

Marts 2022

Brugsanvisning til *therascreen*[®] EGFR Plus RGQ PCR Kit



Version 1



Til in vitro-diagnostisk brug

Til brug med plasma eller FFPE-væv

Til brug med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrument og
Rotor-Gene[®] AssayManager[®]



874611



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, TYSKLAND



1126175DK

Indhold

Tilsigtet anvendelse	6
Erklæring om brugsindikationer	6
Beskrivelse og princip	7
Oversigt og forklaring	7
Funktionsprincip	10
Teknologi	12
Medfølgende materialer	16
Kit-indhold	16
Kitformat og analyser	17
Platform og software	18
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	19
Yderligere reagenser til klargøring af prøve	19
Forbrugsvarer og generelt laboratorieudstyr	19
Udstyr	20
Advarsler og forholdsregler	22
Sikkerhedsinformation	22
Forholdsregler	22
Opbevaring og håndtering af reagenser	25
Forsendelsesbetingelser	25
Opbevaringsbetingelser	25
Stabilitet	26
Prøveopbevaring og -håndtering	27

FFPE-prøver.....	27
Plasmaprøver.....	28
Genomisk DNA og cirkulerende cellefrie DNA-prøver.....	28
Procedure.....	29
Protokol: DNA-ekstrahering og -klargøring.....	29
Protokol: gDNA-ekstrahering fra FFPE-prøver.....	29
Protokol: Automatiseret gDNA-ekstrahering fra FFPE-prøver ved hjælp af QIASymphony SP.....	31
Protokol: Manuel gDNA-ekstrahering fra FFPE-prøver.....	31
Protokol: Deparaffineringsprotokol af FFPE-sektioner med QIAGEN Deparaffinization Solution	32
Protokol: Forbehandlingsprotokol til brug med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit..	35
Protokol: ccfDNA-ekstrahering fra plasmaprøver.....	38
Protokol: Automatiseret ccfDNA-ekstrahering fra plasmaprøver ved hjælp af QIASymphony SP.....	39
Protokol: Manuel ccfDNA-ekstrahering fra plasmaprøver.....	39
Protokol: gDNA-kvantificering og normalisering.....	40
Protokol: Vurdering af <i>EGFR</i> -mutation med qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM- instrument.....	42
Protokol: Klargøring af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.....	46
Fortolkning af resultater [hvis relevant].....	58
Kontroller.....	58
Prøver.....	59
Flag.....	61
Gentest.....	64

Begrænsninger	67
Ydelseskarakteristika	69
Tomgrænse	69
Påvisningsgrænse	70
DNA-input	72
Repeterbarhed	73
Reproducerbarhed	76
Interfererende stoffer	79
Specificitet og krydsreaktivitet	82
Krydskontaminering og overførsel	82
Tidsramme for drift	83
Klinisk ydeevne	84
Litteraturhenvisninger	92
Fejlfindingsvejledning	94
Kvalitetskontrol	99
Symboler	100
Kontaktoplysninger	101
Bilag A: Installation af Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren Gamma Plug-in'et og Import af analyseprofilen	102
Bilag B: Kørsel af FFPE- og plasmaanalyseprofiler i samme eksperiment	106
Bestillingsinformation	109
Revisionshistorik for dokumentet	112

Tilsigtet anvendelse

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er en *in vitro*-diagnostisk real-time PCR-test til kvalitativ påvisning og identifikation af mutationer i exon 18, 19, 20 og 21 i det epidermale vækstfaktorreceptorgen (Epidermal Growth Factor Receptor, *EGFR*) (1) i DNA udledt af formalinfikseret paraffinindstøbt (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) tumurvæv og plasma fra patienter med småcellet lungecancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er yderligere indiceret til semi-kvantitativ måling af mutationer i exon 18, 20 og 21 i *EGFR*-genet i humant plasma som en hjælp til behandling af patienter med NSCLC-cancer.

Testen skal anvendes af uddannet laboratoriepersonale i et professionelt laboratoriemiljø

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er beregnet til *in vitro*-diagnostisk brug.

Erklæring om brugsindikationer

Testen er beregnet til brug som hjælpemiddel til udvælgelse af patienter med NSCLC til behandling med en *EGFR*-tyrosinkinasehæmmer (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI).

Beskrivelse og princip

Oversigt og forklaring

Mutationer i *EGFR*-onkogenet findes ved human cancer (1, 2). Tilstedeværelse af disse mutationer falder sammen med en manglende respons på visse behandlinger med tyrosinkinasehæmmere (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) hos patienter med ikke-småcellet lungecancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) (3-8). Sådanne mutationer i *EGFR*-onkogenet findes blandt den generelle population af patienter med NSCLC med en hyppighed på ca. 10 % hos patienter fra USA, Europa eller Australien og op til 30 % hos patienter fra Japan og Taiwan (1, 2, 9).

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er en real-time PCR-test (polymerasekædereaktion) til påvisning af 42 mutationer i cancer-relaterede *EGFR*-gen ved hjælp af ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (10, 11) og PCR-clamp-teknologier til kvalitativ påvisning og identifikation af mutationer i *EGFR*-genet, exon 18, 19, 20 og 21 (Tabel 1). Kittet tillader semi-quantificering af G719X (X = A, S, eller C, exon 18), T790M (exon 20), C797Sa og C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) og L861Q (exon 21) i DNA-prøver ekstraheret fra humant plasma. Kort fortalt:

- G719X i exon 18 (påviser og semi-quantificerer G719S, G719A eller G719C, men skelner ikke mellem dem)
- 28 deletioner i exon 19 (påviser tilstedeværelsen af en af de 28 deletioner, men skelner ikke mellem dem)
- S768I, T790M, C797Sa og C797Sb i exon 20 (påviser og semi-quantificerer alle fire mutationer, men skelner ikke mellem C797Sa og C797Sb)
- Fire indsætninger i exon 20 (påviser tilstedeværelsen af en af de fem indsætninger, men skelner ikke mellem dem)

De anvendte metoder er meget selektive, og afhængigt af den samlede mængde af DNA muliggør de påvisning af en lav procentdel af mutant-DNA mod en baggrund af vildtype-genomisk DNA. Disse selektivitet og påvisningsgrænser er overlegne i forhold til teknologier som-farveterminatorsekventering.

Tablet 1. Liste over mutationer og COSMIC-identiteter

Exon	Mutation	COSMIC-id*	Basisændring
18	G719A	6239	c.2156G>C
	G719S	6252	c.2155G>A
	G719C	6253	c.2155G>T
19	Deletioner	26038	c.2233_2247del15
		13550	c.2235_2248>AATTC
		6223	c.2235_2249del15
		6225	c.2236_2250del15
		18427	c.2237_2257>TCT
		6220	c.2238_2255del18
		12367	c.2237_2254del18
		12384	c.2237_2255>T
		12678	c.2237_2251del15
		13551	c.2235_2252>AAT
		13552	c.2235_2251>AATTC
		12386	c.2237_2252>T
		12416	c.2237_2253>TTGCT
		12728	c.2236_2253del18
		12422	c.2238_2248>GC
12382	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C		

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen fortsat fra foregående side

Tablet 1. Liste over mutationer og COSMIC-identiteter (fortsat)

Exon	Mutation	COSMIC-id*	Basisændring
19	Deletioner	6218	c.2239_2247delTTAAGAGAA
		12387	c.2239_2258>CA
		12370	c.2240_2257del18
		12403	c.2239_2256>CAA
		6255	c.2239_2256del18
		12383	c.2239_2251>C
		12419	c.2238_2252>GCA
		6210	c.2240_2251del12
		23571	c.2238_2252del15
		12369 [†]	c.2240_2254del15
		13556	c.2253_2276del24
		12385	c.2235_2255>AAT
20	S768I	6241	c.2303G>T
	Insertioner	12376	c.2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	c.2310_2311insGGT
		12377	c.2319_2320insCAC
		13428	c.2311_2312insGCGTGGACA
		13558	c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT
	T790M	6240	c.2369C>T
	C797Sa	6493937	c.2389T>A
C797Sb	5945664	c.2390G>C	

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen fortsat fra foregående side

Tablet 1. Liste over mutationer og COSMIC-identiteter (fortsat)

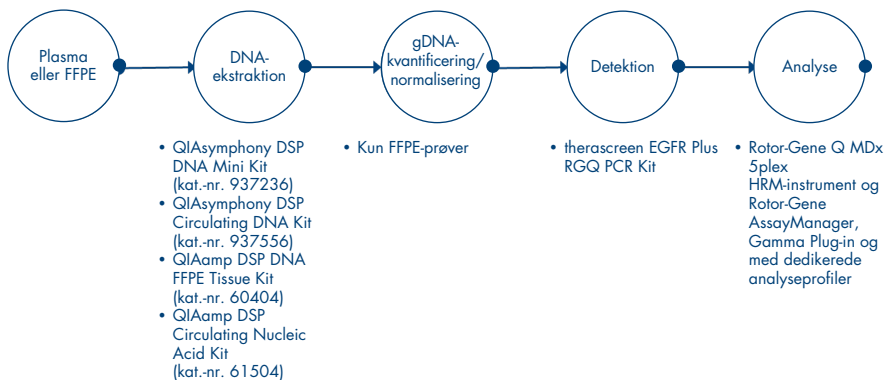
Exon	Mutation	COSMIC-id*	Basisændring
21	L858R	6224	c.2573T>G
	L861Q	6213	c.2582T>A

*COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (Katalog over somatiske cancermutationer):
<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

† Ifølge den nye COSMIC-database er deletion 6254 kombineret med deletion 12369 på grund af ligheder i sekvens, efter deletion er foretaget.

Funktionsprincip

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit anvender real-time PCR til påvisning af 42 mutationer i *EGFR*-genet (exon 18, 19, 20 og 21) og semi-kvantificering af G719X (med X = A, S eller C, exon 18), T790M (exon 20), C797Sa og C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) og L861Q (exon 21) i DNA-prøver ekstraheret fra humant plasma. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit tester genomisk DNA (gDNA) ekstraheret fra FFPE-tumorvæv og cirkulerende cellefrit DNA (ccfDNA) ekstraheret fra plasmaprøver fra patienter med småcellet lungecancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). EGFR-mutationsstatus og semi-kvantificering (når det er relevant) af rent ccfDNA påvises ved hjælp af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument udført med Rotor-Gene AssayManager (RGAM) softwareversion 2.1 (eller højere) kombineret med Gamma plug-in version 1.0.0 (eller højere) associeret med den plasmadedikerede analyseprofil. Dataanalyse og resultatfortolkning er fuldautomatiseret og administreres af RGAM (Figur 1).



Figur 1. theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit-arbejdsgang.

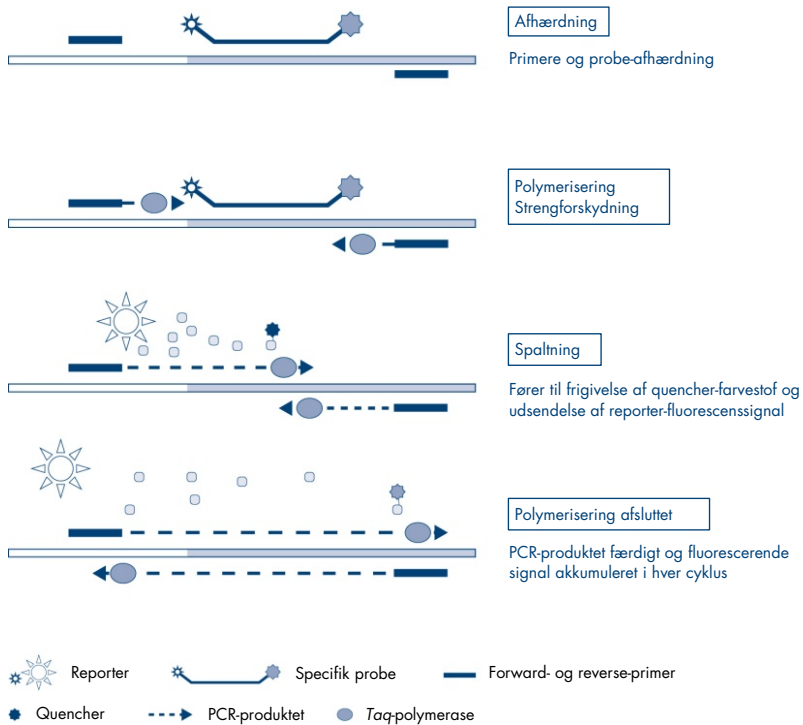
Teknologi

Anvendelse af qPCR tillader den nøjagtige detektering af PCR-produkter under den eksponentielle fase af PCR-amplifikationsprocessen. qPCR-data kan opnås hurtigt og uden post-PCR-behandling ved realtidsdetektering af fluorescerende signaler under PCR-cyklus.

therascreen EGFR Plus RGQ PCR-analyser anvender qPCR-oligonukleotid-hydrolyse-princippet. Under PCR hybridiserer forward- og reverse-primere til en bestemt sekvens. Et andet farvestoffbundet oligonukleotid er indeholdt i samme blanding. Denne probe, som består af et oligonukleotid, der er mærket med et 5'-reporterfarvestof og et downstream 3' farvefri quencher, hybridiserer til en målsekvens i PCR-produktet. qPCR-analysen med hydrolyseprober udnytter 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten af *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polymerase. Når proben er intakt, resulterer reporter-farvestoffets nærhed til quencheren i undertrykkelse af reporter-fluorescensen, primært ved energioverførsel af Förster-typen.

Under PCR, og hvis interessemålet er til stede, afhænder og flankerer både forward- og reverse-primere specifikt proben. 5'→3'-eksonukleaseaktiviteten af DNA-polymerasen spalter kun proben mellem reporter og quencher, hvis de tre oligonukleotider hybridiserer til målet. Probefragmenter bliver forskudt fra målet, og polymerisering af strengen fortsætter. 3'-enden af proben er blokeret for at forbygge forlængelse af proben under PCR (Figur 2). Denne proces forekommer i hver cyklus og forstyrrer ikke produktets eksponentielle akkumulering.

Stigningen i fluorescenssignalet detekteres kun, hvis målsekvensen er komplementær til primerne og proben og dermed amplificeres under PCR.

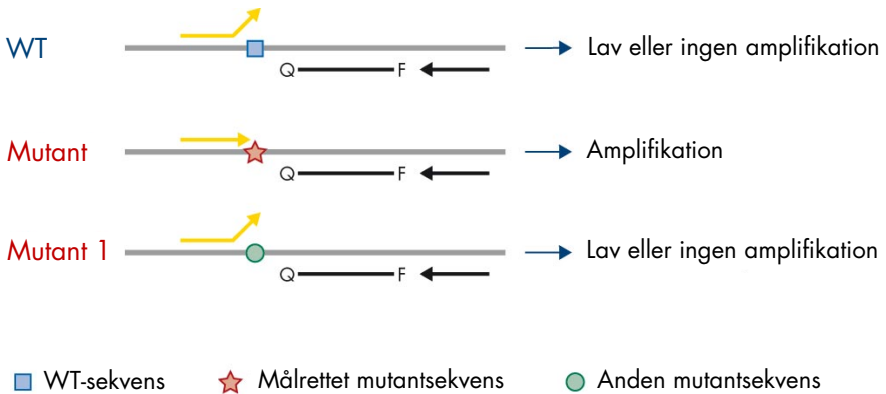


Figur 2. Reaktionsprincip.

I *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit anvender mutationsspecifikke reaktioner ARMS (Amplification Refractory Mutation System) og clamp-design til at påvise, identificere og semi-kvantificere (når det er relevant) mutationer i DNA ekstraheret fra plasma.

ARMS

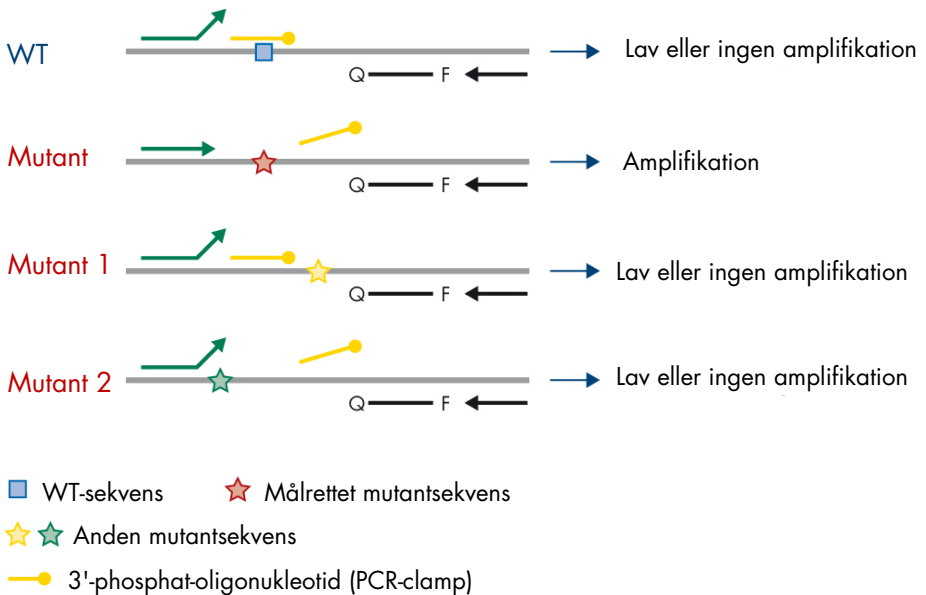
ARMS (Amplification Refractory Mutation System) anvender muligheden for, at *Taq* DNA-polymerase kan skelne mellem en matchet og en ikke matchet base i 3'-enden af en PCR-primer. Når primeren er fuldstændigt matchet, fortsætter amplifikationen med fuld effektivitet. Når 3'-basen ikke er matchet, kan der kun forekomme baggrundsamplifikation på et lavt niveau. En muteret sekvens forstærkes derfor selektivt, selv i prøver hvor størsteparten af DNA'et ikke bærer mutationen (Figur 3).



Figur 3. **Identifikation af specifik mutation med ARMS PCR.** WT: Vildtype. Q-F: Dobbeltfarve-probe. D: Forward- og reverse-primer.

PCR-clamp

Denne metode anvendes til at påvise flere varianter lokaliseret i samme hotspot (f.eks. *EGFR*-deletioner i exon 19). Clamp-analysen kombinerer standardprimere og prober med et ekstra oligonukleotid, 3'-blok med tilføjelsen af en fosfatgruppe for at forhindre PCR-elongering. Clamp-oligonukleotidet samt primerne og proberne er specifikke for vildtypesekvensen (PCR-clamping). Når PCR-skabelonen indeholder en vildtypesekvens, hybridiseres clampen før primeren på grund af den højere T_m , som fører til lav eller ingen amplifikation. I modsætning hertil kan clampen ikke binde, når der er en muteret sekvens til stede, hvilket tillader afhærdning og amplifikation af primeren (Figur 4).



Figur 4. **Påvisning af mutation med clamp-teknologi.** WT: Vildtype. Q-F: Dobbeltfarve-probe. D: Forward- og reverse-primer.

Medfølgende materialer

Kit-indhold

<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit			(24)
Katalognr.			874611
Antal reaktioner			24
Farve	Identitet	Rør-id	Volumen
Grønt	T790M & L861Q Mix (T790M- og L861Q-blanding)	EGFR T790M & L861Q Mix (EGFR T790M- og L861Q-blanding)	280 µl
Gult	Insertions & G719X Mix (Insertioner og G719X-blanding)	EGFR Insertions & G719X Mix (EGFR-insertioner og G719X-blanding)	280 µl
Lilla	L858R & C797S Mix (L858R- og C797S-blanding)	EGFR L858R & C797S Mix (EGFR L858R- og C797S-blanding)	280 µl
Orange	Deletions & S768I Mix (Deletioner og S768I-blanding)	EGFR Deletions & S768I Mix (EGFR-deletioner og S768I-blanding)	280 µl
Rødt	EGFR Positive Control (Positiv kontrol for EGFR)	EGFR Positive Control (EGFR Positive Control)	190 µl
Blå	PCR Master Mix (PCR-masterblanding)	EGFR PCR Master Mix (EGFR PCR-master-blanding)	2 × 940 µl
Farveløs	Water for NTC (Vand til NTC)	NTC	1,9 ml
Farveløs	Water for sample dilution (Vand til fortynding af prøven)	Dil.	1,9 ml

Bemærk: Indholdet af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit er tilstrækkeligt til 24 prøver (sættet indeholder tilstrækkelige reagenser til op til fire qPCR-kørsler på seks prøver pr. kørsel, herunder kørselskontroller).

Kitformat og analyser

Mutationsanalyser

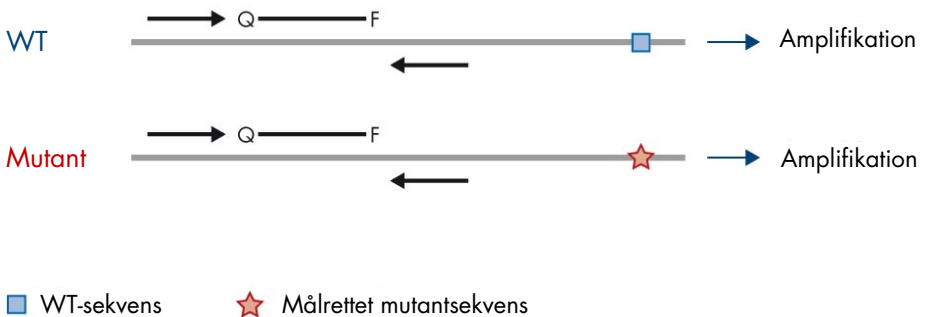
Der medfølger fire primer- og probeblandinger i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:

- T790M og L861Q
- Insertioner (exon 20) og G719X
- L858R og C797S
- Deletioner (exon 19) og S768I

Alle primer- og probeblandinger muliggør påvisning af mål, som er mærket med carboxyfluorescein (FAM™), CAL Fluor® Red 610 og en intern kontrol mærket med hexachlorofluorescein (HEX™), når de kombineres med PCR-master-blandingen.

Intern kontrolanalyse

Den interne amplifikationskontrolreaktion, mærket med HEX, anvendes til at vurdere den samlede amplificerbare EGFR DNA-skabelon i en muteret og en ikke-muteret (vildtype) prøve (Figur 5) og identificere reaktionsfejl, som skyldes suboptimal DNA-input eller tilstedeværelsen af hæmmende stoffer i prøvematrixen. Denne interne amplifikationsreaktion forstærker en exon 2-region i EGFR-genet. Primere og probe er designet, så alle kendte *EGFR*-polymorfismer undgås.



Figur 5. Påvisning *EGFR*-exon 2 intern kontrol (Internal Control, IC). WT: Vildtype. Q-F: Dobbelfarve-probe. D Forward- og reverse-primere.

Vand til fortynding af prøven (Dil.)

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit indeholder nukleasefrit vand til fortynding af gDNA-prøver.

Kontroller

Alle PCR-kørsler skal omfatte en positiv kontrol (Positive Control, PC) og en negativ kontrol (NTC) for hver af de fire analyser.

Positiv kontrol (Positive Control, PC)

Hver kørsel skal indeholde en positiv kontrol i rør 1-4. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit indeholder en positiv kontrol (Positive Control, PC) for *EGFR*, der skal bruges som skabelon i den positive kontrolreaktion. De positive kontrolresultater vil blive vurderet automatisk af Rotor-Gene AssayManager® for at sikre, at kittet fungerer korrekt inden for de foruddefinerede acceptkriterier.

Ingen-skabelon-kontrol (No Template Control, NTC)

Hver kørsel skal indeholde en negativ kontrol (ikke-skabelon-kontrol (No Template Control, NTC)) i rør 5-8. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit indeholder vand til NTC, der skal bruges som "skabelon" i kontrollen uden skabelon. Kontrollen uden skabelon anvendes til at bedømme potentiel reagens- og miljøkontaminering.

Platform og software

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er specifikt udviklet til brug med Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM-instrumenter* med fluorescenskanaler til Cycling Green, Cycling Yellow og Cycling Red med Rotor-Gene AssayManager v2.1.X ($X \geq 0$) Core-software, Gamma plug-in v1.0.X ($X \geq 0$) og *therascreen* EGFR Plus Assay-profiler.

Der fås to *therascreen* EGFR-analyseprofiler: **therascreen EGFR Plus FFPE** (til FFPE-prøvevurdering) og **therascreen EGFR Plus Plasma** (til Plasma-prøvevurdering). Analyseprofilerne indeholder PCR-kørselsparametrene og de analyseparametre, som muliggør en automatiseret resultatfortolkning.

* Sørg for, at instrumenterne og udstyret er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Yderligere reagenser til klargøring af prøve

- Deparaffinization Solution (kat.-nr. 19093 eller 939018) til manuel og automatiseret gDNA-klargøring fra FFPE-prøver
- QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236) til automatiseret gDNA-klargøring fra FFPE-prøver
- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.-nr. 937556) til automatiseret ccfDNA-klargøring fra plasmaprøver
- QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.-nr. 60404) til manuel gDNA-klargøring fra FFPE-prøver
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.-nr. 61504) til manuel ccfDNA-klargøring fra plasmaprøver

Bemærk: De nødvendige materialer, som ikke medfølger til ovenstående DNA-ekstraheringskits, er beskrevet i håndbøgerne til de respektive kits.

- RNase A (kat.-nr. 19101) til manuel eller automatiseret klargøring af gDNA-prøver fra FFPE-prøver
- Buffer ATL (kat.-nr. 939016) til den deparaffineringsprotokol, der anvendes med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236) eller QIASymphony DNA Mini Kit (kat.-nr. 931236)

Forbrugsvarer og generelt laboratorieudstyr

- Dedikerede pipetter* (justerbare) til klargøring af prøver
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til klargøring af PCR-reaktionsblanding
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til dosering af DNA-skabelon

* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

- Nukleasefrie, aerosolresistente, sterile PCR-pipettespidser med hydrofobiske filtre (pipettespidser med aerosolbarrierer anbefales som hjælp til at forhindre krydskontaminering)
- Vortex-mixer*
- Bordcentrifuge* med rotor til 0,5 ml, 1,5 ml og 2,0 ml reaktionsrør (der kan nå op på 13.000-14.000 o/min.)
- DNase, RNase, DNA-fri, sterile 1,5 eller 2,0 ml mikrocentrifugerør til klargøring af DNA- og PCR-reaktionsblandinger
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (båndrør og hætter, 0,1 ml), til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument (kat.-nr. 981103 eller 981106)
- DNA-kvantificeringsinstrument
- Prøverør (f.eks. 2 ml Sarstedt-rør [kat.-nr. 72.693]) til automatiseret gDNA-klargøring (fra FFPE-blokke). Kompatible primære og sekundære glasformater er anført på www.qiagen.com/goto/dspdnakits.
- Steril skalpel til engangsbrug til manuel og automatiseret gDNA-klargøring (fra FFPE-sektion på glasprøve)
- Sterilt fosfat-bufferet saltvand til IVD-brug (PBS, skal evt. anvendes til opfyldning af plasmaprøvemængder)

Udstyr

Udstyr til automatiseret klargøring af prøve

- QIASymphony SP instrument* (kat.-nr. 9001297) og medfølgende tilbehør
Bemærk: Det nødvendige tilbehør er beskrevet i håndbøgerne til de respektive kits og i *Brugervejledning til QIASymphony SP/AS – Generel beskrivelse*.
- QIASymphony-software version 4.0 eller nyere

* Kontrollér, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

- QIASymphony Tissue_LC_200_DSP-protokol til automatiseret gDNA-klargøring fra FFPE-prøver (se www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-dna-kits-row/#resources)
- QIASymphony circDNA_2000_DSP-protokol til automatiseret ccfDNA-klargøring fra plasmaprøver (se www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-circulating-dna-kit/#resources)

Udstyr og materialer til qPCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument* med fluorescenskanaler til Cycling Green, Cycling Red og Cycling Yellow (påvisning af hhv. FAM, CAL Fluor Red 610 og HEX)
- Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes, aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette (kat.-nr. 9018901)
- 72-Well Rotor (72-brønds rotor) (kat.-nr. 9018903), Locking Ring 72-Well Rotor (låsering til 72-brønds rotor) (kat.-nr. 9018904) og Rotor Holder (rotorholder) (kat.-nr. 9018908)
- Rotor-Gene AssayManager-software version 2.1.x (hvor x = 1 eller nyere)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in installeret, version 1.0. x (hvor x = 0 eller nyere)
- EGFR RGQ PCR-analyseprofil version 1.0.x (hvor x = 0 eller nyere)
 - *therascreen_EGFR_Plus_FFPE* til FFPE-prøver
 - *therascreen_EGFR_Plus_Plasma* til plasmaprøver

* I nogle lande kan Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumentet med produktionsdatoen maj 2011 eller senere om nødvendigt anvendes. Produktionsdatoen findes under serienummeret på bagsiden af instrumentet. Serienummeret findes i formatet "mmåånnn", hvor "mm" står for produktionsmåneden i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den entydige instrumentidentifikator.

Advarsler og forholdsregler

Kunder i EU skal være opmærksomme på, at alvorlige hændelser med relation til brugen af udstyret skal indberettes til producenten og den ansvarlige myndighed i det medlemsland, hvor brugeren og/eller patienten befinder sig.

Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der henvises til de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere information. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og alle kitkomponenter.

Se sikkerhedsinformationerne vedrørende QIASymphony SP-instrumentet og Rotor-Gene Q-instrumentet i den brugervejledning, der følger med instrumentet.

- Alle kemikalier og alt biologisk materiale er potentielt farligt. Prøver er potentielt farlige og skal håndteres som biologisk farlige materialer.
- Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.

Forholdsregler

Brug af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit kræver god laboratoriepraksis, herunder sporbarhed, vedligeholdelse af udstyr til molekylærbiologi og overholdelse af gældende lovgivning og relevante standarder.

Dette kit er beregnet til *in vitro*-diagnostisk brug. Reagenser og vejledning, der medfølger i dette kit, er testet for optimal ydeevne.

Følgende anvisninger skal altid overholdes af brugeren:

- Denne test er beregnet til brug sammen med FFPE- og plasma NSCLC-prøver.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre kontaminering af prøver og reagenser med EGFR-positivt materiale (dvs. positiv kontrol) eller potentielt EGFR-positivt materiale (dvs. prøver, der skal testes).
 - Sørg for at skifte skalpeller mellem prøverne, når vævet skræbes.
 - Anvend separate, dedikerede pipetter til DNA-ekstrahering/klargøring, opsætning af PCR-reaktionsblandinger (inden klargøring af PCR-blanding) og tilsætning af DNA-prøver i PCR-rør.
 - Brug friske aerosol-resistente pipetter til alle pipetteringstrin for at undgå krydskontaminering af prøver og reagenser. Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre overførsel af DNA eller PCR-produkt, hvilket kan resultere i et falskt positivt signal.
 - Klargøring og dispensering af reaktionsblandinger skal udføres i et særligt område, som er adskilt fra DNA-klargøringsområdet, hvor ingen DNA-matricer (DNA-, plasmid- eller PCR-produkter) introduceres. Tilsæt, i det samme område, vand i NTC-rør, og luk dem.
 - Tilføj DNA-skabelonen i et separat område, helst i et separat rum, med særligt udstyr (pipetter, spidser osv.).
 - Rotor-Gene Q-rørene må ikke åbnes, når PCR-kørslen er afsluttet. Dette er for at forhindre kontaminering af laboratoriet med post-PCR-produkter.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-reagenser skal beskyttes mod lys, temperatur og gentagen optøning og frysning, da kittets ydelse ellers kan ændre sig.
- Frosne komponenter optøs helt ved stuetemperatur (15-25 °C) (eller i et køleskab (2-8 °C) og beskyttes mod lys. Kontrollér regelmæssigt, om materialet er optøet.
- Alle kemikalier og alt biologisk materiale er potentielt farligt. Prøver er potentielt farlige og skal håndteres som biologisk farlige materialer.
- Reagenserne til *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit er fortyndet optimalt. Fortynd ikke reagenserne yderligere, da dette kan resultere i forringet pålidelighed.

-
- Brug ikke reaktionsvolumener (reaktionsblanding plus prøve) på mindre end 25 µl, da det øger risikoen for falsk negative resultater.
 - Alle reagenser, der leveres med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.
 - Reagenserne i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit eller mellem *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lots må ikke udskiftes, da dette kan påvirke ydelsen.
 - Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
 - Der skal udvises forsigtighed for at sikre korrekt test og analyse af prøver med vægt på at eliminere forkert prøveangivelse, fejl ved isætning, pipetteringsfejl og placering af PCR-båndrørene i de passende positioner på 72-Well Rotor.
 - Kontrollér, at prøverne håndteres på en systematisk måde for at sikre korrekt identifikation og sporbarhed.
 - Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre DNase-kontaminering, der kan resultere i forringelse af DNA-skabelonen. Brug nukleasefrit laboratorieudstyr (f.eks. pipetter, pipettespidser og reaktionshætteglas), og brug handsker under udførelse af analysen.
 - Bemærk: Produktet må kun anvendes af erfarent laboratoriepersonale, som er bekendt med laboratoriets procedurer og Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

Forsendelsesbetingelser

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit forsendes på tøris og skal stadig være frosset ved modtagelse. Hvis nogle af komponenterne i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit ikke er frosne ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en brugsvejledning eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til en afdeling af QIAGENs Teknisk Service eller lokale distributører (besøg www.qiagen.com).

For forsendelsesbetingelser relateret til DNA-ekstraktionskittet og de tilhørende reagenser, som skal anvendes, henvises der til de respektive håndbøger til kittet.

Opbevaringsbetingelser

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit skal straks efter modtagelse opbevares ved -30 til -15 °C i en fryser med konstant temperatur og beskyttes mod lys.

Bemærk: Alle fluorescensmærkede prober i reaktionsblandingen er lysfølsomme. Beskyt reaktionsblandingsreagenser mod lys for at undgå fotobleging.

Undgå gentagen indfrysning og optøning. Reagenserne skal ideelt maksimalt udsættes for fire fryse-/optøningscykluser.

Se oplysninger om opbevaring og håndtering vedrørende DNA-ekstraheringskits og tilhørende reagenser, som skal anvendes, i de respektive håndbøger til kittet.

Stabilitet

Når *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit opbevares under de specifikke opbevaringsbetingelser, er det stabilt indtil den udløbsdato, som fremgår af mærkaten. Undgå unødvendig nedfrysning/optøning af kittets indhold.

Når de er åbnet, kan reagenser opbevares i deres originale emballage ved -30 til -15 °C indtil udløbsdatoen, der er angivet på emballagen. Når PCR-reaktioner er klargjort, må den samlede tid før kørslen ikke overstige 24 timer ved opbevaring i køleskab (2-8 °C – denne tid omfatter både PCR-klargøring og opbevaring).

Se de respektive håndbøger til kittet for at få stabilitetsoplysninger om DNA-ekstraktionskittet og de tilhørende reagenser, som skal anvendes.

Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

Prøveopbevaring og -håndtering

Prøvemateriale er humant genomisk DNA ekstraheret fra FFPE-tumorstof eller cirkulerende cellefrit DNA (ccfDNA) ekstraheret fra 2K-EDTA-plasma.

Prøverne skal transporteres i henhold til standardmetoder inden for patologien for at sikre prøvernes kvalitet.

Bemærk: Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Bemærk: Prøver bør være samlede i batch for at sikre den optimale anvendelse af reagenser i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit. Hvis prøver testes individuelt, bruger det flere reagenser og reducerer antallet af prøver, som kan testes med kittet.

FFPE-prøver

Tumorprøver er uhomogene, og data fra én tumorprøve vil muligvis ikke være samstemmende med data fra andre sektioner fra den samme tumor. Tumorprøver kan også indeholde ikke-tumorstof. DNA fra ikke-tumorstof forventes ikke at indeholde de mutationer, der detekteres af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.

Sådan klargøres vævsprøver til gDNA-ekstrahering:

- Standardmæssige formalinfikserings- og paraffinindstøbningsprocedurer skal anvendes. Se flere oplysninger i den relevante håndbog til ekstraheringskittet.
- Ved hjælp af en mikrotom skal man skære 5 µm serielle sektioner fra paraffinblokken og montere dem på objektglas. Brug en uddannet person (f.eks. en patolog) til at vurdere en hæmatoxylin- og eosin-farvet (H&E) sektion for at bekræfte, at der er en tumor til stede. De farvede sektioner må ikke bruges til DNA-ekstrahering.
- Startmaterialet til gDNA-oprensning i sektioner af FFPE-væv (ideelt frisk skåret).

- Opbevar alle FFPE-blokke og objektglas ved stuetemperatur (15-25 °C). FFPE-sektioner monteret på objektglas kan opbevares ved stuetemperatur i op til én måned før DNA-ekstrahering.

Plasmaprøver

Der skal anvendes standardmæssige laboratorieprocedurer til at klargøre plasma fra 2K-EDTA-helblodsprøver. Se flere oplysninger i den relevante håndbog til ekstraheringskittet.

Hvis der anvendes frisk plasma til ekstraktion af nukleinsyrer den samme dag, skal det opbevares ved 2-8 °C frem til videre behandling. Ved langtidsopbevaring skal plasmaen være frossen ved -30 til -15 °C eller -90 til -65 °C. Det anbefales at bruge alikvoter for at undgå nedfrysning/optøning af plasmaprøver. Gentagne fryse-tø-cykler medfører denaturering og udfældning af proteiner, som kan medføre reducerede udbytte af cirkulerende cellefrie nukleinsyrer.

Genomisk DNA og cirkulerende cellefrie DNA-prøver

Genomisk DNA ekstraheret fra FFPE-væv og cirkulerende cellefrit DNA ekstraheret fra plasma skal opbevares ved 2-8 °C ved kortvarig opbevaring (op til 24 timer) og -30 til -15 °C (eller -90 til -65 °C), hvis der er behov for langtidsopbevaring. Undgå unødvendig nedfrysning/optøning af den ekstraherede gDNA og ccfDNA. Frosne eluater må ikke tøs op mere end tre gange.

Procedure

Protokol: DNA-ekstrahering og -klargøring

Ting, der skal gøres før start

- Sørg for, at operatøren er uddannet i brug af de instrumenter og ekstraheringskits, der er nødvendige til DNA-ekstrahering og klargøring af prøver. Instrumenttræning kan om nødvendigt gives ved installation (se "Bestillingsinformation", side 109).
- Læs afsnittet "Nødvendige materialer, som ikke medfølger" i håndbogen til hvert ekstraheringskit for at identificere det tilbehør, der kræves til hver procedure:
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236) til automatiseret gDNA-klargøring (fra FFPE-prøver)
- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.-nr. 937556) til automatiseret ccfDNA-klargøring (fra plasmaprøver)
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.-nr. 60404) til manuel gDNA-klargøring (fra FFPE-prøver)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.-nr. 61504) til manuel ccfDNA-klargøring (fra plasmaprøver)

Protokol: gDNA-ekstrahering fra FFPE-prøver

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er kun testet i kombination med QIAGEN Deparaffinization Solution (kat.-nr. 19093 eller 939018) til deparaffinering af FFPE-sektion med følgende DNA-ekstraheringskits:

- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236) til automatiseret ekstrahering
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.-nr. 60404) til manuel ekstrahering

Vigtige anvisninger før start

Relevant for automatiseret ekstrahering og manuelle ekstraheringsprotokoller:

- Kontrollér, at DNA-ekstraktionsreagenserne ikke er udløbet og er blevet transporteret og opbevaret under korrekte forhold.
- Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Der kan kombineres mellem en og fire FFPE-vævssektioner, hver med en tykkelse på 10 µm, eller mellem to og otte sektioner med en tykkelse på op til 5 µm i én klargøring.
- Brug kun Deparaffinization Solution til FFPE-deparaffinering i overensstemmelse med proceduren "Forbehandlingsprotokol til brug med QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit" på side 32 eller "Protokol: Forbehandlingsprotokol til brug med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" på side 35.

Bemærk: Deparaffinization Solution medfølger ikke i ekstraheringskits og skal bestilles separat (se "Bestillingsinformation", side 109).

- Brug RNase A til at minimere RNA-indholdet (indgår i proceduren "Protokol: Deparaffinering af FFPE-sektioner med QIAGEN Deparaffinization Solution" på side 32).
Bemærk: RNase A medfølger ikke i ekstraheringskits og skal bestilles separat (se "Bestillingsinformation" på side 109).
- Fortynding af prøven inden qPCR-test (se "Protokol: gDNA-kvantificering og normalisering" på side 40) eller opbevaring kan være nødvendig.
- DNA isoleret fra FFPE-prøver har normalt en lavere molekylvægt end DNA fra friske eller frosne prøver. Graden af fragmentering afhænger af prøvens type og alder og de forhold, der anvendes til fiksering.
- Se "Genomisk DNA og cirkulerende cellefrie DNA-prøver" på side 28 angående DNA-opbevaring efter ekstrahering.

Protokol: Automatiseret gDNA-ekstrahering fra FFPE-prøver ved hjælp af QIASymphony SP

Hvis QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236) anvendes til automatiseret ekstrahering, skal DNA-ekstraheringen udføres i henhold til instruktionerne i håndbogen med følgende bemærkninger:

- Brug kun Deparaffinization Solution til FFPE-deparaffinering i overensstemmelse med proceduren "Forbehandlingsprotokol til brug med QIASymphony DSP DNA Mini Kit" på side 32.

Bemærk: Deparaffinization Solution medfølger ikke i ekstraheringskits og skal bestilles separat (se "Bestillingsinformation" på side 109).

- Vælg protokollen *Tissue_LC_200_V7_DSP* på QIASymphony SP-instrumentet (se protokollen *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue_LC_200_V7_DSP* for at få flere oplysninger)
- Brug 50 µl elueringsmængde.
- Se de brugervejledning, der leveres sammen med instrumentet, for at få supplerende oplysninger om QIASymphony SP-instrumentet.

Protokol: Manuel gDNA-ekstrahering fra FFPE-prøver

Hvis QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.-nr. 60404) skal anvendes til manuel ekstrahering, skal DNA-ekstraheringen udføres i henhold til instruktionerne i håndbogen med følgende bemærkninger:

- Brug kun Deparaffinization Solution til FFPE-deparaffinering i overensstemmelse med proceduren "Protokol: Forbehandlingsprotokol til brug med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" på side 35.

Bemærk: Deparaffinization Solution medfølger ikke i ekstraheringskits og skal bestilles separat (se "Bestillingsinformation" på side 109).

- Brug 50 µl elueringsmængde.

Protokol: Deparaffinering af FFPE-sektioner med QIAGEN Deparaffinization Solution

Forbehandlingsprotokol til brug med QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Denne forbehandlingsprotokol skal bruges til QIASymphony DSP DNA Mini Kit (til automatiseret ekstrahering) og er baseret på protokollen *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue_LC_200_V7_DSP* (metode 1: deparaffinering ved hjælp af Deparaffinization Solution).

Vigtige anvisninger før start

- Ækvilibrér alle buffere til stuetemperatur (15-25 °C), og ækvilibrér Deparaffinization Solution til 20-25 °C.
- QIASymphony magnetiske partikler oprenser både RNA og DNA, hvis begge forefindes i prøven. For at minimere indholdet af RNA i prøven tilsættes RNase A til prøven i de trin, som er angivet i nedenstående forbehandlingsprotokol.
- Deparaffinization Solution, RNase A og Buffer ATL medfølger ikke i QIASymphony DSP DNA Mini Kit og skal bestilles separat (se "Bestillingsinformation" på side 109).

Ting, der skal gøres før start

- Forvarm en thermomixer eller en rysteinkubator til 56 °C til brug i trin 7.
- Kontrollér ATL-bufferen for hvidt bundfald. Opløs om nødvendigt bundfaldet i henhold til den protokol, der er beskrevet i *QIASymphony SP Protocol Sheet Tissue_LC_200_V7_DSP*.

Procedure

Start udelukkende med FFPE-blokke

1. Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken. Afskær mellem en og fire sektioner med 10 µm tykkelse eller mellem to og otte sektioner med 5 µm tykkelse.
Bemærk: Hvis prøveoverfladen er blevet udsat for luft, bortskaffes de første 2-3 sektioner.
2. Placer straks sektionen/sektionerne i et 2 ml prøverør, der er kompatibelt med prøverørsholderen til QIASymphony SP (medfølger ikke, f.eks. Sarstedt, kat.-nr. 72.693).
3. Fortsæt med trin fire nedenfor (for alle prøver).

Start udelukkende med FFPE-sektioner på objektglas

1. Placer én dråbe Deparaffinization Solution på hvert objektglas ved hjælp af særlige pipetter til klargøring af prøver.
2. Skrab prøvematerialet af med en steril skalpel til engangsbrug for at opsamle hele vævet. Placer aggregaterne i et 2 ml prøverør, der er kompatibelt med prøverørsholderen til QIASymphony SP (medfølger ikke, f.eks. Sarstedt, kat.-nr. 72.693).
3. Fortsæt med trin fire nedenfor (for alle prøver).

For alle prøver

4. Tilsæt 200 µl Buffer ATL til sektionerne.
5. Tilsæt 20 µl proteinase K.
Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Tilsæt 160 µl eller 320 µl Deparaffinization Solution (se Tabel 2), og bland med vortex.

Tabel 2. Krævet volumen af Deparaffinization Solution

Sektionstykkelser	Antal sektioner	Volumen af Deparaffinization Solution
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Anbring glasset i en termomixer eller rysteinkubator og inkubér ved 56 °C i 1 time med rystning ved 1000 o/min., eller indtil vævet er helt lysere.

Bemærk: Lysistiden varierer afhængig af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lysis inden for 1 timer. Hvis lysis er ufuldstændig efter 1 time som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale, kan lysistiden forlænges eller uopløseligt materiale pelleres ved centrifugering. Lysis i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

8. Inkubér ved 90 °C i 1 time.

Bemærk: Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvist formaldehydmodifikationen af nukleinsyrer. Længere inkuberingstider eller højere inkuberingstemperaturer kan resultere i mere fragmenteret DNA. Hvis der kun anvendes en varmeblok, skal prøven forblive ved stuetemperatur efter 56 °C inkubering, indtil varmeblokken når 90 °C.

9. Tilsæt 2 µl RNase A (100 mg/ml) til den laveste fase, og inkubér i to minutter ved stuetemperatur for at minimere indholdet af RNA i prøven, før der fortsættes til trin 10. Lad prøven afkøle til stuetemperatur, før der tilsættes RNase A.

10. Centrifuger ved fuld hastighed i 1 minut ved stuetemperatur.

11. Overfør forsigtigt glassene (med begge faser) til prøveholderen på QIASymphony SP.

12. Fortsæt med ekstraheringen i henhold til instruktionerne i håndbogen til *QIASymphony DSP DNA Mini Kit* (brug 50 µl elueringsmængde).

Protokol: Forbehandlingsprotokol til brug med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Denne forbehandlingsprotokol er beregnet til brug med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (til manuel ekstrahering) og er baseret på "QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of genomic DNA from FFPE tissue using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit and Deparaffinization Solution".

Vigtige anvisninger før start

- Udfør alle centrifugeringstrin ved stuetemperatur (15-25 °C).
- Ækvilibrér alle buffere til stuetemperatur. Ækvilibrér Deparaffinization Solution til 20-25 °C.
- Deparaffinization Solution, RNase A og Buffer ATL medfølger ikke til QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit og skal bestilles separat (se "Bestillinginformation" på side 109).

Ting, der skal gøres før start

- Forvarm en thermomixer eller en opvarmet orbital inkubator til 56 °C til anvendelse i trin 6 og 10. Hvis der ikke er en tilgængelig thermomixer eller opvarmet orbital inkubator, kan der i stedet benyttes en varmeblok eller et vandbad.
- Hvis Buffer AL eller Buffer ATL indeholder bundfald, skal dette opløses i henhold til den protokol, der er beskrevet i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.
- Kontrollér, at Buffer AW1 og Buffer AW2 er klargjort i henhold til instruktionerne i håndbogen til *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

Procedure

Start udelukkende med FFPE-blokke

1. Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken. Afskær i sektioner med en tykkelse på 5-10 µm.

Bemærk: Hvis prøveoverfladen er blevet udsat for luft, bortskaffes de første 2-3 sektioner.

2. Anbring omgående sektionen/sektionerne i et 1,5 ml eller 2 ml mikrocentrifugerør (medfølger ikke).
3. Fortsæt med trin fire nedenfor (for alle prøver).

Start udelukkende med FFPE-sektioner på objektglas

1. Placer én dråbe Deparaffinization Solution på hvert objektglas ved hjælp af særlige pipetter til klargøring af prøver.
2. Skrab prøvematerialet af med en skalpel for at opsamle hele vævet. Placer aggregaterne i et 1,5 ml eller 2 ml mikrocentrifugerør (medfølger ikke).
3. Fortsæt med trin fire nedenfor (for alle prøver).

For alle prøver

4. Tilsæt 160 µl eller 320 µl Deparaffinization Solution (Tabel 3), og vortex kraftigt i 10 sekunder.

Tabel 3. Krævet volumen af Deparaffinization Solution

Sektionstykkelse	Antal sektioner	Volumen af Deparaffinization Solution
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

5. Centrifuger kort for at samle prøven i bunden af røret.
6. Inkubér ved 56 °C i 3 minutter, og lad afkøle ved stuetemperatur (15-25 °C).
7. Tilsæt 180 µl Buffer ATL, og bland med en vortexer.
8. Centrifuger 1 minut ved 11.000 x g (10.000 o/min.). To faser kommer til syne (blå og gennemsigtig).

-
9. Tilsæt 20 µl proteinase K til den laveste, gennemsigtige fase. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.
 10. Inkubér ved 56 °C i 1 time (eller indtil prøven er fuldstændig lyseret).
 11. Inkubér ved 90 °C i 1 time.

Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvist formaldehydmodifikationen af nukleinsyrer. Længere inkuberingstider eller højere inkuberingstemperaturer kan resultere i mere fragmenteret DNA.

Bemærk: Hvis der kun anvendes en varmeblok, skal prøven forblive ved stuetemperatur (15-25 °C) efter 56 °C inkubering i trin 10, indtil varmeblokken har nået 90 °C til trin 11.
 12. Centrifugér kortvarigt 1,5 ml røret for at fjerne dråber fra lågets inderside.
 13. Overfør den nederste, gennemsigtige fase til et nyt 2 ml mikrocentrifugerør.
 14. Tilsæt 2 µl RNase A (100 mg/ml), og inkuber i 2 minutter ved stuetemperatur.
 15. Fortsæt med trin 12 (tilsætning af Buffer AL) i håndbogen til *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* (brug 50 µl elueringsmængde).

Protokol: ccfDNA-ekstrahering fra plasmaprøver

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er teste i kombination med følgende DNA-ekstraheringskits:

- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.-nr. 937556) til automatiseret ccfDNA-ekstrahering (fra plasmaprøver)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.-nr. 61504) til manuel ccfDNA-ekstrahering (fra plasmaprøver)


Vigtige anvisninger før start

Relevant for automatiseret ekstrahering og manuelle ekstraheringsprotokoller:

- Kontrollér, at DNA-ekstraktionsreagenserne ikke er udløbet og er blevet transporteret og opbevaret under korrekte forhold.
- Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Startmaterialet til ccfDNA-oprensning skal være plasma klargjort fra 2K-EDTA-helblodsprøver. Prøver kan være enten friske eller frosne (hvis de ikke har været frosne og optøede mere end én gang).
- Koncentrationen af cirkulerende cellefrie nukleinsyrer i biologiske væsker såsom plasma er normalt lav og varierer betydeligt fra person til person. Derfor kvantificeres eller normaliseres (ingen fortynding) ccfDNA ekstraheret fra plasmaprøver ikke og anvendes direkte i qPCR-reaktionen.
- Se afsnittet "Genomisk DNA og cirkulerende cellefrie DNA-prøver" på side 28 angående DNA-opbevaring efter ekstrahering.

Protokol: Automatiseret ccfDNA-ekstrahering fra plasmaprøver ved hjælp af QIAasymphony SP

Hvis QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.-nr. 937556) anvendes til automatiseret ekstrahering, skal DNA-ekstraheringen udføres i henhold til instruktionerne i håndbogen med følgende bemærkninger:

- Vælg protokollen *circDNA_2000_DSP_V1* på QIAasymphony SP-instrumentet (se *QIAasymphony SP Protocol Sheet circDNA_2000_DSP_V1* for at få flere oplysninger om protokollen)
-  Den anbefalede prøvevolumen til *circDNA_2000_DSP* er 2 ml. Vi anbefaler dog at starte med 2,4 ml for at forhindre ekstraheringsfejl under den indledende pipettering som specificeret i "Fejlfindingsguide" i håndbogen til *QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit*. Hvis der er utilstrækkelig prøve, tilsættes sterilt PBS (medfølger ikke) til prøven op til den krævede prøvevolumen, før prøven isættes.
- Brug 60 µl elueringsmængde.
- Se de brugervejledning, der leveres sammen med instrumentet, for at få supplerende oplysninger om QIAasymphony SP-instrumentet.

Protokol: Manuel ccfDNA-ekstrahering fra plasmaprøver

Hvis QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.-nr. 61504) skal anvendes til manuel oprensning, skal DNA-ekstraheringen udføres i henhold til instruktionerne i håndbogen med følgende bemærkninger:

- Oprensning af cirkulerende nukleinsyrer udføres fra 2 ml plasma.
- Til denne protokol kræves der en vakuummanifold (f.eks. QIAvac 24 Plus med QIAvac Connecting System) og en vakuumpumpe, der kan frembringe et vakuum på -900 til -800 mbar (f.eks. QIAGEN Vacuum Pump).
- Brug 60 µl elueringsmængde.

Protokol: gDNA-kvantificering og normalisering

Ting, der skal gøres før start

Hvis du bruger automatiserede ekstraheringsprocedurer, skal du se kolonnen "Validity of result" (Resultatets gyldighed) for hver prøve i QIASymphony SP-resultatfilen, når kørslen er afsluttet:

- Gyldig status: Fortsæt til gDNA-kvantificering.
- Uklar status: Kan behandles afhængig af flagets årsag (se brugervejledningen til QIASymphony SP/AS for at få oplysninger om mulige årsager til "uklare" markeringer).
- Ugyldig status: Prøven afvises. Gentag ekstraheringstrinnet.

Procedure

gDNA ekstraheret fra FFPE-prøver skal kvantificeres.

Hvis den målte koncentration er mindre end 4 ng/μl, skal prøven ekstraheres igen med flere sektioner (med maksimalt otte sektioner på 5 μm eller fire sektioner på 10 μm).

Hvis den målte koncentration er over 6 ng/μl, skal prøven fortyndes til 5 ng/μl med vand til fortynding af prøven, som medfølger i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, efter formlen:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Hvor

C_i: Indledende koncentration af det ekstraherede gDNA

C_f: Endelig målkoncentration = 5 ng/μl

V_f: Endelig volumen nødvendig for at foretage en *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR-kørsel (dvs. 20 μl + ekstra volumen til pipetteringsfejle)

Vi: Det initiale volumen af det ekstraherede gDNA, der skal pipetteres og fortyndes med det vand til fortynding af prøven, som medfølger i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (vandmængde, der skal tilsættes = $V_f - V_i$)

Hver PCR-reaktion er optimeret til 25 ng gDNA fortyndet i et endeligt prøvevolumen på 5 μ l. Når hver prøve skal testes med de fire *EGFR*-reaktionsblandinger, kræves der i alt 100 ng pr. testet prøve.

Bemærk: Sørg for, at den korrekte elueringsbuffer anvendes til at kalibrere kvantificeringsinstrumentet.

ccfDNA ekstraheret fra plasmaprøver skal ikke kvantificeres. Hver PCR-reaktion er optimeret til 5 μ l rent ekstraheret ccfDNA. Når hver prøve skal testes med de fire *EGFR*-reaktionsblandinger, kræves der i alt 20 μ l pr. testet prøve.

Protokol: Vurdering af *EGFR*-mutation med qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrument

Vigtige anvisninger før start

- Sørg for, at operatøren er uddannet i brug af instrumenterne til qPCR. Instrumenttræning kan om nødvendigt gives ved installation (se "Bestillingsinformation", side 109).
- Læs "Forholdsregler" på side 22, og bliv bekendt med alle sættets komponenter, inden udstyret tages i brug.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit skal køres på et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument* ved hjælp af Rotor-Gene AssayManager version 2.1 (eller nyere) kombineret med Gamma Plug-in version 1.0.0 (eller nyere) associeret med den FFPE- eller plasmadedikerede analyseprofil.
- Sørg for at være fortrolig med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, Rotor-Gene AssayManager-softwaren og Gamma Plug-in, før protokollen påbegyndes. Se brugervejledningerne til instrumentet, Rotor-Gene AssayManager og Gamma Plug-in'en for at få detaljerede oplysninger.
- Rotor-Gene AssayManager version 2.1 muliggør automatisk tolkning af PCR-resultaterne. Cyklusparametrene er låst for kørslen.
- Se installationsinstruktionerne i afsnittet "Bilag A: Installation af Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren Gamma Plug-in'et og Import af analyseprofilen" på side 102, hvis Rotor-Gene AssayManager Version 2.1-softwaren, Gamma Plug-in og analyseprofilen anvendes for første gang. Fortsæt med nedenstående instruktioner, hvis Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren, Gamma Plug-in og analyseprofilen allerede er installeret og importeret på computeren.
- Kontrollér kolonnen "Validity of result" (Resultatets gyldighed) for hver prøve i QIA-symphony SP-resultatfilen, når kørslen er gennemført, hvis der anvendes automatiserede ekstraheringsprocedurer. Se "Protokol: gDNA-quantificering og normalisering" på side 40.

* Sørg for, at instrumenterne og udstyret er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger.

- Hvis der anvendes gDNA ekstraheret fra FFPE, skal prøven kvantificeres og fortyndes til 5 ng/μl, se "Protokol: gDNA-kvantificering og normalisering" på side 40.
- Hvis der anvendes ccfDNA ekstraheret fra plasma, skal prøverne anvendes ufortyndet.

Konfiguration af qPCR

Ved brug af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit anbefales det at teste seks DNA-prøver i det samme eksperiment for at optimere brugen af kontrollerne og reaktionsblandingerne. Der kan dog testes op til 16 prøver i samme eksperiment.

Ting, der skal gøres før start

- Nedkøl isætningsblokken (72 x 0,1 ml rør) i et køleskab (2-8 °C).
- Optø alle nødvendige komponenter før hver brug.

Bemærk: Overskrid ikke en time ved stuetemperatur på optøningstrinnet for at undgå eventuel nedbrydning af materialet. Hvis der kræves mere tid, skal komponenterne opbevares ved 2-8 °C i op til otte timer.

- Rengør det bordareal, som skal bruges til klargøring af PCR-blandingen, for at mindske risikoen for skabelon- eller nukleasekontaminering.
- Bland de rør, der indeholder kontroller, primer- og probeblandinger samt PCR-master-blanding i en vortexer (3-5 sekunder), og centrifuger derefter kortvarigt inden brug.

Procedure

1. Klargør de fire PCR-reaktionsblandinger i 1,5 ml eller 2 ml rør (medfølger ikke), dvs. bland hver primer- og probeblanding (T790M- og L861Q-blanding, indsætninger og G719X-blanding, L858R- og C797S-blanding eller deletioner og S768I-blanding) med PCR-master-blanding i henhold til antallet af prøver, der skal behandles.

Det volumen, der kræves til hver komponent i kittet for at fremstille reaktionsblandingerne, er vist i Tabel 4. Det endelige PCR-reaktionsvolumen er 25 μl efter tilsætning af 5 μl DNA-prøve eller kørselskontrolskabelon. Der er inkluderet ekstra volumen for at kompensere for pipetteringsvariationer og muliggøre klargøring af tilstrækkelig reaktionsblanding til det planlagte antal testprøver og kontroller, f.eks. seks prøver plus to kontroller.

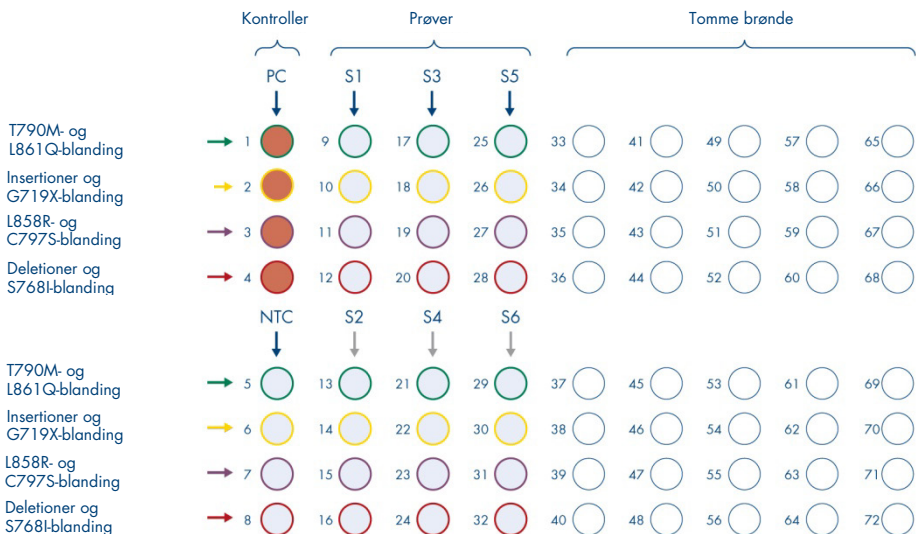
Tabel 4. Klargøring af reaktionsblandinger


Komponent	1 reaktion (µl)	8 + 1 reaktioner (µl)*
EGFR-primer- og probeblanding	7,5	67,5
PCR-masterblanding	12,5	112,5
Samlet volumen for reaktionsblanding	20	180
Fordeling af reaktionsblanding		20 µl pr. rør
Fordeling af testprøve		5 µl pr. rør
Samlet volumen pr. reaktion		25 µl

* Der er inkluderet en ekstra reaktionsvolumen for at kompensere for pipetteringsfejl: en ekstra brønd for op til 10 brønde og to ekstra brønde for op til 20 brønde.

2. Sæt alle *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-komponenter tilbage i fryseren for at undgå eventuel nedbrydning af materiale.
3. Vortex reaktionsblandingerne i 3-5 sekunder, og centrifuger kortvarigt.
4. Placer PCR-båndrørene på en afkølet Loading Block (72 x 0.1 ml Tubes) (isætningsblok), og dispenser 20 µl af EGFR-reaktionsblandingerne pr. båndrør i henhold til konfigurationen af isætningsblokken som vist i Figur 6.

Bemærk: Det anbefales at dispensere 20 µl reaktionsblanding ved hjælp af omvendt pipettering.



Figur 6. Opsætning af isætningsblok til et eksperiment med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit, test af seks prøver. Position 1-32 er som følgende. PC: EGFR-positiv kontrol, NTC: Ikke-skabelon-kontrol (vand), prøve 1 (S1) til prøve 6 (S6): DNA-prøver. Reaktionsblandinger: EGFR T790M- og L861Q-blanding, EGFR-indsætninger og G719X-blanding, EGFR L858R og C797S-blanding, EGFR-sletninger og S768I-blanding. Alle resterende positioner  er tomme brønde.

Bemærk: FFPE- og plasma-DNA-prøverne kan køre i samme eksperiment. Dette kræver kørsel af både FFPE- og Plasma-analyseprofiler i samme eksperiment og et specifikt pladelayout. Se flere oplysninger i Bilag B: Kørsel af FFPE- og plasmaanalyseprofiler i samme eksperiment (side 106).

5. Tilsæt 5 µl vand til NTC i de særlige NTC-rør (Figur 6) for at opnå et samlet volumen på 25 µl. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned. Luk alle rør, der indeholder NTC.
6. Bland alle DNA-prøver og EGFR positive kontroller (PC) i en vortexer, og centrifuger dem kortvarigt. Tilsæt derefter 5 µl prøve eller PC-skabelon i de relevante rør (Figur 6) for at opnå et samlet volumen på 25 µl. Bland forsigtigt ved at pipettere op og ned.
7. Luk alle slanger, og kontrollér, at der ikke er bobler i bunden af rørene.

Bemærk: Skift spids mellem hver skabelontilsætning for at undgå kontaminering.

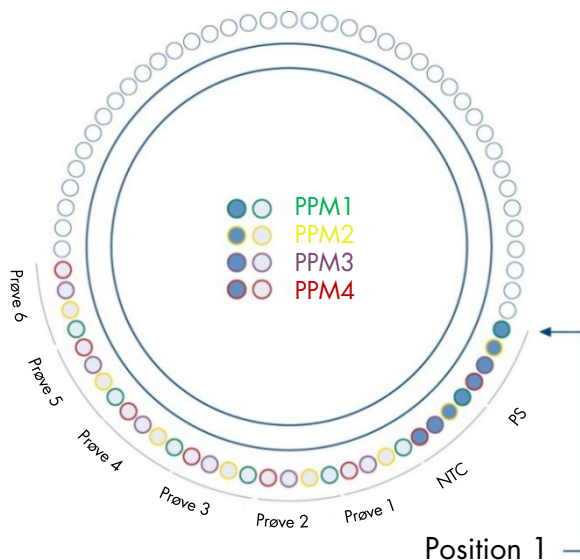
Protokol: Klargøring af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet


- Placer en 72-Well Rotor i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentets Rotor Holder.
- Fyld rotoren med båndrør i henhold til de tildelte positioner, startende ved position 1, som vist i Figur 7.

Bemærk: Sørg for, at det første rør er sat i position 1, og at striprørene er anbragt i den rigtige retning og position som vist.

- Alle ubrugte positioner skal fyldes med tomme striprør med låg.

Bemærk: Vi anbefaler at holde de fire positive kontroller i position 1 til 4 og de fire ingen skabelonkontroller i position 5 til 8, da det automatiske analysekit i analyseprofilerne er baseret på denne organisation. Hvis der anvendes et andet layout, opnås der afvigende eller ugyldige resultater.



Figur 7. **Rotoropsætning til et eksperiment med theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit.** Fra position 1 PC: EGFR-positiv kontrol, NTC: Ingen skabelonkontrol (vand), PPM 1: EGFR T790M og L861Q-blanding, PPM 2: EGFR-insertioner og G719X-blanding, PPM 3: EGFR L858R og C797S-blanding, PPM 4: EGFR-deletioner og S768I-blanding, Prøve 1 til Prøve 6: DNA-prøver. Bemærk: Alle resterende positioner  skal være fyldt med tomme rør.

11. Montér låseringen.

12. Sæt rotoren med låseringen i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Luk instrumentlåget.

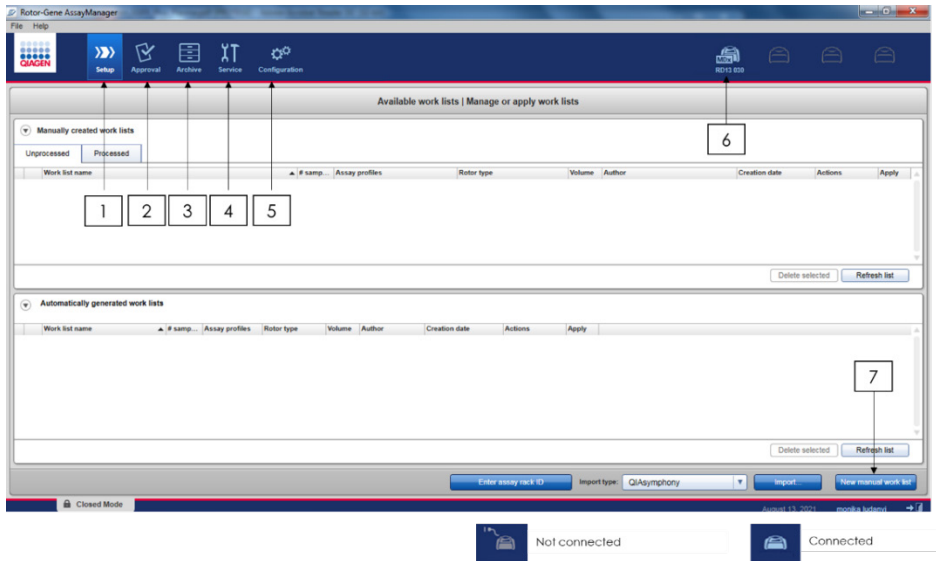
Oprettelse af en arbejdsliste og start af qPCR-kørslen

Bemærk: Arbejdslisten kan oprettes og gemmes, før prøverne klargøres, eller når eksperimentet sættes op på instrumentet, som beskrevet i denne håndbog.

13. Tænd Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

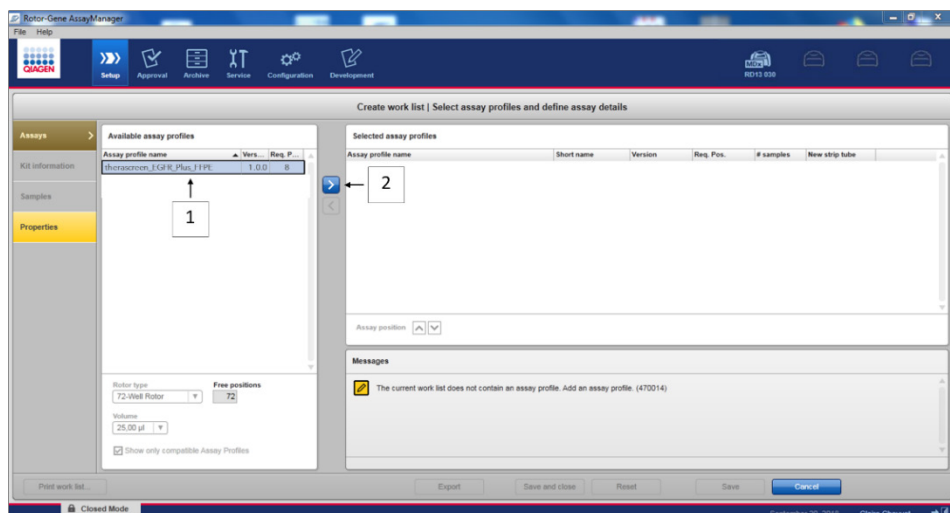
14. Åbning af Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren.

15. Log på som en bruger med rollen Operator (operatør) i lukket tilstand. Klik på OK. Følgende vindue vises.



Figur 8. **Rotor-Gene AssayManager v2.1.** 1 = Fanen Setup (Opsætning). Denne fane gør det muligt at håndtere eller anvende arbejdslistes. 2 = Fanen Approval (Godkendelse). Denne fane gør det muligt at finde tidligere eksperimenter. 3 = Fanen Archive (Arkiv). Denne fane gør det muligt at finde tidligere godkendte eksperimenter. 4 = Fanen Service. På denne fane rapporteres en historikpost for hver fil, der er genereret af softwaren. 5 = Fanen Configuration (Konfiguration). Denne fane gør det muligt at konfigurere alle softwareparametre. 6 = Instrumentikonet Rotor-Gene Q (RGQ) informerer brugeren, om et givent cyklusapparat er tilsluttet. Der kan forbindes op til fire RGQ-instrumenter til den samme computer. 7 = New manual work list (Ny manuel arbejdsliste).

16. Kontrollér, at RGQ registreres korrekt af softwaren, før kørslen startes. Se "Cycler Environment" (Cyklusmiljø) i *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* for at få flere oplysninger.
17. Klik på "New manual work list" (Ny manuel arbejdsliste) i arbejdslisteoversigten (miljøet "Setup" (Opsætning)) (Figur 8).
18. Vælg den relevante EGFR-analyseprofil fra listen over tilgængelige analyseprofiler:
 - Til test af gDNA-prøver fra FFPE: theascreen_EGFR_Plus_FFPE
 - Til test af ccfDNA-prøver fra plasma: theascreen_EGFR_Plus_Plasma



Figur 9. Sådan vælges en analyseprofil. 1 = Tilgængelige analyseprofiler, 2 = Overførsel af analyseprofil til arbejdsliste

Bemærk: Det er muligt at køre både FFPE- og plasmaanalyseprofilerne i samme eksperiment. Se flere oplysninger i Bilag B: Kørsel af FFPE- og plasmaanalyseprofiler i samme eksperiment på side 106.

19. Klik på Move (Flyt) for at overføre den valgte analyseprofil til listen Selected assay profiles (Valgte analyseprofiler).
20. Angiv antallet af prøver i det tilsvarende felt.



Figur 10. Oprettelse af arbejdslisten: definition af analyseoplysninger. 3 = Antal prøver

Bemærk: Antallet af prøver svarer ikke til antallet af rør og indeholder ikke kontroller.

21. Vælg fanen "Kit Information" (kitoplysninger). Indtast følgende oplysninger om EGFR-kittet, som er trykt på mærkatene på kassen til *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR kit:

- Materialenummer: 1114551
- Gyldig udløbsdato
- Lotnummer

The screenshot shows the 'Create work list | Edit Kit information' window. On the left, a sidebar has tabs for 'Assays', 'Kit information', 'Samples', and 'Properties'. The 'Kit information' tab is active. The main area shows the assay name 'therascreen_EGFR_Plus_FFPE' and two radio buttons: 'Use kit bar code' (unselected) and 'Enter kit information manually' (selected). Below this is a 'Kit information' section with three input fields: 'Kit bar code', 'Material number', and 'Lot number'. The 'Kit expiry date' field is a date picker. Arrows point from boxes labeled 4, 5, 6, and 7 to these fields respectively. On the right, a 'Messages' panel displays three error messages with yellow warning icons.

Figur 11. **Oprettelse af arbejdslisten: Rediger kitoplysninger.** 4 = Kitsregkode. Denne fane angiver stregkoden for kittet (hvis stregkoden indlæses, udfyldes de andre felter automatisk). 5 = Materialenummer. 6 = Kitudløbsdato. 7 = Lot-nummer. Disse oplysninger findes på kittets kasse.

Bemærk: Alle felter skal udfyldes og blive blå, når der indtastes gyldige oplysninger.

22. Vælg fanen "Samples" (prøver). Der vises en liste med prøveoplysninger. Denne liste repræsenterer det forventede layout af rotoren.

23. Indtast prøveidentifikationen samt eventuelle valgfri prøveoplysninger i denne liste som en kommentar til hver prøve.

Bemærk: Feltet "is editable" (kan redigeres) (Figur 13) definerer, om arbejdslisten stadig kan redigeres. Så hvis arbejdslisten er gældende og ikke efterfølgende skal ændres, skal dette felt ryddes.

Bemærk: Arbejdslisten kan anvendes direkte eller gemmes og køres senere.

25. Markér afkrydsningsfeltet for at angive, at arbejdslisten er komplet (kan anvendes).

26. Gem arbejdslisten.

Valgfrit: Arbejdslisten kan udskrives, og dette kan være en hjælp ved klargøringen og opsætningen af qPCR. Tryk på knappen Print work list (Udskriv arbejdsliste) for at udskrive arbejdslisten. Prøveoplysningerne medtages som en del af denne arbejdsliste.

27. Vælg den tilsvarende arbejdsliste på arbejdslistemanageren, og klik på "Apply" (Anvend). Alternativt kan du klikke Apply (Anvend), hvis arbejdslisten stadig er åben.

28. Indtast eksperimentnavnet i feltet Experiment name (Eksperimentnavn).

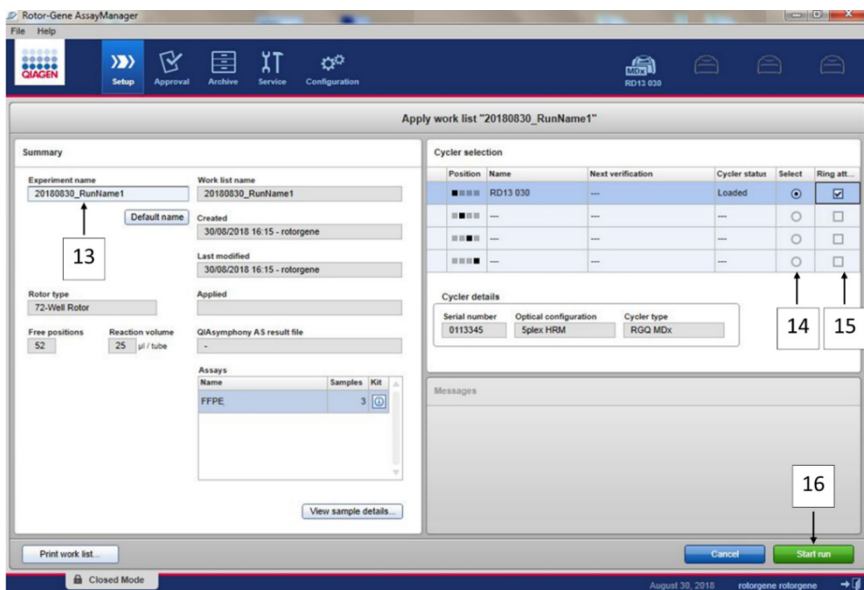
29. Vælg det cyklusapparat, der skal bruges, i listen Cycler selection (Vælg cyklusapparat).

Bemærk: Der skal anvendes et Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrument*.

30. Sørg for, at låseringen er korrekt påsat, og markér afkrydsningsfeltet Ring Attached (Låsering påsat).

31. Klik på Start run (Start kørsel). qPCR-kørslen starter (Figur 14).

* I nogle lande kan Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumentet med produktionsdatoen maj 2011 eller senere om nødvendigt anvendes. Produktionsdatoen findes under serienummeret på bagsiden af instrumentet. Serienummeret findes i formatet "mmåånnn", hvor "mm" står for produktionsmåneden i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den entydige instrumentidentifikator.



Figur 14. **Kørselsstart.** 13 = Indtast eksperimentnavn, 14 = Valg af cyklusapparat; 15 = Bekræft, at låsringen er påsat, 16 = Klik på Start run (Start kørsel) for at starte kørslen.

Frigivelse og rapportering af qPCR-resultater

Den generelle funktionalitet for godkendelsesmiljøet er beskrevet i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

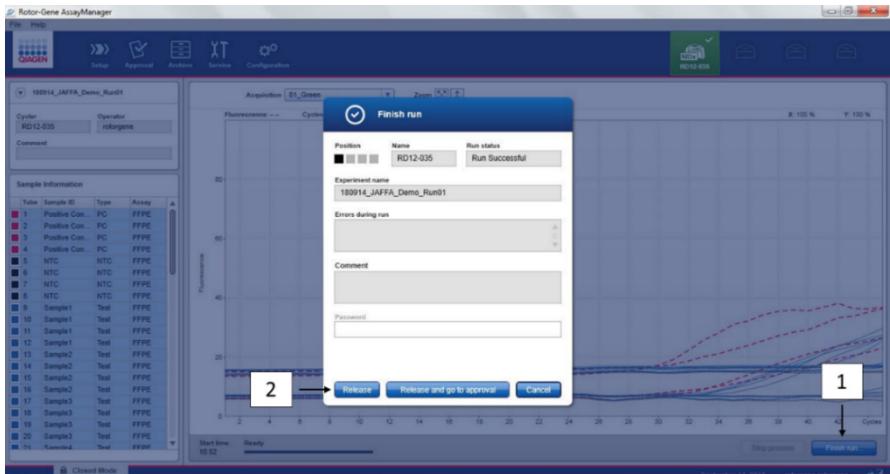
Når en kørsel er færdig, og cyklusapparatet er slukket, gemmes eksperimentet i den interne database. Analysen af de indsamlede data udføres automatisk afhængigt af det plugin, der svarer til analyseprofilen, og de regler og parameterværdier, der er defineret af analyseprofilen.

32. Klik på Finish run (Afslut kørsel), når kørslen er fuldført (Figur 15).

Bemærk: Indtil dette trin er afsluttet, gemmes eksperimentet ikke i den interne database.

33. Frigiv og godkend kørslen.

- En bruger, der er logget ind med rollen Approver (Godkender), skal klikke på Release and go to approval (Frigiv og fortsæt til godkendelse).
- En bruger, der er logget ind med rollen Operator (Operatør), skal klikke på Release (Frigiv).



Figur 15. Afslutning af kørslen. Finish run (Afslut kørsel) (1) og Release run (Frigiv kørsel) (2)

34. Resultater af frigivelse.

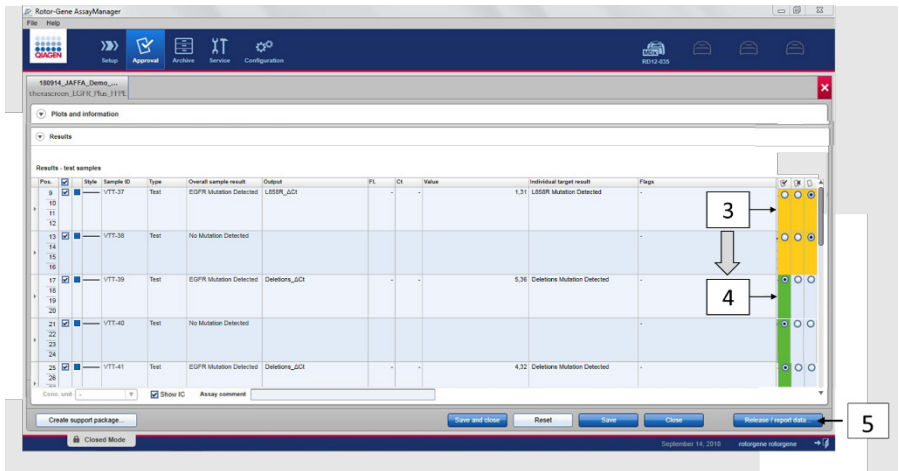
- Hvis der blev klikket på "Release and go to approval" (Frigiv og gå til godkendelse), vises resultaterne af eksperimentet i miljøet "Approval" (Godkendelse).
- Hvis der blev klikke på Release with a user role (Frigiv med en brugerrolle), skal der logge en bruger med rollen Approver (Godkender) ind og vælge miljøet Approval (Godkendelse).

35. Filtrer analysen, der skal godkendes ved at vælge filtreringsindstillingerne og klikke på Apply (Anvend). Vælg den ønskede analyse på listen over filtrerede analyser ved hjælp af afkrydsningsfeltet, og klik på Start Approval (Start godkendelse).

36. Godkend eller afvis prøverne ved hjælp af alternativknapperne (Figur 16).

Bemærk: Prøver kan afvises i tilfælde af operatørens håndteringsfejl eller usædvanlige kurver (artefakt).

37. Gennemse resultaterne, og klik på Release/Report data (frigiv/rapporter data).



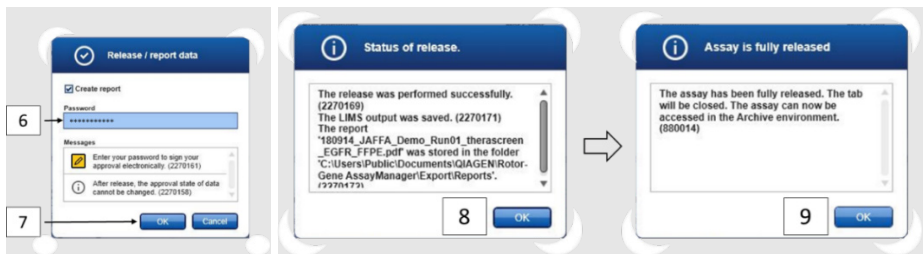
Figur 16. **Gennemse og frigiv data.** Gennemse og godkend (ü) eller afvis (û) resultaterne af prøverne: Hvis dataene godkendes, feltets farve skifter fra gul til f.eks. grøn (3, 4). Klik derefter på "Release/report data" (frigiv/rapporter data) (5).

38. Indtast om nødvendigt en adgangskode, og klik på OK. Rapporten genereres i Adobe Portable Document-format (.pdf) og gemmes automatisk i den foruddefinerede mappe. Standardmappestien er C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\Reports.

Bemærk: Stien og mappen kan ændres i miljøet Configuration (Konfiguration).

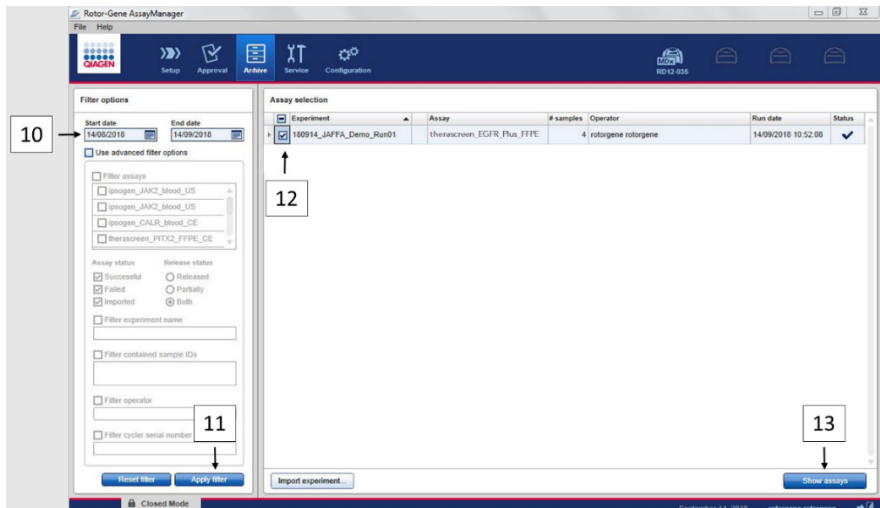
Bemærk: Samtidig oprettes og gemmes der automatisk en LIMS-fil i den foruddefinerede mappe. Standardmappestien er C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\LIMS

39. Luk pdf-filen, og vend tilbage til Rotor-Gene AssayManager. Klik OK til alle spørgsmål.



Figur 17. **Release/Report data** (Frigiv/rapportér data). Indtast adgangskode (6), og klik på OK (7). Der genereres og åbnes en PDF-rapport. Luk PDF-rapporten: der genereres automatisk en LIMS-fil, og der vises en frigivelseserklæring. Klik på OK (8). Analysen er nu fuldt frigivet: Klik på OK for at gå til miljøet Archive (Arkiv) (9).

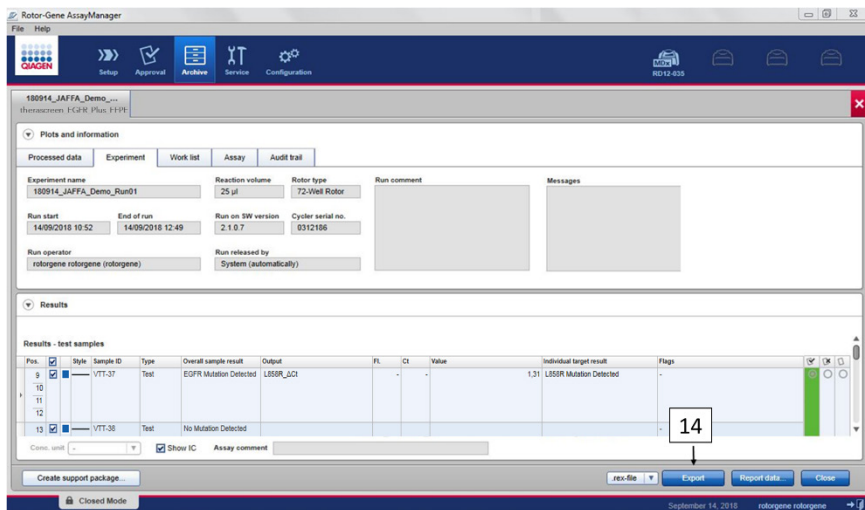
40. Gå til Archive (Arkiv) for at eksportere .rex-filen med rådata. Find eksperimentet vha. filtreringen, og klik på "show assays" (vis analyser) (Figur 18)



Figur 18. **Valg af eksperiment i miljøet Archive (Arkiv)**. Filtrér f.eks. efter dato (10) og anvend filteret (11). Vælg eksperimentet (12), og klik derefter på "Show assays" (vis analyser) (13).

41. Klik på Export .rex file (Eksporter .rex-fil), og klik på OK for at gemme.

Bemærk: Det er muligt at vælge, hvor .rex-filen skal gemmes (standardstien er C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\Experiments forClosedMode). Denne sti og mappe kan også ændres på fanen "Specify the .rex file export destination" (Angiv eksportdestination for .rex-fil).



Figur 19. Eksporterer .rex-filen ved at klikke på knappen "Export" (Eksporter) (14).

Bemærk: Der kræves en supportpakke fra kørslen for at få hjælp med fejlfinding fra QIAGENS tekniske supportafdeling. Supportpakker kan oprettes fra miljøerne "Approval" (Godkendelse) eller "Archive" (Arkiv). Se afsnittet "Creating a support package" (Oprettelse af en supportpakke) i brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application for at få flere oplysninger.

Udover supportpakken kan historikposten fra ±1 dag fra tidspunktet for en hændelse muligvis være til nytte. Historikposten kan hentes i miljøet "Service". Der står flere oplysninger i brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application.

42. Tøm Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet, og bortskaf stripbrørene i henhold til de lokale sikkerhedsregler.

Fortolkning af resultater [hvis relevant]

Analyse af resultaterne fra *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit for hver kontrol og prøve udføres automatisk af Rotor-Gene AssayManager v2.1 sammen med Gamma Plug-in v1.0 og EGFR-analyseprofilerne.

EGFR-analyseprofilerne analyserer amplifikationskurver og kan ugyldiggøre ikke-overensstemmende kurver, afhængigt af deres form og støjamplitude. Hvis dette er tilfældet, vil der blive knyttet et flag til den ugyldiggjorte kurve (se Tabel 6 på side 62).

Kontroller

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserer kørselskontrollerne:

- NTC kontrolleres for manglende specifik amplifikation.
- Gyldigheden af den positive kontrol forudsætter overholdelse af CT-værdier med foruddefinerede specifikationer.
- Hvis nogen af disse kørselskontroller ikke er i overensstemmelse, udløses flaget "ASSAY_INVALID". Hvis dette flag udløses, anses kørslen for at være ugyldig, og eksperimentet skal udføres igen (beslutningsdiagrammet for gentest præsenteres i Figur 20).
- **Bemærk:** Den rapport, der genereres efter kørslen, viser de resultater, der er opnået på kørselskontroller med ugyldiggørende flag (se Tabel 6 på side 62) foran ugyldige data.

Hvis alle kontrollerne i kørslen er i overensstemmelse, analyserer Rotor-Gene AssayManager v2.1 testprøverne. DNA-prøver fra både FFPE og plasma analyseres efter den samme proces, men med specifikke kriterier registreret i de respektive analyseprofiler.

Prøver

Exon 2 Intern kontrol

Gyldigheden af exon 2 intern kontrol forudsætter overholdelse af CT-værdier med foruddefinerede specifikationer. Den interne kontrol skal være gyldig, for at prøveresultaterne kan fortolkes. En gyldig intern kontrol angiver tilstrækkelig DNA-input og kvalitet samt manglende interfererende stoffer. Se beslutningsdiagrammet i Figur 20 i tilfælde af ugyldighed.

Påvisning af EGFR-mutation

Manglende tilstedeværelse af EGFR-mutationer i hver testprøve vurderes baseret på delta Ct mellem mutantamplifikationen og den interne kontrolamplifikation (målene T790M_ΔCt, L861Q_ΔCt osv.) for FFPE-prøver og baseret på mutantamplifikationen for plasmaprøver (CT).

Semikvantificering af EGFR-mutationer

En semikvantitativ vurdering af koncentrationen af mutationer i ccfDNA fra plasma angives for de omfattede mål (angivet i Oversigt og forklaring) i form af nedre og øvre grænse i et interval. Antallet af mutante kopier pr. milliliter plasma vurderes, dvs. de nedre og øvre grænser i et interval angives med målene T790M_CN_LL, L861Q_CN_LL, osv.

Resultaterne af hvert mål vises i kolonnen "Result" (Resultat) i rapporten.

Konklusionen på analysen for hver prøve vises i kolonnen Overall Sample Result (samlet prøveresultat) i rapporten (Tabel 5).

Table 5. Generelle prøveresultater og -handlinger

Generelt prøveresultat	Prøvetype	Beskrivelse	Handling
Valid (Gyldig)	Kontrol (Positiv kontrol, NTC)	Kontrollen er gyldig	Ikke relevant
Invalid* (Ugyldig)	Kontrol (Positiv kontrol, NTC)	Kontrollen er ugyldig (CT-værdien er uden for det foruddefinerede acceptable område)	Gentag hele kørslen (dvs. alle fire EGFR-reaktionsblandinger, alle prøver)
EGFR Mutation Detected (EGFR-mutation påvist)**	Testprøve	Der er påvist mindst én EGFR-mutation†	Ikke relevant
"No Mutation Detected" (ingen mutation påvist)**	Testprøve	Ingen EGFR-mutation påvist	Ikke relevant
Invalid (Ugyldig) (tilknyttet flaget ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE)‡	Testprøve	Den påviste CT-værdi er under det acceptable område for den interne kontrol. DNA-input er muligvis for højt.	Fortynd prøven før gentest. Gentest de/den pågældende prøver med alle fire EGFR-reaktionsblandinger i en ny qPCR-kørsel.
Invalid (Ugyldig) (tilknyttet flaget ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE)‡	Testprøve	Den påviste CT-værdi er over det acceptable område for den interne kontrol. Prøven indeholder muligvis ikke tilstrækkelig DNA, der kan forstærkes, eller indeholder muligvis en hæmmer.	Gentest de/den pågældende prøver med alle fire EGFR-reaktionsblandinger i en ny qPCR-kørsel. Hvis prøven allerede var gentestet én gang før, gentages ekstraheringsstrinnet og gentestes i en ny qPCR-kørsel. Hvis der er mistanke om tilstedeværelse af hæmmer, skal prøven muligvis fortyndes før gentesten (kun for plasma). Se Tabel 6 på side 62 for at få yderligere oplysninger.

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen fortsat fra foregående side

Tabel 5. Generelle prøveresultater og -handling (fortsat)

Generelt prøveresultat	Prøvetype	Beskrivelse	Handling
Invalid (Ugyldig) (tilknyttet flaget ASSAY_IC_NO_CT_VALUE) [§]	Testprøve	Intet signal detekteret for den interne kontrol.	Gentest de/den pågældende prøver med alle fire EGFR- reaktionsblandinger i en ny qPCR-kørsel.
Invalid (Ugyldig) (andet)	Testprøve	Ugyldighed, som skyldes kurveanomali eller andre årsager (se Tabel 6 på side 62)	Hvis prøven allerede var gentestet én gang før, gentages ekstraheringsstrinnet og gentestes i en ny qPCR-kørsel. Hvis der er mistanke om tilstedeværelse af hæmmer, skal prøven muligvis fortyndes før gentesten (kun for plasma). Se Tabel 6 på side 62 for at få yderligere oplysninger

* Når kontroller er ugyldige, vises de ugyldige CT-værdier i firkantede parenteser til orientering.

** For mutationer i omfanget af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (angivet i Tabel 1)

† Se kolonnen med måleresultater (f.eks. T790M detekteret) for at få oplysninger om identifikation af påviste EGFR-mutation(er) i ΔCt -mål (f.eks. T790M ΔCt). For resultater af semikvantificering (antal kopier pr. milliliter plasma for ccfDNA) henvises til målene X_CN_LL and X_CN_UL (hvor X = mutationsnavn), kolonneværdi, for at få de nedre og øvre grænser for intervallet for semikvantificering.

Bemærk: og ASSAY står for T790M_L861Q/INSERTIONS_G719X/L858R_C797S/DELETIONS_S768I

Flag

Ugyldige resultater er knyttet til flag, der vises i kolonnen Flag i rapporten for Rotor-Gene AssayManager.

Ugyldiggørende prøveflag, der kan være tildelt en prøve eller et mål under analysen af Rotor-Gene AssayManager v2.1, er defineret i Tabel 6. Du kan få oplysninger om universelle flag i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

Tabel 6. Definition af flag

Flag	Beskrivelse
ANALYSIS_FAILED	Analysen er sat til ugyldig, fordi analysen mislykkedes. Kontakt QIAGENs Teknisk Service
ASSAY_INVALID	Prøven er ugyldig, fordi mindst én ekstern kontrol er ugyldig.
CONSECUTIVE_FAULT	Et mål, der anvendtes til beregningen af dette mål, er ugyldigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Rådataene for amplifikationskurven har en facon der afviger fra den fastlagte adfærd for denne analyse. Der er en høj sandsynlighed for forkerte resultater eller fejlfortolkning af resultater.
FLAT_BUMP	Amplifikationskurven for rådata har en facon som ligner en flad bule og afviger fra den fastlagte adfærd for denne analyse. Der er høj sandsynlighed for ukorrekte resultater eller fejlfortolkning af resultater (f.eks. forkert bestemmelse af C_T -værdi).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Den procentvise fluorescensændring for denne prøve i forhold til prøverøret med den største fluorescensændring er lavere end den definerede grænse.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Amplifikationskurven krydser tærsklen mere end én gang. En utvetydig C_T kan ikke fastslås.
TARGET_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE*	Et ugyldigt signal er påvist i kontrollen for ingen skabelon
OTHER_TARGET_INVALID	Et andet mål for den samme prøve er ugyldigt.
ASSAY_IC_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE& ASSAY_IC_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE&	Den påviste C_T -værdi er uden for det acceptable område for den interne kontrol i Positive Control-røret.
ASSAY_IC_PC_NO_CT_VALUE&	Intet signal påvist for den interne kontrol i Positive Control-røret.
TARGET_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE** TARGET_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE**	Den påviste C_T -værdi er uden for det acceptable område for en mutationsanalyse i Positive Control-røret.

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen fortsat fra foregående side

Table 6. Definition af flag (fortsat)

Flag	Beskrivelse
TARGET_PC_NO_CT_VALUE**	Intet signal påvist for målkanalen i Positive Control-røret.
RUN_FAILED	Ugyldig analyse er indstillet til ugyldig pga. et problem med cyklusapparatet eller tilslutningen til cyklusapparatet.
RUN_STOPPED	Ugyldig analyse er indstillet til ugyldig, fordi kørslen blev stoppet manuelt.
ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE&	Den påviste C _T -værdi er under det acceptable niveau for den interne kontrol i en testprøve. DNA-input er muligvis for højt: fortynd prøven inden gentest.
ASSAY_IC_NO_CT_VALUE&	Intet signal detekteret for den interne kontrol i en testprøve.
ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Den påviste C _T -værdi er over det acceptable område for den interne kontrol i en testprøve. Prøven indeholder muligvis ikke tilstrækkelig DNA, der kan forstærkes, eller indeholder muligvis en hæmmer.
SATURATION	Rådatafluorescensen mættes kraftigt før amplifikationskurvens knæpunkt.
SPIKE	En spids i rådatafluorescensen påvises i amplifikationskurven men uden for området, hvor CT bestemmes.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	En spids blev påvist i amplifikationskurven ved siden af C _T .
NO_BASELINE	Der er ikke fundet nogen første baseline. Den efterfølgende analyse kan ikke udføres
STEEP_BASELINE	En skarp stigning i baseline for rådatafluorescensen er påvist i amplifikationskurven.
STRONG_BASELINE_DIP	Et skarpt fald i baseline for rådatafluorescensen er påvist i amplifikationskurven.

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen fortsat fra foregående side

Tablet 6. Definition af flag (fortsat)

Flag	Beskrivelse
STRONG_NOISE	Kraftig støj blev påvist uden for vækstfasen af amplifikationskurven.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Kraftig støj blev påvist i vækstfasen (eksponentiel) af amplifikationskurven.
TARGET_ΔCT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	Det påviste ΔC _T er lavere end forventet for målet for en testprøve med en mutationsreaktionsblanding
TARGET_CT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	Det påviste C _T er lavere end forventet for målet for en testprøve med en mutationsreaktionsblanding
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	En bølgeformet baseline for rådatafluorescensen er påvist i amplifikationskurven.

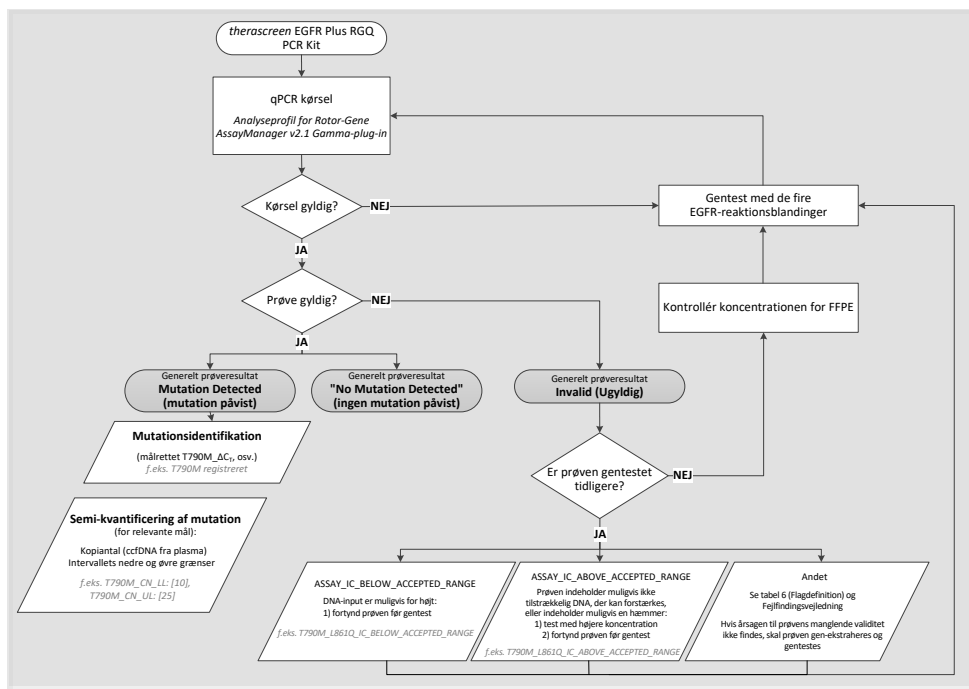
* MÅLET står for T790M, L861Q, T790M_L861Q_IC, INSERTIONS, G719X, INSERTIONS_G719X_IC, L858R, C797S, L858R_C797S_IC, DELETIONS, S768I, DELETIONS_S768I_IC

** MÅLET står for T790M, L861Q, INSERTIONS, G719X, L858R, C797S, DELETIONS, S768I & ASSAY stands for T790M_L861Q/INSERTIONS_G719X/L858R_C797S/DELETIONS_S768I

Gentest

I tilfælde af ugyldige resultater henvises til "Fejlfindingsvejledning", side 94, for at afklare årsagen til fejlen og muligvis identificere eventuelle fejl, der skal udbedres.

Proceduren for gentests er opsummeret i Figur 20.



Figur 20. Beslutningsdiagram for theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit.

Hvis en eller flere kørselskontroller er ugyldige, skal kørslen gentages med de fire EGFR-reaktionsblandinger. Hvis f.eks. den positive kontrol ikke opfylder validitetskriterierne for T790M- og L861Q-blandingen, men er gyldig for alle andre EGFR-reaktionsblandinger, skal de fire blandinger testes igen med alle prøver.

Hvis en eller flere prøver er ugyldige, skal de pågældende prøver gentestes med de fire EGFR-reaktionsblandinger. Afhængigt af det flag, der vises af RGAM, skal prøven fortyndes før gentest eller gentest den med højere koncentration.

Hvis årsagen til prøvens manglende validitet ikke findes:

- Kontrollér, at prøverne håndteres og opbevares som beskrevet i afsnittet "Prøveopbevaring og -håndtering".
- Genudtræk din FFPE-prøve med flere sektioner før gentest.
- Genudtræk din FFPE-prøve ved at vælge en større tumorzone før gentest.
- Bemærk, at alle ydelser er fastslået ved hjælp af DNA ekstraheret fra FFPE ved 5 ng/μl og/eller 5 μl ren ccfDNA ekstraheret fra plasma.

Se "Fejlfindingsvejledning" på side 94 for at få andre forklaringer af prøvers ugyldighed.

Begrænsninger

De fremkomne resultater ved brug af produktet skal fortolkes i forbindelse med alle relevante kliniske fund eller laboratoriefund og må ikke bruges som eneste grundlag for en diagnose.

Produktet skal anvendes af professionelt laboratoriepersonale, der er uddannet i molekylærbiologiske procedurer, i in vitro-diagnostiske procedurer og i brugen af QIASymphony SP system, Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet, Rotor-Gene AssayManager og Gamma plug-in'et.

Produktet er kun beregnet til brug på et Rotor-Gene Q MDx real-time PCR-cyklusapparat, 5plex HRM-serien kombineret med Rotor-Gene AssayManager-software og Gamma plug-in'et med anvendelse af særlige *therascreen* EGFR Plus-analyseprofiler.

Vi anbefaler brugen af Deparaffinization Solution (herunder RNase A-behandling), QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit, QIASymphony DSP DNA Mini Kit og QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit Instructions for Use skal følges fuldstændigt for at opnå optimale resultater. Fortyndning af reagenserne anbefales ikke, undtagen som det er beskrevet i denne håndbog, da det vil medføre tab af ydelse. Alle reagenser, der leveres med *therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit*, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme kit. Brug af reagenser fra forskellige kitlots inden for samme kørsel kan påvirke ydelsen.

Det er vigtigt, at mængden af gDNA fra FFPE-prøven vurderes, inden prøven analyseres ved hjælp af *therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit*. Ekstraheringsproceduren skal gentages, hvis der ikke er tilstrækkelig gDNA til mutationsanalyse. Hvis koncentrationen er for høj til mutationsanalyse, skal gDNA fortyndes.

Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit er kun valideret til plasma indsamlet i 2K EDTA og FFPE fra NSCLC-patienter.

Enhver brug til andre formål end de tiltænkte af dette produkt og/eller komponentændringer gør, at QIAGENs garanti bortfalder.

Ydelseskarakteristika

Tomgrænse

Tomgrænsen (Limit of Blank, LOB) blev fastsat ud fra 77 NSCLC EGFR vildtype-FFPE-prøver og 75 plasmaprøver fra raske donorer (mindst 60 målinger pr. reagenslot, tre *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lots anvendt). LOB blev bestemt ved hver given analyse som den lavest opnåede LOB-værdi. LOB-resultaterne er opsummeret i Tabel 7.

Tabel 7. Resumé af tomgrænseresultater for *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kits

EGFR-mål	FFPE LoB (ΔCt)	Plasma LoB (ΔCt)
T790M	11,49	40,23
L861Q	15,31	35,54
Insertioner	11,32	38,42
G719X	14,47	45,00
L858R	10,52	37,54
C797S	15,06	45,00
Deletioner	14,15	45,00
S768I	14,64	45,00

Raten af falske positive er under 1 % for alle EGFR-mål undtagen L858R i FFPE (1,2 %) og for insertioner i plasmaprøver (1,08 %)

Påvisningsgrænse

Påvisningsgrænsen (Limit of Detection, LoD) for hver af de 42 EGFR-mutationer blev påvist på EGFR-lave positive FFPE- og plasmaprøver (tre *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lots anvendt). LOD-resultaterne er opsummeret i Tabel 8.

Tabel 8. Resumé af påvisningsgrænserelementerne for *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit

Exon	Mutation	COSMIC-id	Basisændring	FFPE Mutantprocent	Plasma Kopi pr. ml
18	G719A	6239	c.2156G>C	5,09%	794
	G719S	6252	c.2155G>A	35,00%	149
	G719C	6253	c.2155G>T	1,10%	161
19	Deletioner	26038	c.2233_2247del15	2,02%	100
		13550	c.2235_2248>AATTC	0,61%	75
		6223	c.2235_2249del15	0,54%	75
		6225	c.2236_2250del15	0,74%	75
		18427	c.2237_2257>TCT	1,00%	75
		6220	c.2238_2255del18	0,22%	75
		12367	c.2237_2254del18	0,80%	75
		12384	c.2237_2255>T	0,36%	75
		12678	c.2237_2251del15	0,25 %	75
		13551	c.2235_2252>AAT	0,65%	75
		13552	c.2235_2251>AATTC	1,00%	75
		12386	c.2237_2252>T	0,78%	75

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen fortsat fra foregående side

Tablet 8. Resumé af påvisningsgrænsereultatene for thetascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit (fortsat)

Exon	Mutation	COSMIC-id	Basisændring	FFPE Mutantprocent	Plasma Kopi pr. ml
19	Deletioner	12416	c.2237_2253>TTGCT	0,60%	75
		12728	c.2236_2253del18	0,79%	75
		12422	c.2238_2248>GC	0,79%	100
		12382	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	2,99%	589
		6218	c.2239_2247delTTAAGAGAA	35,00%	1100
		12387	c.2239_2258>CA	0,93%	75
		12370	c.2240_2257del18	0,77%	75
		12403	c.2239_2256>CAA	0,92%	75
		6255	c.2239_2256del18	0,16%	75
		12383	c.2239_2251>C	0,72%	75
		12419	c.2238_2252>GCA	0,40%	75
		6210	c.2240_2251del12	0,92%	75
		23571	c.2238_2252del15	1,10%	75
		12369	c.2240_2254del15	0,78%	75
		13556	c.2253_2276del24	0,89%	75
		12385	c.2235_2255>AAT	0,71%	75

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen fortsat fra foregående side

Tablet 8. Resumé af påvisningsgrænseresultaterne for *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (fortsat)

Exon	Mutation	COSMIC-id	Basisændring	FFPE Mutantprocent	Plasma Kopi pr. ml
20	S768I	6241	c.2303G>T	0,69%	167
	Insertioner	12376	c.2307_2308insGCCAGCGTG	0,76%	150
		12378	c.2310_2311insGGT	3,04%	131
		12377	c.2319_2320insCAC	0,64%	51
		13428	c.2311_2312insGCGTGGACA	0,76%	100
		13558	c.2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	0,89%	100
	T790M	6240	c.2369C>T	1,80%	174
	C797Sa	6493937	c.2389T>A	1,11%	126
	C797Sb	5945664	c.2390G>C	0,62%	125
	21	L858R	6224	c.2573T>G	0,75%
L861Q		6213	c.2582T>A	0,65%	43

DNA-input

Den optimerede gDNA-input til brug i kombination med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit blev evalueret på EGFR-positive FFPE-prøver for ni EGFR-mål (T790M, L861Q, G719A, G719C, G719S, L858R, C797Sa, C797Sb og S768I) (tre forskellige gDNA-input, ti målinger pr. input-prøve, et *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot anvendt). Resultaterne viste, at det optimerede input, der skal anvendes, er 25 ng (5 ng/µl).

Det optimerede ccfDNA-input til brug i kombination med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit blev ikke evalueret på plasmaprøver.

Repetierbarhed

Repetierbarheden blev bestemt på en EGFR-positiv og en negativ FFPE- og plasmaprøve. For hver EGFR-analyse blev repetierbarheden vurderet på en given EGFR-mutation, testet på to niveauer af mutation (mellemstor og lav). Hvert niveau blev testet i to eksemplarer på mindst 43 kørsler foretaget over 20 dage med minimum 78 målinger pr. mutationsniveau og pr. analyse (tre Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter, tre operatører, tre *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lots anvendt). Den kvantitative analyse af repetierbarhedsresultaterne er opsummeret i Tabel 9 for FFPE-prøver og i Tabel 10 for plasmaprøver.

Tabel 9. Resumé af repeterbarhedsresultaterne for theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit på FFPE-prøver

EGFR Plus Mix	EGFR Plus target	Testet mutationsniveau	Mellem operatører		Mellem instrumenter		Mellem kitlot		Mellem dage		Mellem kørsler		Inden for kørsel		I alt	
			SD*	CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	lav	0,04	0,51	0,11	1,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	4,13	0,17	2,08	0,4	4,84
		middel	0,05	1,03	0,14	2,63	0,00	0	0,00	0,00	0,34	6,41	0,18	3,43	0,41	7,8
	L861Q	lav	0,00	0,00	0,36	8,14	0,00	0,00	0,00	0	0,34	7,63	0,26	5,9	0,56	12,62
		middel	0,00	0,00	0,23	11,27	0,03	1,27	0,00	0	0,35	16,92	0,21	10,02	0,47	22,7
	Vildtype	Ikke relevant	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,81	0,00	0	0,4	1,59	0,11	0,45	0,46	1,84
	Ins_G719X	Insertioner	lav	0,15	3,10	0,23	4,55	0,30	6,00	0,00	0	0,64	12,93	0,35	6,97	0,83
middel			0,00	0,00	0,23	11,95	0,21	10,79	0,29	15,29	0,49	25,23	0,17	8,59	0,67	34,69
G719X		lav	0,00	0,00	0,52	9,14	0,48	8,49	0,55	9,7	0,78	13,78	0,27	4,74	1,21	21,5
		middel	0,00	0,00	0,49	13,33	0,48	12,82	0,52	14,06	0,63	17,02	0,33	8,84	1,12	30,13
Vildtype		Ikke relevant	0,00	0,00	0,27	1,05	0,28	1,12	0,21	0,81	0,72	2,83	0,18	2,83	0,86	3,39
L858R_C797S		L858R	lav	0,00	0,00	0,41	5,76	0,21	2,93	0,43	6,02	0,23	3,25	0,41	5,74	0,79
	middel		0,16	3,40	0,38	8,28	0,00	0,00	0,45	9,72	0,24	5,32	0,38	8,29	0,76	16,48
	C797S	lav	0,00	0,00	0,52	9,13	0,24	4,19	0,00	0	0,22	3,82	0,31	5,35	0,69	12
		middel	0,00	0,00	0,35	11,31	0,29	9,23	0,26	8,5	0,36	11,72	0,21	6,69	0,67	21,62
	Vildtype	Ikke relevant	0,20	0,79	0,29	1,11	0,15	0,59	0,44	1,72	0,4	1,58	0,21	0,83	0,74	2,92
	Del_S768I	Deletioner	lav	0,17	3,10	0,16	2,85	0,00	0,00	0,00	0	0,39	6,95	0,24	4,41	0,51
middel			0,20	5,91	0,24	7,14	0,00	0,00	0,00	0	0,42	12,64	0,15	4,53	0,54	16,31
S768I		lav	0,06	0,74	0,35	4,43	0,35	4,43	0,18	2,32	0,42	5,36	0,25	3,2	0,72	9,18
		middel	0,15	2,58	0,27	4,64	0,34	5,82	0,32	5,38	0,31	5,25	0,24	4,17	0,68	11,66
Vildtype		Ikke relevant	0,00	0,00	0,14	0,56	0,28	1,12	0,26	1,02	0,32	1,26	0,15	0,61	0,54	2,13

* SD: Standardafvigelse

** %CV: Variationskoefficient

Tabel 10. Resumé af repeterbarhedsresultaterne for theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit på plasmaprøver

EGFR Plus Mix	EGFR Plus target	Testet mutationsniveau	Mellem operatører		Mellem instrument-SD		Mellem kitlot		Mellem dage		Mellem kørsler		Inden for kørsel		I alt	
			SD*	%CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	lav	0,1	0,28	0	0	0,16	0,46	0	0	0,29	0,8	0,45	1,27	0,57	1,6
		middel	0,16	0,49	0	0	0,12	0,36	0	0	0,26	0,79	0,24	0,73	0,41	1,23
	L861Q	lav	0,24	0,76	0,3	0,96	0,2	0,63	0,38	1,23	0,33	1,06	0,29	0,94	0,72	2,33
		middel	0,14	0,49	0,27	0,93	0,18	0,63	0,18	0,63	0,34	1,18	0,18	0,63	0,55	1,93
	Vildtype	Ikke relevant	0,22	0,84	0,11	0,41	0,32	1,22	0	0	0,42	1,63	0,15	0,57	0,6	2,31
	Ins_G719X	Insertioner	lav	0,15	0,48	0,08	0,26	0,14	0,46	0,05	0,15	0,1	0,32	0,31	0,99	0,4
middel			0,13	0,43	0	0	0,06	0,22	0,1	0,35	0	0	0,16	0,55	0,24	0,81
G719X		lav	0,53	1,84	0,2	0,71	0,14	0,47	0,52	1,8	0,68	2,35	0,15	0,51	1,05	3,62
		middel	0,13	0,47	0,21	0,76	0,39	1,42	0	0	0,57	2,05	0,13	0,47	0,75	2,69
Vildtype		Ikke relevant	0,33	1,24	0,1	0,4	0,25	0,97	0	0	0,43	1,63	0,16	0,6	0,63	2,31
L858R_C797S	L858R	lav	0,19	0,56	0	0	0,1	0,3	0,28	0,82	0,33	1	0,3	0,89	0,57	1,7
		middel	0,17	0,55	0	0	0,09	0,3	0,22	0,71	0,3	0,96	0,18	0,57	0,45	1,47
	C797S	lav	0,12	0,39	0,32	1,01	0,26	0,82	0,14	0,46	0,11	0,36	0,28	0,89	0,54	1,72
		middel	0,09	0,3	0,28	0,98	0,2	0,7	0	0	0,24	0,83	0,12	0,41	0,45	1,55
	Vildtype	Ikke relevant	0		0,31	1,06	0,31	1,08	0,08	0,28	0,28	0,97	0,23	0,8	0,57	1,99
Del_S768I	Deletioner	lav	0,66	1,99	0	0	0	0	0,18	0,54	0,84	2,52	0,28	0,84	1,12	3,36
		middel	0,46	1,5	0	0	0	0	0	0	0,66	2,16	0,28	0,9	0,85	2,78
	S768I	lav	0,53	1,66	0,16	0,49	0,33	1,04	0,34	1,06	0,66	2,07	0,14	0,44	0,99	3,11
		middel	0,14	0,45	0,24	0,78	0,25	0,81	0,24	0,77	0,35	1,13	0,12	0,39	0,57	1,87
	Vildtype	Ikke relevant	0,47	1,8	0,2	0,78	0,26	1,08	0	0	0,45	1,71	0,14	0,52	0,74	2,83

* SD: Standardafvigelse

** %CV: Variationskoefficient

Der er udført en kvalitativ analyse af repeterbarhedsresultaterne for FFPE og plasma, som viste, at resultaterne for EGFR-mutationsdetektion er uafhængige af analysekittets batch, Rotor-Gene Q-instrumentet og brugeren.

Reproducerbarhed

Reproducerbarheden blev bestemt på en EGFR-positiv og en negativ FFPE- og plasmaprøve. For hver EGFR-analyse blev reproducerbarheden vurderet på en given EGFR-mutation, testet på to niveauer af mutation (mellemstor og lav). Hvert niveau blev testet i fem replikater på mindst 75 kørsler (25 kørsler pr. teststed) udført over mindst fem dage med minimum 70 målinger pr. mutationsniveau og pr. analyse (tre teststeder, et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument pr. sted, en operatør pr. sted, et *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot anvendt). Den kvantitative analyse af reproducerbarhedsresultaterne er opsummeret i Tabel 11 for FFPE-prøver og i Tabel 12 for plasmaprøver.

Table 11. Summary of reproducibility results for *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit on FFPE samples

EGFR Plus Mix	EGFR Plus target	Testet mutationsniveau	Inden for kørsel		Mellem dage		Mellem teststeder		I alt	
			SD*	CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	lav	0,23	2,7	0,48	5,48	0,12	1,38	0,54	6,26
		middel	0,19	3,42	0,44	7,95	0,13	2,29	0,5	8,95
	L861Q	lav	0,22	4,85	0,7	15,48	0,31	6,81	0,79	17,59
		middel	0,21	8,7	0,66	27,6	0	0	0,69	28,93
	Vildtype	Ikke relevant	0,14	0,55	0,62	2,46	0,38	1,53	0,74	2,95
Ins_G719X	Insertioner	lav	0,28	5,29	0,21	4,02	0	0	0,35	6,64
		middel	0,15	7,11	0,15	6,87	0,09	3,99	0,23	10,66
	G719X	lav	0,25	4	0,2	3,14	0,29	4,56	0,43	6,83
		middel	0,18	4,18	0,22	5,11	0,26	6,01	0,39	8,92
	Vildtype	Ikke relevant	0,14	0,54	0,14	0,54	0,15	0,61	0,25	0,97
L858R_C797S	L858R	lav	0,27	3,4	0,15	1,92	0,33	4,11	0,45	5,67
		middel	0,22	4,23	0,15	2,92	0,31	5,96	0,42	7,87
	C797S	lav	0,3	4,97	0,12	2,07	0,12	1,93	0,35	5,72
		middel	0,19	5,23	0,16	4,52	0,2	5,59	0,32	8,89
	Vildtype	Ikke relevant	0,12	0,46	0,21	0,82	0,05	0,18	0,24	0,96
Del_S768I	Deletioner	lav	0,24	4,16	0,24	4,16	0,19	3,33	0,37	6,53
		middel	0,15	4,43	0,11	3,12	0,16	4,65	0,25	7,14
	S768I	lav	0,26	3,29	0,2	2,54	0,14	1,85	0,35	4,55
		middel	0,21	3,66	0,28	4,76	0,13	2,25	0,37	6,41
	Vildtype	Ikke relevant	0,12	0,49	0,11	0,45	0,26	1,02	0,31	1,22

* SD: Standardafvigelse

** %CV: Variationskoefficient

Table 12. Summary of reproducibility results for *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit on plasma samples

EGFR Plus Mix	EGFR Plus target	Testet mutationsniveau	Inden for kørsel		Mellem dage		Mellem teststeder		I alt	
			SD*	%CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	lav	0,34	0,93	0,26	0,73	0,14	0,4	0,45	1,25
		middel	0,2	0,58	0,22	0,66	0,24	0,73	0,38	1,14
	L861Q	lav	0,35	1,11	0,19	0,6	0,17	0,55	0,43	1,37
		middel	0,19	0,65	0,16	0,56	0,23	0,81	0,34	1,18
	Vildtype	Ikke relevant	0,18	0,67	0,86	3,28	0,47	1,8	1	3,8
Ins_G719X	Insertioner	lav	0,29	0,93	0	0	0	0	0,3	0,94
		middel	0,19	0,65	0	0	0	0	0,2	0,67
	G719X	lav	0,39	1,3	0,64	2,15	0,85	2,86	1,13	3,81
		middel	0,24	0,87	0,33	1,19	0,25	0,9	0,48	1,72
	Vildtype	Ikke relevant	0,19	0,72	0,21	0,82	0,16	0,63	0,33	1,26
L858R_C797S	L858R	lav	0,37	1,1	0,35	1,04	0,47	1,38	0,69	2,05
		middel	0,17	0,55	0,35	1,12	0,48	1,54	0,62	1,98
	C797S	lav	0,29	0,94	0,23	0,74	0,31	0,98	0,48	1,54
		middel	0,2	0,68	0,18	0,63	0,35	1,22	0,44	1,53
	Vildtype	Ikke relevant	0,3	1,04	0,38	1,31	0,34	1,18	0,59	2,05
Del_S768I	Deletioner	lav	0,3	0,91	0,38	1,16	0,54	1,62	0,73	2,19
		middel	0,21	0,69	0,32	1,04	0,52	1,7	0,65	2,11
	S768I	lav	0,17	0,53	0,27	0,84	0,39	1,21	0,5	1,57
		middel	0,2	0,66	0,17	0,56	0,28	0,92	0,39	1,26
	Vildtype	Ikke relevant	0,17	0,65	0,19	0,71	0,3	1,13	0,39	1,49

* SD: Standardafvigelse

** %CV: Variationskoefficient

Der er udført en kvalitativ analyse af reproducerbarhedsresultaterne for FFPE og plasma, som viste, at resultaterne for EGFR-mutationsdetektion er uafhængige af analysestedet.

Interfererende stoffer

Der er i alt testet 36 potentielle interfererende stoffer på to EGFR-positive og en EGFR-negative FFPE- og plasmaprøver (Tabel 13). De potentielle endogene interfererende og eksogene stoffer, som kan påvises i en prøve inden DNA-klargøringen blev blandet med prøverne ved et klinisk relevant maksimumsniveau. De potentielle eksogene interferenser som følge af DNA-klargørings-workflows blev blandet med det ekstraherede DNA på et beregnet niveau (i værste tilfælde). Hver prøve (kontrol og blandet med potentiel interferent) blev testet i seks replikater, som resulterede i sammenlagt 51 kørsler (et *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot anvendt). Den kvantitative analyse har ikke vist nogen interfererende virkning af de testede stoffer.

Table 13. Potentielle interfererende stoffer testet på FFPE-prøver

Testet stof	Testet koncentration
Formalin 4-10 %	4.10E-05%
Paraffinvoks	4.10E-05%
Deparaffinization solution	4.10E-05%
ATL (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1.30E-05%
Proteinase K	4.00E-05%
RNAse A	1.99E-07%
AL buffer (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1.99E-03%
Ethanol 96-100 %	1.99E-03%
AW1 (QIAamp FFPE Wash Buffer)	1.00E-01%
AW2 (QIAamp FFPE Wash Buffer)	1.00E+00%
QSB1 (QIASymphony FFPE Buffer)	4.19E-07%
MBS (QIASymphony FFPE Magnetic Beads Solution)	6.15E-09%
QSW1 (QIASymphony FFPE Wash Buffer)	8.80E-04%
QSW2 (QIASymphony FFPE Wash Buffer)	8.80E-02%
AVE (QIASymphony FFPE Elution Buffer)	5.00E+00%
ATE (QIAamp FFPE Tissue Elution Buffer)	5.00E+00%

Tabel 14. Potentielle interfererende stoffer testet på plasmaprøver

Testet stof	Testet koncentration
Buffer ACL (QIAamp Plasma Lysis Buffer)	5.77E-05%
Buffer ACB (QIAMP Plasma Buffer)	2.92E-04%
Buffer ACW1 (QIAamp Plasma Wash Buffer)	1.00E-03%
Buffer ACW2 (QIAamp Plasma Wash Buffer)	1.25E-02%
Ethanol 96-100 %	1.25E-01%
Buffer AVE (QIAamp Plasma Elution Buffer)	5.00E+00%
MBS3 (QIASymphony Plasma Magnetic Beads Solution)	3.48E-05%
Proteinase K	7.49E-05%
QSB4 (QIASymphony Plasma Buffer)	5.57E-04%
QSW8 (QIASymphony Plasma Wash Buffer)	1.11E-01%
QSW9 (QIASymphony Plasma Wash Buffer)	4.62E-01%
QSW10 (QIASymphony Plasma Wash Buffer)	5.00E+00%
QSE1/QSE2 (QIASymphony Plasma Elution Buffer)	5.00E+00%
Ethylen-diamin-tetra-eddikesyre (EDTA)	3.39E+00 µmol/L
Ukonjugeret bilirubin	684 µmol/L
Konjugeret bilirubin	475 µmol/L
Hæmoglobin	10 g/L
Triglycerider	16,94 mmol/L
Xylen	684 µmol/L
Chloroform	5.00E+00%

Specificitet og krydsreaktivitet

Specificiteten og krydsreaktiviteten af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit blev evalueret ved at teste, hvorvidt *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit korrekt kunne påvise og identificere (hvis relevant) EGFR-mutationen, som fremgår af Tabel 1. For FFPE-prøverne blev studiet udført på alle EGFR-målrettede mutationer. Plasmaprøvernes specificitet blev vurderet på C797Sa- og C797Sb-målrettede mutationer. Alle prøver blev testet enkeltvis på hvert *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot, og der blev anvendt tre *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lots. Studiet viste, at alle målrettede mutationer blev påvist af den forventede EGFR-analyse, og der blev ikke observeret signaler ved andre analyser.

Påvisningen af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit af den sjældne, ikke-målrettede L858Q-mutation blev også vurderet ved test af FFPE- og plasmaprøver. Dette studie viste, at L858Q-mutationen ikke påvises af C797S-analysen og muligvis kan påvises af L858R-analysen ved høj mutationsprocent (FFPE) og højt kopiantal (plasma).

Krydskontaminering og overførsel

Krydskontamineringen af de fire EGFR Plus-workflows, dvs. brug af de fire DNA klargøringsmetoder, blev evalueret ved hjælp af forskellige betingelser med skiftende EGFR-positive og -negative prøver. Der blev foretaget mindst tre kørsler på alle EGFR Plus-workflows (der blev anvendt et *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot pr. workflow), og der var ikke krydskontaminering i nogen af de fire workflows.

Under vurderingen af krydskontaminering blev overførslen af de fire EGFR Plus-workflows evalueret, og der blev ikke påvist nogen overførsel mellem kørsler.

Tidsramme for drift

Den maksimale tidsramme mellem klargøringen af qPCR-plader og starten af qPCR-kørslen blev bestemt for hver EGFR-analyse på en given EGFR-mutation, testet på en mutation med lavt niveau (et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument, en operatør, et *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot anvendt). De otte forskellige FFPE-positive prøver er testet umiddelbart efter klargøring af qPCR-plader og efter henholdsvis 3, 6 og 24 timers opbevaringstid ved +2 °C/+8 °C. den maksimale acceptable tidsramme er 24 timer, men det anbefales dog at starte qPCR-kørslen med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit qPCR snarest muligt efter klargøring af pladen (dvs. efter isætning af alle prøver til test).

Klinisk ydeevne

Nøjagtighed: Sammenligning med den analytiske referencemetode

Studiet påviste et højt niveau af overensstemmelse mellem *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og den/de analytiske præcisionsmetoder (anvendte reference- og diskrepansløsningsmetoder: PNA qPCR – i Karachaliou et al., 2015 og Mayo-de-las-Casas et al., 2017, Sanger-bidirektional sekventering, Next Generation Sequencing, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit V2, CE (kat.-nr. 874111) og *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, CE (kat.-nr. 870311)).

Resultaterne blev analyseret for at vurdere positiv procentvis overensstemmelse (Positive Percent Agreement, PPA), negativ procentvis overensstemmelse (Negative Percent Agreement, NPA) og overordnet overensstemmelse i procent (Overall Percent Agreement, OPA) angående EGFR-mutationsstatus (MT eller WT) og EGFR-målet (mutationsidentifikation) for FFPE- og plasmaprøver mellem *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og den respektive referencemetode og efter diskrepansløsningsmetoden.

I studiet blev 170 plasmaprøver testet, og 148 gav gyldige tolkbare resultater (148 prøvestatus og 155 målstatus).

Der var uoverensstemmelse i fire EGFR-prøvestatusser (MT eller WT), da resultaterne af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit blev sammenlignet med resultaterne af den respektive referencemetode. Efter analyse af diskrepansløsningsmetoden faldt antallet af prøver med diskordant status (MT eller WT) til en diskrepans, falsk negativ prøvestatus. PPA, NPA og OPA med de tilsvarende tosidede 95 % konfidensintervaller (Confidence Intervals, CI) er opsummeret i Tabel 15 og Tabel 16.

Tabel 15. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. prøve – *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og sammenligning af referencemetoder for FFPE-prøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	97,30%	93,22 %	99,26%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	93,65%	84,53%	98,24%
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	100,00%	95,75%	100,00%

Tabel 16. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. prøve efter diskordansundersøgelse for FFPE-prøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	99,32%	96,29%	99,98%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	98,33%	91,06%	99,96 %
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	100,00%	95,89%	100,00%

Der var uoverensstemmelse i ni EGFR-målstatusser (Tabel 17), da resultaterne af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit blev sammenlignet med resultaterne af den respektive referencemetode. Efter analyse af diskrepansløsningsmetoden faldt antallet af prøver med diskordant målstatus til tre diskrepanser, to falske negative og en falsk positiv målstatus (Tabel 18). PPA, NPA og OPA med de tilsvarende tosidede 95 % konfidensintervaller (Confidence Intervals, CI) er opsummeret i Tabel 19 og Tabel 20.

Tabel 17. Detaljeret FFPE-mutationsstatus pr. mål – sammenligning af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og referencemetode

	Referencemetode	WT	T790M	L861Q	Insertioner	G719X	L858R	C797S	Deletioner	Ex21 MT	I alt
		<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit									
WT		85	1	-	-	2	-	-	2	1	91
T790M		2	2	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q		-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Insertioner		1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X		-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R		-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S		-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Deletioner		-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I alt		88	3	1	1	3	19	1	38	1	155

Tabel 18. Detaljeret FFPE-mutationsstatus pr. mål efter diskordansundersøgelse

Reference- og diskrepansløsningsmetode	WT	T790M	L861Q	Insertioner	G719X	L858R	C797S	Deletioner	Ex21 MT	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit										
WT	89	-	-	-	2	-	-	-	-	91
T790M	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Insertioner	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R	-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Deletioner	-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I alt	90	4	1	1	3	19	1	36	-	155

Tabel 19. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. mål – *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og sammenligning af referencemetoder for FFPE-prøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	94,19%	89,26%	97,31%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	91,04%	81,52%	96,64%
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	96,59%	90,36%	99,29%

Tabel 20. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. mål efter diskordansundersøgelse for FFPE-prøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	98,06%	94,44%	99,60%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	96,92%	89,32%	99,62%
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	98,89%	93,96%	99,97%

I studiet blev 106 plasmaprøver testet, og 106 gav gyldige tolkbare resultater (106 prøvestatus og 121 målstatus).

Der var uoverensstemmelse i ni EGFR-prøvestatusser (MT eller WT), da resultaterne af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit blev sammenlignet med resultaterne af den respektive referencemetode. Efter analyse af diskrepansløsningsmetoden faldt antallet af prøver med diskordant status (MT eller WT) til tre diskrepanser, en falsk negativ og to falske positive prøvestatusser. PPA, NPA og OPA med de tilsvarende tosidede 95 % konfidensintervaller (Confidence Intervals, CI) er opsummeret i Tabel 21 og Tabel 22.

Tabel 21. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. prøve – *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og sammenligning af referencemetoder for plasmaprøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	91,51%	84,49%	96,04%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	87,27%	75,52%	94,73%
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	96,08%	86,54%	99,52%

Tabel 22. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. prøve efter diskordansundersøgelse for plasmaprøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	97,17%	91,95%	99,41%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	97,96%	89,15%	99,95%
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	96,49%	89,89%	99,57%

Der var uoverensstemmelse i 18 EGFR-målstatusser (Tabel 23), da resultaterne af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit blev sammenlignet med resultaterne af den respektive referencemetode. Efter analyse af diskrepansløsningsmetoden faldt antallet af prøver med diskordant målstatus til fem diskrepanser, tre falske positive og to falske negative målstatusser (Tabel 24). PPA, NPA og OPA med de tilsvarende tosidede 95 % konfidensintervaller (Confidence Intervals, CI) er opsummeret i Tabel 25 og Tabel 26.

Tabel 23. Detaljeret plasmamutationsstatus pr. mål – sammenligning af *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og referencemetode

Referencemetode	WT	T790M	L861Q	Insertioner	L858R	C797S	Deletioner	I alt
	<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit							
WT	49	6			6		1	62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Insertioner				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Deletioner	4					1	30	35
I alt	53	14	2	1	19	1	31	121

Tabel 24. Detaljeret plasmamutationsstatus pr. mål efter diskordansundersøgelse

Reference- og diskrepansløsningsmetode	WT	T790M	L861Q	Insertioner	L858R	C797S	Deletioner	I alt
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit								
WT	60	1			1			62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Insertioner				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Deletioner	3						32	35
I alt	63	9	2	1	14	0	32	121

Tabel 25. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. mål – *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit og sammenligning af referencemetoder eller plasmaprøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	85,12%	77,51%	90,94%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	80,60%	69,11%	89,24%
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	90,74%	79,70%	96,92%

Tabel 26. Analyse af overensstemmelse mellem samlet mutationsstatus pr. mål efter diskordansundersøgelse for plasmaprøver

		Nedre grænse for 95 % konfidensinterval	Øvre grænse for 95 % konfidensinterval
Overordnet overensstemmelse i procent	95,87%	90,62%	98,64%
Positiv procentvis overensstemmelse (sensitivitet)	96,55%	88,09%	99,58%
Negativ procentvis overensstemmelse (specificitet)	95,24%	86,71%	99,01%

Litteraturhenvisninger

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* 23, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525.
3. Inoue, A., Suzuki, T., Fukuhara, T., Maemondo, M., and Kimura, Y. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* 24, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2-6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2-6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May-3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* 26 (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* 15, 2442.

-
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). J. Clin. Oncol. 26 (May 20 suppl), abstr 8038.
 9. Lynch, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med. 2004 May 20;350(21):2129-39. Epub 2004 Apr 29.
 10. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) Nucleic Acids Res. 17, 2503.
 11. Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotech. 17, 804.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden med hyppigt stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGEN Teknisk Service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og/eller protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: Besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Kørsel ugyldig på grund af ugyldig positiv kontrol

- | | |
|--|---|
| a) En komponent af reaktionsblandingen ikke tilsat | Kontrollér, at reaktionsblandingen er klargjort korrekt.
Kontrollér, at alle komponenter i qPCR-reaktionsblandingen er tilsat.
Gentag qPCR-kørslen. |
| b) Reaktionsblanding nedbrudt | Kittet har været frosset og optøet for mange gange, kittets indehold er ikke opbevaret ved -30 til -15 °C, eller primer- og probeblandingerne blev ikke beskyttet mod lyset.
Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se etiketten), og brug et nyt kit.
Gentag qPCR-kørslen. |
| c) For lav volumen pipetteret: pipetteringsvolumen kan være ukorrekt | Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontrollér, at 5 µl kontrol blev tilsat.
Kontrollér og recalibrer pipetter før gentagelse af qPCR-kørslen. |
| d) Fejl i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet | Kontrollér instrumentets vedligeholdelseslog.
Gentag qPCR-kørslen. |
| e) Fejl i tilbehør til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet | 72-Well Rotor kan være forkert låst.
Gentag qPCR-kørslen. |

Kommentarer og forslag

- | | |
|---|--|
| f) Ombytning af båndrør og/eller prøve-id | Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.
Gentag qPCR-kørslen. |
| g) Kontroller mangler eller er indsat i en forkert position | Kontrollér, at den rigtige kontrol er indsat i den rigtige position.
Gentag qPCR-kørslen. |
| h) Utilstrækkelig blanding af kontrolprøver | Kontrollerne var ikke helt optøet ved isætning, eller blanding af kontrollerne med reaktionsblandingen (op- og nedpipettering) blev ikke udført korrekt.
Gentag qPCR-kørslen. |
| i) Ineffektiv rørlukning | Røret var ikke lukket korrekt, og det resulterede i fordampning under qPCR-kørslen.
Gentag qPCR-kørslen. |
| j) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er givet i "Opbevaringsbetingelser" (side 25) | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug eventuelt et nyt kit. |
| k) <i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit er udløbet | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug eventuelt et nyt kit. |
| l) Forkert amplifikationskurve (artefakt) | Kontrollér den relevante kurve for usædvanlige kurver (dvs. en lige linje).
Gentag qPCR-kørslen. |

Kommentarer og forslag

Kørsel ugyldig på grund af amplifikation i No Template Control (Ingen skabelonkontrol)

- a) Krydskontaminering eller kontaminering af reagenser
- Håndtér altid prøver, kitkomponenter og forbrugsvarer i henhold til anbefalede fremgangsmåder for at forhindre overførsel.
- Sørg for at skifte spidser mellem pipettering af forskellige reagenser eller ved isætning af forskellige rør. Klargør qPCR-reaktionsblandingen med dedikerede materialer (pipetter, spidser osv.).
- Klargør qPCR-reaktionsblandingen og NTC-reaktionen på et dedikeret område, hvor der ikke benyttes DNA-matricer (DNA, plasmid eller PCR-produkter).
- Udskift alle reagenser, hvis der identificeres krydskontaminering.
- Gentag qPCR-kørslen.
- b) Forkert amplifikationskurve (artefakt)
- Kontrollér den relevante kurve for usædvanlige kurver (dvs. en lige linje).
- Gentag qPCR-kørslen.
- c) Ombytning af striprør og/eller prøve-id
- Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen.
- Gentag qPCR-kørslen.
- d) Fejl i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet
- Kontrollér instrumentets vedligeholdelseslog.
- Eksempelvis kan linseskævhed medføre højere baggrund eller artefakt. Hvis linsejustering ikke indgår i din vedligeholdelsesplan, bedes du kontakte QIAGENs Teknisk Service for yderligere information og eventuel indgriben.

Kommentarer og forslag

Prøve ugyldig på grund af ingen eller lav amplifikation i intern kontrol

- a) For lav DNA-koncentration i prøve *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit er optimeret til en arbejdskoncentration på 5 ng/μl (DNA fra FFPE) og 5 μl rent ekstrakt af ccfDNA fra plasmaprøver. Kontrollér koncentrationen (for FFPE). Gentaq qPCR-trinnet for prøven.
- b) Dårlig kvalitet af DNA-prøve Kontrollér koncentrationen (for FFPE). Gentaq qPCR-trinnet med en alternativ prøve (ideelt frisk skåret). Gentaq kørslen med en højere prøvekonzentration. Bemærk: Test af en højere koncentration af gDNA kan muliggøre en tidligere exon2 C_T, men øger risikoen for hæmning. C_T exon 2 kan derfor være senere end med en lavere koncentration.
- c) Tilstedeværelse af hæmmer i prøven Fortynd prøven, og gentaq kørslen med lavere koncentration af prøven. Bemærk: Test af en lavere koncentration kan give et tidligere exon 2-signal, hvis der var hæmmere til stede i prøven ved 5 ng/μl. Ekstraher prøven (FFPE) igen med flere sektioner, og gentaq kørslen. Bemærk: Ved at eluere flere sektioner i samme volumen kan dæmperkoncentrationen øges, når prøven normaliseres ved 5 ng/μl.
- d) For lav volumen pipetteret: pipetteringsvolumen kan være inkorrekt Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontrollér 5 μl prøve tilføjet. Kontrollér og recalibrer pipetter før gentagelse af qPCR-kørslen.
- e) Ineffektiv rørlukning Røret var ikke lukket korrekt, og det resulterede i fordampning under qPCR-kørslen. Gentaq qPCR-trinnet for prøven.

Kommentarer og forslag

- f) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i "Opbevaringsbetingelser" (side 25) Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug eventuelt et nyt kit.
- g) *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit er udløbet Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug eventuelt et nyt kit.
- h) Unormal fluorescens Skriv ikke på rørene. Vær forsigtig ved håndtering af rør. Brug handsker.
Kontrollér visuelt PCR-reaktionsrøret for tilstedeværelsen af sorte magnetiske partikler (stammer fra automatiseret QIASymphony-ekstrahering). Partikler kan fjernes som beskrevet i håndbøgerne til de respektive kits.

Prøve ugyldig på grund af tidlig amplifikation af den interne kontrol i prøver

- a) For høj DNA-koncentration i prøve *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit er optimeret til en arbejdskoncentration på 5 ng/µl (FFPE).
For gDNA fra FFPE: Kontrollér DNA-koncentrationen. Fortynd DNA'et, hvis der ikke er DNA ved denne koncentration.
For ccfDNA fra plasma: Fortynd prøven.
Gentag qPCR-trinnet for prøven.
- b) For høj volumen pipetteret: Pipetteringsvolumen kan være forkert. Kontrollér pipetteringsplanen og konfigurationen af reaktionen. Kontrollér, at 5 µl prøve blev tilsat.
Kontrollér og recalibrer pipetter før gentagelse af qPCR-kørslen for prøven.

Kommentarer og forslag

- c) Amplifikationskurven kan være ukorrekt
Kontrollér den tilsvarende kurve for falske positive (dvs. en lige kurve i stedet for eksponentiel amplifikation).
Gentag qPCR-trinnet for prøven.
- d) Unormal fluorescens
Skriv ikke på rørene. Vær forsigtig ved håndtering af rør. Brug handsker.
Kontrollér visuelt PCR-reaktionsrøret for tilstedeværelsen af sorte magnetiske partikler (stammer fra automatiseret QIA-symphony-ekstrahering). Partikler kan fjernes som beskrevet i håndbøgerne til de respektive kits.
- e) Fejl i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet
Kontrollér instrumentets vedligeholdelseslog.
Eksempelvis kan linseskævhed medføre højere baggrund. Hvis linsejustering ikke indgår i din vedligeholdelsesplan, bedes du kontakte QIAGENs Teknisk Service for yderligere information og eventuel indgriben.

Prøve ugyldig på grund af uventet tidlig Δ CT eller CT

- a) Prøve ugyldig – CT for lav eller under cutoff-området
Opsæt ny PCR-kørsel for at gentage prøven, og vær meget opmærksom på blandingstrinene.





Kvalitetskontrol



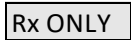

I henhold til QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem er hvert lot i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit testet efter fastlagte specifikationer for at sikre ensartet produktkvalitet.

Der er udført kvalitetskontrol af hele kittet på et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Dette kit er fremstillet i henhold til ISO 13485-standarden. Analysecertifikater er tilgængelige på anmodning på www.qiagen.com/support.

Symboler

Følgende symboler vises muligvis i brugsvejledningen eller på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
 Σ <N>	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Holdbarhedsdato
IVD	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
REF	Katalognummer
LOT	Lotnummer
MAT	Materialenummer (dvs. etiketten på komponenten)
COMP	Komponenter
CONT	Indeholder
NUM	Antal
GTIN	Globalt handelsvarenummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning
	Producent

Symbol	Symboldefinition
	Læs brugsanvisningen
	Opbevares uden for sollys
	Kun til brug på recept
	Advarsel/forsigtig

Kontaktoplysninger

For teknisk bistand og yderligere information kan du gå ind på vores tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringe på 00800-22-44-6000 eller kontakte QIAGEN Teknisk Service eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Bilag A: Installation af Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren Gamma Plug-in'et og Import af analyseprofilen

Vigtige anvisninger før start


- Rotor-Gene AssayManager software v2.1 skal være installeret på den computer, der er forbundet med Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet. Softwaren kan downloades på produktsiden for Rotor-Gene AssayManager v2.1 på www.qiagen.com/9025620 > Resources (Ressourcer) > Operating Software (Driftssoftware). Se *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* for at få oplysninger om installationen af Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application-softwaren.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit kræver et særligt plug-in: Gamma Plug-in. Den seneste version af dette plug-in kan findes på produktsiden for Rotor-Gene AssayManager v2.1 på www.qiagen.com/9025620 > Resources (Ressourcer) > Operating Software (Driftssoftware). Dette plug-in skal installeres på en computer, der som minimum allerede har Rotor-Gene AssayManager version 2.1 installeret.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit kræver også en analyseprofil. Denne analyseprofil indeholder alle de parametre, der er nødvendige for PCR-cyklus og automatiseret dataanalyse. Der findes to tilgængelige analyseprofiler til brug med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:
 - Én dedikeret til test af gDNA-prøver fra FFPE: `therascreen_EGFR_Plus_FFPE`
 - Én dedikeret til test af ccfDNA-prøver fra plasma: `therascreen_EGFR_Plus_Plasma`
- Analyseprofilerne svarer til ".iap"-filer, der kan downloades fra *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-produktsiden på www.qiagen.com. Analyseprofilerne skal importeres i Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren.

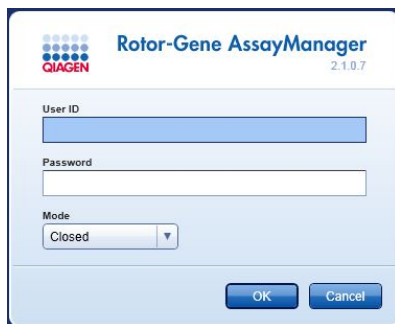
Procedure

Oplysninger om installation af Gamma Plug-in og import af analyseprofilerne i Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren er som følger.

Installation og import af Gamma Plug-in og analyseprofilen er beskrevet i brugervejledningerne til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* og *Gamma Plug-In*.

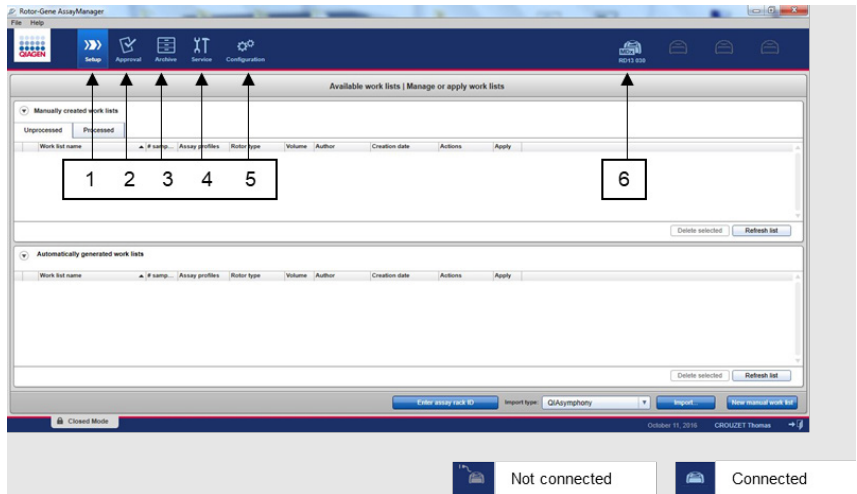
1. Download Gamma Plug-in'et fra QIAGENs websted.
2. Dobbeltklik på filen RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_x.msi ($x \geq 0$), og følg instruktionerne for at installere. Se afsnittet "Installing plug-ins" (Installation af plug-ins) i brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* for at få en detaljeret beskrivelse af denne proces.
3. Efter en vellykket installation af plug-in'et skal en person med administratorrettigheder til Rotor-Gene AssayManager v2.1-softwaren importere den seneste version af analyseprofilen som følger.
 - 3a. Gå til Windows Explorer, og gem AP i følgende mappe: "
C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Import\AssayProfiles.

- 3b. Klik på ikonet Rotor-Gene Assay Manager v2.1. 
Logovinduet vises.



Figur 21. Rotor-Gene AssayManager v2.1.

- 3c. Indtast bruger-id og adgangskode. Lad indstillingen Mode (Tilstand) være Closed (Lukket). Klik på OK.
Arbejdsområdet Rotor-Gene AssayManager vises.



Figur 22. **Rotor-Gene AssayManager v2.1.1**. 1 = Fanen Setup (Opsætning). Denne fane gør det muligt at håndtere eller anvende arbejdslisters. 2 = Fanen Approval (Godkendelse). Denne fane gør det muligt at finde tidligere eksperimenter. 3 = Fanen Archive (Arkiv). Denne fane gør det muligt at finde tidligere godkendte eksperimenter. 4 = Fanen Service. På denne fane rapporteres en historikpost for hver fil, der er genereret af softwaren. 5 = Fanen Configuration (Konfiguration). Denne fane gør det muligt at konfigurere alle softwareparametre. 6 = Instrumentikonet Rotor-Gene Q (RGQ) informerer brugeren, om et givent cyklusapparat er tilsluttet. Der kan forbindes op til fire RGQ-instrumenter til den samme computer.

- 3d. Foretag følgende nødvendige konfigurationsindstillinger i lukket tilstand af hensyn til processikkerheden i hele systemet:
- Vælg fanen "Settings" (indstillinger) i miljøet "Configuration" (konfiguration).
 - Markér afkrydsningsfelterne "Material number required" (materialer. påkrævet), "Valid expiry date" (gyldig udløbsdato) og "Lot number required" (lotnummer påkrævet) i panelet "Work list" (Arbejdsliste) under "Closed mode" (Lukket tilstand).
- Bemærk: Disse konfigurationsindstillinger kan kun foretages af personer med Administratorrettigheder.


-
- 3e. Vælg fanen Assay Profiles (Analyseprofiler) i miljøet Configuration (Konfiguration).
 - 3f. Klik på Import (Importér).
 - 3g. Vælg *therascreen_EGFR_Plus_FFPE_V1_0_0.iap* som den første EGFR-analyseprofil i dialogboksen Open file (Åbn fil).
 - 3h. Klik på "Open" (Åbn).
Derefter indlæses analyseprofilen og føjes til listen over tilgængelige analyseprofiler, som kan anvendes i miljøet "Setup" (Konfiguration)
 - 3i. Gentag trin 3e-3h for at indlæse og tilføje *therascreen_EGFR_Plus_Plasma_V1_0_0.iap* som den anden analyseprofil.
Bemærk: Samme version af en analyseprofil må ikke importeres to gange.

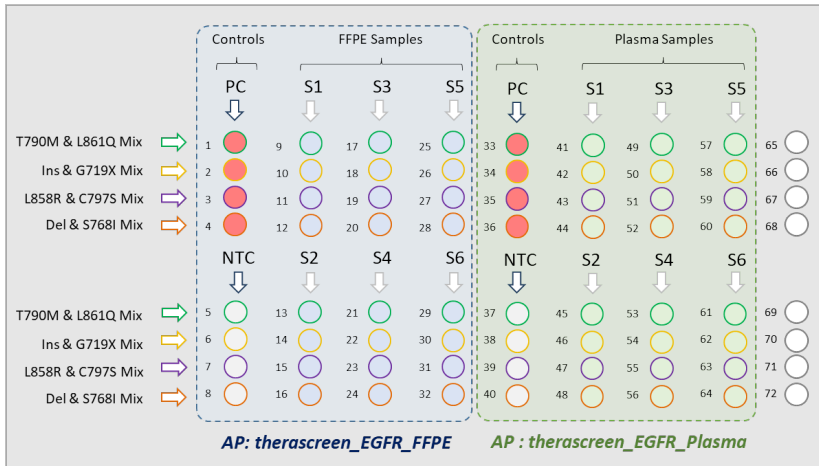
Bilag B: Kørsel af FFPE- og plasmaanalyseprofiler i samme eksperiment

To analyseprofiler er tilgængelige til brug med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:

- Til test af gDNA-prøver fra FFPE: *therascreen_EGFR_Plus_FFPE*
- Til test af ccfDNA-prøver fra plasma: *therascreen_EGFR_Plus_Plasma*.

Sådan køres både FFPE- og plasmaanalyseprofiler i samme eksperiment:

1. Klargør qPCR-eksperimentet som beskrevet i "Konfiguration af qPCR" og "Protokol: Klargøring af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet" i "Protokol: Vurdering af *EGFR*-mutation med qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrument" (starter på side 42).
 -  Der kræves et særligt pladelayout (Figur 23) ved kørsel af to analyseprofiler i samme eksperiment:
 - Kontroller (positiv kontrol, NTC) skal tilføjes to gange og placeres i brøndene foran prøverne for hver prøvetype (FFPE og plasma) som vist i Figur 23.
 - Alle prøver med den samme prøvetype (FFPE eller plasma) skal testes i på hinanden følgende brønde. Den rækkefølge, som de to prøvetyper testes i (dvs. FFPE eller plasma først), er ikke vigtig.
 - Der må ikke være tomme brønde mellem den sidste brønd, der indeholder en prøve af den første prøvetype (f.eks. i Figur 23, hvor brønd 32 indeholder prøven S6 FFPE), og den første brønd, som indeholder den positive kontrol knyttet til testen af den anden prøvetype (f.eks. i Figur 23, positiv kontrol i brønd 33 tilknyttet plasmaanalyseprofilen).

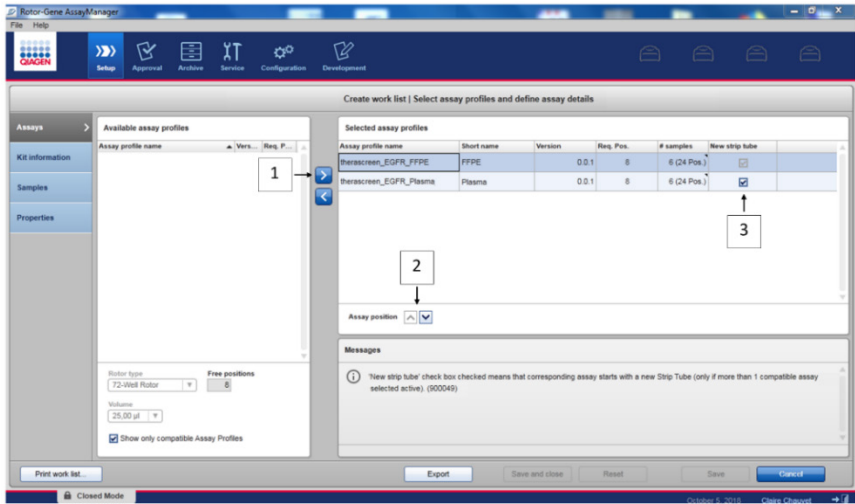


Figur 23. Pladelayout til test af FFPE- og plasma prøver i det samme qPCR-eksperiment. PC: EGFRv3 positiv kontrol, NTC: Ikke skabelonkontrol (vand), AP: analyseprofil, Reaktionsblandinger: EGFRv3 T790M og L861Q-blanding, EGFRv3-insertioner og G719X-blanding, EGFRv3 L858R og C797S-blanding, EGFRv3-deletioner og S768I-blanding. Prøve 1 (S1) til Prøve 6 (S6): DNA-prøver. ○ = tomme brønde.

2. Fortsæt til trin 13-17 i proceduren "Oprettelse af en arbejdsliste og start af qPCR-kørslen" (starter på side 47).
3. Importer de to analyseprofiler i rækkefølge som beskrevet i trin 18 og 19 af "Oprettelse af en arbejdsliste og start af qPCR-kørslen" (side 47). Sørg for, at analyseprofilerne importeres i den rigtige rækkefølge som angivet af pladelayoutet: f.eks. skal FFPE analyseprofilen importeres først og derefter plasmaanalyseprofilen ved brug af layoutet fra Figur 23.

Bemærk: Analyseprofilernes position kan ændres, hvis det er nødvendigt, for at sikre, at analyseprofilerne aflæses i den rigtige rækkefølge (Figur 24).

4. Markér afkrydsningsfeltet New strip tube (Nyt båndrør) for at angive, at den tilsvarende analyse starter med et nyt båndrør (Figur 24).



Figur 24. **Analyseposition.** 1 = Vælg og overfør de to analyseprofiler til arbejdslisten. 2 = Analysepositionen kan ændres: flyt analyseprofilen op eller ned ved hjælp af pilene. 3 = Markér afkrydsningsfeltet "New strip tube" (Nyt båndrør).

5. Fortsæt proceduren fra trin 20, side 47.

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaktioner: T790M og L861Q-blanding, Insertioner og G719X-blanding, L858R og C797S-blanding, Deletioner og S768I-blanding, PCR-master-blanding, <i>EGFR</i> positiv kontrol, RNase/DNase-frit vand	874611
Rotor-Gene Q og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød og lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse medfølger	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød og lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse medfølger ikke	9002032
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Aluminiumblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
72-Well Rotor	Til at holde båndrør og -hætter, 0,1 ml, kræver Locking Ring 72-Well Rotor	9018903

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
Locking Ring 72-Well Rotor	Til at låse Strip Tubes and Caps, 0,1 ml i 72-Well Rotor	9018904
Rotor Holder	Fritstående metalholder til samling af rør og Rotor-Discs® i rotorer	9018908
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Software til rutinetestning sammen med Rotor-Gene Q- og Rotor-Gene Q MDx-instrumenter	9024203
Rotor-Gene AssayManager v2.1 License (1)	Enkelt licens til installation af Rotor-Gene AssayManager v2.1-software på én computer	9025620
QIASymphony SP*		
QIASymphony SP System	QIASymphony-modul til klargøring af prøver: inklusive installation og uddannelse, 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony-modul til klargøring af prøver: inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn	9001297
Relaterede produkter		
Deparaffinization Solution (16 ml)	2 x 8 ml Deparaffinization Solution	19093

* Se de relevante håndbøger angående QIASymphony SP-tilbehør.

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
Deparaffinization Solution (50 ml)	1 x 50 ml Deparaffinization Solution	939018
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargøringer: 50 QIAamp MinElute® Columns, Proteinase K, Buffers og Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Til 50 klargøringer: QIAamp Mini-kolonner, Buffers, Carrier DNA, QIAGEN Proteinase K og rør	61504
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Til 192 klargøringer a 200 µl: Indeholder 2 reagenspatroner og enzymracks samt tilbehør	937236
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	Reagenspatroner, tilbehør og proteinase K-hætteglas til 192 klargøringer af 2000 µl eller 4000 µl hver	937556
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml, 7000 enheder/ml, opløsning)	19101
Buffer ATL (4 x 50ml)	4 x 50 ml lysisbuffer	939016

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser findes i håndbogen eller brugsvejledningen til det pågældende QIAGEN-kit. Håndbøger og brugsvejledninger til QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale forhandler.

Revisionshistorik for dokumentet

Revision	Beskrivelse
R1, marts 2022	Første udgivelse

Denne side skal være tom

Aftale om begrænset licens til *therascreen*[®] EGFR Plus RGQ PCR Kit

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i panelet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette panel med komponenter, der ikke er inkluderet i dette panel, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette panel, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette panel og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af panelet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og sagsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med panelet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

Køb af dette produkt giver køberen ret til at bruge det til udførelse af diagnostiske tjenester inden for human *in vitro*-diagnostik. Der overdrages intet generelt patent eller andre licenser af nogen art udover denne specifikke brugsret i forbindelse med købet.

Varemærker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], *therascreen*[®], QIAamp[®], QIASymphony[®], MinElute[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®], Rotor-Disc[®] (QIAGEN Group), CAL Fluor[®] (Biosearch Technologies, Inc.), FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Mar-2022 HB-2963-001 1126175 © 2022 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

