

September 2019

Bruksanvisning (handbok) för *therascreen*[®] PIK3CA RGQ PCR Kit



Version 1

IVD

För in vitro-diagnostisk användning

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

För användning med QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

För användning med QIAamp[®] DSP Circulating Nucleic Acid Kit



REF

873111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Tyskland

R2 **MAT**

1116336SE

Innehåll

Avsedd användning	5
Procedurens begränsningar	6
Sammanfattning och förklaring av testet	8
Testprincipen	10
Mutationsreaktionsblandningar	10
Plattform och programvara	15
Material som medföljer	16
Kitinnehåll	16
Material som behövs men inte medföljer	17
Varningar och försiktighet	19
Allmänna försiktighetsåtgärder	20
Förvaring och hantering av reagenser	22
Leveransvillkor	22
Förvaring	22
Stabilitet	22
Förvaring och hantering av prover	24
Förvaring av prover	26
Procedur	27
DNA-extrahering från FFPE-prover	27
DNA-extrahering från plasmaprover	29
Detektion av <i>PIK3CA</i> -mutationer	30
Utföra en <i>PIK3CA</i> -mutationsanalyser	36

Resultat.....	50
Analys	50
<i>therascreen</i> PIK3CA Assay Profile-flaggor i Rotor-Gene AssayManager v2.1	52
Prestandaegenskaper: Vävnadsprover.....	56
Analytisk prestanda: Vävnadsprover	56
Blankgräns (Limit of Blank, LoB): Vävnadsprover.....	56
Detektionsgräns (Limit of detection, LoD): Vävnadsprover	57
Indataintervall för genomiskt DNA: Vävnadsprover.....	58
ΔC_T -cutoffvärden: Vävnadsprover	59
Effekt av DNA-input på ΔC_T -värden (linjäritet): Vävnadsprover	60
Analysspecificitet (korsreaktivitet/specificitet): Vävnadsprover.....	61
Interferens: Vävnadsprover	62
Utbytbarhet mellan loter: Vävnadsprover.....	64
Provhantering: Vävnadsprover	64
Repeterbarhet och reproducerbarhet: Vävnadsprover	65
Korskontaminering/analytisk carryover: Vävnadsprover.....	68
Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod (vävnadsprover)	69
Klinisk prestanda: Vävnadsprover	71
Prestandaegenskaper: Plasmaprover	76
Analytisk prestanda: Plasmaprover	76
Blankgräns (Limit of Blank, LoB): Plasmaprover.....	76
Detektionsgräns (Limit of detection, LoD): Plasmaprover.....	77
Indataintervall för genomiskt DNA: Plasmaprover.....	78
ΔC_T -cutoffvärden: Plasmaprover.....	79

Effekt av DNA-input på ΔC_T -värden (linjäritet): Plasmaprover.....	80
Analyspecificitet (korsreaktivitet/specificitet): Plasmaprover	80
Interferens: Plasmaprover	81
Utbytbarhet mellan loter: Plasmaprover	82
Provhantering: Plasmaprover	82
Repeterbarhet och reproducerbarhet: Plasmaprover.....	83
Validering av blodprovtagningsrör	87
Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod (plasmaprover).....	88
Klinisk prestanda: Plasmaprover	89
Felsökningsguide	95
Referenser.....	97
Kontaktinformation.....	97
Symboler	98
Beställningsinformation.....	100
Dokumentrevisioner.....	102

Avsedd användning

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är ett kvalitativt PCR-test i realtid för detektion av 11 mutationer i genen fosfatidylinositol 3-kinas katalytisk underenhet alfa (*PIK3CA*) (Exon 7: C420R; Exon 9: E542K, E545A, E545D [endast 1635G>T], E545G, E545K, Q546E, Q546R; och Exon 20: H1047L, H1047R, H1047Y) med hjälp av genomiskt DNA (gDNA) som extraherats från formalinfixerad, paraffinbäddad (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) brösttumörsvävnad eller cirkulerande tumör-DNA (ctDNA) från plasma som utvunnits från K₂EDTA antikoagulerat perifert helblod taget från patienter med bröstcancer.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är avsett för användning som ett tillhörande diagnostiskt test för att hjälpa vårdgivare identifiera bröstcancerpatienter som kan lämpa sig för behandling med PIQRAY® (alpelisib) baserat på en *PIK3CA*-mutation. Patienter vars FFPE-vävnads- eller plasmaprover ger ett positivt *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-testresultat för närvaro av en eller flera *PIK3CA*-mutationer är lämpliga för behandling med PIQRAY (alpelisib). Patienter vars plasmaprover ger ett negativt resultat med det här testet ska reflexas till testning av ett FFPE-tumörvävnadsprov för förekomst av *PIK3CA*-mutationer.

FFPE-tumörprover bearbetas med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit för manuell provberedning. Prover med K₂EDTA antikoagulerat helt perifert venblodspasma bearbetas med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit för manuell provberedning. För bägge provtyperna används instrumentet Rotor-Gene Q (RGQ) MDx 5plex HRM för automatiserad amplifiering och detektion.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är en in vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit ska användas av utbildad personal i en professionell labbmiljö.

Procedurens begränsningar

- Det här bruksanvisningsdokumentet måste läsas fullständigt och förstås innan *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit används.
- Enbart resultaten från produkten ska inte ligga till grund för diagnos, utan de måste tolkas med hänsyn till resultat från alla relevanta kliniska studier eller laboratoriestudier.
- Prover med resultat som rapporteras som "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad) kan innehålla *PIK3CA*-mutationer som inte detekteras av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.
- Analytiska och kliniska prestandadata relaterade till detektion av följande *PIK3CA*-mutationer: E545A, E545D, Q546E, Q546R och H1047Y etablerades enbart med konstruerade plasmaprover (cellinje-DNA spikat i plasma), inte med kliniska prover från den avsedda användningspopulationen.
- Detektion av mutationer beror på provets integritet och på mängden amplifierbart DNA som finns. Testproceduren ska upprepas om analys av DNA i provet indikerar att kvantitet och/eller kvalitet antingen inte är tillräcklig eller att koncentrationen är för hög för mutationsanalys.
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit används i en PCR-procedur. Precis som vid alla PCR-procedurer kan proverna bli kontaminerade av externa DNA-källor i testmiljön och av DNA i den positiva kontrollen. Iaktta försiktighet för att förhindra att prover och kitreagenser kontamineras.
- Om provet innehåller mindre än den procentsats muterade alleler som kan detekteras av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit så kommer det att ge resultatet "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad).
- Det är inte känt om *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit uppvisar korsreaktivitet (som leder till resultatet "Mutation Detected" [Mutation detekterad]) med andra *PIK3CA*-mutationer utöver de som listas som biomarkörer som detekteras av kitet.

- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är ett kvalitativt test. Testet ger inte kvantitativa mätningar av frekvens mutantalleler (Mutant Allele Frequency, MAF) i ett prov.
- Prestandapåverkan på *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är okänd om mikrobiell kontaminering introduceras under analysprocedurerna. Operatörer måste vidta försiktighetsåtgärder för att undvika mikrobiell kontaminering under testprocedurerna och bör inte använda kitkomponenter om tecken på mikrobiell kontaminering uppmärksammas.
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ska enbart användas med DNA som extraherats från FFPE-bröstcancervävnad eller plasmaprover som förberetts från K₂EDTA antikoagulerat helt perifert venöst blod som tagits från bröstcancerpatienter.
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ska enbart användas med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (för vävnadsprover) eller QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (för plasmaprover).
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ska enbart användas när alla reaktionsblandningar används.
- Produkten är avsedd att användas endast av personal som fått särskild utbildning i in vitro-diagnostiska procedurer och Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.
- Produkten är endast avsedd för användning på en Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cykler. Ingen annan termal cykler med optisk detektering i realtid kan användas med den här produkten.
- Strikt efterlevnad med *bruksanvisningen (handboken) för theascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* krävs för att erhålla optimala resultat. Utspädning av reagenser rekommenderas inte och leder till en sämre prestanda.
- Den här handboken är avsedd att användas med Rotor-Gene AssayManager programversion 2.1 med automatiserad mutationsstatusanrop.
- Var uppmärksam på de utgångsdatum och förvaringsvillkor som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Sammanfattning och förklaring av testet

Signalvägen fosfatidylinositol 3-kinas (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) reglerar olika cellulära funktioner, inklusive celltillväxt, överlevnad, translatörisk reglering av proteinsyntes, glukosmetabolism, cellmigration och angiogenes (1). Aktiverande somatiska missensmutationer i genen *PIK3CA* (fosfatidylinositol 3-kinas katalytisk subenhet alfa) som ökar kinasaktiviteten för proteinet PI3K α har identifierats i tumörvävnader och har länkats till cellulära omvandlingar i flera mänskliga cancerformer (2), inklusive hormonreceptorpositiv (HR+) bröstcancer (3).

Bröstcancer är den vanligaste diagnostiserade cancerformen för kvinnor och den näst största orsaken till cancerrelaterade dödsfall (4). År 2018 estimerades det att 266 120 kvinnor skulle diagnosticeras med bröstcancer i USA (vilket motsvarar ungefär 30 % av alla cancerfall för kvinnor) och att 40 920 dödsfall skulle inträffa (5). I Europa estimerades det att 92 700 kvinnor skulle dö av bröstcancer år 2018 (6). Bröstcancer hos män är ovanligt < 1 % av bröstcancerdiagnoser är för manliga patienter (4); behandlingsrekommendationerna är dock samma för bägge könen.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är ett kvalitativt in vitro-diagnostiskt PCR-test i realtid som utförs på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Det använder sig av ARMS-primrar (Allele Refractory Mutation System, ARMS), hydrolysprober och PCR clamp-tekniker för att detektera 11 mutationer (Tabell 1) i exon 7, 9 och 20 av *PIK3CA*-onkogenen mot en bakgrund av vildtyp-DNA (Wilde-Type, WT).

Tabell 1. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-analysmål

Exon	Mutation	COSMIC* ID	Basskifte
7	C420R	757	1258 T>C
9	E542K	760	1624 G>A
	E545A	12458	1634 A>C
	E545D	765	1635 G>T
	E545G	764	1634 A>G
	E545K	763	1633 G>A
	Q546E	6147	1636 C>G
	Q546R	12459	1637 A>G
20	H1047L	776	3140 A>T
	H1047R	775	3140 A>G
	H1047Y	774	3139 C>T

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

Testprincipen

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit består av sex separata PCR-amplifieringsreaktionsblandningar:

- Fem mutationsspecifika reaktioner som riktar in sig på exon 7, 9 och 20 i *PIK3CA*-genen
- En kontrollreaktion som riktar in sig på exon 15

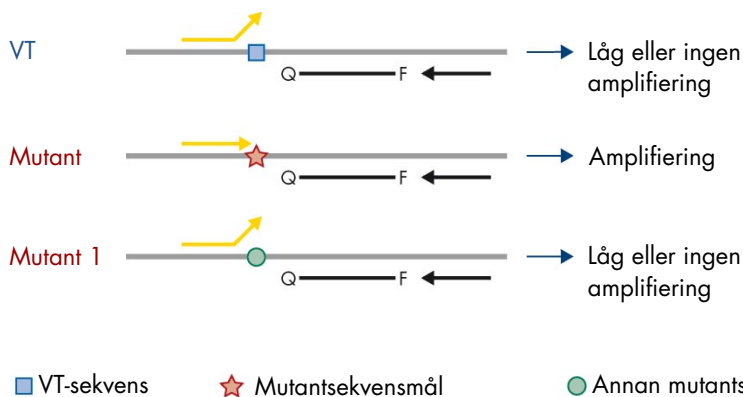
De viktigaste komponenterna i kitet förklaras nedan.

Mutationsreaktionsblandningar

Muterat DNA amplificeras selektivt och detekteras av mutationsspecifika reaktionsblandningar med mutationsspecifika ARMS-primrar, prober (hydrolysprober och korta höggradigt specifika prober), och PCR-clamper. Mutationsreaktioner detekteras i kanalerna Green, Yellow och Crimson på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

ARMS

Allelspecifik amplifiering erhålls genom ARMS som utnyttjar förmågan hos *Taq* DNA-polymeras att skilja mellan en matchad och felmatchad bas vid 3'-änden 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 amplificeras en muterad sekvens selektivt även för prover där majoriteten av DNA inte bär på mutationen (Figur 1).

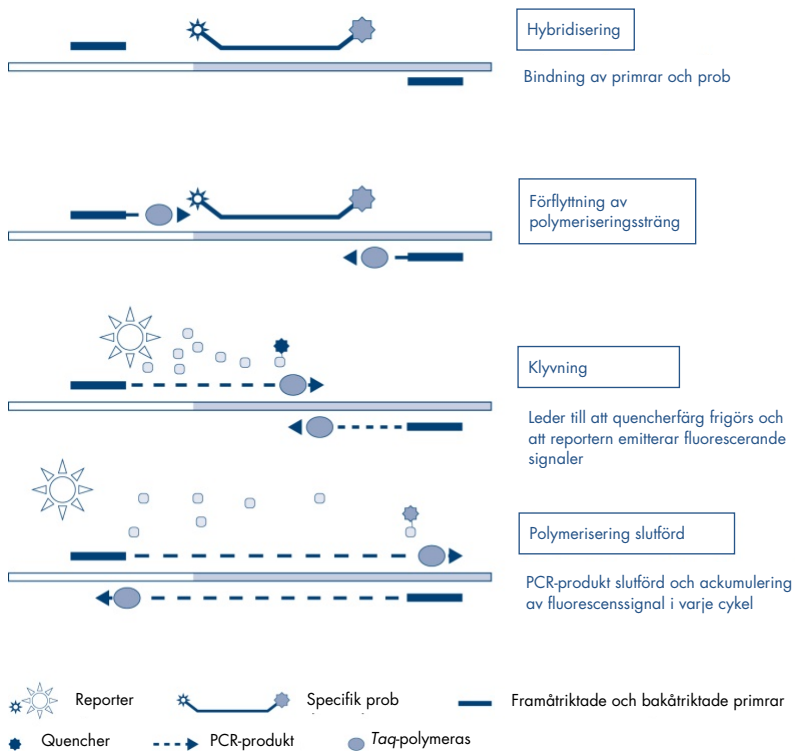


Figur 1. Identifiering av specifik mutation av ARMS PCR. VT: Vildtyp. Q-F: Dubbel färgningsprob. ⇄: Framåtriktade och bakåtriktade primrar.

Hydrolysprober

Hydrolysprober fäster inom en DNA-region som amplifierats av en specifik uppsättning primrar. När *Taq*-polymeraset förlänger primern och syntetiserar dottersträngen, degraderar 5' till 3' exonukleasaktiviteten för *Taq*-polymeraset proben, vilket leder till frigörande av fluoroforen och utsöndrande av fluorescens.

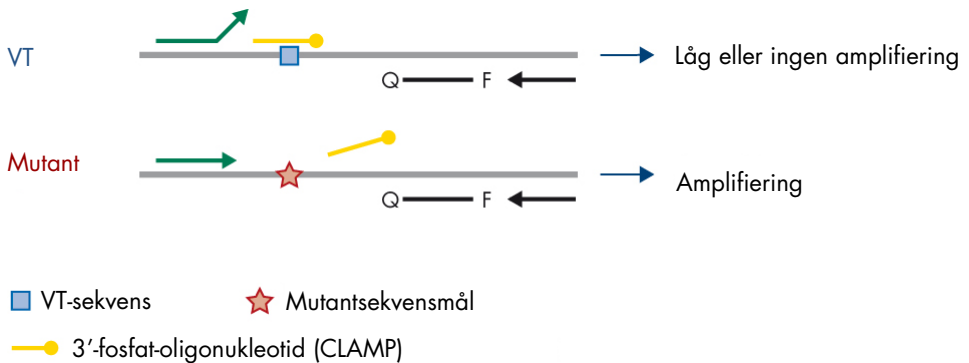
Ökningen av fluorescenssignalen detekteras bara om målsekvensen är komplementär till primrarna och proben och därför amplifieras under PCR (Figur 2).



Figur 2. Reaktionsprincip med hydrolysprober.

PCR-clamp

PCR-clamper tillåter selektiv amplifiering av mutantallelen. PCR-clamper som är perfekt matchade till vildtypsekvensbindningen till vildtypmallen och förhindrar amplifiering genom interferens med primerförlängning. 3'-ändan av PCR-clampen är blockerad med tillsats av en fosfatgrupp för att förhindra förlängning av vildtypsekvensen (Figur 3).



Figur 3. PCR-clamp teknik. VT: Vildtyp. Q-F: Dubbel färgningsprob. ⇨: Framåtriktade och bakåtriktade primrar.

Kontrollreaktion

Kontrollreaktionsblandningen (rör 1) innehåller en framåtriktad och en bakåtriktad primer och märkt prob (detekteras i kanalen Green) för att amplifiera en kort sekvens av exon 15 i *PIK3CA*-genen. Kontrollreaktionen används för att bestämma om en lämplig nivå amplifierbart DNA finns i provet och är en faktor vid analytiska beräkningar för att bestämma mutationsstatus.

Internkontroll

Var och en av reaktionsblandningarna innehåller en internkontroll som är utformad för att detektera en misslyckad reaktion (t.ex. på grund av förekomst av hämmare). Internkontrollen använder sig av en icke-*PIK3CA*-relaterad oligonukleotidmålsekvens, omärkta framåtriktade och bakåtriktade primrar och en hydrolysisprob märkt med en orange fluorofor.

Positiv kontroll

Den positiva kontrollen (rör Positiv kontroll, PC) består av en blandning av fem plasmider som motsvarar var och en av de 11 mutationerna och kontrollen. Detektion av mutationerna inom acceptabla intervall bekräftar att samtliga reaktionsblandningar i kitet fungerar korrekt.

Negativ kontroll

Kontroll utan mall (Rör NTC) innehåller nukleasfritt vatten som ska användas för reaktionen med kontroll utan mall (No Template Control, NTC). NTC fungerar som en negativ kontroll och identifierar potentiell kontaminering under analyskonfigurationen.

Provspädning

Provspädningen (Rör Dil.) innehåller nukleasfritt vatten.

Plattform och programvara

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är specifikt avsett för användning med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet tillsammans med en persondator med:

- Rotor-Gene AssayManager® version 2.1
- Gamma Plug-in version 1.0.0
- *therascreen*_PIK3CA_FFPE Assay Profile version 1.0.1 för analys av vävnadsprover
- *therascreen*_PIK3CA_Plasma Assay Profile version 1.0.1 för analys av plasmaprover

Se *användarhandboken för Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* för information om Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet måste underhållas enligt instruktionerna i användarhandboken.

Se *användarhandboken för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* och *användarhandboken för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in* för ytterligare information om programvaran.

Körningsparametrar

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet är programmerat för olika cykelparametrar (eller "runs" [körningar]) med *therascreen* PIK3CA Assay Profile. Analysprofilerna innehåller PCR-körningsparametrarna och beräknar resultaten. PCR-termalcyklingsparametrarna för analysen är som följer:

- Förvara vid 95 °C i 15 minuter för att aktivera Taq DNA-polymeraset.
- PCR med 45 cykler i 95 °C i 30 sekunder för att denaturera och i 60 °C i 1 minut för att fästa och förlänga.

Material som medföljer

Kitinnehåll

<i>therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit (24)</i>		
Katalognr.		873111
Antal reaktioner		24
Innehåll	Locketts färg	Volym
PIK3CA Reaction Mix 1 (PIK3CA-reaktionsblandning 1)	Röd	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 2 (PIK3CA-reaktionsblandning 2)	Lila	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 3 (PIK3CA-reaktionsblandning 3)	Orange	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 4 (PIK3CA-reaktionsblandning 4)	Gul	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 5 (PIK3CA-reaktionsblandning 5)	Grön	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 6 (PIK3CA-reaktionsblandning 6)	Blå	750 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i>) [Taq DNA-polymeras (Taq)]	Mint	85 µl
PIK3CA Positive Control (Positive control, PC) [PIK3CA positiv kontroll (Positive control, PC)]	Beige	250 µl
Water for no template control (NTC) [vatten för kontroll utan mall (No Template Control, NTC)]	Vit	1,9 ml
Nuclease-free water for Dilution (Dil.) [Nukleasfritt vatten för spädning (Dil.)]	Vit	1,9 ml
<i>Bruksanvisning (handbok) för theascreen PIK3CA RGQ PCR Kit</i>		1

Material som behövs men inte medföljer

Se till att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer före användning.

Reagenser

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, katnr. 60404, se "DNA-extrahering från FFPE-prover", sida 27) eller QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, katnr. 61504, se "DNA-extrahering från plasmaprover", sida 27)
- DNAZap™ PCR-nedbrytningslösningar
- Distel High Level Laboratory Disinfectant och IPA-tvätt (isopropylalkohol, IPA)

Förbrukningsartiklar

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps för användning med en rotor med 72 brunnar (QIAGEN, kat.nr 981103 eller kat.nr 981106)
- Nukleasfria, mikrocentrifugrör med låg DNA-bindning för beredning av masterblandningar
- Nukleasfria pipettspetsar med aerosolbarriärer

Utrustning

- Spritpenna
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform (katnr. 9002032) eller Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System (katnr. 9002033)*†

* Kontrollera att instrumenten och utrustningen har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

† I vissa länder kan instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum maj 2011 eller senare användas. Produktionsdatumet anges i serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret är i formatet "mmåånnn" där "mm" anger tillverkningsmånad i siffror, "åå" anger de sista två siffrorna i tillverkningsåret, och "nnn" anger den unika instrumentidentifieraren.

- Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in och "therascreen_PIK3CA_FFPE" och/eller "therascreen_PIK3CA_Plasma" Assay Profile
- Särskilda pipetter* (justerbara) för provberedning
- Särskilda pipetter* (justerbara) för beredning av PCR-huvudblandning
- Särskilda pipetter* (justerbara) för dosering av DNA-mall
- Bänkcentrifug* med rotor för 1,5 ml rör
- Termomixer*, uppvärmd skakinkubator*, värmeblock* eller vattenbad* som klarar inkubering vid 56 °C, 70 °C och 90 °C
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (katalognr 19413)
- QIAvac Connecting System (katalognr. 19419)
- Vacuum Pump (katalognr. 84010) eller motsvarande pump som kan skapa ett vakuum på -800 till -900 mbar
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumblock för manuell reaktionsinställning (QIAGEN, katnr. 9018901)
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes, aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med enkanals-pipett i 96 x 0,2 ml PCR-rör (QIAGEN, katnr. 9018905)
- 72-Well Rotor, för att hålla Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, med reaktionsvolymen på 10-50 µl; kräver en Locking Ring 72-Well Rotor (QIAGEN, katnr. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor, för att fästa Strip Tubes and Caps, 0.1 ml i 72-Well Rotor (QIAGEN, katnr. 9018904)

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit ska användas av utbildad personal i en professionell labbmiljö.

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, 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.

För användning med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Säkerhetsinformation om Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet finns i användarmanualen som medföljer instrumentet.

Enbart vävnadsprover: Enbart för användning med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

För säkerhetsinformation om QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (katnr 60404) se *handboken för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

Enbart plasmaprover: Enbart för användning med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit.

För säkerhetsinformation om QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (katnr 61504) se *handboken för QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

Allmänna försiktighetsåtgärder

- Testet är avsett för användning med FFPE-bröstcancervävnadsprover eller K₂EDTA-plasmaprover från bröstcancerpatienter.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. FFPE-provmaterial och nukleinsyror som förberetts från det utgör inte en sannolik infektionsrisk, men alla plasmaprover ska behandlas som potentiellt smittfarliga. Hälso- och säkerhetsprocedurerna för din lokala institution måste alltid följas.
- Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med dina lokala säkerhetsprocedurer.
- Reagenser till *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är optimalt utspädda. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda. Använd inte reaktionsvolymen (reaktionsblandning plus prov) på mindre än 25 µl.
- Alla reagenser som medföljer *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är enbart avsedda att användas tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Byt inte ut reagenserna i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit eller mellan *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit eftersom det kan påverka prestandan.
- Använd endast det *Taq* DNA-polymeras (Rör *Taq*) som medföljer i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Byt inte ut det mot *Taq* DNA-polymeras från andra QIAGEN-kit och byt inte heller ut det mot *Taq* DNA-polymeras från en annan leverantör.
- Ytterligare instruktioner om varningar och säkerhetsåtgärder samt fler procedurbeskrivningar finns i användarhandboken till instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Iaktta största försiktighet för att förhindra kontaminering av kontroll- och reaktionsblandningsreagenserna med syntetiskt kontrollmaterial som finns i positiv kontroll-reagenset.
- Iaktta största försiktighet för att undvika korskontaminering mellan prover. Förslut omedelbart rören efter att varje prov tillsatts.

-
- Dekontaminera laddningsblocket noggrant innan du använder det för beredning av huvudblandningar för analys. Användning av DNAzap PCR-nedbrytande lösningar följt av Distel High Level Laboratory Disinfectant och IPA-tvätt rekommenderas. Laddningsblocket måste vara torrt innan användning.
 - Använd separata pipetter avsedda för ändamålet för beredning av reaktionsblandningar och tillsats av positiv kontroll-reagenser.
 - Utför beredning och fördelning av reaktionsblandningar i ett område avskilt från området där den positiva kontrollen tillsätts.
 - Fluorescent markerade molekyler som ingår i reaktionsblandningsreagenser är ljuskänsliga. Skydda kontroll- och reaktionsblandningsreagenserna mot ljus för att undvika fotoblekning.
 - Öppna inte Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet före körningen har avslutats.
 - Öppna inte Rotor-Gene Q-rören efter att körningen har avslutats.
 - Iakttag största försiktighet för att tillse korrekt provtestning och undvika fel provinmatning, laddnings och pipettering.

Förvaring och hantering av reagenser

Leveransvillkor

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit levereras på torris och måste frysas vid ankomst. Om någon komponent av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit inte är fryst vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, bruksanvisning eller reagenser i leveransen ska du kontakta QIAGENs teknisk support eller lokala distributörer (se www.qiagen.com).

Förvaring

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 till -15 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus.

Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

Stabilitet

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

Reagenserna måste tinas i rumstemperatur i minst 1 timme (och max 4,5 timmar) innan användning. När reagenserna är klara för användning kan PCR-reaktionerna göras i ordning. Rotor-Gene Q-rören som innehåller huvudblandningarna och prov-DNA kan laddas omgående på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet. Den totala tiden från start av PCR-konfigurationen till start av körningen ska inte överskrida 7,5 timmar om den utförs i rumstemperatur.

Obs! Den här tiden inkluderar både PCR-konfiguration och förvaring.

Obs! Fluorescent markerade molekyler som ingår i reaktionsblandningsreagenser är ljuskänsliga. Skydda kontroll- och reaktionsblandningsreagenserna mot ljus för att undvika fotoblekning.

Reagenserna i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är optimalt utspädda och de behöver inte renas eller behandlas ytterligare innan de används.

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

Förvaring och hantering av prover

Provhantering: Vävnad

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är avsett för användning med gDNA extraherat från resekerade prover av FFPE-tumörvävnad och kärnnålsbiopsiprover (Core Needle Biopsy, CNB) som samlats in från bröstcancerpatienter. Tumörerna är heterogena både vad gäller genotyp och fenotyp. Mutationspositiva tumörer kan innehålla vildtyp-DNA, och på samma sätt kan histologin uppvisa områden med tumörfri vävnad.

Så här förbereder du vävnadsprover för DNA-extraktion:

- Använd standardmaterial och -metoder för att fixera vävnadsprovet i 10 % neutralbuffrat formalin (Neutral Buffered Formalin, NBF) och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- Låt en utbildad person (t.ex. en patolog) bedöma effektivt tumörområde (Effective Tumor Area, ETA) och utbredning på ett snitt färgat med hematoxylin och eosin (H&E). Markera det färgade objektglaset för att bestämma regionen av intresse (Region Of Interest, ROI). Använd seriesnitt för DNA-extraktion.
Obs! De färgade snitten får inte användas för DNA-extraktion.
- Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnaden med en ny, steril skalpell och kassera.

FÖRSIKTIGHET



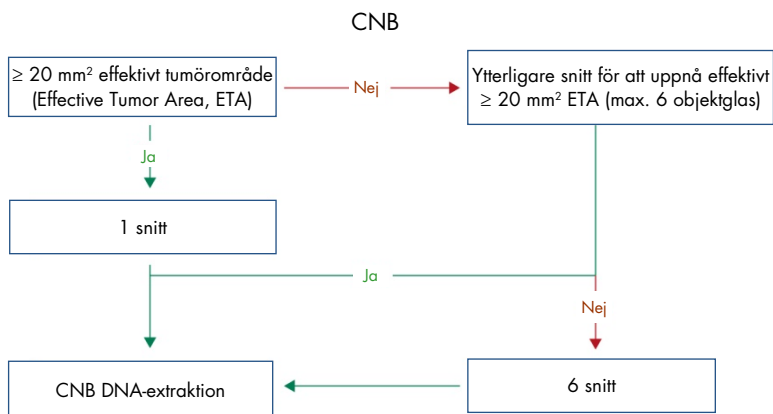
Använd torra skalpeller. Utför inte det här steget i en huv för laminärt flöde eller i ett dragskåp.

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

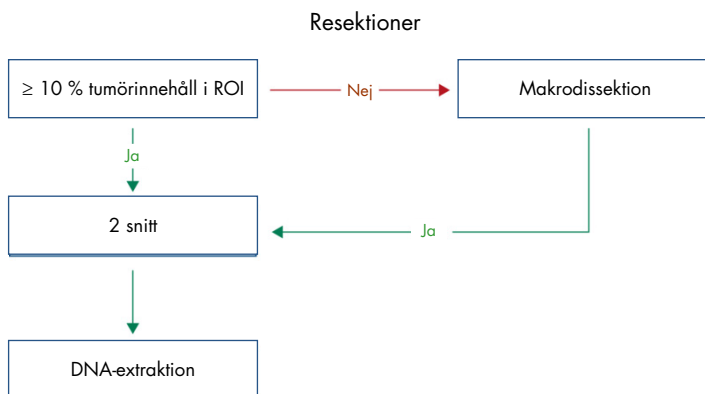
Märk, hantera och förvara tumörprover, block, objektglas, prover och mikrocentrifugrör som är redo för extraktion på ett kontrollerat sätt enligt lokala procedurer.

Det finns två separata arbetsflöden när du använder resekerade prover med FFPE-tumörvävnad och FFPE CNB-prover (Figur 4).

A



B



Figur 4. Arbetsflöde för rening av kliniskt prov för användning med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. A: FFPE CNB.

B: FFPE-tumörvävnad resekerade prover.

Provhantering: Plasma

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är avsett för användning med DNA isolerat från K₂EDTA antikoagulerade plasmaprover från bröstcancerpatienter. Alla plasmaprover ska behandlas som potentiellt smittfarliga.

Helt perifert venöst blod som samlats in i K₂EDTA-blodprovtagingsrör måste bearbetas för att erhålla plasma inom fyra timmar från blodprovtagning. Om så inte görs kan det föreligga risk för genomisk DNA-kontaminering av provet. Ytterligare information om att isolera plasma från helblod finns i Bilaga A i *handboken för QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

Plasmaprover ska förvaras vid –80 °C. Alla frusna plasmaprover måste ekvibreras till rumstemperatur innan användning.

Märk, hantera och förvara prover och mikrocentrifugrör som är redo för extraktion på ett kontrollerat sätt, enligt lokala procedurer.

Förvaring av prover

Innan DNA-extrahering ska FFPE-block och objektglas förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) och plasma ska förvaras vid –80 °C. DNA kan förvaras efter extrahering, innan testning. Tabell 2 och Tabell 3 ger vägledning om längsta rekommenderade förvaringstider och förhållanden för prover och DNA efter extrahering.

Tabell 2. Rekommenderade förvaringstider för gDNA extraherat från FFPE-vävnad

Förvaring	Längsta rekommenderade förvaringstid
Frys (-30 till -15 °C)	5 veckor
Kyl (2-8 °C)	1 vecka
Frys (-80 °C)	33 månader

Tabell 3. Rekommenderade förvaringsförhållanden och tider för plasma och ctDNA som extraherats från plasma

Prov	Förvaring	Längsta rekommenderade förvaringstid
Plasma	Frys (-80 °C)	11 månader
Extraherat ctDNA	Frys (-30 till -15 °C)	4 veckor

Procedur

DNA-extrahering från FFPE-prover

DNA ska extraheras med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (katnr. 60404).

Obs! *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit har tagits fram med DNA som extraherats med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Använd inte någon annan produkt för DNA-extraktion.

Utför DNA-extraheringen enligt anvisningarna i *handboken för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* och notera följande:

- Använd det antal objektglas och elueringsvolymmer som rekommenderas i avsnitten nedan ("FFPE-vävnadsresektionsprover (RES)" och "FFPE CNB-prover" på sida 28 i den här handboken).
- Utför en ytterligare centrifugering om vävnaden inte är centrifugerad efter den första.

- Använd etanol som är avsedd för molekylärbiologibruk* för alla steg.
- Efter etanolborttagningen inkuberar du det öppna röret i 15–40 °C i 10 minuter för att låta kvarvarande etanol dunsta.

FFPE-vävnadsresektionsprover (RES)

- Om RES-proverna har $\geq 10\%$ tumörinnehåll i regionen av intresse (Region Of Interest, ROI), skrapar du hela vävnadsområdet från två sektioner (4–5 μm) i märkta mikrocentrifugrör med en färsk skalpell för varje prov. Om proverna har $< 10\%$ tumörinnehåll i ROI utför du en makrodissektion och skrapar bara tumör-ROI:n från två sektioner i märkta mikrocentrifugrör med en färsk skalpell för varje prov.
- Nedbrytning av proteinas K måste utföras i 1 timme för resekerade vävnadsprover.
- För RES-prover måste renat gDNA elueras i 120 μl Buffer ATE (medföljer QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) efter 10 minuters inkubering på kolumnen.

FFPE CNB-prover

- För CNB-prover, använd ett lämpligt antal 4–5 μm snitt för att erhålla minsta nödvändiga effektiva tumörområde (Effective Tumor Area, ETA) på 20 mm^2 från max sex snitt. Använd det minsta möjliga antalet snitt (1–6) för att uppnå 20 mm^2 ETA.
- För prover där 20 mm^2 ETA inte kan erhållas med max sex snitt, fortsätter du med testning med sex snitt.
- Nedbrytning av proteinas K måste utföras i 1 timme för CNB-prover.
- För CNB-prover måste renat genomiskt DNA elueras i 70 μl Buffer ATE (medföljer QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) efter 10 minuters inkubering på kolumnen.

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

DNA-extrahering från plasmaprover

DNA ska extraheras med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.nr. 61504) med de föreskrifter som beskrivs nedan för att rena ctDNA från plasmaprover.

Obs! *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit har tagits fram med DNA som extraherats med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit. Använd inte någon annan produkt för DNA-extraktion.

Utför DNA-extraheringen enligt anvisningarna för det "Klassiska protokollet" i *Handboken för QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit* och notera följande:

- Startvolymen för plasma är 2 ml.
- Där 2 ml inte är tillgängligt, justerar du volymen till 2 ml med fosfatbuffrad saltlösning (Phosphate Buffered Saline, PBS).
- Alla centrifugeringssteg utförs i rumstemperatur (15-25 °C).
- Stäng av vakuuemet mellan stegen för att säkerställa att en jämn och konsekvent vakuumnivå används under protokollstegen.
- Volymen proteinas K ska vara 250 µl.
- Renat ctDNA måste elueras i 70 µl Buffer AVE (medföljer i QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit).
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit får bara användas manuellt.
- Använd etanol som är avsedd för molekylärbio­logi­bruk* för alla steg
- Förvara renat ctDNA vid –30 till –15 °C.

Obs! Alla analyser i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit genererar korta PCR-produkter. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit fungerar dock inte på högg­radigt fragmenterat DNA. Det extraherade DNA:t ska vara inom fungerande kontroll-C_T-intervall (≥ 24,68 och ≤ 31,68) för att provet ska vara giltigt.

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

Detektion av *PIK3CA*-mutationer

Detta protokoll är avsett för detektion av *PIK3CA*-mutationer.

Viktigt att tänka på före start

- Upp till 24 prover kan bedömas över fyra körningar med den tillgängliga *PIK3CA*-reaktionsblandningen som finns i varje kit. Optimal användning är fyra körningar där varje körning innehåller max sex prover. Mindre batchstorlekar innebär att färre prover kan testas med varje *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit*.
- Provet måste testas med alla reaktionsblandningar som medföljer *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit*.
- Det går inte att analysera blandade batcher med prover som kommer från både vävnads- och plasmaprover i samma PCR-körning; PCR-batcher måste bestå av enbart vävnadsderiverade prover eller enbart plasmaderiverade prover.
- Vortexblanda inte *Taq* DNA-polymeras (*Rör Taq*) eller någon blandning som innehåller *Taq* DNA-polymeras, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* DNA-polymeras genom att försiktigt placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att utsidan på spetsen täcks med överflödigt enzym.

Saker som måste göras före start

- Se till att körningarna utförs med Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in och antingen "*therascreen_PIK3CA_FFPE*" Assay Profile (vävnadsprover) eller "*therascreen_PIK3CA_Plasma*" analysprofil (plasmaprover). Se till att relevant programvara installeras innan första användning av Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet och följ lämpliga instruktioner för start av körningen och dataanalys ("*Utföra en PIK3CA-mutationsanalyskörning*" på sida 36).

- Före varje användning måste alla reagenser, inklusive *Taq* DNA-polymeras (Rör *Taq*) och DNA-proverna tinas fullständigt i 1 timme (och upp till max 4,5 timmar) i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom invertering 10 gånger och centrifugeras kort för att samla innehållet i botten av röret.
- Se till att PCR-laddningsblocket är dekontaminerat på korrekt sätt (se "Allmänna försiktighetsåtgärder", sida 20) och torrt.

Procedur

1. Tina alla reaktionsblandningar, vatten för kontroll utan mall, *Taq* DNA-polymeras, PIK3CA positiv kontroll och DNA-prover i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme och max 4,5 timmar.
2. Efter 1 timme blandar du alla reagenser grundligt genom att invertera varje rör 10 gånger för att undvika lokaliserade saltkoncentrationer. Centrifugera alla reagenser en kort stund för att samla upp innehållet i botten av röret.

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

3. Märk sex mikrocentrifugrör (medföljer inte) enligt Tabell 4. Bered tillräckligt med blandningar (kontroll- och mutationsreaktionsblandningar) plus *Taq* DNA-polymeras för DNA-proverna, en PIK3CA positiv kontrollreaktion och en kontroll utan mall-reaktion enligt volymerna i Tabell 4.

Huvudblandningarna innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

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

Tabell 4. Beredning av huvudblandningar för analys

Reaktionsblandningsrör	Volym av reaktionsblandning ($n^* + 3$)	Volym av Taq DNA-polymeras ($n^* + 3$)
Rör RM 1	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Rör RM 2	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Rör RM 3	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Rör RM 4	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Rör RM 5	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$
Rör RM 6	19,83 $\mu\text{l} \times (n + 3)$	0,17 $\mu\text{l} \times (n + 3)$

* n = antal DNA-prover. Värdet n ska inte överstiga sex eftersom det är det maximala antalet prover som får plats i en körning. Tre extra reaktioner ingår för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen och kontroller.

4. Förslut huvudblandningen och invertera 10 gånger för att noggrant blanda den. Centrifugera en kort stund för att se till att blandningen finns i botten av röret.
5. Omedelbart efter att huvudblandningarna är redo, placerar du lämpligt antal PCR 4-rör på remsa (varje remsa har fyra rör; PCR 4 rör på remsa medföljer inte) i laddningsblocket enligt layouten i Tabell 4. Förslut inte rören på remsa. Tillsätt omedelbart 20 μl av rätt huvudblandning för i varje PCR-rör på remsa.

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

Obs! Se Tabell 4 för rörlayouten medan du bereder reaktionsblandningarna.

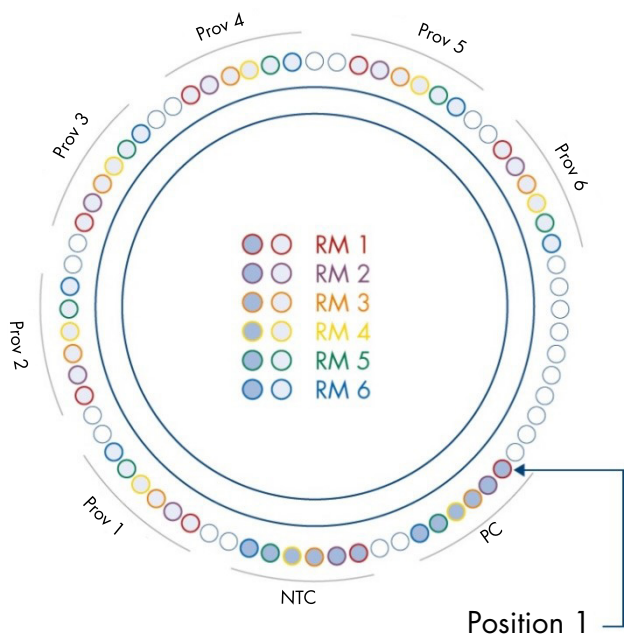
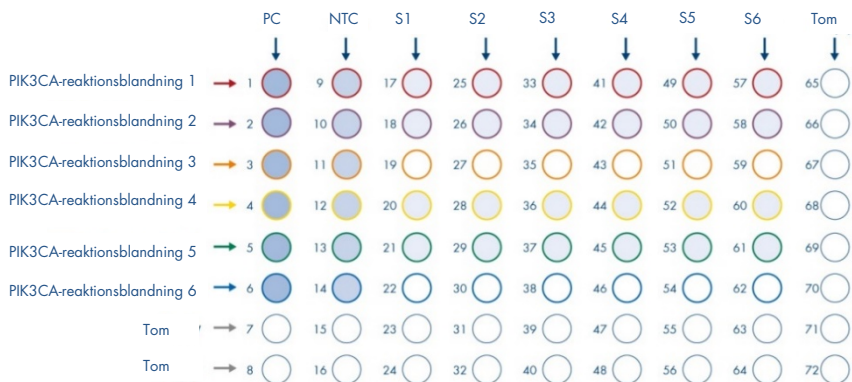
Tabell 5. Körningslayout i laddningsblocket för detektion av *PIK3CA*-mutationer

Analys	Kontroller		Provnummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Rör RM 1	1	9	17	25	33	41	49	57	E
Rör RM 2	2	10	18	26	34	42	50	58	E
Rör RM 3	3	11	19	27	35	43	51	59	E
Rör RM 4	4	12	20	28	36	44	52	60	E
Rör RM 5	5	13	21	29	37	45	53	61	E
Rör RM 6	6	14	22	30	38	46	54	62	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Obs! Varje rör ska innehålla en total reaktionsvolym på 25 µl (20 µl huvudblandning beredd enligt Tabell 4, plus 5 µl NTC/prov/PC). Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition. E: Tom.

- Tillsätt omedelbart 5 µl vatten för kontroll utan mall till NTC-rören (rörpositioner 9–14) och förslut rören.
- Tillsätt 5 µl av varje DNA-prov till provrören och förslut rören omedelbart efter att du tillsatt varje prov för att undvika korskontaminering från prov till prov.
- Tillsätt 5 µl *PIK3CA* positiv kontroll till PC-rören (rörpositioner 1–6) och förslut rören.
- Använd en spritpenna och markera locken till de första rören i den lägsta numeriska positionen i varje PCR 4-rör (t.ex. positioner 1, 5 och 9 osv.) för att visa i vilken riktning rören ska laddas i rotorn med 72 brunnar på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
- Placera alla PCR 4-rör på lämpliga positioner i rotorn med 72 brunnar enligt körningslayouten (Tabell 5 och Figur 5). Var extra noga så att rören överförs till korrekta positioner i rotorn med 72 brunnar (rörposition i rotorn med 72 brunnar ska vara samma som rörpositionen i laddningsblocket).

Obs! Alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med förslutna, tomma rör. Detta gör att den termiska effektiviteten på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet säkerställs.



Figur 5. Platt- och rotorkonfiguration för en analys med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. PC: Positiv kontroll. S: DNA-prov. NTC: Kontroll utan mall (vatten).

FÖRSIKTIGHET

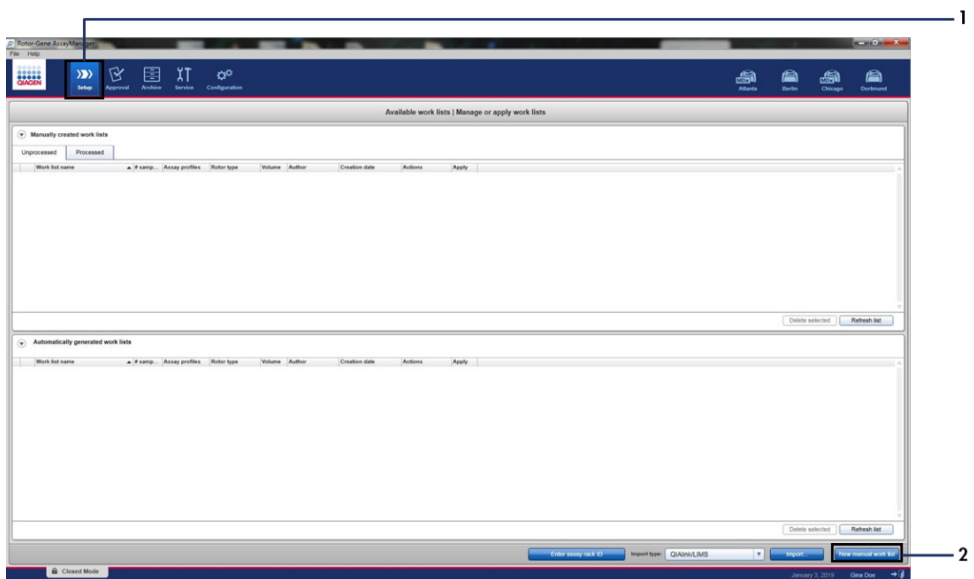


Rören måste sättas in i rotorerna som det visas i Figur 5 eftersom den automatiska analysen som anges i analysprofilen är baserad på denna organisation. Om du använder en annan layout blir resultaten avvikande.

11. Placera omedelbart rotorn med 72 brunnar i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Se till att låsringen (medföljer Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) placeras ovanpå rotorn för att säkra rören under körningen och instrumentlocket är stängt.
12. Starta körningen genom att följa instruktionerna i "Utföra en *PIK3CA-mutationsanalyiskörning*", nästa avsnitt.


Utföra en PIK3CA-mutationsanalyskörning

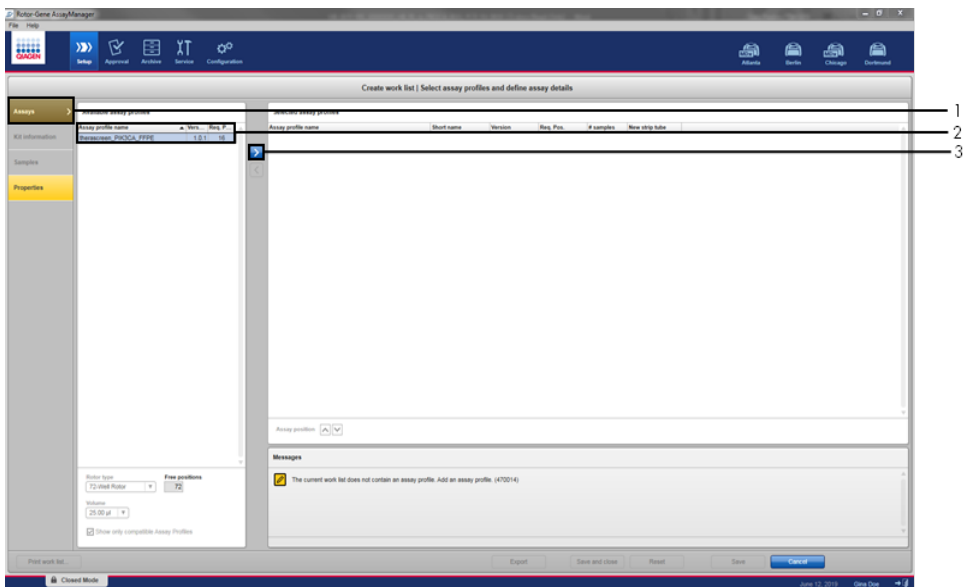
13. Dubbelklicka på ikonen för Rotor-Gene AssayManager v2.1 på skrivbordet på den bärbara dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
14. Miljön "Setup" (Inställningar) visas som standard. Klicka på New manual worklist (Ny manuell arbetslista) för att skapa en ny arbetslista (Figur 6).



Figur 6. Konfigurera en ny manuell arbetslista. 1 = Fliken "Setup" (Inställningar), 2 = "New manual worklist" (Ny manuell arbetslista).

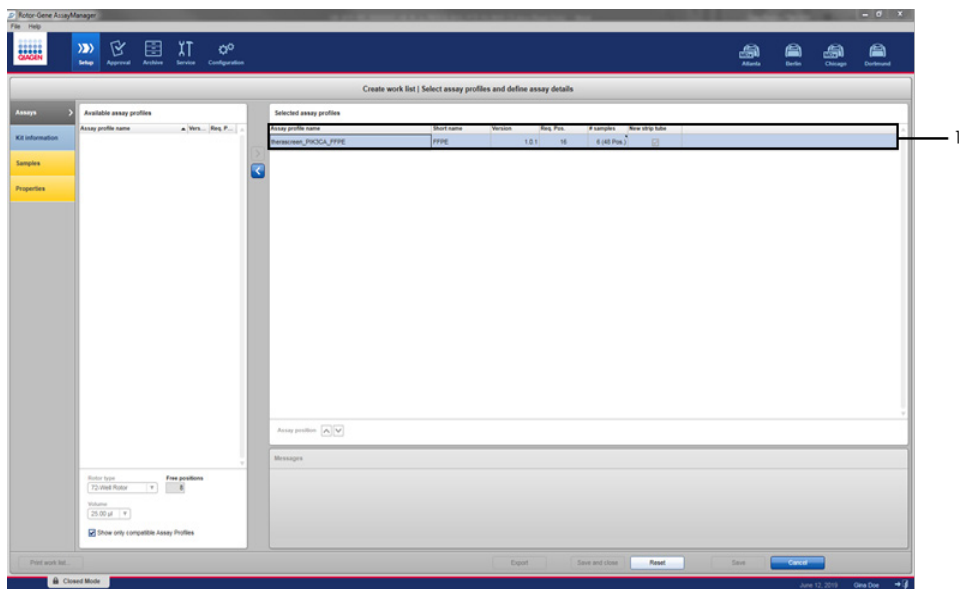
15. Välj fliken "Assays" (Analyser) på vänster sida om huvudfönstret. Beroende på provtyp klickar du på `therascreen_PIK3CA_FFPE` Assay Profile för vävnadsprover eller `therascreen_PIK3CA_Plasma` Assay Profile för plasmaprover från listan över tillgängliga analysprofiler och klicka på den blå pilen för att välja analysprofil. Om analysprofilens namn är trunkerat, pekar du på analysprofilen för att få det fullständiga namnet (Figur 7).

FÖRSIKTIGHET	Kontrollera att analysprofilen för provtypen har markerats.
	



Figur 7. Konfigurera en ny manuell arbetslista: Välj analysprofilnamn. 1 = Fliken "Assays" (Analyser),
 2 = Tillgängliga analysprofiler med "therascreen_PIK3CA_FFPE" eller "therascreen_PIK3CA_Plasma" markerade,
 3 = Välj analysprofil.

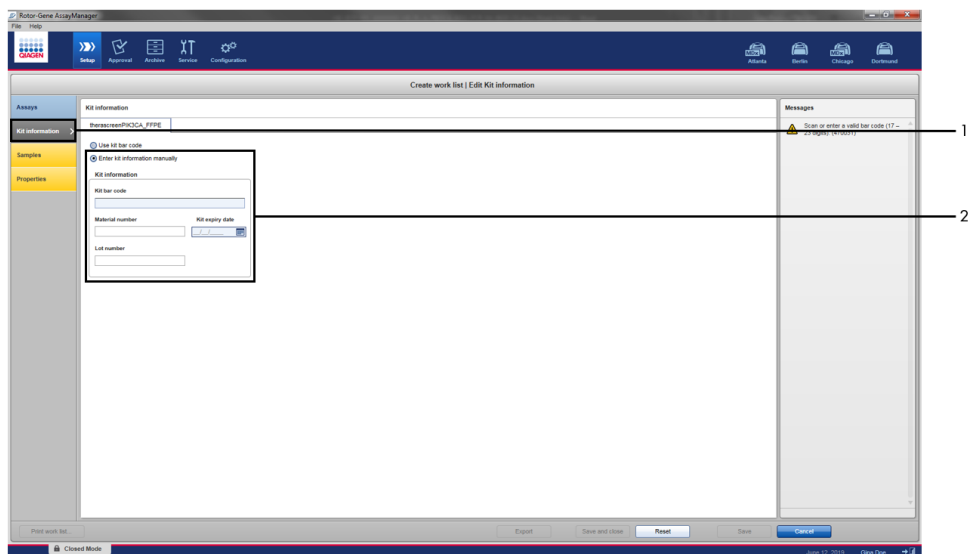
16. I fönstret "Selected assay profiles" (Markerade analysprofiler) anger du antalet analysprov som ska analyseras, exklusive antalet körningskontroller (Figur 8).



Figur 8. Skapa arbetslistans huvudfönster. 1 = Lägg till antalet prover.

17. Klicka på fliken "Kit information" (Kitinformation). Välj Enter kit information manually (Ange kitinformation manuellt) och ange följande kitinformation (Figur 9):

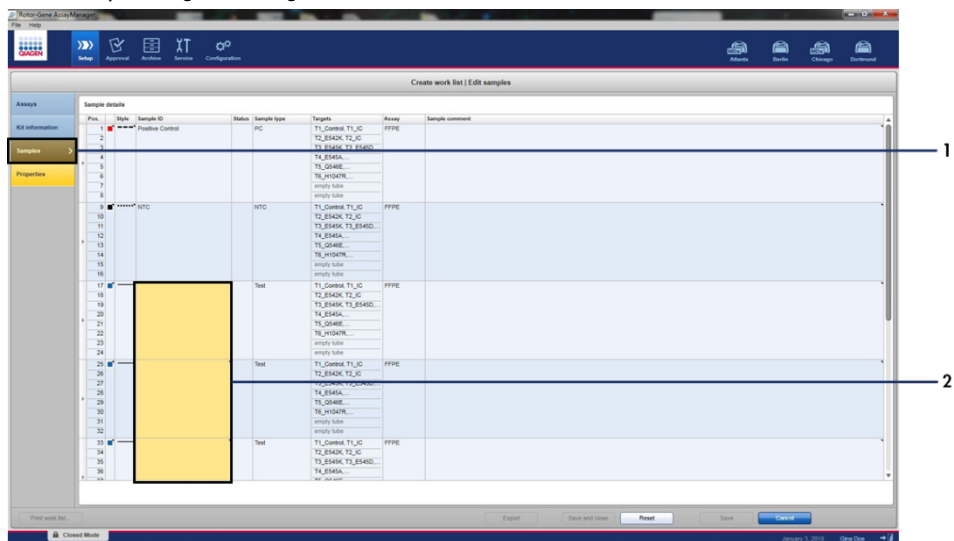
- Kit bar code (Kitets streckkod)
- Material number (Materialnummer)
- Lot number (Lotnummer)
- Kit expiry date (Kitets utgångsdatum)



Figur 9. Skapa arbetslistans huvudfönster. 1 = Fliken "Kit information" (Kitinformation), 2 = Ange kitinformationen.

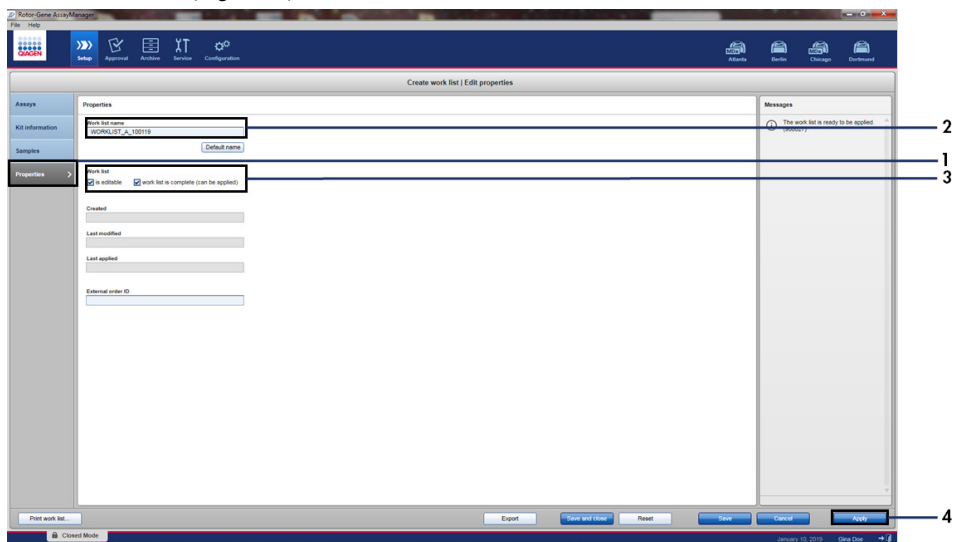
18. Klicka på fliken "Samples" (Prover) för att ange provinformation. Ange provnamnen manuellt (Figur 10).

Obs! Kontrollera att korrekt provnamn har angetts innan du startar Rotor-Gene AssayManager-körningen.



Figur 10. Skapa arbetslistans huvudfönster. 1 = Fliken "Samples" (Prover), 2 = Ange provnamn.

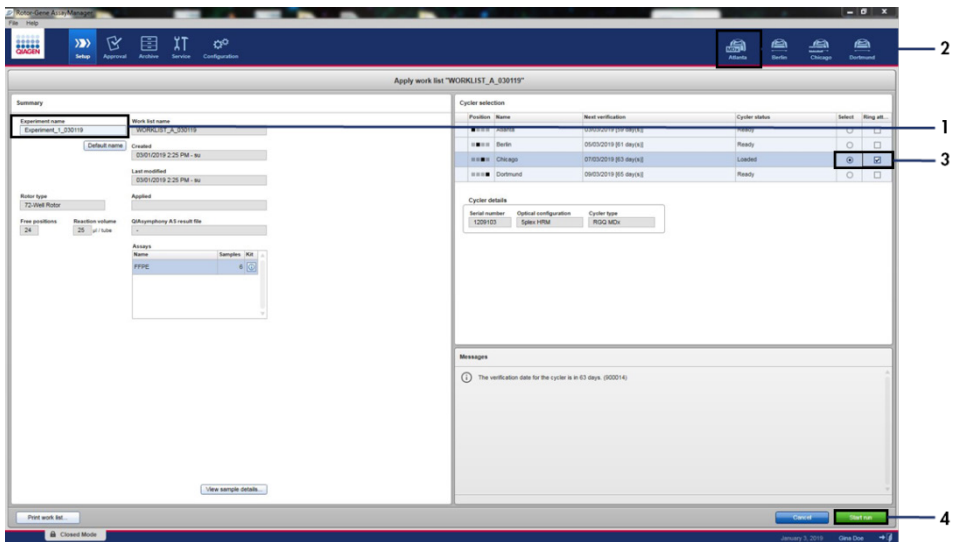
19. Klicka på fliken "Properties" (Egenskaper) och ange namnet på arbetslistan. Efter att arbetslistans namn har angetts, kontrollera att kryssrutorna is editable (är redigeringsbar) och work list is complete (arbetslistan är komplett) är markerade. Klicka på Apply (Tillämpa) i det nedre högra hörnet för att tillämpa arbetslistan. Ett nytt fönster visas (Figur 11).



Figur 11. Skapa arbetslistans huvudfönster. 1 = Fliken "Properties" (Egenskaper), 2 = Ange arbetslistans namn, 3 = Markera "is editable" (är redigeringsbar) och "work list is complete" (arbetslistan är komplett), 4 = "Apply" (Tillämpa).

20. Ange namnet på experimentet i fältet Experiment name (Experimentnamn). Välj en cykler från listan med tillgängliga cykler och kontrollera att kryssrutan Ring attached (Ring bifogad) är markerad (Figur 12).

När alla steg har utförts, klickar du på Start run (Starta körning). RGQ-ikonen överst till vänster på skärmen blir grön för att indikera att körningen har startat.



Figur 12. Tillämpa arbetslistor och körningsstart. 1 = Ange experimentets namn, 2 = Val av instrument, 3 = Se till att "Ring attached" (Ring bifogad) är markerat, 4 = Starta körningen.

Obs! Ikonen "Cycler" (Cykler) ändrar utseende beroende på körningens förlopp och resultat. Du hittar en fullständig beskrivning av dessa cyklerikoner i *användarhandboken för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Du kan se exempel på cyklerikoner i Figur 13.



Figur 13. Cyklerikoner som kan visas.

21. När körningen är klar klickar du på Finish run (Avsluta körning). Dialogfönstret "Release and go to approval" (Frigör och gå till godkännande) öppnas (Figur 14).

Obs! Förstärkningsgrafan visas och uppdateras i realtid under körningsprocessen. En förloppsindikator längst ned till vänster visar kvarvarande tid.

Viktigt: Stäng inte fönstret när körningen pågår.



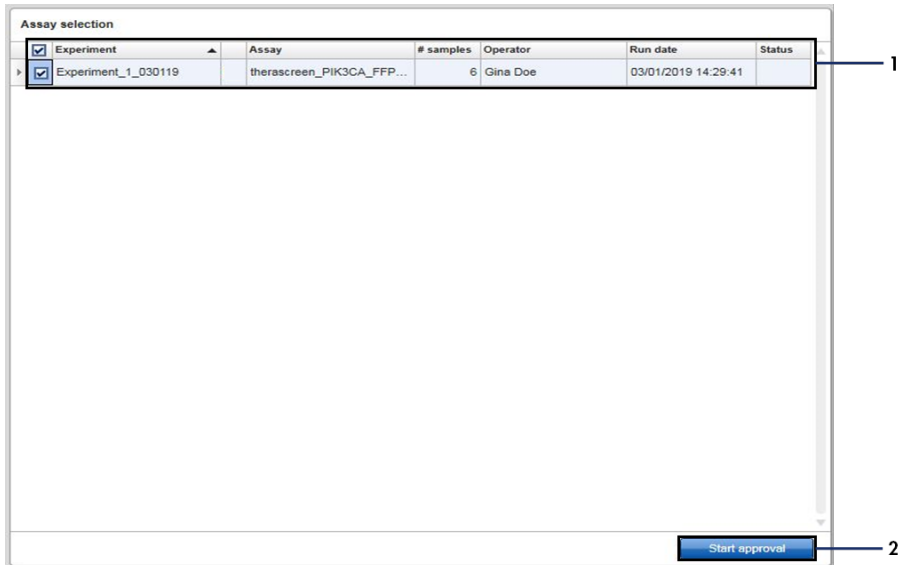
Figur 14. Avsluta en körning. 1 – "Finish run" (Avsluta körning).

22. Klicka på Release and go to approval (Frigör och gå till godkännande) för att gå till fliken "Approval" (Godkännande) och frigöra Rotor-Gene Q-instrumentet (Figur 15). RGQ-ikonen överst till höger på skärmen ändras från grön till blå vilket indikerar att instrumentet är redo att utföra en till körning. Oavsett om körningen lyckas eller inte måste körningen frigöras och godkännas. En lista över potentiella fel och felkoder som visas i Rotor-Gene AssayManager finns i *användarhandboken för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* och *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

The image shows a 'Finish run' dialog box. At the top left is a checkmark icon. The title is 'Finish run'. Below the title, there are three columns: 'Position' with three colored squares (grey, black, grey), 'Name' with a text box containing 'Chicago', and 'Run status' with a text box containing 'Run Successful'. Below these are sections for 'Experiment name' (text box with 'Experiment_1_030119'), 'Errors during run' (a scrollable list area), 'Comment' (a large text area), and 'Password' (a text box). At the bottom, there are three buttons: 'Release', 'Release and go to approval', and 'Cancel'. A blue line with the number '1' points to the 'Release and go to approval' button.

Figur 15. Popup-fönstret "Finish run" (Avsluta körning). 1 = "Release and go to approval" (Frigör och gå till godkännande).

23. Välj experimentet under "Assay Selection" (Analysval) i miljön Approval (Godkännande) och klicka på Start approval (Starta godkännande) (Figur 16).



Figur 16. Starta frigörelseprocessen i miljön "Approval" (Godkännande). 1 = Analysen som valts för godkännande, 2 = "Start approval" (Starta godkännande).

Information om "Raw data" (Rådata), "Processed data" (Bearbetade data), "Experiment", "Assay" (Analys) och "Audit Trail" (Granskningsspår) finns i avsnittet "Plots and information" (Kurvor och information) (1). Du hittar analysresultaten i avsnittet "Results" (Resultat) (2).

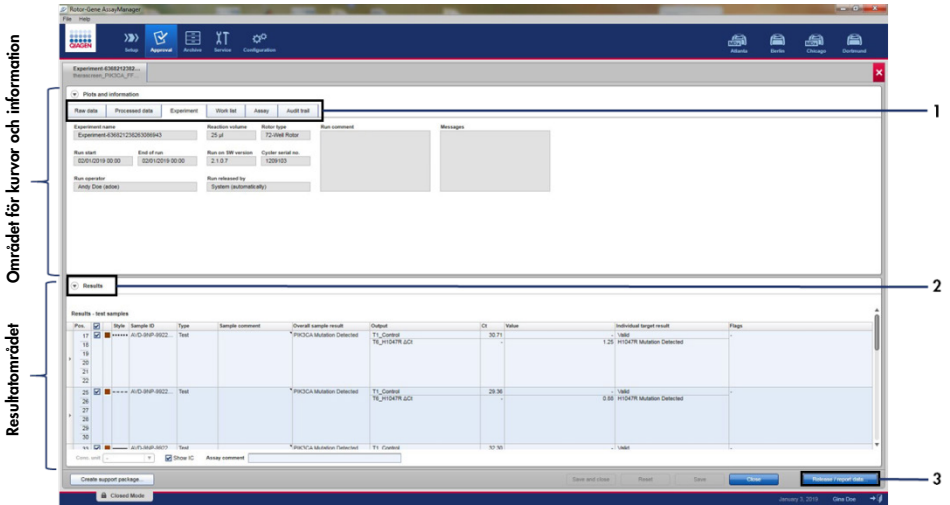
Om Positiv kontroll och Kontroll utan mall är inom ett acceptabelt intervall, rapporterar kolumnen "Sample Status" (Provstatus) Valid (Giltigt). I annat fall rapporteras provstatus Invalid (Ogiltigt).

Om någon av körningskontrollerna misslyckas blir körningen ogiltigförklarad. Alla prover flaggas som ASSAY_INVALID.

Se "therascreen PIK3CA Assay Profile-flaggor i Rotor-Gene AssayManager v2.1" (sida 52) för instruktioner om hur du fortsätter.

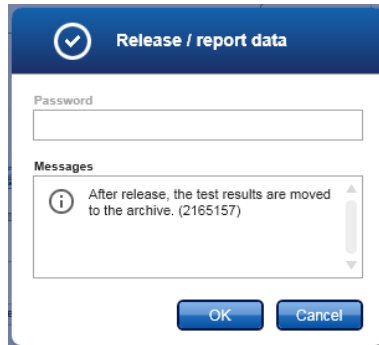
Obs! Analysprofilen innehåller alla reglerna för automatisk analys och provanalys och resultattolkning. Programvaran utvärderar därmed giltigheten eller ogiltigheten för prover och kontroller automatiskt.

24. Klicka på Release/report data (Frigör/rapportera data). Fönstret "Release/report data" (Frigör/rapportera data) öppnas (Figur 17).



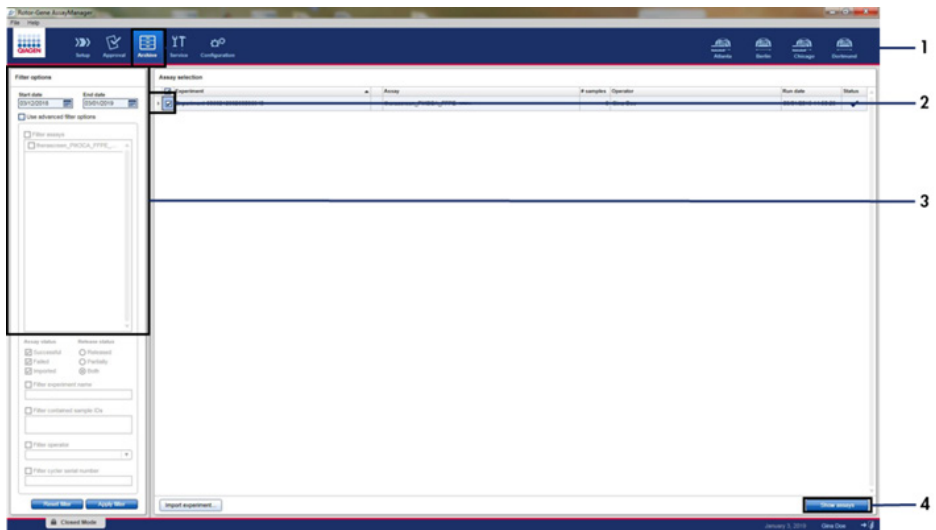
Figur 17. Exempel på huvudfönstret för analysresultat. 1 = Fliken "Experiment" i området "Plots and information" (Kurvor och information). 2 = Resultatområdet, 3 = "Release/report data" (Frigör/rapportera data).

25. Klicka OK för att spara experimentet till arkivet och skapa LIMS-utdata och en körningsrapport (Figur 18). Körningsrapporter och LIMS-exporter sparas i standard rapportkatalogen. Du kan hitta standardkatalogen under "Default data export directories" (Standard dataexportkataloger) på fliken "Configuration" (Konfiguration).



Figur 18. Exempel på fönstret "Release/report data" (Frigör/rapportera data).

26. För att visa ett experiment som är lagrat i experimentarkivet, klicka på Archive (Arkiv) och sök efter experimentet med sökkriteriet i avsnittet "Filter Options" (Filteralternativ). Klicka på Apply filter (Tillämpa filter) för att söka. Välj ett experiment genom att markera kryssrutan bredvid experimentet du vill visa och klicka på Show assays (Visa analyser) (Figur 19).



Figur 19. Exempel på huvudfönstret "Experiment Archive" (Experimentarkiv). 1 = Fliken "Archive" (Arkiv), 2 = Sökalternativ, 3 = Välja experimentnamn, 4 = Fliken "Show assays" (Visa analyser).

Resultat

Analys och mutationsbestämningar utförs automatiskt av *therascreen* PIK3CA Assay Profile när en körning slutförs. Följande information förklarar hur *therascreen* PIK3CA Assay Profile gör analysen och mutationsbestämningarna.

Analys

PCR-cykeln vid vilken fluorescensen från en viss reaktion går över det förinställda tröskelvärde som anges av *therascreen* PIK3CA Assay Profile definieras som C_T-värdet. C_T-värden 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 där fluorescensen korsar tröskelvärdet på eller efter detta C_T-värde klassas som positiva.

Genom att använda kontrollreaktionen för att bedöma DNA-provet är det möjligt att baserat på de erhållna C_T-värdena bestämma om proverna innehåller DNA-nivåer som är lämpliga för analys, och vilka prover som behöver spädas ut innan analys.

Bedömning av prover med hjälp av de olika mutationsreaktionsblandningarna för att bestämma deras respektive C_T-värden gör att *therascreen* PIK3CA Assay Profile kan utföra en beräkning för att bestämma ΔC_T -värdet för provet med hjälp av ekvationen:

$$\Delta C_T = [\text{mutationsanalysens } C_T\text{-värde}] - [\text{kontrollanalysens } C_T\text{-värde}]$$

Baserat på fastställda analytiska C_T- och ΔC_T -värden gör *therascreen* PIK3CA Assay Profile en kvalitativ bestämning av mutationsstatus på DNA-proverna och rapporterar om ett prov innehåller en mutation.

Körningskontrollerna (PC, NTC och IC) bedöms för att säkerställa att acceptabla C_T-värden uppfylls och att reaktionerna har lyckats.

Om C_T-kontrollprovet är under acceptabelt intervall innebär det att DNA-indata är för högt och att provet måste spädas som det beskrivs i "therascreen PIK3CA Assay Profile-flaggor i Rotor-Gene AssayManager v2.1", sida 52.

Alla dessa bestämningar utförs automatiskt och kräver ingen manuell tolkning. Systemen kontrollerar automatiskt kriterier för körningsvaliditet och provvaliditet och rapporterar inte mutationsstatus vid ett ogiltigt prov eller en ogiltig körning.

Programvaran Rotor-Gene AssayManager v2.1 fastställer resultatet för varje biomarkörmål genom att kombinera alla relevanta analysresultat i enlighet med kärnanalysalgoritmer som normaliserings-, prov- och analysregler som definierats i den motsvarande analysprofilen.

Följande resultat kan tilldelas ett enskilt prov:

- PIK3CA Mutation Detected (PIK3CA-mutation detekterad)
- No Mutation Detected (Ingen mutation detekterad)
- INVALID (OGILTIGT): Om en eller flera provflaggor tilldelas till provet under analys av Rotor-Gene AssayManager v2.1 som är definierade att fastställa målresultatet som "INVALID" (OGILTIGT).

Obs! Om ett fel har uppstått under körningen måste proverna i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM kasseras och ska inte omtestas.

therascreen PIK3CA Assay Profile-flaggor i Rotor-Gene AssayManager v2.1

Alla möjliga flaggor som motsvarar Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in listas i *Användarhandboken för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

Tabell 6 listar de möjliga flaggor som kan genereras av *therascreen* PIK3CA Assay Profile, deras betydelse och vilka åtgärder som ska vidtas.

Flaggnamnen utformas för att ge information om den komponent i kitet, det prov eller den kontroll som berörs, samt om felstatusen.

Till exempel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = kontrollanalysen (CTRL_ASSAY) för den positiva kontrollen (PC) har misslyckats (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = internkontrollen (INT_CTRL) för kontrollen utan mall (NTC) har misslyckats (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = kontrollanalysen (CTRL) för provet (SAMPLE) har en hög koncentration (HIGH_CONC)

Tabell 6. Programflaggor som används av PIK3CA Assay Profiles

Flagga	Betydelse	Åtgärd
IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ogiltig körning. IC-värdet över specifikationsintervallet i PC- eller NTC-rör. Ogiltigt prov. IC i provet över specifikationsintervall.	Upprepa körningen. Testa om provet en gång, om provets IC C_T fortfarande är ovanför det acceptabla intervallet, extrahera om provet. Om provets IC fortfarande är ovanför det acceptabla intervallet efter omextraktion och två rundor med tester så ska provet rapporteras som obestämt.
(PC)_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ogiltig körning. PC över specifikationsintervallet.	Upprepa körningen.
(PC)_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Ogiltig körning. PC under specifikationsintervallet.	Upprepa körningen.
IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Ogiltig körning. IC under specifikationsintervallet i PC- eller NTC-rör. Ogiltigt prov. IC i provet under specifikationsintervall	Upprepa körningen. Testa om provet en gång, om provets IC C_T fortfarande är under det acceptabla intervallet, extrahera om provet. Om provets IC fortfarande är under det acceptabla intervallet efter omextraktion och två rundor med tester så ska provet rapporteras som obestämt.
UNEXPECTED_CT_VALUE	Ogiltig körning. C_T -värdet har detekterats i NTC.	Upprepa körningen.
NO_CT_VALUE	Ogiltig PC eller IC. Inget C_T -värde för PC i PC-rör eller för IC i PC- och NTC-rör. Ogiltigt prov. Inget C_T -värde i provet.	Upprepa körningen. Testa om provet en gång, om det fortfarande inte finns något prov-IC C_T , extrahera om provet. Om det fortfarande inte finns något prov-IC efter omextrahering och två rundor med tester så ska provet rapporteras som obestämt.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 6. Programflaggor som används av PIK3CA Assay Profiles fortsatt

Flagga	Betydelse	Åtgärd
DNA_INPUT_TOO_HIGH	Ogiltigt prov. Provets C_T -kontrollvärde under kontrollens arbetsintervall.	Provet är för koncentrerat och måste spädas. Följ instruktionerna i "C _T -kontrollvärde", sida 54.
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ogiltigt prov. Provets C_T -kontrollvärde över kontrollens arbetsintervall.	Testa om provet en gång, om C_T -kontrollvärdet fortfarande är ovanför kontrollens arbetsintervall efter omtestning, extrahera om provet. Om C_T -kontrollvärdet fortfarande är ovanför det acceptabla intervallet efter omextraktion och två runder med tester så ska provet rapporteras som obestämt.
T1_CONTROL_NO_CT_VALUE	Ogiltigt prov. Inget C_T -värde för provet i provkontrollröret.	Testa om provet en gång, om det fortfarande inte har något C_T , extrahera om provet. Om provet fortfarande inte har någon C_T efter omextrahering och två runder testning så ska provet rapporteras som obestämt.

Obs! Om ett omtestat prov är ogiltigt av en annan orsak vid upprepning så klassas det här fortfarande som en andra upprepning och en omextrahering av provet ska utföras.

C_T-kontrollvärde

Det finns två möjliga flaggor för ogiltigt prov på grund av C_T-kontrollvärde:

- **DNA_INPUT_TOO_HIGH:** Provet är för koncentrerat och kommer att överbelasta mutationsanalyserna. Provet måste spädas för att erhålla ett giltigt provresultat. Proverna ska spädas på den bas att spädning med hälften ökar C_T med 1. Prover ska spädas med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).

Beräkna nödvändigt kontroll- C_T genom att skifta (X_R) och uppskatta den spädningfaktor som krävs (Tabell 7):

$$X_R = 25 - X \text{ (FFPE-prover)}$$

$$X_R = 27 - X \text{ (plasmaprover)}$$

där 25 (för FFPE-prover) eller 27 (för plasmaprover) ges målvärdet för kontroll- C_T för det spädda provet och X är ett faktiskt kontroll- C_T av provet som ska spädas.

Om X inte är ett heltal, runda upp till nästa heltal, t.ex. rundas 2,1 upp till 3,0. Det här värdet är X_R . Erhåll den spädningfaktor som krävs från Tabell 7.

Tabell 7. Beräkning av spädningfaktor

X_R	Spädningfaktor	Provkvot	Spädningkvot
1	2-falt	1	1
2	4-falt	1	3
3	8-falt	1	7
4	16-falt	1	15
5	32-falt	1	31
6	64-falt	1	63
7*	128-falt	1	127
8*	256-falt	1	255

* Enbart för plasma.

- ABOVE_ACCEPTED_RANGE och T1_CONTROL_NO_CT_VALUE: Mängden DNA är otillräcklig för mutationsanalys. Testa om provet där tillräckligt DNA-eluat finns tillgängligt (>30 μ l). Om mängden DNA fortfarande är otillräcklig vid omtestning, extrahera om med färsk FFPE-snitt eller ett färskt plasmaprov. Om det inte går ska provet rapporteras som obestämt.

Prestandaegenskaper: Vävnadsprover

Analytisk prestanda: Vävnadsprover

De specifika prestandaegenskaperna för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bestämdes i studier med FFPE-vävnadsprover som samlats in från bröstcancerpatienter och 12 FFPE humana cellinjeprover (FFPE-cellinjeprover) som bär på kända *PIK3CA*-mutationer som detekteras av analysen, plus ett *PIK3CA*-vildtypsprov (dvs. inga mutationer som *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit hävdar kunna detektera i exon 7, 9 och 20).

Blankgräns (Limit of Blank, LoB): Vävnadsprover

LoB definieras i CLSI riktlinje EP17-A2 som "det högsta märesultatet som är sannolikt att observeras (med en angiven sannolikhet) med ett blankprov". För *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är det här den datapunkt som motsvarar den övre 95:e percentilen i mutationsnegativa prover. LoB bestämdes genom analys av 56 individuella kliniska FFPE-vildtypsprover (30 RES-prover och 26 CNB-prover) testade i duplikat per prov för var och en av tre *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit loter vilket genererar totalt 336 datapunkter. LoB-värdena för var och en av mutationsanalyserna (i termer av ΔC_T) som detekterades av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit verifierades att vara ovanför de ΔC_T -cutoffvärden som fastställts för var och en av analyserna och sammanställs nedan tillsammans med de falska positiva bestämmingar som erhållits.

Tabell 8. Sammanfattning av LoB-resultat

Exon	Mutation	Basskifte	LoB (ΔC_T värde)	Falska positiva bestämningar (%)
7	C420R	1258T>C	7,57	0,94
9	E542K	1624G>A	5,09	1,88
	E545A	1634A>C	13,03	0,00
	E545D	1635G>T	9,19	0,31
	E545G	1634A>G	13,03	0,00
	E545K	1633G>A	6,74	1,57
	Q546E	1636C>G	13,03	0,00
	Q546R	1637A>G	8,72	0,00
	20	H1047L	3140A>T	12,63
H1047R		3140A>G	9,80	1,25
H1047Y		3139C>T	7,61	0,63

Detektionsgräns (Limit of detection, LoD): Vävnadsprover

En studie utfördes för att fastställa LoD (Limit of detection) för var och en av de 11 *PIK3CA*-mutationerna. LoD definierades som den lägsta mängden mutant-DNA i en bakgrund med vildtyps-DNA då ett mutantprov ger mutationspositiva resultat för 95 % av testresultaten (C_{95}). LoD för de 11 *PIK3CA*-mutationsanalyserna av *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit rapporteras som MAF. För att bestämma LoD för varje mutation, bereddes kliniska FFPE-bröstcancerprover eller FFPE-cellinje-DNA med olika procentandelar mutation vid låg DNA-input genom seriell spädning i en FFPE klinisk vildtypbakgrund. För varje *PIK3CA*-mutation, bestämdes procentandelen korrekta bestämningar för olika spädningsnivåer med tre olika *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-loter med 24 testade replikat per kit lot per fem till sex MAF-nivåer. LoD för varje analys beräknades med en probit-metod (Tabell 9). Det slutgiltiga LoD-värdet för varje mutation bestämdes som det högsta värdet (vad det gäller MAF) för alla *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-loter. För att verifiera LoD testades mutationsprover vid fastställt LoD och den positiva testandelen verifierades studien av repeterbarhet och reproducerbarhet.

Tabell 9. LoD för vävnadsprover bestämdes med låg DNA-inputprover från kliniska FFPE-prover och FFPE-cellinjeprover

Exon	Mutation	COSMIC* ID	Basskifte	LoD (% MAF)
7	C420R	757	1258T>C	2,41 [†]
9	E542K	760	1624G>A	5,47 [‡]
	E545A	12458	1634A>C	3,54 [†]
	E545D	765	1635G>T	2,69 [‡]
	E545G	764	1634A>G	4,98 [‡]
	E545K	763	1633G>A	4,13 [‡]
	Q546E	6147	1636C>G	4,50 [†]
	Q546R	12459	1637A>G	6,08 [‡]
	20	H1047L	776	3140A>T
H1047R		775	3140A>G	3,13 [‡]
H1047Y		774	3139C>T	14,04 [†]

MAF: Mutantallelfrekvens.

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

[†] LoD-värden bestämdes med DNA från cellinjeprover.

[‡] LoD-värden bestämdes med DNA från kliniska prover.

Indataintervall för genomiskt DNA: Vävnadsprover

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit använder inte någon specifik koncentration av DNA som det fastställts av spektrofotometri. DNA-indata baseras på kontrollreaktion C_T-resultatet som används för att indikera att det finns tillräckligt med amplifierbart DNA i provet. Arbetsintervallet för kontroll-C_T bestämdes med totalt 20 kliniska FFPE-prover av vildtyp som genererade 107 datapunkter. Arbetsintervallet för kontroll-C_T angavs med beräknade toleransintervall. Kontrollreaktionens C_T-intervall fastställdes från 23,23 till 33,38 C_T.

ΔC_T -cutoffvärden: Vävadsprover

Analysens cutoffvärde är ett specifikt ΔC_T -värde som används för att bestämma om ett prov ska klassas som positivt eller negativt för en *PIK3CA*-mutation. Prover som genererar ΔC_T -värden vid eller under cutoffvärdet klassificeras som *PIK3CA*-mutationspositiva (dvs., *PIK3CA* Mutation Detected [PIK3CA-mutation detekterad]) och ΔC_T -värden ovanför cutoffvärdet klassificeras som *PIK3CA*-mutationsnegativa (dvs., No Mutation Detected [Ingen mutation detekterad]). En blandning av cellinje, kliniska prover och förextraherat cellinje-DNA användes för att bestämma cutoffvärdena för varje mutation. Cutoffvärdena valdes med avseende på följande parametrar: falsk positiv fraktion, falsk negativ fraktion och analyskänslighet.

Cutoffvärdena för varje analys inom *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit visas i Tabell 10.

Tabell 10. Cutoffvärden för varje mutationsanalys vid testning av DNA från vävnadsprover

Analys	Cutoffvärde (ΔC_T)
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,5$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 6,5$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 7,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

Effekt av DNA-input på ΔC_T -värden (linjäritet): Vävnadsprover

DNA-inputnivån definieras som den totala mängden amplifierbart DNA i ett prov som det bestäms av C_T -värden från *PIK3CA*-kontrollreaktionen. För att demonstrera att prestandan för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är konsekvent för kontrollreaktionens C_T -intervall (23,23 till 33,38), en 9-nivås seriell spädning med varierande DNA-inputnivåer med övre och nedre nivåer utanför kontrollreaktionens C_T arbetsintervall (23,23–33,38 C_T), utvärderades mot mutationspositiva prover. Tre olika provtyper användes i den här studien: kliniska FFPE-resektionsprover och gDNA förextraherat från cellinjer. MAF:arna hölls konstanta medan DNA-indata varierades. Mål C_T -värden för spädningsnivåer 1 och 9 för varje mutation var ungefär 23,00 respektive 33,50. Bägge värdena var inriktade att vara utanför kontrollreaktionens C_T -intervall.

Utvärderingen utfördes med en *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-lot med tre testade replikat per DNA-nivå. Data analyserades med regressionsanalys för att bestämma det linjära intervallet. För att analysen ska anses vara linjär över DNA-indataintervallet ska det inte vara någon ändring över intervallet i ΔC_T , dvs. ingen statistiskt signifikant linjär, kvadratisk eller kubisk effekt. Överlag var de ΔC_T -värden som mättes vid olika total DNA-inputnivåer konsekventa över arbetsintervallet för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit för mutationerna E542K, E545D, E545G, E545A, H1047Y, Q546E, C420R och H1047R, dvs. analyserna uppvisade inget statistiskt signifikant p-värde ($p > 0.05$) för de anpassade linjära, kvadratiske och kubiska effekterna för alla testade modeller. Analyserna E545K, Q546R och H1047L är inte linjära för ΔC_T för det testade DNA-indataintervallet. Ett linjärt intervall för E545K-analysen observerades mellan C_T 24,08 och 31,02. Ett linjärt intervall för Q546R-analysen observerades mellan C_T 24,28 och 32,69. Ett linjärt intervall för H1047L-analysen observerades mellan C_T 25,74 och 31,61. En undersökning fastställde att de icke-linjära effekterna inte påverkade prestandan för analyserna E545K och H1047L. En effekt på Q546R-analysens prestanda fastställdes dock. Prover vid LoD kan bestämmas som falska negativa när DNA-indata är högt (ungefär kontroll- C_T 23). Sannolikheten för att det här inträffar är dock extremt låg, ungefär 0,0052 %.

Analyspecificitet (korsreaktivitet/specificitet): Vävnadsprover

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit består av sex separata reaktionsblandningar: en enda kontrollreaktion som detekterar en region i exon 15 av *PIK3CA*-genen och 11 mutationsanalyser som detekterar *PIK3CA*-mutationer. Det finns ingen reaktion som specifikt mäter *PIK3CA*-sekvensen av vildtyp vid exon 7, 9 eller 20. Om *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ger resultatet "No Mutation Detected" (Ingen mutation detekterad), antyder det frånvaro av positiva mutationsresultat.

För att utvärdera om korsreaktivitet mellan mutationer som detekterats av analysen har tagits med i konfigurationen av de analytiska cutoffvärdena, testades mutantpositiva kliniska prover och cellinjeprover och testades i duplikat med tre loter av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit vid låg DNA-input och låg MAF% och hög DNA-input och hög MAF% (vilket totalt genererade 240 datapunkter). Inom den här studien fanns det en instans av korsreaktivitet mellan E545D och H1047R, och en instans mellan C420R och H1047R. Det fanns även fyra instanser av mutant icke-specifik amplifiering mellan högt MAF-prov E545A och H1047L. Totalt uppvisade 6/240 datapunkter mutant icke-specifik amplifiering. De sex datapunkterna som uppvisade mutant icke-specifik amplifiering var sporadiska och inkonsekventa med andra replikat från samma prov. Resultaten ansågs därmed inte vara ett resultat av korsreaktivitet. PCR-korsreaktivitet observerades dock mellan H1047L och H1047R. Den här korsreaktiviteten är enkelriktad dvs. om ett dubbelt H1047R- och H1047L-prov observeras, kommer det bara att rapporteras som "H1047R Mutation Detected" (H1047R-mutation detekterad). Den här regeln är inkorporerad i den automatiska "*therascreen*_PIK3CA_FFPE Assay Profile"-algoritmen.

Interferens: Vävnadsprover

Effekter av nekrotisk vävnad

För att utvärdera den potentiella interferensen av nekrotiskt vävnadsinnehåll i bröstcancer FFPE-prover i prestandan för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, FFPE kliniska prover från SOLAR-1 med både *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit och nästa generations sekvensering (NGS) resultat analyserades. Totalt 180 *PIK3CA* mutantnegativa prover enligt NGS och 199 *PIK3CA* mutantpositiva enligt NGS utvärderades, vilket inkluderade CNB- och RES-prover. Procent nekros som det identifierats av en patolog, varierade från 0 till 10 % för mutantnegativa och 0 till 20 % för mutantpositiva prover.

För både mutantpositiva och mutantnegativa FFPE-prover, hade 20 prover *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultat som var icke överensstämmande med förväntade NGS-resultat. Dessa resultat var från 17 mutantnegativa och två mutantpositiva prover med mindre än 5 % nekrotiskt innehåll och ett mutantnegativt prov med mindre än 10 % nekrotiskt innehåll, därmed är det osannolikt att nekros orsakade de icke överensstämmande resultaten. Resultaten stöder användning av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit med bröstcancer FFPE-prover med nekrotiskt vävnadsinnehåll upp till 20 %.

Effekten av hemoglobin och exogena ämnen

Effekten av potentiellt interfererande ämnen som introducerats av FFPE extraktionskitet (ett exogent ämne) eller från själva provet (hemoglobin) på analysprestanda mättes med jämförelse av ΔC_T mellan interferentspetsade och kontrollspetsade extrakt av varje mutant och jämförelse av de korrekta bestämningarna för DNA-prover av vildtyp.

De exogena ämnena i DNA-extraktionsprocessen som testades för var:

- Paraffinwax
- Xylen
- Etanol

- Buffer ATL
- Proteinase K
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2

Prover som skulle spetsas med exogena interferenter normaliserades först till C_T 30,00 och späddes därefter med vildtyp (även det normaliserat till C_T 30,00) för att ge förväntat ΔC_T vid en MAF som representerar 3x LoD. Prover spetsade med hemoglobin (endogen interferent) under extraktionsprocessen normaliserades inte till C_T 30,00 eller späddes till 3x LoD innan mutationsutvärdering, utan användes direkt efter extraktion. Det var för att undvika att förlora eventuell variabilitet som kunde ha introducerats av interferenten.

Studien krävde beredning av en testprovsuppsättning och en blankprovsuppsättning (Buffer ATE för exogena ämnen och vatten för hemoglobin). Testprovet inkluderade alla mutant- och vildtyp-prover som spetsats med en interferent. Blankprovsuppsättningen inkluderade mutant- och vildtyp-prover som spetsats med en lämplig kontrollsubstans. Prover testade med hemoglobin spetsades under extraktionsprocessen för att spegla det som skulle introduceras via FFPE-provet. Testkoncentrationen för hemoglobin och beräknad använd vävnadsvolym i extraktionsprocessen baserades på CLSI riktlinjer (CLSI EP7-A2, Appendix D, 2005, Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline). Den rekommenderade testkoncentrationen för hemoglobin som ges i EP07-A, Appendix D, 2005 är 2 mg/ml. Prover som testades med potentiellt exogena interferenter spikades efter normalisering till C_T 30,00 och spädnings till 3x LoD vid en koncentration som representerade den högsta (värsta fall) genomförbara nivån på carryover av interfererande substans till ett prov (10x koncentration). Totalt sex replikat av varje prov/interferent-kombination testades med en *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-lot. Alla mutationsbestämmelser i både mutant- och vildtyp-prover var som förväntade. I fall där en signifikant skillnad observerades mellan spetsade prover och kontrollprover, var detta inom acceptabla variationer inom laboratoriet för analysen och var

därför inom den normala variationen för analysen. Resultaten demonstrerade att de här ämnena inte interfererade med bestämningsresultaten för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Utbytarhet mellan loter: Vävnadsprover

therascreen PIK3CA RGQ PCR-systemet använder sig av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, för isolering av DNA och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit för amplifiering av DNA och detektion av *PIK3CA*-mutationsstatus. Reproducerbarhet mellan loter påvisades med hjälp av tre loter av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit och tre loter av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Den totala procentandelen korrekta bestämningar mellan loter för alla mutationspositiva och vildtypprover var 96,8 % (363/375).

Provhantering: Vävnadsprover

Reproducerbarheten för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit utvärderades med snitt tagna från 11 FFPE provblock; fyra *PIK3CA* mutant kliniska bröstcancerprover, sex *PIK3CA* mutant cellinjeprover och ett kliniskt bröstcancerprov av vildtyp. För varje prov utfördes extraktionerna tre gånger av två operatörer, på tre platser vilket gav totalt 18 datapunkter per prov. Vid varje plats utfördes testningen med en lot QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit och en lot *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-reagenser. Alla giltiga mutant- och vildtypresultat gav förväntade totala mutationsstatusresultat (korrekt bestämning = 100 %, 18/18 för varje prov). Över specifika *PIK3CA*-mutationsbestämningar var andelen korrekta bestämningar 97,92 % vilket stöder reproducerbarhet och repeterbarhet för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit för det föranalytiska steget DNA-isolering.

Repeterbarhet och reproducerbarhet: Vävnadsprover

Precision och reproducerbarhet för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit utvärderades genom testning av DNA extraherat från FFPE kliniska bröstcancerprover för *PIK3CA*-mutationerna E542K, E545G, E545K, H1047L, H1047R och Q546R och cellinje FFPE prover för *PIK3CA*-mutationerna C420R, E545A, E545D, H1047Y, Q546E och Q546R. Kliniska FFPE-bröstprover av vildtyp ingick också i studien (Tabell 11).

För att demonstrera repeterbarhet, testades prover vid två mutationsnivåer (LoD och 3x LoD) i duplikat med två körningar per dag, av tre operatörer över 20 icke-sammanhängande dagar, vilket gav 120 datapunkter på en plats (i Storbritannien) förutom för prover vid LoD med E545A och Q546R *PIK3CA*-mutationer. Prover med mutationerna E545A och Q546R vid LoD utvärderades under sex dagar vid en plats av tre operatörer, med två körningar och fyra replikat för totalt 144 mätningar för att demonstrera repeterbarhet. För reproducerbarhet utfördes två körningar per dag per operatör (tre operatörer per plats) av två ytterligare platser (båda i USA) under 10 dagar för att ge ytterligare 60 datapunkter för varje ytterligare plats, förutom för prover vid LoD med E545A och Q546R *PIK3CA*-mutationer. Prover vid LoD med E545A och Q546R *PIK3CA*-mutationer utvärderades under sex dagar vid två till platser av tre operatörer, med två körningar och fyra replikat för totalt 144 mätningar per plats, totalt 432 på tre platser. Vid varje plats testades proverna med två *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-loter (tre loter för tre platser). En till två loter av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit användes för att extrahera DNA från FFPE-prover. Proverna bereddades vid låga DNA-indatanivåer där ett C_T-kontrollvärde på ungefär 30 var målet.

Mutationspositiva prover kördes bara med kontrollreaktionsblandningen och relevant reaktionsblandning av mutationen av intresse. Vildtypprover kördes med alla reaktionsblandningar.

För varje prov, visas andelen korrekta bestämningar i Tabell 11 för repeterbarhet.

Tabell 11. Analysens repeterbarhet – andel korrekta bestämningar för *PIK3CA*-mutationer testade i DNA-prover erhållna från FFPE-vävnadsprover

Exon	Mutation	Mutationsnivå	Fraktionell andel giltiga resultat	Korrekta bestämningar, %	Nedre tvåsidigt 95% KI
NA	Vildtyp	NA	108/120	90,00	83,18
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	119/119	100,00	96,95
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545A	LoD*	144/144	100,00	97,47
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD	118/120	98,33	94,11
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	Q546R	LoD*	139/140	99,29	96,08
		3x LoD	119/119	100,00	96,95
20	H1047L	LoD	117/120	97,50	92,87
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	117/120	97,50	92,87
		3x LoD	120/120	100,00	96,97

NA: Ej tillämpligt.

* Prover vid LoD med E545A och Q546R *PIK3CA*-mutationer utvärderades under sex dagar vid en plats av tre operatörer, med två körningar och fyra replikat för totalt 144 mätningar.

Tabell 12. Analysens reproducerbarhet – andel korrekta bestämningar för *PIK3CA*-mutationer testade i DNA-prover erhållna från FFPE-vävnadsprover

Exon	Mutation	Mutationsnivå	Fractionell andel giltiga resultat	Korrekta bestämningar, %	Nedre tvåsidigt 95% KI
NA	Vildtyp	NA	222/240	92,50	88,41
7	C420R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
9	E542K	LoD	237/239	99,16	97,01
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD*	431/432	99,77	98,73
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	238/240	99,17	97,02
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545K	LoD	238/240	99,17	97,02
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546E	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546R	LoD*	421/424	99,29	97,95
		3x LoD	239/239	100,00	98,47
20	H1047L	LoD	230/240	95,83	92,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047Y	LoD	234/240	97,50	94,64
		3x LoD	240/240	100,00	98,47

NA: Ej tillämpligt.

* Prover vid LoD med E545A och Q546R *PIK3CA*-mutationer utvärderades under sex dagar vid tre platser av tre operatörer, med två körningar och fyra replikat för totalt 144 mätningar per plats, totalt 432.

En varianskomponentanalys användes för att uppskatta standardavvikelsen för variabilitet mellan kit, mellan körning, mellan operatör, mellan instrument, mellan dag och inom körningar för repeterbarhet och reproducerbarhet. För alla varianskomponenter var den totala

standardavvikelsen (Standard Deviation, SD) $\leq 1,32 \Delta C_T$ för LoD och $\leq 0,63 \Delta C_T$ för 3x LoD för alla *PIK3CA*-mutationer testade i reproducerbarhetstestningen. För alla mutantpanelmedlemmar var SD $\leq 0,17 \Delta C_T$ för LoD och $\leq 0,16 \Delta C_T$ för 3x LoD för mellan loter (utbytbarhet mellan loter). SD för variabilitet inom körning (repetierbarhet) var $\leq 1,24 \Delta C_T$ för LoD och $\leq 0,53 \Delta C_T$ för 3x LoD.

Korskontaminering/analytisk carryover: Vävnadsprover

Den här studiens syfte var att utvärdera *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit när höga *PIK3CA*-mutationspositiva prover testades bredvid *PIK3CA*-mutationsnegativa prover. Den här studien utvärderade sannolikheten för korskontaminering under hela testningsproceduren (DNA-extrahering och efterföljande testning med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit).

Den här studien utfördes med H1047R (mutationen med högst förekomst) och FFPE-cellinjeprover av vildtyp. Två oberoende uppsättningar prover kallade "Set A" (Uppsättning A) och "Set B" (Uppsättning B) extraherades efter en fördefinierad extraheringsmatris utformad för att introducera risk för korskontaminering mellan prover. Två operatörer utförde extraheringarna. Totalt 18 extraktioner (nio per uppsättning) utfördes för mutationspositiva (H1047R) prover. Totalt 42 extraktioner (21 per uppsättning) utfördes för vildtypprover. Extrakten utvärderades för mutation över tio PCR-körningar, fem per provuppsättning konfigurerades samtidigt av samma operatör med samma utrustning och Rotor-Gene Q-instrument där inga andra körningar konfigurerades på instrumentet mellan körningarna. Extrakt testades med kontrollanalysens reaktionsblandning (*therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit Tube 1) och mutationen av intresse (*therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit Tube 6).

Den observerade procentsatsen av korrekta mutationsbestämningar för giltiga vildtypprover var 100 % utan att uppvisa korskontaminering av vildtypproverna genom prover som delar samma DNA-extraherings- och konfigurationsprocedurer.

Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod (vävnadsprover)

För att demonstrera exaktheten för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit relativt en validerad NGS-analys, genomfördes en exakthetsstudie med FFPE-kliniska prover från bröstcancerpatienter randomiserade i SOLAR-1 studien och för vilken det fanns tillräckliga mängder tillgängliga prover för att testa med NGS-jämförelseanalysen. Av dessa 453 kliniska prover, uppfyllde 385 NGS-jämförelseprovskraven för vävnadsvolym och tumörinnehåll och 379 gav ett giltigt resultat för NGS.

Prover med giltiga resultat för både NGS och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit analyserades med NGS som referens för att utvärdera positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA), negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och total överensstämmelse i procent (Overall Percent Agreement, OPA). De här procentvärdena, tillsammans med de motsvarande tvåsidiga 95-procentiga konfidensintervallen (KI) som beräknades med Clopper-Pearson Exact-metoden, sammanfattas i Tabell 13.

Tabell 13. Analys av överensstämmelse för FFPE-vävnadsprover

Mätning	Överensstämmelse i procent (N)	Tvåsidigt 95 % KI
Positiv överensstämmelse i procent	99,0 (197/199)	96,4, 99,9
Negativ överensstämmelse i procent	90,0 (162/180)	84,7, 94,0
Total överensstämmelse i procent	94,7 (359/379)	92,0, 96,7

För de totalt 20 icke överensstämmande mutationsstatusresultaten, hade två prover med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit negativa resultat NGS-positiva resultat, medan 18 prover med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit positiva resultat hade NGS-negativa resultat. Av de två proverna med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-negativa resultat som hade NGS-positiva resultat, detekterades båda av NGS vid MAF-nivåer under LoD för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Av de 18 prover som fastställdes som positiva av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit

och negativa av NGS, var 11 låg positiva (inom en ΔC_t av cutoff med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit och var därför låg positiva prover). Ett fall detekterades som H1047L (3140A>T) av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit men detekterades som H1047I (3139_3140CA>AT) av NGS-analysen. Den underliggande orsaken för de sex återstående icke överensstämmande resultaten identifierades inte.

Tabell 14 visar PPA för målet med NGS som den ortogonala metoden.

Tabell 14. Analys av överensstämmelse för FFPE-vävnadsprover efter specifik mutation

Mutation*	Positiv överensstämmelse i procent (N)	Tvåsidigt 95 % KI
C420R	100,0 (4/4)	39,8, 100,0
E542K	100,0 (27/27)	87,2, 100,0
E545G	100,0 (3/3)	29,2, 100,0
E545K	100,0 (49/49)	92,7, 100,0
E545A	100,0 (2/2)	15,8, 100,0
Q546E	100,0 (1/1)	2,5, 100,0
Q546R	50,0 (1/2)	1,3, 98,7
H1047L	100,0 (12/12)	73,5, 100,0
H1047R	98,1 (101/103)	93,2, 99,8

* Alla 11 PIK3CA-mutationer detekterades i vävnadsprover i SOLAR-1-studien (Tabell 15).

Klinisk prestanda: Vävnadsprover

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit är avsett att användas som ett tillhörande diagnostiskt test för att hjälpa vårdgivare identifiera bröstcancerpatienter som kan lämpa sig för behandling med PIQRAY (alpelisib) baserat på förekomsten av en eller flera detekterade *PIK3CA*-mutationer i kliniska FFPE-brösttumörvävnadsprover.

Kliniska resultatdata

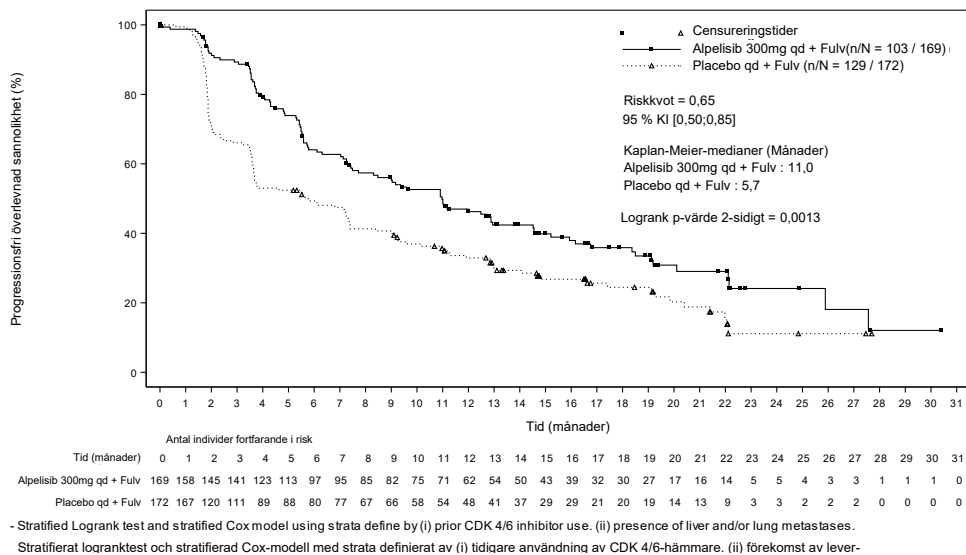
SOLAR-1 studien, CBYL719C2301, var en randomiserad dubbelblind, placebokontrollerad, internationell, multicenter fas III klinisk studie för att fastställa effektiviteten och säkerheten för behandling med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant kontra placebo plus fulvestrant i män och postmenopausala kvinnor med HR+, HER2-negativ avancerad bröstcancer som ökade under eller efter behandling med aromatashämmare. Totalt 572 bröstcancerpatienter rekryterades i två grupper med eller utan en *PIK3CA*-mutation. Patienterna randomiserades att ta emot antingen PIQRAY (alpelisib) 300 mg plus fulvestrant eller placebo plus fulvestrant i en 1:1 kvot. Randomiseringen stratifierades efter förekomst av lung- och/eller levermetastaser och tidigare behandling med CDK4/6-hämmare.

Studiens primära slutpunkt var progressionsfri överlevnad (Progression Free Survival, PFS) enligt RECIST v1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), baserat på utvärdering hos avancerade bröstcancerpatienter registrerade med en *PIK3CA*-mutation. Andra sekundära slutpunkter inkluderade PFS för patienter utan *PIK3CA*-mutation, samt övergripande överlevnad (Overall Survival, OS), övergripande respons (Overall Response Rate, ORR) och klinisk nytta (Clinical Benefit Rate, CBR) efter *PIK3CA*-grupp (dvs., med eller utan *PIK3CA*-mutation).

PIK3CA-mutationsstatus för screening och registrering av patienter bestämdes centralt av en klinisk undersökningsanalys (Clinical Trial Assay, CTA) eller QIAGEN *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, som testar FFPE bröstcancertumörprover.

Av de 572 randomiserade patienterna i SOLAR-1, randomiserades 177 patienter (30,9 % av studiepopulationen, inklusive 172 *PIK3CA*-mutationspositiva och fem *PIK3CA*-mutationsnegativa patienter) med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Alla andra patienter (395) randomiserades med CTA (69,1 % av studiepopulationen, inklusive 169 *PIK3CA*-mutationspositiva och 226 *PIK3CA*-mutationsnegativa patienter).

PIQRAY (alpelisib) i kombination med fulvestrant visade sig överlägsen jämfört med enbart fulvestrant för den primära slutpunkten PFS per utvärdering med RECIST 1.1 i *PIK3CA*-mutantgruppen. En uppskattad 35 % riskreduktion i sjukdomsförlopp eller dödsfall observerades för PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant armen, relativt placebo plus fulvestrant armen (Riskkvot [HR] = 0,65; 95 % KI: 0,50, 0,85; $p = 0,0013$, baserat på ett tvåsidig stratifierat logranktest). Median PFS förlängdes med kliniskt signifikanta 5,3 månader, från 5,7 månader i placebo plus fulvestrant armen till 11,0 månader i PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant armen (Figur 20).



Figur 20. Kaplan-Meier diagram av PFS efter behandling hos *PIK3CA*-mutantpatienter randomiserade i SOLAR-1.

Prover från de 395 patienter som randomiserades med CTA testades om retrospektivt av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit och gav 389 prover utvärderingsbara av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (98,5 %) med sex patientprover icke utvärderingsbara av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (Tabell 16).

Tabell 15. Förekomst av PIK3CA-mutationer detekterade av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i vävnadsprover i SOLAR-1 kliniska studien

Exon	Mutation*	COSMIC ID [†]	Basskifte	Frekvens i FFPE-vävnadsprover N = 374 (%)
7	C420R	757	1258 T>C	6 (1,6)
9	E542K	760	1624 G>A	66 (17,6)
	E545A	12458	1634 A>C	4 (1,1)
	E545D	765	1635 G>T	6 (1,6)
	E545G	764	1634 A>G	9 (2,4)
	E545K	763	1633 G>A	91 (24,3)
	Q546E	6147	1636 C>G	1 (0,3)
	Q546R	12459	1637 A>G	2 (0,5)
20	H1047L	776	3140 A>T	24 (6,4)
	H1047R	775	3140 A>G	160 (42,8)
	H1047Y	774	3139 C>T	5 (1,3)

* En PIK3CA-mutationspositiv patient kan ha mer än en mutation.

[†] COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = antal PIK3CA-mutationspositiva patienter identifierade efter FFPE-vävnadsprover i SOLAR-1.

Tabell 16. Disposition av retrospektivt omtestade (CTA-registrerade) patienter (fullständig analysuppsättning, CTA-registrerade)

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit-resultat	CTA-positiva (N = 169)	CTA-negativa (N = 226)	Totalt (N = 395)
Valid (Giltigt)	169 (100,0 %)	220 (97,3 %)	389 (98,5 %)
Positive (Positivt)	164 (97,0 %)	11 (4,9 %)	175 (44,3 %)
Negative (Negativt)	5 (3,0 %)	209 (92,5 %)	214 (54,2 %)
Invalid (Ogiltigt)	0 (0 %)	6 (2,7 %)	6 (1,5 %)

För att utvärdera överensstämmelse mellan CTA och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, beräknades överensstämmelseindexen PPA, NPA och OPA, tillsammans med respektive tvåsidigt Clopper-Pearson Exact 95 % konfidensintervall.

Tabell 17 visar *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit utvärderingsbar delmängd med CTA som referens och indikerar en hög överensstämmelse mellan CTA och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultat.

Tabell 18 använder *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit som referens och indikerar en hög överensstämmelse mellan CTA och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultat.

Tabell 17. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit kontra CTA (med CTA som referens)

Mått på överensstämmelse	Procentuell överensstämmelse, %	Tvåsidigt 95 % KI
Positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA)	97,0	93,2, 99,0
Negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA)	95,0	91,2, 97,5
Total överensstämmelse i procent (Overall Percent Agreement, OPA)	95,9	93,4, 97,6

Tabell 18. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit kontra CTA (med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit som referens)

Mått på överensstämmelse	Procentuell överensstämmelse, %	Tvåsidigt 95 % KI
Positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA)	93,7	89,0, 96,8
Negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA)	97,7	94,6, 99,2
Total överensstämmelse i procent (Overall Percent Agreement, OPA)	95,9	93,4, 97,6

Tabell 19 visar uppskattningar för PPA, NPA och OPA omberäknade för att justera för berikning på grund av de sex saknade *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultaten i CTA-mutationsnegativa patienter.

Tabell 19. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit kontra CTA (med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit som referens)

Mått på överensstämmelse	Procentuell överensstämmelse, %	Tvåsidigt 95 % KI
Positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA)	93,6	90,1, 97,0
Negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA)	97,7	95,6, 99,5
Total överensstämmelse i procent (Overall Percent Agreement, OPA)	95,9	93,8, 97,8

Den primära PFS-analysen för klinisk nytta av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit uppvisade liknande klinisk effektivitet som den som fastställts i SOLAR-1 studien. Analys av den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.-mutantpositiva patientdelmängden (347 patienter) demonstrerade att patienter som randomiserats till PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant armen hade en uppskattat 36 % lägre risk för sjukdomsprogression eller dödsfall (HR = 0,64; 95 % KI: 0,48, 0,85) än patienter som randomiserats till placebo plus fulvestrant armen.

Sensitivitetsanalyser utvärderade effekten av saknade *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-data på PFS och demonstrerade att resultaten var robusta för saknade data. Vid antagande att de sex saknade *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultaten var icke överensstämmande med CTA-resultaten, hade de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-mutationspositiva patienter som randomiserats till PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant armen en uppskattat 37 % lägre risk för sjukdomsprogression eller dödsfall (HR = 0,63; 95 % KI [0,47, 0,84]) jämfört med patienter som randomiserats till placebo plus fulvestrant armen.

Alla CTA-registrerade mutationspositiva patienter var *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-utvärderingsbara och bara sex CTA-registrerade mutationsnegativa patienter var inte *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-utvärderingsbara. Följaktligen förelåg ingen bias i resultaten genom studieprovutvärderingsbarhet.

PFS beräknades också för den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-negativa populationen och ingen PFS-fördel observerades i de patienterna (HR = 0,85; 95 % KI: 0,58, 1,25).

Prestandaegenskaper: Plasmaprover

Analytisk prestanda: Plasmaprover

De specifika prestandaegenskaperna för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit bestämdes i studier med kliniska plasmaprover som samlats in från bröstcancerpatienter, sammanställda plasmaprover från friska donatorer (HD) plasma spetsat med fragmenterat cellinje-DNA från 11 humana cellinjepröver som bär på kända *PIK3CA*-mutationer som detekteras av analysen, plus ett *PIK3CA*-vildtypprov (dvs. inga mutationer som *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit hävdar kunna detektera i exon 7, 9 och 20).

Blankgräns (Limit of Blank, LoB): Plasmaprover

Blankgräns (Limit of blank, LoB) definieras i CLSI riktlinje EP17-A2 som "det högsta mätresultatet som är sannolikt att observeras (med en angiven sannolikhet) för ett blankprov". För *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit är det här den datapunkt som motsvarar den övre 95:e percentilen i blanka prover. För att utvärdera prestanda för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i frånvaro av mall och för att tillse att ett prov med vildtyp-DNA inte skapar en analytisk signal som kan indikera en låg koncentration av mutation, testades totalt 60 unika HD-prover spetsade med seriellt spädd, fragmenterad vildtyp PIK3CA DNA vid sex inmatningsnivåer tre gånger i en studie enligt vägledning från CLSI riktlinje EP17-A2 för att bestämma LoB för varje mutationsanalys. Alla mutationsanalyser gav LoB-värden över cutoff för sina respektive mutationer. LoB för *PIK3CA*-mutanterna detekterade av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit från plasmaprover visas nedan (Tabell 20).

Tabell 20. Sammanfattning av LoB-resultat

Exon	Mutation	Basskifte	LoB (ΔC_T -värde)	Falsa positiva bestämningar (%)
7	C420R	1258T>C	11,15	0 %
9	E542K	1624G>A	8,32	0 %
	E545A	1634A>C	15,82	0 %
	E545D	1635G>T	9,13	0 %
	E545G	1634A>G	13,39	0 %
	E545K	1633G>A	15,74	0 %
	Q546E	1636C>G	15,82	0 %
	Q546R	1637A>G	10,19	0,56 %
	H1047L	3140A>T	15,55	0,56 %
20	H1047R	3140A>G	11,93	0 %
	H1047Y	3139C>T	9,89	0 %

Detektionsgräns (Limit of detection, LoD): Plasmaprover

En studie utfördes för att fastställa LoD (Limit of Detection) för var och en av de 11 *PIK3CA*-mutationerna med sammanställda plasmaprover. LoD definierades som den lägsta mängden mutant-DNA i en bakgrund med vildtyps-DNA då ett mutantprov ger mutationspositiva resultat för 95 % av testresultaten (C_{95}).

För att fastställa LoD för varje mutation, bereddes prover med olika procentsatser mutation vid lågt DNA-indata och testades med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit (Tabell 21). LoD för varje analys beräknades med en probit-metod. LoD för 11 sammanställda mutantprover bestämdes med tre olika *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-loter med 24 replikat testade per kit lot per nivå. En delmängd av mutationerna verifierades med kliniska plasmaprover vid bestämd LoD.

Tabell 21. LoD för plasmaprover bestämdes med låg DNA-indata kliniska och sammanställda plasmaprover

Exon	Mutation	COSMIC* ID	Basskifte	LoD, % MAF
7	C420R	757	1258T>C	4,46 [†]
9	E542K	760	1624G>A	5,06 ^{††}
	E545A	12458	1634A>C	1,82 [†]
	E545D	765	1635G>T	3,21 [†]
	E545G	764	1634A>G	1,94 ^{††}
	E545K	763	1633G>A	2,42 ^{††}
	Q546E	6147	1636C>G	5,31 [†]
	Q546R	12459	1637A>G	4,22 [†]
	20	H1047L	776	3140A>T
H1047R		775	3140A>G	1,98 ^{††}
H1047Y		774	3139C>T	7,07 [†]

MAF: Mutantallelfrekvens.

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

[†] LoD-värden bestämdes med cellinjeprover.

^{††} LoD-värden verifierades med kliniska plasmaprover.

Indataintervall för genomiskt DNA: Plasmaprover

Arbetsintervallet för kontroll- C_T angavs med beräknade toleransintervall och LoB-värden. C_T arbetsintervallet för kontrollanalysen bestämdes med totalt 30 individuella 10 ml vildtypsprov med olika DNA-koncentrationer av vildtyp (120 observationer). Det slutliga C_T arbetsintervallet för kontrollanalysen angavs som ett C_T -värde på 24,69 till 31,68 vilket ger ett konfidensintervall på 98 % för 95 % av populationen för avsedd användning.

ΔC_T -cutoffvärden: Plasmaprover

Sammanställda plasmaprover användes för att bestämma cutoffvärdena för varje mutation. Utöver statistisk analys av ΔC_T -värden, användes LoB-värden och designkrav för falska positiva och falska negativa frekvenser för att definiera godtagbara cutoffvärden.

Fastställda cutoffvärden presenteras i Tabell 22.

Tabell 22. Fastställda cutoffvärden för varje mutationsanalys vid testning av DNA från plasmaprover

Analys	Cutoffvärde (ΔC_T)
C420R	$\leq 6,0$
E542K	$\leq 4,8$
E545A	$\leq 10,0$
E545D	$\leq 7,0$
E545G	$\leq 9,5$
E545K	$\leq 10,0$
Q546E	$\leq 10,0$
Q546R	$\leq 7,0$
H1047L	$\leq 10,0$
H1047R	$\leq 9,0$
H1047Y	$\leq 6,2$

Effekt av DNA-input på ΔC_T -värden (linjäritet): Plasmaprover

DNA-inputnivån definieras som den totala mängden amplifierbart DNA i ett prov som det bestämts av C_T -värden från *PIK3CA*-kontrollreaktionen. För att demonstrera att prestandan för *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit är konsekvent över kontrollreaktionens C_T -intervall (24,69 till 31,68), bereddes en 8-nivås seriell spädning för var och en av de 11 *PIK3CA*-mutationsanalyserna (fragmenterad DNA extraherad från cellinjeprover). C_T -målvärdena för spädningsnivåerna 1 och 8 för varje mutation var inriktade att vara över och under kontrollreaktionens C_T -intervall. Generellt sett var ΔC_T -värdena vid olika totala DNA-inputnivåer konsekventa över hela arbetsintervallet för *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit för mutationer.

Analysspecificitet (korsreaktivitet/specificitet): Plasmaprover

För att utvärdera om korsreaktivitet mellan mutationer detekterade av analysen har tagits med i beräkningen korrekt vid beräkning av analytiska cutoffvärden, spädades mutantpositiva sammanställda plasmaprover med hög och låg DNA-indata till höga och låg MAF-mål och testades i duplikat med tre loter av *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Korsreaktivitet observerades mellan analyserna H1047L och H1047R. Den här korsreaktiviteten fastställdes dock vara enkelriktad (dvs. om ett dubbelt H1047R- och H1047L-prov observeras, kommer det bara att rapporteras som "H1047R Mutation Detected" [H1047R-mutation detekterad]). Den här regeln är inkorporerad i den automatiska "*therascreen*_*PIK3CA*_Plasma Assay Profile"-algoritmen.

Interferens: Plasmaprover

Endogena substanser

Potentiellt endogena interfererande ämnen som kan vara närvarande i plasmaproverna testades i sammanställda mutant- och vildtypprover vid koncentrationer baserade på CLSI riktlinjen EP7-A2:

- Hemoglobin (2 g/l)
- Triglycerider (37 mmol/l)
- EDTA (3,4 µmol/l)
- Koffein (308 µmol/l)
- Albumin (30 mg/ml)
- Konjugerat bilirubin (342 µmol/l)
- Okonjugerat bilirubin (342 µmol/l)

Resultaten demonstrerade att de här ämnena inte interfererade med resultaten för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Exogena ämnen

Potentiella exogena interfererande ämnen som förekommer i DNA-extraktionsprocessen testades i mutant- och vildtypprover vid koncentrationer som förutsätter 10 % carryover från extraktionsprocessen:

- Etanol
- Proteinas K
- Buffer ACL
- Buffer ACB
- Buffer ACW1
- Buffer ACW2

Resultaten demonstrerade att de här ämnena inte interfererade med resultaten för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Utbytarhet mellan loter: Plasmaprover

therascreen PIK3CA RGQ PCR-systemet använder sig av QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit för extraktion av DNA och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit för amplifiering av DNA och detektion av *PIK3CA*-mutationsstatus. Reproducerbarhet och utbytarhet mellan loter påvisades med hjälp av tre loter av QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit och en lot av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Den totala procentandelen korrekta bestämningar mellan loter för alla mutationspositiva och vildtypprover var 100 %.

Provhantering: Plasmaprover

För att demonstrera att olika laboratorier kommer att producera godkända resultat när de startar från samma plasmaprover så utfördes extraheringar för tre olika platser. Sammanställda prover användes för alla 11 mutationer samt ett *PIK3CA* kliniskt plasmaprover av vildtyp. 18 x 2 ml alikvoter för varje prov bereddes. Alikvoterna randomiserades och delades upp i 18 extraktionsuppsättningar. Extraktionsuppsättningarna distribuerades därefter mellan de tre testplatserna (en intern QIAGEN-plats) i Storbritannien och två ytterligare externa platser i USA), sex extraktioner per studieplats. Testning av DNA extraherat från provalikvoterna med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit utfördes på den interna QIAGEN-platsen. Vid jämförelse av resultat från varje prov över alla tre platser, var procentsatsen korrekta mutationsbestämningar för *PIK3CA*-mutationspositiva och vildtypprover 100 %.

Repeterbarhet och reproducerbarhet: Plasmaprover

Sekretessinställningar för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit utvärderades genom att testa DNA extraherat från cellinjepröver som representerade alla 11 mutationer som detekteras av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit vid 1x LoD och 3x LoD.

Sekretessinställningar utvärderades genom att testa dessa prover vid en plats över 20 ej sammanhängande dagar med tre Rotor-Gene Q-instrument och av tre operatörer för att generera totalt 120 replikat per prov (Tabell 23).

Tabell 23. Analysens repeterbarhet – andel korrekta bestämningar för *PIK3CA*-mutationer testade i DNA-prover erhållna från plasmaprover

Exon	Mutation	Mutationsnivå	Fraktionell andel giltiga resultat	Korrekta bestämningar, %	Nedre tvåsidigt 95 % KI
NA	Vildtyp	C _r 30	114/120	95,00	89,43
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
	E542A	LoD	119/120	99,17	95,44
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	119/120	99,17	95,44
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD*	111/120	92,50	86,24
		3x LoD*	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	115/120	95,83	90,54	
	3x LoD*	120/120	100,00	96,97	
20	H1047L	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	110/120	91,67	85,21
		3x LOD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	120/120	100,00	96,97
		3x LOD	120/120	100,00	96,97

* För E545K och H1047R var använda LoD 1,99 respektive 1,44. LoD omjusterades och bekräftades i en efterföljande studie. Det omjusterade LoD användes i den efterföljande studien (Tabell 24).

Reproducerbarheten mättes genom att testa sammanställda prover vid 1x LoD och 3x LoD över tre olika platser (en intern QIAGEN-plats i Storbritannien och två ytterligare externa platser i USA). Alla dessa prover testades vid varje plats över 10 ej sammanhängande dagar med tre Rotor-Gene Q-instrument och av tre operatörer för att generera totalt 60 replikat per prov (Tabell 24).

Tabell 24. Analysens reproducerbarhet – andel korrekta bestämningar för *PIK3CA*-mutationer testade i DNA-prover erhållna från plasmaprover för alla testplatser

Exon	Mutation	Mutationsnivå	Fraktionell andel giltiga resultat	Korrekta bestämningar, %	Nedre tvåsidigt 95 % KI
NA	VT	C:30	223/238	93,70	89,82
7	C420R	LoD	237/238	99,58	97,68
		3x LoD	238/238	100,00	98,46
9	E542K	LoD	237/240	98,75	96,39
		3x LOD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD	239/240	99,58	97,70
		3x LOD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	240/240	100,00	98,47
		3x LOD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	237/240	98,75	96,39
		3x LOD	239/239	100,00	98,47
	E545K	LoD*	432/432	100,00	99,15
		3x LOD	240/240	100,00	89,47
Q546E	LoD	238/238	100,00	98,46	
	3x LOD	238/238	100,00	98,46	
Q546R	LoD*	232/240	96,67	93,54	
	3x LOD	240/240	100,00	98,47	
20	H1047L	LoD	236/238	99,16	97,00
		3x LOD	238/238	100,00	98,46
	H1047R	LoD	430/432	99,54	98,34
		3x LOD	236/236	100,00	98,45
	H1047Y	LoD	239/240	99,58	97,70
		3x LOD	240/240	100,00	98,47

* Prover vid reviderad LoD med E545K och H1047R (enligt Tabell 21) utvärderades i sex dagar på tre platser av tre operatörer, med två körningar och fyra replikat för totalt 144 mätningar per plats, totalt 432 för alla tre platser. Tabell 25 visar positiv överensstämmelse i procent (Positive Percentage Agreement, PPA) för målet med NGS som den ortogonala metoden.

En varianskomponentanalys användes för att uppskatta standardavvikelsen för variabilitet mellan kit, mellan körning, mellan operatör, mellan instrument, mellan dag och inom körningar för repeterbarhet och reproducerbarhet. För alla varianskomponenter var den totala standardavvikelsen (Standard deviation, SD) $\leq 1,34 \Delta C_T$ för LoD och $\leq 0,73 \Delta C_T$ för 3x LoD för alla *PIK3CA*-mutationer testade i reproducerbarhetstestningen. För alla mutantpanelmedlemmar var SD $\leq 0,20 \Delta C_T$ för LoD och $\leq 0,10 \Delta C_T$ för 3x LoD för mellan loter (utbytbarhet mellan loter). SD för variabilitet inom körning (repeterbarhet/precision) var från 0,415 ΔC_T till 1,407 ΔC_T för LoD och 0,206 ΔC_T till 0,583 ΔC_T för 3x LoD.

Validering av blodprovtagningsrör

Inverkan av blod till sekretessinställningar på kvalitetsmässigt och efterföljande resultat fastställdes med sammanställda blodprover för H1047R (den vanligaste mutationen) och helblodprover från hälsosamma frivilliga användes som vildtypprover. Blodprover samlades in i 10 ml K₂EDTA-rör från fyra donatorer (åtta rör per donator). Sammanställda blodprover genererades genom att spetsa *PIK3CA* H1047R-mutant fragmenterat cellinjé-DNA i blodprovtagningsrör från två donatorer efter provtagning. Blodprover separerades i plasma vid ungefär 1-, 2-, 3- och 4-timmars intervallen. DNA extraherades från plasmaproverna med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit och varje mål testades med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit i 16 replikat.

Alla testade prover bestämdes korrekt vid var och en av tidpunkterna. Dessutom fanns det ingen statistiskt signifikant förskjutning i ΔC_T observerat för *PIK3CA* H1047R-mutant provet.

Studien demonstrerade att det inte finns någon effekt av sekretessinställningar för blod till plasma om det bearbetas inom fyra timmar på *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit.

Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod (plasmaprover)

För att demonstrera exaktheten hos *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, genomfördes en studie med prover från SOLAR-1 kliniska studien relativt en validerad NGS-analys. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit- och NGS-testning för *PIK3CA*-ändringar utfördes med DNA från 552 kliniska plasmaprover från den kliniska studien SOLAR-1.

DNA-prover med giltiga resultat för både NGS- och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (542/552 prover) analyserades för att bedöma den positiva överensstämmelsen i procent (Positive Percent Agreement, PPA), den negativa överensstämmelsen i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och den totala överensstämmelsen i procent (Overall Percent Agreement, OPA). De här procentvärdena, tillsammans med de motsvarande tvåsidiga 95-procentiga konfidensintervallen (KI), sammanfattas i Tabell 25.

Tabell 25. Analys av överensstämmelse för DNA-prover erhållna från plasmaprover

Mätning	Överensstämmelse i procent (N)	Lägre 95 % KI
Positiv överensstämmelse i procent	97,39 (149/153)	93,44
Negativ överensstämmelse i procent	91,26 (355/389)	88,00
Total överensstämmelse i procent	92,99 (504/542)	90,50

För de 38 avvikande resultaten för total överensstämmelse i procent:

- Fyra prover (0,7 %) var Wild-Type (Vildtyp) (dvs. No Mutation Detected [Ingen mutation detekterad]) med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit men Mutation Detected (Mutation detekterad) med NGS.
- 34 prover (6,3 %) var Mutation Detected (Mutation detekterad) med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit men Wild-Type (Vildtyp) med NGS.
- Tabell 26 visar PPA för målet med NGS som den ortogonala metoden.

Tabell 26. Analys av överensstämmelse för DNA-prover erhållna från plasmaprover genom mutation

Mutation*	Positiv överensstämmelse i procent (N)	Tvåsidigt 95 % KI
C420R	100,0 % (2/2)	15,8, 100,0
E542K	90,9 % (20/22)	70,8, 98,9
E545G	100,0 % (2/2)	15,8, 100,0
E545K	100,0 % (38/38)	90,7, 100,0
H1047L	100,0 % (5/5)	47,8, 100,0
H1047R	97,6 % (83/85)	91,8, 99,7

* 6/11 *PIK3CA*-mutationer detekterades ur plasmaprover i SOLAR-1-studien (Tabell 31).

Klinisk prestanda: Plasmaprover

therascreen *PIK3CA* RGQ PCR Kit är avsett att användas som ett tillhörande diagnostiskt test för att hjälpa vårdgivare identifiera bröstcancerpatienter som kan lämpa sig för behandling med PIQRAY (alpelisib) baserat på förekomsten av en eller flera detekterade *PIK3CA*-mutationer i kliniska plasmaprover med K₂EDTA antikoagulerat perifert venöst helblod.

Kliniska plasmaprover med K₂EDTA antikoagulerat perifert venöst helblod insamlat från bröstcancerpatienter randomiserade i SOLAR-1 innan start av studiebehandling (baslinje) testades retrospektivt med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit för att utvärdera klinisk nytta av den här provtypen för bestämning av *PIK3CA*-mutationsstatus och för att utvärdera överensstämmelse mellan vävnads- och plasma resultat.

Resultat från överensstämmelseanalys

Överensstämmelse för *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit med plasma resultat till *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit med vävnadsresultat visas i Tabell 27. Av de 328 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-vävnadspositiva patienterna var 179 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-plasmapositiva. Av de 215 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-vävnadsnegativa patienterna var 209 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-plasmanegativa. Det förekom inga ogiltiga plasma resultat.

Tabell 27. Motsvarandetablell mellan *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadsresultat och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasma resultat

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit-plasma	<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnad			
	Positivt	Negativt	Ogiltigt	Totalt
Positivt	179	6	1	186
Negativt	149	209	5	363
Ogiltigt	0	0	0	0
Totalt	328	215	6	549

Överensstämmelse (PPA, NPA och OPA) mellan *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasma resultat och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadsresultat beräknades med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadsresultaten som referens (Tabell 28). Punktuppskattningarna för PPA, NPA och OPA var 55 %, 97 % respektive 72 %.

Tabell 28. Överensstämmelse mellan *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmareultat och *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadsresultat med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadsresultaten som referens

Mått på överensstämmelse	Överensstämmelse i procent (N)	95 % KI*
Positiv överensstämmelse i procent	55 % (179/328)	(49,0, 60,1)
Negativ överensstämmelse i procent	97 % (209/215)	(94,0, 99,0)
Total överensstämmelse i procent	72 % (388/543)	(67,5, 75,2)

* 95 % KI beräknat med Clopper-Pearson Exact-metoden.

Bekräftande testning av plasmaprover med validerad NGS-referenstestmetod bekräftade 91 % av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmareultat. Av de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadspositiva patienter som var *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmanegativa, bekräftade NGS de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmanegativa resultaten i 80 % av fallen. Av de sex avvikande *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositiva, *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadsnegativa patienterna var fem bekräftat plasmapositiva med NGS.

Progressionsfri överlevnad (Progression Free Survival, PFS) analys

PFS för PIQRAY (alpelisib) i kombination med fulvestrant för den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositiva populationen (N = 185) observerades till fördel för PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant-armen jämfört med placebo plus fulvestrant-armen med en beräknad 46 % riskreduktion för sjukdomsprogression eller dödsfall (HR = 0,54, 95 % KI: 0,33, 0,88) (Tabell 29). Som jämförelse var PFS HR i den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadspositiva populationen 0,64 (95 % KI: 0,48, 0,85) och 0,65 (95 % KI: 0,50, 0,85) i SOLAR-1 PIK3CA-mutantgrupperna som det bestämts av vävnadsanalysen vid registrering.

Tabell 29. PFS-analys för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositiva patienter

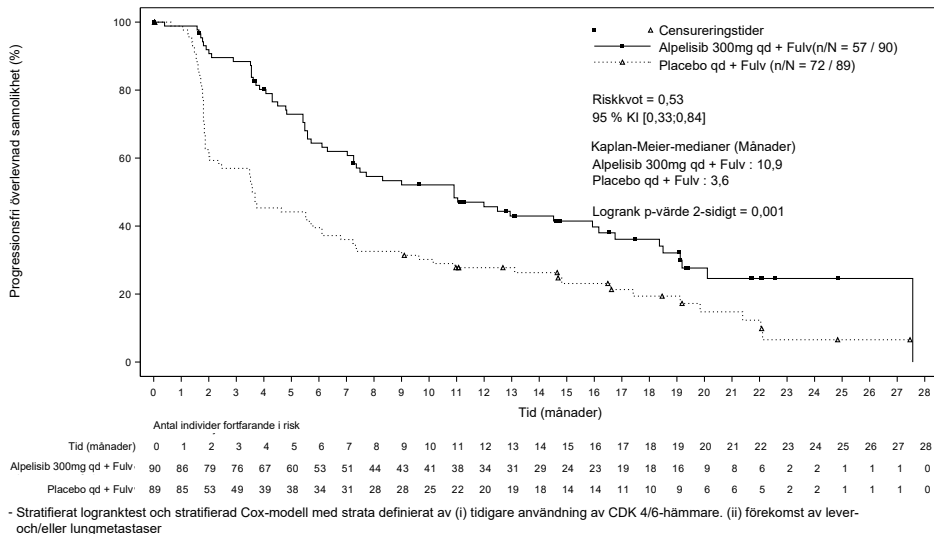
PFS (N)	HR (95 % KI)
	PIQRAY 300 mg qd + fulv/placebo qd + fulv*
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositiva (185)	0,54 (0,33; 0,88)

* HR och 95 % KI beräknat med berikningsjustering.

PFS HR för de 179 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadspositiva *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositiva patienterna var 0,53 (95 % KI: 0,33, 0,84). Median PFS var 10,9 månader för PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant-armen kontra 3,6 månader för placebo plus fulvestrant-armen (Tabell 30, Figur 21).

Tabell 30. Progressionsfri överlevnad (månader) för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadspositiva, *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositiva patienter

Progressionsfri överlevnad	PIQRAY 300 mg qd + fulv N=90	Placebo qd + fulv N=89	HR (95 % KI)
			PIQRAY 300 mg qd + fulv/placebo qd + fulv
Antal händelser (%)	57 (63,3)	72 (80,9)	0,53 (0,33; 0,84)
PD (%)	55 (61,1)	67 (75,3)	–
Dödsfall (%)	2 (2,2)	5 (5,6)	–
Antal censurerade (%)	33 (36,7)	17 (19,1)	–
Median (95 % KI)	10,9 (7,0; 16,2)	3,6 (2,0; 5,8)	–



Figur 21. Kaplan-Meier-diagram av PFS efter behandling för *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vävnadspositiva *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositiva patienter.

Tabell 31. Förekomst av *PIK3CA*-mutationer detekterade av *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* i plasmaprover i den kliniska studien SOLAR-1

Exon	Mutation*	COSMIC ID [†]	Basskifte	Frekvens i plasmaprover N = 186 (%)
7	C420R	757	1258 T>C	2 (1,1)
9	E542K	760	1624 G>A	22 (11,8)
	E545A	12458	1634 A>C	0 (0,0)
	E545D	765	1635 G>T	0 (0,0)
	E545G	764	1634 A>G	3 (1,6)
	E545K	763	1633 G>A	48 (25,8)
	Q546E	6147	1636 C>G	0 (0,0)
	Q546R	12459	1637 A>G	0 (0,0)
20	H1047L	776	3140 A>T	10 (5,4)
	H1047R	775	3140 A>G	102 (54,8)
	H1047Y	774	3139 C>T	0 (0,0)

* En *PIK3CA*-mutationspositiv patient kan ha mer än en mutation.

[†] COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

N = antal *PIK3CA*-mutationspositiva patienter identifierade efter plasmaprov i SOLAR-1.

Slutsatser om säkerhet och effektivitet

Den kliniska exakthetsstudien uppfyllde acceptanskriterierna för PPA för mutationspositiva prover och NPA för mutationsnegativa prover, vilket därmed bekräftar att plasma *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit genererade korrekta resultat både för biomarkörpositiva och -negativa avsedd användning-prover.

Överensstämmelse för plasma *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit- resultat med vävnads *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultat för NPA var 97 % och uppvisade en låg risk för falska positiva. Ett falskt negativt resultat kan förhindra en patient från att få tillgång till potentiellt lämpliga läkemedel. Det fanns 55 % PPA för plasma/vävnad som indikerar att plasmanegativa patienter kan vara *PIK3CA*-mutationspositiva efter vävnad. När patienters plasma uppvisar *PIK3CA*-mutationsnegativa resultat med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, bör därmed ett vävnadsprov testas för att bekräfta *PIK3CA*-mutationsstatus.

Den kliniska effektiviteten av PIQRAY (alpelisib) i kombination med fulvestrant för den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasma *PIK3CA*-mutationspositiva populationen som identifierad av *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, demonstrerades med en beräknad 46 % riskreduktion i sjukdomsförlopp eller dödsfall jämfört med placebo plus fulvestrant (HR = 0,54, 95 % KI: 0,33, 0,88).

Felsökningsguide

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

Kommentarer och förslag på åtgärd

Flaggan "No C_T value" (Inget C_T-värde) i positiv kontroll (Positive control, PC)

- | | |
|--|---|
| a) Felaktig konfiguration av PCR | Kontrollera ditt pipetteringsschema och upprepa PCR. |
| b) Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaring och hantering av reagenser" sida 22 | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs. |

Flaggan "Unexpected C_T value" (Oväntat C_T-värde) i NTC

- | | |
|---|--|
| Kontaminering har uppstått vid beredning av PCR | Se till att området har dekontaminerats. Upprepa PCR med nya reagenser. Om det är möjligt, förslut PCR-rören direkt efter att det prov som ska testas har tillsatts. Försäkra dig om att arbetsplatser och apparater dekontamineras regelbundet. |
|---|--|

Flaggan "Above acceptable range" (Över godtagbart intervall) eller "Below acceptable range" (Under godtagbart intervall) i PC

- | | |
|--------------------------|---|
| Fel vid beredning av PCR | Upprepa PCR och tillse korrekt pipettering. |
|--------------------------|---|

Flaggan "DNA input too high" (DNA-indata för högt) i provröret

- | | |
|----------------------------|--|
| Provet är för koncentrerat | Späd provet för att öka C _T -värdet. Prover ska spädas med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]). |
|----------------------------|--|

Kommentarer och förslag på åtgärd

Flaggan "Above acceptable range" (Över godtagbart intervall) i provröret

Otillräcklig inledande DNA-mall i provet

Vävnadsprover: Testa om en gång till. Om systemet visar samma flagga en andra gång, extrahera om DNA:t med två objektglas från samma prov med resekerad vävnad och ett lämpligt antal objektglas för att CNB:er ska kunna erhålla 20 mm² och upprepa PCR. Om systemet visar samma flagga för provet efter omextrahering, testa om provet en andra gång. Om flaggan visas igen lämpar sig provet inte för användning. Det ska föras in som "indeterminate" (obestämt) och inte testas vidare.

Plasmaprover: Testa om en gång till. Om systemet visar samma flagga en andra gång, extrahera om DNA med 2 ml patientplasma. Om systemet efter omextraktionen visar samma flagga för provet, lämpar sig provet inte för användning. Det ska föras in som "indeterminate" (obestämt) och inte testas vidare. Överväg att upprepa testning med ett färskt prov blodplasma.

Flaggan "IC above acceptable range" (IC över godtagbart intervall) i provröret

Fel vid beredning av PCR eller förekomst av hämmare i reaktionen

Vävnadsprover: Testa om en gång till. Om systemet visar samma flagga en andra gång, extrahera om DNA med två objektglas från samma prov med resekerad vävnad eller lämpligt antal objektglas för att CNB:erna ska kunna erhålla 20 mm² och upprepa PCR. Om systemet visar samma flagga för provet efter omextrahering, testa om provet en andra gång. Om flaggan visas igen lämpar sig provet inte för användning. Det ska rapporteras som "indeterminate" (obestämt) och inte testas vidare.

Plasmaprover: Testa om en gång till. Om systemet visar samma flagga en andra gång, extrahera om DNA med 2 ml patientplasma. Om systemet visar samma flagga efter omextraktion så lämpar sig inte provet för användning, det måste föras in som obestämt och ingen ytterligare testning kan utföras. Överväg att upprepa testning med ett färskt prov blodplasma.

Flaggan "No C_t value" (Inget C_t-värde) i T1-kontroll (prov)

Ingen amplifierbar DNA-mall i provet

Vävnadsprover: Testa om en gång till. Om systemet visar samma flagga en andra gång, extrahera om DNA med två objektglas från samma prov med resekerad vävnad eller lämpligt antal objektglas för att CNB:erna ska kunna erhålla 20 mm² och upprepa PCR. Om systemet visar samma flagga för provet efter omextrahering, testa om provet en andra gång. Om flaggan visas igen lämpar sig provet inte för användning. Det ska föras in som "indeterminate" (obestämt) och inte testas vidare.

Plasmaprover: Testa om en gång till. Om systemet visar samma flagga en andra gång, extrahera om DNA med 2 ml patientplasma. Om systemet visar samma flagga efter omextraktion så lämpar sig inte provet för användning, det måste föras in som obestämt och ingen ytterligare testning kan utföras. Överväg att upprepa testning med ett färskt prov blodplasma.

Referenser














1. Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., et al. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 615.
2. Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., et al. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 304, 554.
3. Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 490, 61.
4. National Breast Cancer Foundation (2018). Breast cancer facts. Available at: www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts. Accessed: 14 January 2019.
5. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* 68, 7.
6. Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., et al. (2018). European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 29, 1016.

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 supportavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Märkning för europeiskt godkännande
	Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> reaktioner
	Använd senast
	in vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
	Skyddas mot ljus
	GS-artikelnummer
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen (handboken) och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning

Symbol

Symbolförklaring



Tillverkare



Läs bruksanvisningen innan användning



Försiktighet

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr.
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: 6 reaktionsblandningar, positiv kontroll, <i>Taq</i> DNA-polymeras, vatten för NTC och vatten för spädning av prov	873111
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-preparat: QIAamp MinElute®-kolumner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit		
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (50)	För 50 DNA-preparat: QIAamp MinElute-kolumner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	61504
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykler och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår	9002033

PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1 000 tunnväggiga rör för 1 000 reaktioner 20–50 µl	981005
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanalspipett i 96 x 0,2 ml PCR-rör	9018905
72-Well Rotor	För att hålla Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, med reaktionsvolymerna på 10–50 µl; Kräver en Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	För låsning av Strip Tubes and Caps, 0.1 ml i 72-Well Rotor	9018904
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	För ctDNA-rening	19413
QIAvac Connecting System	För ctDNA-rening	19419
Vacuum Pump	För ctDNA-rening; eller motsvarande pump kapabel att skapa ett vakuum på –800 till –900 mbar	84010

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i handboken eller bruksanvisningen för respektive QIAGEN-kit. Handböcker och bruksanvisningar för QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS teknisk support eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

Datum	Ändringar
R1, juni 2019	Ursprunglig utgåva
R2, september 2019	Korrigerig i frekvenskolumnen i Tabell 15; typografiska fel åtgärdade; uppdateringar av layout

Sidan har avsiktligt lämnats tom

Sidan har avsiktligt lämnats tom

Avtal om begränsad licens för *therascreen* PIK3CA 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 panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel 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 denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Panelen 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, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otilåtna situationer beskrivna 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.

Notis till köparen: Köp av den här produkten ger köparen en begränsad, ej överförbar rätt att använda enbart den här delen av produkten för att utföra den patenterade peptid-nukleinsyraprocessen (Peptide nucleic acid, PNA) enbart för de köpta aktiviteterna som det står angivet i den medföljande QIAGEN handboken eller bipacksedeln inom human diagnostik. Genom att köpa den här produkten godkänner köparen att denne inte ska: [1] sälja vidare produkten i någon form; [2] använda produkten inom forensiska applikationer, eller [3] använda produkten för andra syften än vad som anges i det här avtalet om begränsad licens. Ytterligare information om rättigheter under patent som ägs av Applied Biosystems LLC kan erhållas genom att kontakta Licensing Department, Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad CA 92008: telefon (760) 603-7200; e-post outlicensing@lifetech.com.

Uppdaterade licensvillkor och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns på www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, *therascreen*® (QIAGEN Group); DNAzap™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.); PIQRAY® (Novartis AG). 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.

1116336 Sep-19 HB-2635-001 © 2019 QIAGEN, med ensamrätt.

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