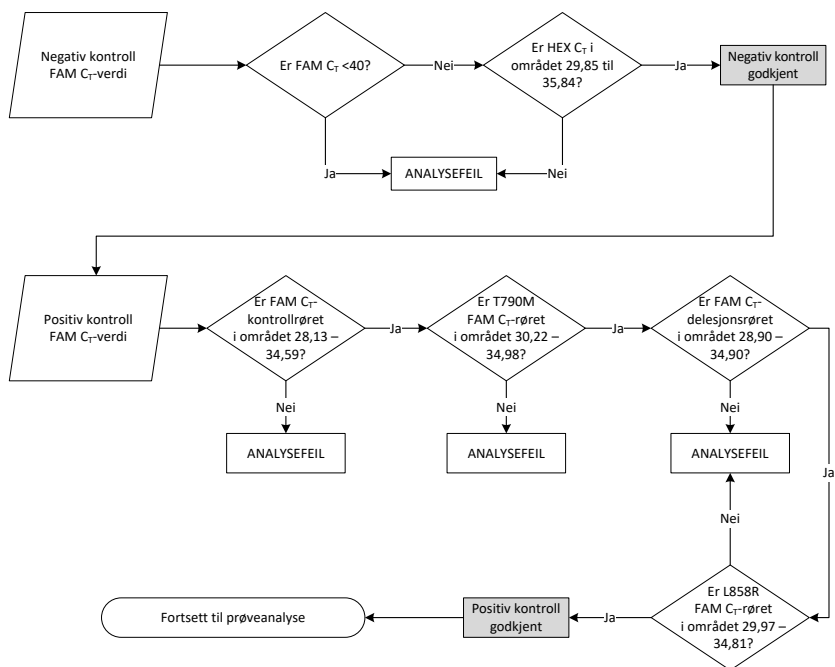
Hvis det er positiv amplifikasjon i den grønne kanalen og/eller amplifikasjon utenfor området 29,85 – 35,84 i den gule kanalen, er analysen ugyldig.

- **Positiv kontroll:** EGFR positiv kontroll (Positive Control, PC) må gi en C_T for hver reaksjonsblanding som er innenfor, og som inkluderer angitt område i Tabell 5. En analyseserie med positiv kontrollverdi utenfor dette området indikerer et analyseoppsettproblem, og analyseserien bør betegnes som mislykket. Fortsett med analyseringen hvis den positive kontrollen gir en C_T innenfor området (FAM), men den interne kontrollen C_T (HEX) er utenfor området på 29,85 til 35,84.

Merk: Prøvedata må ikke brukes hvis den negative eller positive kontrollen mislykkes.

Tabell 5. Godkjent C_T-område for analysekontroller

Reaksjonskontroll	Analyse	Kanal	C _T -område
Positiv kontroll	Kontroll	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Delesjoner	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Ikke-templatkontroll	Alle fire reaksjonsblandinger	Green (FAM)	≥40,00
	Alle fire reaksjonsblandinger	Yellow (HEX)	29,85-35,84



Figur 14. Arbeidsflyt for seriekontrollanalyse.

Forutsatt at begge analysekontrollene er gyldige, må hver prøvekrollanalyse C_T -verdi ligge innenfor et område på 23,70 – 31,10 i den grønne (FAM) kanalen (Tabell 6).

Tabell 6. Godkjent FAM C_T -område for prøvekrollreaksjon

Reaksjonsblanding	Kanal	Akseptabelt C_T -område
Kontroll	Green (FAM)	23,70 – 31,10

Hvis prøven ligger utenfor dette området, gis følgende råd.

- Prøvekrollanalyse- C_T på <23,70: Prøver med en kontroll- C_T på <23,70 vil overbelaste mutasjonsanalysene og må fortynnes. For å kunne se hver mutasjon på et lavt nivå, må de overkonsentrerte prøvene fortynnes slik at de faller innenfor området ovenfor med utgangspunkt i at en halv fortynning vil øke C_T med 1.
- Prøvekrollanalyse C_T >31,10: Prøven inneholder ikke tilstrekkelig DNA for at analysen skal kunne utføres.

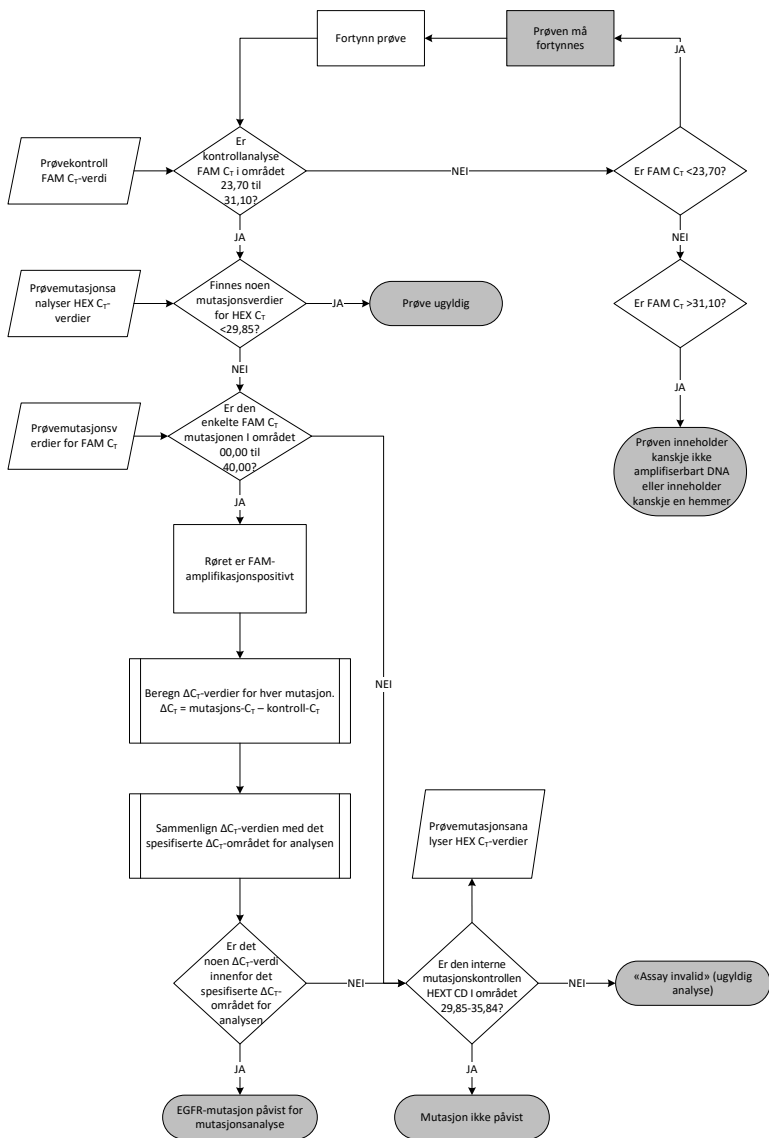
Forutsatt at begge analysekontrollene er gyldige og kontrollanalysen er innenfor området angitt i Tabell 6, må hver prøvemutasjons- C_T -verdi ligge innenfor området angitt i Tabell 7 i den grønne (FAM) kanalen. Hvis prøven ligger utenfor dette området, gis følgende råd.

Tabell 7. Godkjente reaksjonsverdier for prøvemutasjon

Reaksjon	Reaksjonsblanding	Kanal	C_T -område
Mutasjonsreaksjon	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Delesjoner	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Alle tre mutasjoner	Yellow (HEX)	29,85-35,84

Merk: Dersom en prøve ikke genererer en C_T (f.eks. $C_T > 40$), kan grunnen være tilstedeværelsen av en hemmer, en feil i analyseoppsettet eller at det ikke fins noe amplifiserbart EGFR DNA.

- Intern kontroll C_T -verdi er innenfor 29,85 – 35,84: Det fins ikke noe amplifiserbart EGFR DNA.
- Internkontroll- C_T -verdien er ikke innenfor området 29.85 – 35.84: Dette kan indikere en feil i analyseoppsettet eller tilstedeværelsen av en hemmer. Det er mulig å redusere effekten av en hemmer ved å fortynne prøven, selv om dette også vil fortynne DNA-et.



Figur 15. Flytskjema for mutasjonsanalyse.

Prøvemutasjonsanalyser – FAM C_T-verdi

FAM-verdier for alle tre mutasjonsblandinger må kontrolleres opp mot verdiene angitt i Tabell 8.

Beregn ΔC_T -cutoff-verdien for hver mutasjonsprøve med positiv amplifikasjon vist på følgende måte, og kontroller at mutasjon og kontroll-C_T er fra samme prøve.

$$\Delta C_T = \text{mutasjon } C_T - \text{kontroll } C_T$$

Sammenlign ΔC_T -verdien for prøven med ΔC_T -cutoff-området for den aktuelle analysen (Tabell 8), og pass på at riktig cutoff-punkt brukes til hver analyse.

Tabell 8. Mutasjonsanalysens ΔC_T -cutoff-område

Mutasjonsanalyse	ΔC_T -cutoff-område
T790M	$-10,00 \geq \text{til} \leq 7,40$
Delesjoner	$-10,00 \geq \text{til} \leq 8,00$
L858R	$-10,00 \geq \text{til} \leq 8,90$

Den øvre grensen i ΔC_T -cutoff-området er punktet over der et positivt signal kan forekomme, på grunn av bakgrunnssignalet til ARMS-primeren på villtype-DNA. Hvis prøve ΔC_T -verdien er høyere enn det øvre punktet på ΔC_T -cutoff-området, er den klassifisert som «Mutation not detected» (Mutasjon ikke påvist) eller utenfor settets deteksjonsgrense. Hvis prøveverdien er innenfor ΔC_T -cutoff-punktet, anses prøven som positiv for en mutasjon detektert av den analysen. Hvis prøveverdien er under den nedre grensen for ΔC_T -cutoff-området, kan dette potensielt skyldes en fluorescensartefakt.

Merk: For prøver som ikke viser noen FAM-mutasjons-C_T, er det påkrevd med en evaluering av den interne kontroll-(HEX)-C_T-verdien for å avgjøre om det ikke er påvist mutasjon eller om analysen er ugyldig. Hvis HEX C_T-verdien er mellom 29,85 og 35,84, er det ikke påvist mutasjon. Hvis HEX ΔC_T -cutoff-verdien er utenfor dette området, er prøven ugyldig.

Som en helhet gjelder det for hver prøve at hver mutasjonsreaksjon få statusen mutasjon påvist, mutasjon ikke påvist eller ugyldig i henhold til følgende kriterier.

- **Mutasjon påvist:** FAM-amplifikasjon er positiv og ΔC_T er innenfor ΔC_T -cutoff-område. Dersom flere mutasjoner påvises, kan alle rapporteres.
- **Mutasjon ikke påvist:**
 - FAM-amplifikasjon er positiv, og ΔC_T -verdien er over ΔC_T -cutoff-området, og HEX (internkontroll) er innenfor 29,85–35,84.
 - FAM-amplifikasjon er negativ, og HEX (internkontroll) er innenfor 29,85 – 35,84.
- **Ugyldig:** FAM-amplifikasjon er negativ, og HEX-amplifikasjon er utenfor det angitte området.
 - Beregnet ΔC_T er under ΔC_T -cutoff-området, og HEX (internkontroll) er innenfor det forventede området. En ΔC_T -verdi som er lavere enn $-10,00$, kan tyde på at det har oppstått en fluorescensartefakt.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Ingen signal med EGFR positiv kontroll (Positive Control, PC) i fluorescenskanal for «Cycling Green»

- | | |
|--|--|
| a) Den valgte fluorescenskanalen for PCR-dataanalyse oppfyller ikke kravene i protokollen. | Ved dataanalyse må du velge fluorescenskanalen «Cycling Green» for analytisk EGFR PCR og fluorescenskanalen «Cycling Yellow» for internkontroll-PCR. |
| b) Feil programmering av temperaturprofil for Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet | Sammenlign temperaturprofilen med protokollen, og gjenta analyseringen hvis dette ikke er riktig. |
| c) Feil konfigurering av PCR | Kontroller arbeidstrinn ved hjelp av pipetteringsskjema, og gjenta PCR om nødvendig. |
| d) Oppbevaringsforholdene for én eller flere settkomponenter overholdt ikke instruksjonene som ble gitt i «Oppbevaring og håndtering av reagenser» (side 13) | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se settetiketten) på reagensene, og bruk et nytt sett ved behov. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit er utløpt | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se settetiketten) på reagensene, og bruk et nytt sett ved behov. |

Kommentarer og forslag

Signaler med de negative kontrollene i fluorescenskanalen «Cycling Green» for analytisk PCR

Kontaminering oppsto under klargjøring av PCR	Gjenta PCR med nye reagenser. Lukk om mulig PCR-rørene rett etter tilsetning av prøven som skal testes. Sørg for at arbeidsområde og instrumenter dekontamineres regelmessig.
---	---

Kryssing av flere terskler eller ΔC_t -verdi under cutoff-område

Feil blanding under analyseoppsett	Gjenta PCR hvis dette berører en kontroll eller ny testing av en underkjent prøve. Følg bruksanvisningen, og vær spesielt nøye under blandingstrinnene.
------------------------------------	--

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Resultatene fra dette produktet må tolkes i sammenheng med alle relevante kliniske og laboratoriemessige funn og ikke brukes som eneste grunnlag for diagnose.

Produktet skal bare brukes av personell som har mottatt spesialopplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer og Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Analytiske valideringsstudier inkludert humant DNA ekstrahert fra plasmaprøver.

Produktet skal bare brukes sammen med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-real-time PCR-sykluser.

Streng overholdelse av *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit håndbok* er påkrevd for optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.

Primerne i EGFR-blandingen for slettingsreaksjon er designet for å rettes mot flere Exon 19-slettinger, og spanner nukleotider 55174772 til 55174795 (GRCh38 chr7), et område på 23 bp.

Mens Exon 19 slettingsanalysen er validert analytisk og er påvist å detektere spesifiserte slettinger i Exon 19 (se Tabell 13 i denne håndboken), er det imidlertid mulig å amplifisere flere mutasjoner (inkludert, men ikke begrenset til Exon 19-slettinger, Exon 19-innsettinger og L747P-mutasjonen) av blandingen for slettingsreaksjon.

Hvis det foreligger, gir slike tilleggsmutasjoner anledning til resultatet «Deletions Detected» (Slettinger detektert) for en gitt pasientprøve.

Det er også mulig å detektere L858Q-mutasjonen med reaksjonsblandingen L858R. Hvis L858Q-mutasjonen finnes i en pasientprøve, kan den derfor foranledige resultatet «L858R Mutation Detected» (L858R-mutasjon detektert).

Ytelsesegenskaper

Analytisk sensitivitet – blankgrense (Limit of Blank, LOB)

For å vurdere ytelsen til *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit i fravær av malen, og for å sikre at en blank prøve eller en prøve med villtype-DNA ikke genererer et analytisk signal som kan indikere en lav mutasjonskonsentrasjon, ble NSCLC plasma EGFR villtype-DNA vurdert basert på 59 ulike prøver. Akseptkriteriene for studien ble oppfylt (minst 95 % av villtypeprøver må ha en ΔC_T -cutoff-verdi over den respektive cutoff-verdien).

Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD)

LOD er minste prosentandel mutant DNA som kan detekteres i en bakgrunn av villtype-DNA når totalt amplifiserbart DNA (innenfor input-området) ga korrekte mutasjonsfunn ved 95 % for hver mutasjonspositive prøve (C95). Arbeidsområdet for DNA-input for analysen er definert av kontroll C_T ved det forhåndsspesifiserte området på 23,70 til 31,10.

LOD ble bestemt ved lave nivåer med DNA-input (kontroll- C_T ca. 30,10) ved hjelp av DNA fra FFPE-vev (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) fra *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD ble bestemt ved å bruke både kliniske FFPE-prøver og FFPE-cellelinjer ved lave nivåer av DNA-input for disse EGFR-mutasjonene.

LOD-verdier som ble etablert ved hjelp av FFPE-vev, ble testet for *therascreen* EGFR plasma RGQ PCR-settet med DNA fra konstruerte mutasjonspositive plasmaprøver.

De endelige fastsatte verdiene for LOD angitt i Tabell 9 på neste side, indikerer mutasjonsprosenten som ga en predikert sannsynlighet for korrekte andeler på 95 % for hver av mutasjonene.

Tabell 9. LOD-verdiene for hver av EGFR-mutasjonsanalysene

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

* Fastsatte verdier for LOD bekreftet i plasma som en del av *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits LOD-bekreftelsesstudie.

[†] Disse mutasjonene ble ikke bekreftet i plasma.

Analytisk sensitivitet – ΔC_T -cutoff og ΔC_T -cuttoff-område

En risikobasert tilnærming ble tatt med hensyn til falskt positive verdier ved angivelse av cutoff-verdiene for analyser, og estimerte LOB-verdier ble brukt som en komponent i utviklingen av cutoff-verdier.

De respektive ΔC_T -cuttoff-verdiene for hver mutasjonsanalyse i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er angitt i Tabell 10.

Tabell 10. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ΔC_T -cuttoff-områder

Mutasjonsanalyse	ΔC_T -cuttoff-område
T790M	$-10,00 \geq \text{til} \leq 7,40$
Delesjon	$-10,00 \geq \text{til} \leq 8,00$
L858R	$-10,00 \geq \text{til} \leq 8,90$

Repeterbarhet og reproduserbarhet

Repeterbarhet og reproduserbarhet ble vurdert ved å teste prøver med mutasjonsnivå på 3 x LOD mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA ved tre teststeder, ved bruk av flere settbatcher, operatører og kjøringene over ulike dager, med to replikater av hver prøve. Testresultatene for 100 % av de mutante DNA-prøvene var mutasjonspositive for alle tre mutasjonsanalysene. Testresultatene for villtypeprøver var mutasjonsnegative for alle analysene på alle teststedene.

Effekt av DNA-input på C_T -verdier

DNA-inputnivået er angitt som den totale mengden amplifiserbart EGFR DNA i en prøve, som fastsatt av C_T -verdier fra kontrollreaksjonen. For å vise at ytelsen til *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er konsekvent på tvers av området for kontrollreaksjon C_T (23,70 – 31,10), ble alle tre EGFR-mutasjonsanalyser testet mot en seks-punkts, 1-i-3-fortynningsserie (DNA ekstrahert fra FPPE-cellelinjer). Mål- C_T for fortynning én for hver mutasjon, var på ca. 24,70.

Den endelige fortynningen, som ga en C_T på ca. 32 – 33, lå utenfor området for kontrollreaksjon C_T . Generelt sett var ΔC_T -cutoff-verdier som ble målt med forskjellige nivåer av totalt DNA-input, konsekvente på tvers av arbeidsområdet for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Interfererende stoffer

Endogene interfererende stoffer

De potensielt interfererende stoffene ble tilsatt i 3 x LOD konstruerte mutasjonspositive plasmaprøver. Prøver ble deretter testet med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit: Prøver med de potensielle interfererende stoffene ble sammenlignet med 3 x LOD konstruerte mutasjonspositive plasmaprøver som ikke inneholdt tilsatt interfererende stoff. Hvert interfererende stoff ble testet med 4 replikater.

En forskjell i >2 x standardavvik (Standard Deviation, SD) (tatt fra presisjonsstudien) mellom «testens» og «kontrollens» ΔC_T (f.eks. interfererende substans) ble ansett som en indikasjon på potensiell interferens. I disse tilfellene er den observerte forskjellen i ΔC_T oppgitt.

Testkonsentrasjonene i Tabell 11 ble valgt basert på veiledningen angitt i CLSI-retningslinjen EP07-A2 og er representativ for maksimumskonsentrasjonene som er forventet å bli observert i en klinisk prøve.

Merk: Disse endogene forbindelsene ble tilsatt i konstruerte mutasjonspositive plasmaprøver som omfattet plasma fra friske donorer. Derfor ville disse endogene forbindelsene ha vært naturlig til stede i prøvene ved ukjente konsentrasjoner før tilsetning. Den endelige konsentrasjonen av hvert potensielle interfererende endogent stoff som ble testet, ville sannsynligvis ha vært større enn testkonsentrasjonen.

Tabell 11. Potensielt interfererende endogene stoffer

Potensielt interfererende stoffer (Interfering Substance, IS)	Testkonsentrasjon
Ukonjugert bilirubin	150 mg/dl
Hemoglobin (humant)	0,2 g/dl
Triglyserider	3 g/dl

T790M-analyse

Følgende endogene forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 11, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) på ytelsen til T790M-analysen:

- Triglyserider, differanse på $1,37 \Delta C_T$

Slettingsanalyse

Følgende endogene forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 11, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) på ytelsen til slettingsanalysen:

- Hemoglobin, differanse på $0,80 \Delta C_T$

L858R-analyse

Følgende endogene forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 11, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) på ytelsen til L858R-analysen:

- Bilirubin, differanse på $1,13 \Delta C_T$
- Triglyserider, differanse på $1,53 \Delta C_T$

Eksogene interfererende stoffer

De potensielt interfererende stoffene ble tilsatt i 3 x LOD konstruerte mutasjonspositive plasmaprøver. Prøver ble deretter testet med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit: Prøver med de potensielle interfererende stoffene ble sammenlignet med 3 x LOD konstruerte mutasjonspositive plasmaprøver som ikke inneholdt tilsatt interfererende stoff. Hvert interfererende stoff ble testet med 4 replikater.

En forskjell i $>2 \times$ standardavvik (Standard Deviation, SD) (tatt fra presisjonsstudien) mellom «testens» og «kontrollens» ΔC_T og «kontroll» ΔC_T (f.eks. interfererende substans) ble ansett som en indikasjon på potensiell interferens. I disse tilfellene er den observerte forskjellen i ΔC_T oppgitt.

Testkonsentrasjonene i Tabell 12 ble valgt basert på veiledningen angitt i CLSI-retningslinjen EP07-A2, og har overskudd av den terapeutiske konsentrasjonen i alle tilfeller.

Tabell 12. Potensielt interfererende endogene stoffer

Potensielt interfererende stoffer (Interfering Substance, IS)	Testkonsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)
Citalopramhydrobromid	0,75
Paroksetinhydrokloridhemihydrat	1,14
Sertralinhydroklorid	0,67
Fluoksetinhydroklorid	3,87
Paracetamol	200,7
K ₂ EDTA	3600

T790M-analyse

Følgende eksogent forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 12, viste seg å ha en effekt $>2 \times$ SD ($0,40 \Delta C_T$) på ytelsen til T790M-analysen:

- Citalopramhydrobromid, differanse på $0,52 \Delta C_T$

- Sertralin-hydroklorid, differanse på 0,47 ΔC_T
- Fluoksetin-hydroklorid, differanse på 0,48 ΔC_T

Slettingsanalyse

Følgende eksogent forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 12, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ (0,71 ΔC_T) på ytelsen til slettingsanalysen:

- Fluoksetin, differanse på 0,73 ΔC_T

L858R-analyse

Følgende eksogent forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 12, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ (0,56 ΔC_T) på ytelsen til L858R-analysen:

- Citalopram-hydrobromid, differanse på 0,72 ΔC_T
- Paroksetinhydrokloridhemihydrat, differanse på 0,92 ΔC_T
- Sertralin-hydroklorid, differanse på 0,82 ΔC_T
- Fluoksetin-hydroklorid, differanse på 0,98 ΔC_T
- Paracetamol, differanse på 0,81 ΔC_T
- K₂ EDTA, differanse på 0,57 ΔC_T

Klinisk ytelse

Den kliniske NCT01203917-studien var en fase IV, åpen, enkeltarmet studie som ble utført for å vurdere effekten og sikkerheten/toleransen for gefitinib i førstelinje hos kaukasiske pasienter med EGFR-mutasjonspositiv NSCLC i stadium IIIA/B/IV.

Hvorvidt pasienter var kvalifisert for innmelding i den kliniske studien NCT01203917, ble bestemt av tilstedeværelsen av EGFR-sensibiliserende mutasjoner. EGFR-mutasjonsstatus for NSCLC-pasienter ble vurdert ved hjelp av klinisk studietest analyse (Clinical Trial Assay, CTA) med DNA fra matchede vevs- og plasmaprøver. Studien omfattet et forhåndsplanlagt biomarkørutforskende mål om å fastslå om plasmaprøver kan vurderes for mutasjonsanalyse dersom vevsprøver ikke er tilgjengelig. Resultatene viste høyt samsvar mellom samme vev- og plasmaprøver ved 94,3 %, med analysespesifisitet på 99,8 % og sensitivitet på 65,7 %.

Retrospektiv testing av plasmaprøver fra pasienter screenet for den kliniske NCT01203917-studien ble utført med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Det ble utført en tilleggsstudie for å vurdere overensstemmelse mellom *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit og CTA-testen som ble brukt til å velge ut pasienter til den kliniske NCT01203917-studien. Ekvivalens mellom CTA og *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ble vist.

Referanser















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

Kontaktinformasjon

Hvis du trenger teknisk hjelp eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringe 00800-22-44-6000 eller kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå til www.qiagen.com).

Symboler

Følgende symboler kan vises på emballasjen og merkingen:

Symbol	Symboldefinisjon
 Σ <N>	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Siste forbruksdato
	In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr
	Katalognummer
	Lot number (Partinummer)
	Materialnummer
	Komponenter
	Inneholder
	Nummer
	Globalt artikkelnummer
	Temperaturbegrensninger
	Produsent
	Se bruksanvisningen
	Forsiktig

Vedlegg A: Mutasjonsdetaljer

Tabell 13 viser COSMIC ID-ene som er hentet fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabell 13. Liste med mutasjoner og COSMIC ID-er

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

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat. nr.
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – for deteksjon av mutasjoner i EGFR-genet		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaksjoner: 1 kontrollanalyse, 3 mutasjonsanalyser, positiv kontroll, <i>Taq</i> DNA-polymerase	870311
Rotor-Gene Q MDx og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-sykluser og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring ikke inkludert	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-sentrifuge og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med enkeltkanal-pipette i 72 x 0,1 ml-rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103

Produkt	Innhold	Kat. nr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner	981106
Relaterte produkter		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Til 50 klargjøringer: QIAamp Mini-kolonner, rørforlengere (20 ml), QIAGEN Proteinase K, Carrier RNA, buffere, VacConnectors og Collection Tubes (1,5 ml og 2 ml)	55114

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i håndboken eller bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN Kit er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

Endringshistorikk for dokument

Dokument	Endringer
R3, januar 2019	Tilføyning av autorisert representant (forsiden). Delen «Symboler» oppdatert.
R4, oktober 2019	Endret registrert produsent (forsiden) Tilpasning av instrumentnavn fra Rotor-Gene Q MDx til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM for å tilpasses med navnet på instrument-etiketten Korrigerende instruksjoner for oppbevaring av reagenser fra 90 dager til 12 måneder eller til utløpsdatoen Oppdaterte avsnittet Begrensninger med informasjon vedrørende exon 19-slettingsanalysen og L858R-analysen Revidert tabell 9 for å erstatte duplisert exon 21 L858R med exon 19-slettinger EC + REP-symbolet fjernet fra forsiden og avsnittet om symboler
R5, juni 2020	Oppdaterte referanser til RGQ-programvareversjon fra 2.3 til 2.3.5 eller nyere Oppdaterte tabell 8 og 10 for å implementere det nye ΔC_T -cutoff-området og justerte ellers alle relevante beskrivelser i hele håndboken Oppdaterte alle kapitler relatert til protokoller for å inkludere viktig informasjon om blanding, angitt under viktige punkter før de ulike avsnittene starter, og markerte alle blandingsdetaljer ved alle blandingstrinn Lagt til et blandingstrinn i delen «Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner» Oppdaterte delen «Feilsøking» for å legge til løsning for kryssing av flere terskler

Denne siden skal være tom

Begrenset lisensavtale for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit

1. Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:
2. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens når det gjelder noen av QIAGENS åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet sammen med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse andre protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
3. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller bruk av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
4. Dette settet og komponentene i det er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
5. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller underforstått, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
6. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuell intellektuell eiendomsrett forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Varemerker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *therascreen*®, Rotor-Gene®, Scorpions® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group). Registrerte navn, varemerker osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke anses som ikke-beskyttet ved lov selv når de ikke er spesielt merket som sådan.

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

