

Mars 2022

Bruksanvisning för *therascreen*[®] EGFR Plus RGQ PCR Kit



Version 1



För in vitro-diagnostisk användning

För användning med plasma eller FFPE-vävnad

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



874611



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, TYSKLAND



1126175SE

Innehåll

Avsedd användning	6
Meddelande om indikation för användning	6
Beskrivning och princip	7
Sammanfattning och förklaring	7
Testprincipen	10
Teknik	12
Material som medföljer	16
Satsinnehåll	16
Satsens format och analyser	17
Plattform och programvara	19
Material som behövs men inte medföljer	20
Ytterligare reagenser för provberedning	20
Förbrukningsartiklar och allmän laboratorieutrustning	20
Utrustning	21
Varningar och försiktighetsåtgärder	23
Säkerhetsinformation	23
Försiktighetsåtgärder	23
Förvaring och hantering av reagenser	26
Leveransvillkor	26
Förvaringsförhållanden	26
Stabilitet	27
Förvaring och hantering av prover	28

FFPE-prover	28
Plasmaprover	29
Genomiskt DNA och cirkulerande cellfria DNA-prover	29
Procedur	30
Protokoll: Extraktion och beredning av DNA	30
Protokoll: gDNA-extraktion från FFPE-prover	30
Protokoll: Automatiserad gDNA-extraktion från FFPE-prover med användning av QIASymphony SP	32
Protokoll: Manuell gDNA-extraktion från FFPE-prover	32
Protokoll: Deparaffinering av FFPE-sektion med QIAGEN Deparaffinization Solution	33
Protokoll: Förbehandlingsprotokoll för användning med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	36
Protokoll: ccfDNA-extraktion från plasmaprover	39
Protokoll: Automatiserad ccfDNA-extraktion från plasmaprover med användning av QIASymphony SP	40
Protokoll: Manuell ccfDNA-extraktion från plasmaprover	40
Protokoll: gDNA-kvantifiering och normalisering	41
Protokoll: <i>EGFR</i> -mutationsbedömning med qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet	43
Protokoll: Förbered instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	47
Tolkning av resultat (om tillämpligt)	59
Kontroller	59
Prover	60
Flaggor	62

Omtestning	65
Begränsningar	68
Prestandaegenskaper	70
Blankgräns (Limit of Blank, LOB)	70
Detektionsgräns	71
DNA-input	73
Repeterbarhet	74
Reproducerbarhet	77
Interfererande ämnen	80
Specificitet och korsreaktivitet	83
Korskontaminering och överföring	83
Tidsram i användning	84
Klinisk prestanda	85
Referenser	93
Felsökningsguide	95
Kvalitetskontroll	100
Symboler	101
Kontaktinformation	102
Bilaga A: Installera Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet, Gamma Plug-in och importera analysprofilen	103
Bilaga B: Köra analysprofilerna för FFPE och plasma i samma experiment	107
Beställningsinformation	110
Dokumentrevisioner	113

Avsedd användning

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är ett *in vitro*-diagnostiskt real-time PCR-test för kvalitativ detektion och identifiering av mutationer i exon 18, 19, 20 och 21 i genen för epidermal tillväxtfaktorreceptor (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*) (1) i DNA härledda från formalinfixerad paraffinbäddad (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) tumörvävnad och plasma från patienter med icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är vidare indikerat för semikvantitativ mätning av mutationer i exon 18, 20 och 21 i genen för epidermal tillväxtfaktorreceptor (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*) i human plasma som ett hjälpmedel i hanteringen av cancerpatienter med icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Testet ska användas av utbildad personal i en professionell laboratoriemiljö.

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är avsett för *in vitro*-diagnostisk användning.

Meddelande om indikation för användning

Testet är avsett att användas som ett hjälpmedel för att välja ut patienter med icke-småcellig lungcancer (non-small cell lung cancer, NSCLC) för behandling med en *EGFR*-tyrosinkinashämmare (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI).

Beskrivning och princip

Sammanfattning och förklaring

Mutationer i *EGFR*-onkogenen förekommer i cancerformer hos människor (1, 2). Förekomsten av de här mutationerna korrelerar med respons på behandling med vissa tyrosinkinashämmare (tyrosine kinase inhibitor, TKI) hos patienter med icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) (3–8). Sådana mutationer i *EGFR*-onkogenen förekommer hos den allmänna populationen av patienter med NSCLC, med en frekvens på ca 10 % hos patienter från USA, Europa eller Australien och upp till 30 % hos patienter från Japan och Taiwan (1, 2, 9).

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är ett real-time PCR-test (polymeraskedjereaktion) för detektion av 42 mutationer i den cancerrelaterade *EGFR*-genen med teknikerna ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (10, 11) och PCR-klamp för den kvalitativa detektionen och identifieringen av mutationer i *EGFR*-genen; exon 18, 19, 20 och 21 (Tabell 1). Satsen möjliggör semikvantifiering av G719X (X = A, S eller C; exon 18), T790M (exon 20), C797Sa och C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) och L861Q (exon 21) i DNA-prov som extraherats från human plasma. Sammanfattningsvis:

- G719X i exon 18 (detekterar och semikvantifierar G719S, G719A eller G719C men särskiljer dem inte)
- 28 borttagningar i exon 19 (detekterar närvaron av vilken som helst av de 28 borttagningarna men särskiljer dem inte)
- S768I, T790M, C797Sa och C797Sb i exon 20 (detekterar och semikvantifierar alla fyra mutationer men särskiljer inte C797Sa och C797Sb)
- Fem tillägg i exon 20 (detekterar närvaron av vilket som helst av de fem tilläggen men särskiljer dem inte)

De metoder som används är mycket selektiva, och beroende på den totala mängden närvarande DNA kan en låg procentandel mutant-DNA detekteras i en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA. Denna selektivitet och detektionsgräns är överlägsen annan teknik, t.ex. färgterminatorsekvensering.

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter

Exon	Mutation	COSMIC-ID*	Basskifte
18	G719A	6239	c.2156G>C
	G719S	6252	c.2155G>A
	G719C	6253	c.2155G>T
19	Borttagningar	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 fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter (forts.)

Exon	Mutation	COSMIC-ID*	Basskifte
19	Borttagningar	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
	Tillägg	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 fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter (forts.)

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

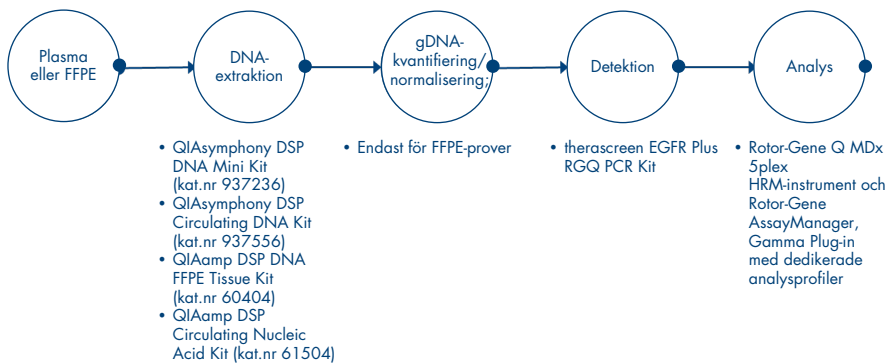
*COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]:

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.

† Enligt den nya COSMIC-databasen kombineras borttagning 6254 med borttagning 12369 på grund av likheterna i sekvensen efter det att borttagningen har skett.

Testprincipen

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit använder real-time PCR för detektion av 42 mutationer i *EGFR*-genen (exon 18, 19, 20 och 21) och semikvantifiering av G719X (med X = A, S eller C; exon 18), T790M (exon 20), C797Sa och C797Sb (exon 20), S768I (exon 20), L858R (exon 21) och L861Q (exon 21) i DNA-prov som extraherats från human plasma. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit testar genomiskt DNA (gDNA) som extraherats från FFPE-tumörvävnad och cirkulerande cellfritt DNA (ccfDNA) som extraherats från plasmaprover från patienter med icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC). EGFR-mutationsstatus och semikvantifiering (om tillämpligt) av renat ccfDNA bestäms med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med Rotor-Gene AssayManager (RGAM) programversion 2.1 (eller senare) kombinerat med Gamma Plug-in version 1.0.0 (eller senare) associerad med den dedikerade analysprofilen för plasma. Dataanalys och resultatolkning är helt automatiserade och hanteras av RGAM (Figur 1).



Figur 1. Arbetsflöde för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.

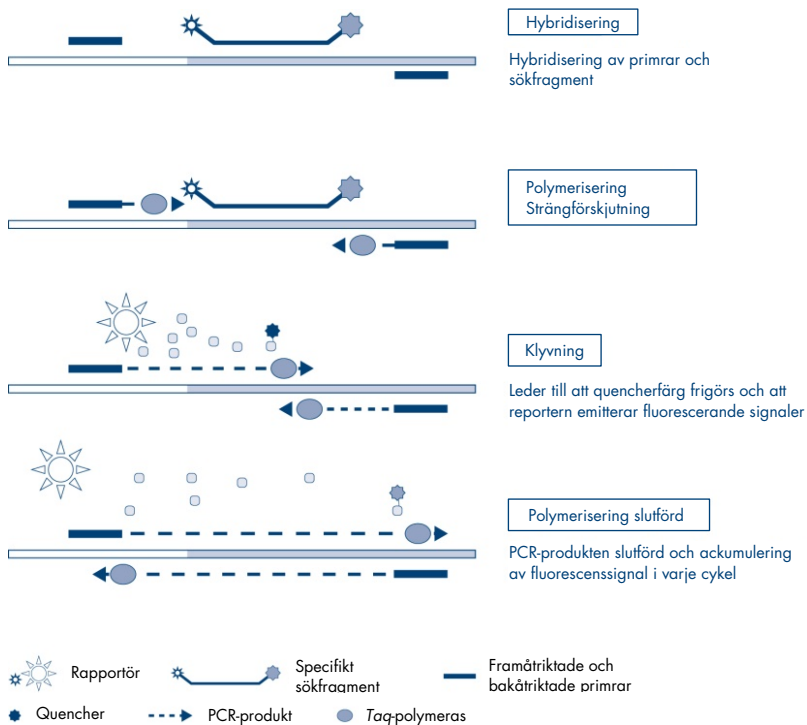
Teknik

Användning av qPCR tillåter exakt identifiering av PCR-produkter vid den exponentiella fasen av amplifieringsprocessen. qPCR-data kan snabbt erhållas utan post-PCR-bearbetning, genom identifiering i realtid av fluorescerande signaler vid PCR-cykling.

therascreen EGFR Plus RGQ PCR-analyserna utnyttjar principen om qPCR-oligonukleotidhydrolys. Under PCR hybridiseras framåtriktade och bakåtriktade primrar till en specifik sekvens. En annan färgbunden oligonukleotid ingår i samma mix. Detta sökfragment, som består av en oligonukleotid märkt med en 5'-reporterfärg och en nedströms 3'-quencher utan färg, hybridiserar till en målsekvens inom PCR-produkten. qPCR-analysen med hydrolyssökfragment utnyttjar 5'→3'-exonukleas-aktiviteten i *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA-polymeraset. När sökfragmentet är intakt fluorescerar inte reporterfärgen så länge reportern och quenchern är i närheten av varandra, vilket främst uppnås genom energiöverföring av Förster-typ.

Om målobjektet är närvarande under PCR binder både framåtriktade och bakåtriktade primrar specifikt till sökfragmentet och flankerar det. 5'→3'-exonukleas-aktiviteten i DNA-polymeraset klyver bara sökfragmentet mellan reportern och quenchern om de 3 oligonukleotiderna hybridiserar till målet. Sökfragmenten förskjuts från målet och polymeriseringen av strängen fortsätter. Sökfragmentets 3'-ände är blockerad för att förhindra att sökfragmentet förlängs under PCR (Figur 2). Den här processen uppstår i varje cykel och interfererar inte med den exponentiella ackumuleringen av produkten.

Ökningen av fluorescenssignalen detekteras bara om målsekvensen är komplementär till primrarna och sökfragmentet och därför amplifieras under PCR.

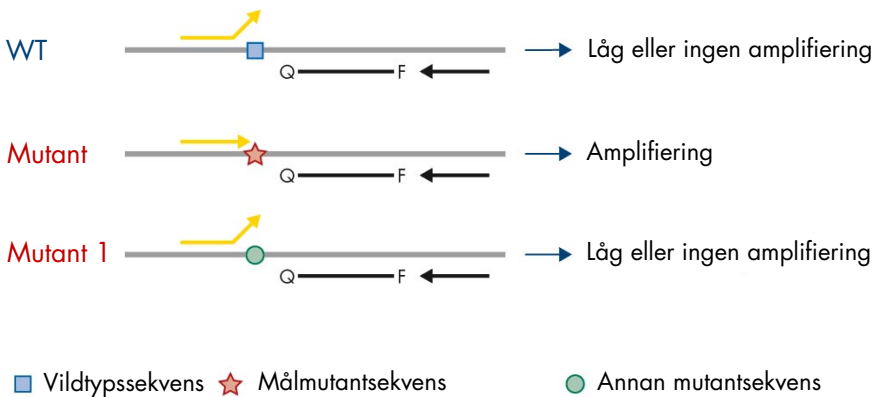


Figur 2. Reaktionsprincip.

I *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit används mutationsspecifika reaktioner, ARMS (Amplification-Refractory Mutation System) och klamputformningar för att detektera, identifiera och semikvantifiera (om tillämpligt) mutationer i DNA som extraherats från plasma.

ARMS

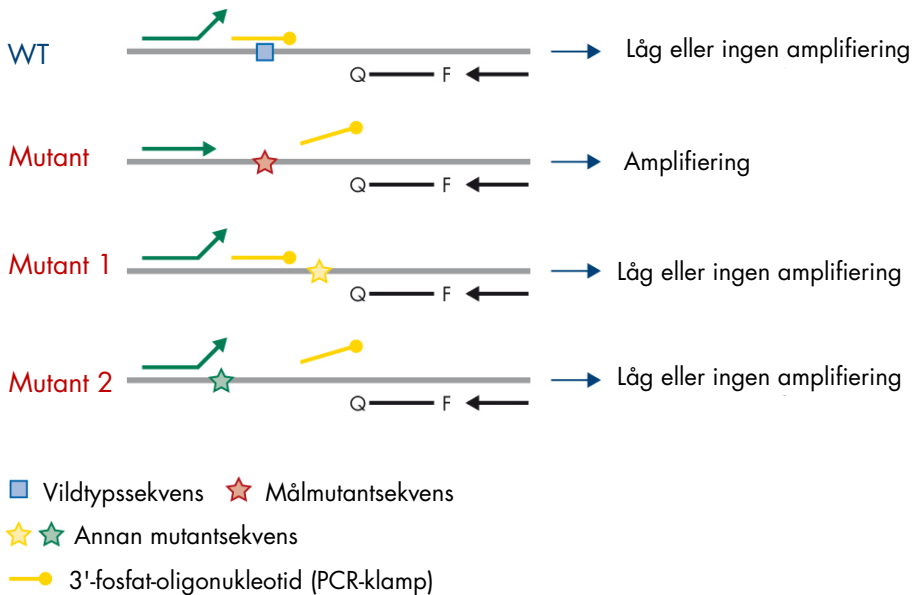
Amplification-refractory mutation system (ARMS) utnyttjar förmågan hos *Taq* DNA-polymeras att särskilja en matchad och en felmatchad bas vid 3'-ändan av en PCR-primer. När primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3'-basen inte matchar sker eventuellt endast bakgrundsamplifiering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



Figur 3. Identifiering av specifik mutation av ARMS PCR. WT: Vildtyp. Q–F: Dubbel infärgningssökfragment. D: Framåtriktade och bakåtriktade primrar.

PCR-klamp

Den här metoden används för att detektera flera varianter som är lokaliserade i samma hotspot (t.ex. *EGFR*-borttagningar i exon 19). Klampanalysen kombinerar standardprimrar och sökfragment med en extra oligonukleotid som är 3'-blockerad med tillsats av en fosfatgrupp för att förhindra PCR-elongering. Klampoligonukleotiden, liksom primrarna och sökfragmenten, är specifika för vildtypssekvensen (PCR-klampning). När PCR-mallen innehåller vildtypssekvensen hybridiseras klampen före primern på grund av ett högre T_m , vilket leder till ingen eller låg amplifiering. När det däremot finns en muterad sekvens kan klampen inte binda, vilket möjliggör hybridisering och amplifiering av primer (Figur 4).



Figur 4. Mutationsdetektion med klamp teknik. WT: Vildtyp. Q-F: Dubbel infärgningssökfragment. D: Framåtriktade och bakåtriktade primrar.

Material som medföljer

Satsinnehåll

<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit			(24)
Katalognr			874611
Antal reaktioner			24
Färg	Identitet	Rör-ID	Volym
Grön	T790M & L861Q Mix (T790M- och L861Q-blandning)	EGFR T790M & L861Q Mix (EGFR T790M- och L861Q-blandning)	280 µl
Gul	Insertions & G719X Mix (Tilläggs- och G719X- blandning)	EGFR Insertions & G719X Mix (EGFR tilläggs- och G719X-blandning)	280 µl
Lila	L858R & C797S Mix (L858R- och C797S-blandning)	EGFR L858R & C797S Mix (EGFR L858R- och C797S-blandning)	280 µl
Orange	Deletions & S768I Mix (Borttagnings- och S768I- blandning)	EGFR Deletions & S768I Mix (EGFR borttagnings- och S768I-blandning)	280 µl
Röd	EGFR Positive Control (EGFR-positiv kontroll)	EGFR Positive Control (EGFR-positiv kontroll)	190 µl
Blå	PCR Master Mix (PCR-masterblandning)	EGFR PCR Master Mix (EGFR PCR-masterblandning)	2 x 940 µl
Färglös	Water for NTC (vatten för NTC)	NTC	1,9 ml
Färglös	Water for sample dilution (vatten för spädning av prov)	Dil.	1,9 ml

OBS! Innehållet i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit räcker till 24 prover (satsen innehåller tillräckligt med reagens för upp till fyra qPCR-körningar med sex prover per körning, inklusive körningskontroller).

Satsens format och analyser

Mutationsanalys

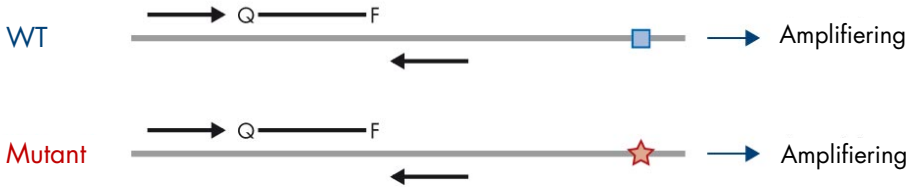
Fyra primer- och sökfragmentblandningar ingår i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:

- T790M och L861Q
- Tillägg (exon 20) och G719X
- L858R och C797S
- Borttagningar (exon 19) och S768I

Alla primer- och sökfragmentblandningar, när de kombineras med PCR-masterblandningen, gör det möjligt att detektera mål som är märkta med karboxyfluorescein (FAM™), CAL Fluor® Red 610 och en intern kontroll som är märkt med hexaklorfluorescein (HEX™).

Intern kontrollanalys

Den interna amplifieringskontrollreaktionen, märkt med HEX, används för att bedöma den totala amplifierbara *EGFR*-DNA-mallen i ett muterat och ett icke-muterat (vildtyp) prov (Figur 5) och för att identifiera reaktionsfel på grund av mindre optimal DNA-input eller förekomst av hämmande substanser i provmatrisen. Denna interna amplifieringsreaktion amplifierar ett område av exon 2 i *EGFR*-genen. Primrarna och sökfragment har utformats så att de undviker kända *EGFR*-polymorfismer.



■ Vildtypssekvens ★ Målmutantsekvens

Figur 5. Detektion av EGFR-exon 2 för intern kontroll (IC). WT: Vildtyp. Q–F: Dubbel infärgningsökfragment. D Framåtriktade och bakåtriktade primärer.

Vatten för spädning av prov (Dil.)

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit innehåller nukleasfritt vatten som ska användas för spädning av gDNA-prov.

Kontroller

Varje PCR-körning måste innehålla en positiv kontroll (PC) och en negativ kontroll (NTC) för var och en av de fyra analyserna.

Positiv kontroll (Positive Control, PC)

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1–4. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit innehåller en EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) som ska användas som mall i den positiva kontrollreaktionen. De positiva kontrollresultaten bedöms automatiskt av Rotor-Gene AssayManager® för att garantera att satsen fungerar inom de fördefinierade acceptanskriterierna.

Kontroll utan mall (No Template Control, NTC)

Varje körning måste innehålla en negativ kontroll (kontroll utan mall; No Template Control, NTC) i rör 5–8. *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit innehåller vatten för NTC som ska användas som "mall" i kontrollen utan mall. Kontrollen utan mall används för att bedöma eventuell kontamination av reagens och miljö.

Plattform och programvara

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är särskilt utformat för att användas med instrumenten Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM* med fluorescenskanaler för cyklade grön, gul och röd med den centrala programvaran Rotor-Gene AssayManager v2.1.X (X≥0), Gamma Plug-in v1.0.X (X≥0) och analysprofilerna *therascreen* EGFR Plus.

Två *therascreen* EGFR-analysprofiler finns tillgängliga: **therascreen EGFR Plus FFPE** (för bedömning av FFPE-prov) och **therascreen EGFR Plus Plasma** (för bedömning av plasmavprov). Analysprofilerna innehåller PCR-körningsparametrar och analysparametrar som möjliggör en automatiserad resultatolkning.

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

Material som behövs men inte medföljer

Ytterligare reagenser för provberedning

- Deparaffinization Solution (kat.nr 19093 eller 939018) för manuell och automatiserad gDNA-beredning från FFPE-prover
 - QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) för automatiserad gDNA-beredning från FFPE-prover
 - QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.nr 937556) för automatiserad ccfDNA-beredning från plasmaprover
 - QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 60404) för manuell gDNA-beredning från FFPE-prover
 - QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.nr 61504) för manuell ccfDNA-beredning från plasmaprover
- OBS!** Material som behövs men inte medföljer för ovanstående DNA-extraktionssatser beskrivs i respektive handbok för satsen.
- RNase A (kat.nr 19101) för manuell eller automatiserad gDNA-provberedning från FFPE-prover
 - Buffer ATL (kat.nr 939016) för deparaffiniseringsprotokollet som används med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) eller QIASymphony DNA Mini Kit (kat.nr 931236)

Förbrukningsartiklar och allmän laboratorieutrustning

- Pipetter avsedda* (justerbara) för provberedning
- Särskilda pipetter* (justerbara) för beredning av PCR-reaktionsblandning
- Särskilda pipetter* (justerbara) för dosering av mall-DNA

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

- Nukleasfria, aerosoltåliga, sterila PCR-pipettspetsar med hydrofobiska filter (pipettspetsar med aerosolbarriärer rekommenderas för att förebygga korskontaminering)
- Vortexblandare*
- Bänkcentrifug med rotor för 0,5 ml, 1,5 ml och 2,0 ml reaktionsrör (med kapacitet för 13 000–14 000 rpm)
- DNase-, RNase-, DNA-fria, sterila 1,5 eller 2,0 ml mikrocentrifugrör för beredning av DNA- och PCR-reaktionsblandningar
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml för instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (kat.nr 981103 eller 981106)
- Instrument för DNA-quantifiering
- Provrör (t.ex. 2 ml Sarstedt-rör [kat.nr 72.693]) för automatiserad gDNA-beredning (från FFPE-block). Kompatibla primära och sekundära format för rör finns på www.qiagen.com/goto/dspdnakits.
- Steril skalpell för engångsbruk för manuell och automatiserad gDNA-beredning (från FFPE-snitt på objektglasprov)
- Steril fosfatbuffrad saltlösning för IVD-användning (Phosphate-Buffered Saline, PBS, kan krävas för att fylla på plasmaprovernas volym).

Utrustning

Utrustning för automatiserad provberedning

- Instrumentet QIASymphony SP* (kat.nr 9001297) och medföljande tillbehör
OBS! Nödvändiga tillbehör beskrivs i handböckerna för respektive extraktionssats och i *Användarhandbok till QIASymphony SP/AS Allmän beskrivning*.
- Programmet QIASymphony version 4.0 eller senare

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

- Protokollet QIAasympHony Tissue_IC_200_DSP för automatiserad gDNA-beredning från FFPE-prover (se www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-dna-kits-row/#resources)
- Protokollet QIAasympHony circDNA_2000_DSP för automatiserad ccfDNA-beredning från plasmaprover (se www.qiagen.com/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiasymphony-dsp-circulating-dna-kit/#resources)

Utrustning och material för qPCR

- Instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* med fluorescenskanaler för Cycling Green, Cycling Red och Cycling Yellow (detektion av FAM, CAL Fluor Red 610 respektive HEX)
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett (kat.nr 9018901)
- 72-Well Rotor (kat.nr 9018903), Locking Ring 72-Well Rotor (kat.nr 9018904) och Rotor Holder (kat.nr 9018908)
- Programmet Rotor-Gene AssayManager version 2.1.x (där x = 1 eller senare)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in version 1.0.x (där x = 0 eller senare)
- EGFR RGQ PCR Assay Profile version 1.0.x (där x = 0 eller senare)
 - **therascreen_EGFR_Plus_FFPE** för FFPE-prover
 - **therascreen_EGFR_Plus_Plasma** för plasmaprover

* I vissa länder kan instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum maj 2011 eller senare användas. Tillverkningsdatumet kan utläsas från serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret har formatet "mmyynnn" där "mm" anger månaden i tillverkningsdatumet med siffror, "yy" anger de två sista siffrorna i tillverkningsåret och "nnn" är en unik identifieringskod för instrumentet.

Varningar och försiktighetsåtgärder

Kunder i EU bör vara medvetna om att allvarliga incidenter som har inträffat i samband med enheten måste rapporteras till tillverkaren och den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten befinner sig.

Säkerhetsinformation

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

Säkerhetsinformation om instrumentet QIASymphony SP och instrumentet Rotor-Gene Q finns i användarhandboken som medföljer instrumentet.

- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.
- Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsprocedurer.

Försiktighetsåtgärder

Användning av *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit kräver god laboratoriesed, inklusive spårning av prover och underhåll av utrustning som är speciellt anpassad till molekylärbiologi och som uppfyller tillämpliga regler och relevanta standarder.

Den här satsen är avsedd för *in vitro*-diagnostisk användning. Reagenserna och instruktionerna som medföljer denna sats har testats för optimal prestanda.

Användaren ska alltid vara uppmärksam på följande:

- Testet är avsett för användning med FFPE- och plasma-NSCLC-prover.
- Var mycket försiktig för att förhindra kontamination av prover och reagenser med *EGFR*-positivt material (dvs. positiv kontroll) eller potentiellt *EGFR*-positivt material (dvs. prover som ska testas).
 - Byt skalpell mellan proverna när du skrapar vävnaden.
 - Använd separata, särskilda pipetter för DNA-extraktion/beredning, vid förberedelse av PCR-reaktionsblandningar (beredning av förblandningar för PCR-reaktion) och för att tillsätta DNA-mall i PCR-rör.
 - Använd nya aerosolresistanta pipettspetsar för alla pipetteringssteg för att undvika korskontaminering av prover och reagenser. Iaktta största försiktighet för att undvika kontaminering via överföring (carryover) av DNA- eller PCR-produkter, vilket kan orsaka en falskt positiv signal.
 - Beredning och fördelning av reaktionsblandningar ska utföras i ett särskilt område avskilt från området för DNA-beredning där inga DNA-matriser (DNA, plasmider eller PCR-produkter) förs in. I samma utrymme tillsätter du vatten i NTC-rör och stänger dem.
 - Tillsätt DNA-mall i ett separat utrymme, helst i ett annat rum, med speciell utrustning (pipetter, spetsar osv.).
 - Rotor-Gene Q-rör får inte öppnas efter att PCR-körningen har avslutats. Detta för att förhindra laboratoriekontaminering från produkter efter PCR-körningen.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-reagenser ska skyddas från ljus, temperaturer utanför tillåtet intervall samt upprepad tining och frysning, annars kan satsens prestanda förändras.
- Frysta komponenter tinas upp helt i rumstemperatur (15–25 °C) (eller i kylskåp (2–8 °C)) skyddade från ljus. Kontrollera regelbundet om materialet redan har tinats upp.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.
- Reagenser till *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit har spänts ut optimalt. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda.

-
- Använd inte reaktionsvolymen (reaktionsblandning plus prov) på mindre än 25 µl då det ökar risken för ett falskt negativt resultat.
 - Alla reagenser som medföljer *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.
 - Byt inte ut reagenserna i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit eller mellan olika loter av *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit eftersom prestandan då kan påverkas.
 - Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
 - Försiktighet måste iaktas för att säkerställa korrekt provtagning och analys med betoning på eliminering av felaktig provinmatning, laddningsfel och pipetteringsfel samt placering av PCR-rören på remsa i rätt position i rotorn med 72 brunnar.
 - Se till att proverna hanteras på ett systematiskt sätt för att säkerställa korrekt identifiering och spårbarhet.
 - Iaktta största försiktighet för att förhindra kontaminering av DNase, vilket kan orsaka försämring av mall-DNA. Använd nukleasfritt laboriematerial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor) och bär handskar när du utför analysen.
 - **OBS!** Produkten är avsedd att användas endast av erfaren laboriepersonal som är väl förtrogen med laborieprocedurer och instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Förvaring och hantering av reagenser

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

Leveransvillkor

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit levereras på torris och måste vara fruset vid ankomst. Om någon komponent i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit inte är fryst vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bruksanvisning eller reagenser i leveransen ska du kontakta en avdelning för QIAGEN teknisk service eller lokala distributörer (se www.qiagen.com).

Leveransvillkoren för DNA-extraktionssatserna och de tillhörande reagenser som ska användas finns i handböckerna för respektive sats.

Förvaringsförhållanden

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

OBS! Alla fluorescensmärkta sökfragment i reaktionsblandningsreagenserna är ljuskänsliga. Skydda reaktionsblandningsreagenserna mot ljus för att undvika fotoblekning.

Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Reagenserna ska helst inte utsättas för mer än fyra frysings-/upptiningscykler.

Lagrings- och hanteringsinformation för DNA-extraktionssatserna och de tillhörande reagenser som ska användas finns i handböckerna för respektive sats.

Stabilitet

Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren är *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Undvik att frysa/tina upp innehållet i satsen i onödan.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15 °C fram till angivet utgångsdatum. Den totala tiden innan körning efter det att PCR-reaktionerna har iordningställts ska inte överskrida 24 timmar vid förvaring i kylskåp ($2-8$ °C; den här tiden inkluderar både PCR-konfiguration och förvaring).

Information om stabilitet för DNA-extraktionssatserna och de tillhörande reagenser som ska användas finns i handböckerna för respektive sats.

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

Förvaring och hantering av prover

Provmaterialet är humant genomiskt DNA som extraherats från FFPE-tumörvävnad eller cirkulerande cellfritt DNA (ccfDNA) som extraherats från 2K-EDTA-plasma.

Proverna måste transporteras enligt standardmässig patologisk metod för att garantera provets kvalitet.

OBS! Alla prover måste behandlas som potentiellt smittbärande material.

OBS! För att uppnå optimal användning av reagenser i *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit måste proverna indelas i batchar. Om prover testas individuellt krävs mer reagenser, vilket leder till att färre prover kan testas med satsen.

FFPE-prover

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

Så här förbereder du vävnadsprover för gDNA-extraktion:

- Standardprocedurer för formalinfixering och paraffinbäddning ska användas. Se handboken för relevant extraktionssats för mer information.
- Skär med hjälp av mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas. Låt en utbildad person (t.ex. en patolog) bedöma ett H&E-färgat (Hematoxylin och eosin) snitt för att bekräfta förekomst av tumör. De färgade snitten får inte användas för DNA-extraktion.
- Startmaterialet för gDNA-rening är sektioner med FFPE-vävnad (helst nyskurna).

- Förvara alla FFPE-block och objektglas i rumstemperatur (15–25 °C). FFPE-sektioner monterade på objektglas kan förvaras i rumstemperatur i upp till 1 månad innan DNA-extraktion.

Plasmaprover

Använd standardprocedurer för laboratorier för att förbereda plasma från 2K-EDTA-helblodsprouver. Se handboken för relevant extraktionssats för mer information.

Om färsk plasma används för utvinning av nukleinsyror samma dag ska den förvaras vid 2–8 °C tills dess att den ska bearbetas. För mer långvarig förvaring ska du förvara plasma fryst vid –30 till –15 °C eller –90 till –65 °C. Det rekommenderas att använda alikvoter för att undvika att frysa/tina upp plasmaproverna. Upprepad frysning och tining leder till denaturering och precipitat av proteiner, vilket kan resultera i minskat utbyte av cirkulerande cellfria nukleinsyror.

Genomiskt DNA och cirkulerande cellfria DNA-prover

Genomiskt DNA som extraherats från FFPE-tumörvävnad och cirkulerande cellfritt DNA som extraherats från plasma måste förvaras vid 2–8 °C för korttidsförvaring (upp till 24 timmar) och –30 till –15 °C (eller –90 till –65 °C) om långtidsförvaring krävs. Undvik att frysa/tina upp det extraherade gDNA och ccfDNA i onödan. Fryst eluat får inte tinas upp mer än tre gånger.

Procedur

Protokoll: Extraktion och beredning av DNA

Saker som måste göras före start

- Se till att operatören är utbildad i att använda de instrument och extraktionssatser som behövs för DNA-extraktion och provberedning. Vid behov kan utbildning om instrumentet tillhandahållas vid installationen (se "Beställningsinformation", sida 110).
- Läs avsnittet "Material som behövs men inte medföljer" i handboken för varje extraktionssats för att se vilka tillbehör som krävs för varje procedur:
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) för automatiserad gDNA-beredning (från FFPE-prover)
- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.nr 937556) för automatiserad ccfDNA-beredning (från plasmaprover)
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 60404) för manuell gDNA-beredning (från FFPE-prover)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.nr 61504) för manuell ccfDNA-beredning (från plasmaprover)

Protokoll: gDNA-extraktion från FFPE-prover

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är endast testat i kombination med QIAGEN Deparaffinization Solution (kat.nr 19093 eller 939018) för deparaffinisering av FFPE-sektioner med följande DNA-extraktionssatser:

- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) för automatiserad extraktion
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 60404) för manuell extraktion

Viktigt att tänka på före start

Tillämpas för protokoll för automatiserad och manuell extraktion:

- Kontrollera att reagenserna för DNA-extraktion inte har passerat utgångsdatum och att de har transporterats och förvarats under rätt förhållanden.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Mellan en och fyra FFPE-vävnadssektioner, vardera med en tjocklek på 10 µm, eller mellan två och åtta sektioner med en tjocklek på upp till 5 µm, kan kombineras i ett preparat.
- Använd endast Deparaffinization Solution för deparaffinisering av FFPE enligt proceduren "Förbehandlingsprotokoll för användning med QIASymphony DSP DNA Mini Kit" på sida 33 eller "Protokoll: Förbehandlingsprotokoll för användning med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit" på sida 36.

OBS! Deparaffinization Solution medföljer inte extraktionssatserna och måste beställas separat (se "Beställningsinformation", sida 110).

- Använd RNase A för att minimera RNA-innehållet (inkluderat i proceduren "Protokoll: Deparaffinisering av FFPE-sektion med QIAGEN Deparaffinization Solution" på sida 33).

OBS! RNase A medföljer inte extraktionssatserna och måste beställas separat (se "Beställningsinformation", sida 110).

- Spädning av prover kan vara nödvändig innan qPCR-testning (se "Protokoll: gDNA-kvantifiering och normalisering", sida 41) eller för förvaring.
- DNA som isolerats från FFPE-prover har vanligtvis lägre molekylvikt än DNA från färska eller frysta prover. Graden av fragmentering beror på provets typ och ålder och de förhållanden som använts för fixering.
- För förvaring av DNA efter extraktion, se "Genomiskt DNA och cirkulerande cellfria DNA-prover", sida 29.

Protokoll: Automatiserad gDNA-extraktion från FFPE-prover med användning av QIASymphony SP

Om du använder QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236) för automatiserad extraktion utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande:

- Använd endast Deparaffinization Solution för deparaffinisering av FFPE enligt proceduren "Förbehandlingsprotokoll för användning med QIASymphony DSP DNA Mini Kit", sida 33.

OBS! Deparaffinization Solution medföljer inte extraktionssatserna och måste beställas separat (se "Beställningsinformation", sida 110).

- Välj protokollet Tissue_LC_200_V7_DSP på instrumentet QIASymphony SP (mer information finns i protokollet *QIASymphony SP-protokollblad Tissue_LC_200_V7_DSP*)
- Använd 50 µl elueringsvolym.
- Ytterligare information om instrumentet QIASymphony SP finns i användarhandboken som medföljer instrumentet.

Protokoll: Manuell gDNA-extraktion från FFPE-prover

Om du använder QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 60404) för manuell extraktion utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande:

- Använd endast Deparaffinization Solution för deparaffinisering av FFPE enligt proceduren "Protokoll: Förbehandlingsprotokoll för användning med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit", sida 36.

OBS! Deparaffinization Solution medföljer inte extraktionssatserna och måste beställas separat (se "Beställningsinformation", sida 110).

- Använd 50 µl elueringsvolym.

Protokoll: Deparaffinering av FFPE-sektion med QIAGEN Deparaffinization Solution

Förbehandlingsprotokoll för användning med QIASymphony DSP DNA Mini Kit

Detta förbehandlingsprotokoll är avsett för användning med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (för automatiserad extraktion) och är baserat på protokollet *QIASymphony SP-protokollblad Tissue_LC_200_V7_DSP* (Metod 1: deparaffinering med Deparaffinization Solution).

Viktigt att tänka på före start

- Ekvilibrera alla buffrar till rumstemperatur (15–25 °C) och ekvilibra Deparaffinization Solution till 20–25 °C.
- QIASymphony-magnetpartiklar renar både RNA och DNA samtidigt om båda finns i provet. För att minimera RNA-innehållet i provet tillsätter du RNase A till provet vid det steg som anges i förbehandlingsprotokollet nedan.
- Deparaffinization Solution, RNase A och Buffer ATL medföljer inte QIASymphony DSP DNA Mini Kit och måste beställas separat (se "Beställningsinformation", sida 110).

Saker som måste göras före start

- Förvärm en termomixer eller skakinkubator till 56 °C för användning i steg 7.
- Kontrollera ATL-buffert avseende vitt precipitat. Lös vid behov upp precipitat enligt protokollet som beskrivs i protokollet *QIASymphony SP-protokollblad Tissue_LC_200_V7_DSP*.

Procedur

Starta endast med FFPE-block

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell. Skär ut mellan en och fyra sektioner med en tjocklek på 10 µm eller mellan två och åtta sektioner med en tjocklek på 5 µm.

OBS! Om provytan har exponerats för luft ska de första 2–3 snitten kasseras.

2. Placera omedelbart sektionen/sektionerna i ett 2 ml provrör som är kompatibelt med provrörshållaren för QIASymphony SP (medföljer inte; t.ex. Sarstedt, kat.nr 72.693).
3. Fortsätt med steg 4 nedan (för alla prover).

Starta endast med FFPE-sektioner på objektglas

1. Lägg 1 droppe Deparaffinization Solution på varje objektglas med särskilda pipetter för provberedning.
2. Skrapa av provmaterialet med en steril skalpell för engångsbruk för att samla in hela vävnaden. Placera det insamlade materialet i ett 2 ml provrör som är kompatibelt med provrörshållaren för QIASymphony SP (medföljer inte; t.ex. Sarstedt, kat.nr 72.693).
3. Fortsätt med steg 4 nedan (för alla prover).

För alla prover

4. Tillsätt 200 µl Buffer ATL till snitten.
5. Tillsätt 20 µl proteinas K.
OBS! Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Tillsätt 160 µl eller 320 µl Deparaffinization Solution (se Tabell 2) och vortexblanda.

Tabell 2. Erforderlig volym Deparaffinization Solution

Sektionstjocklek	Antal snitt	Volym Deparaffinization Solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Placera provröret i en ThermoMixer eller skakinkubator och inkubera vid 56 °C i 1 timme med skakning vid 1 000 rpm tills vävnaden är helt lyserad.

OBS! Lyseringstiden varierar beroende på vävnaden som bearbetas. För de flesta vävnader är lyseringen klar inom 1 timme. Om lysering är ofullständig efter 1 timmar, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material kan pelleteras med centrifugering. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.

8. Inkubera vid 90 °C i 1 timme.

OBS! Inkuberingen vid 90 °C i Buffer ATL häver delvis formaldehydmodificeringen av nukleinsyror. Längre inkuberingstider eller högre inkuberingstemperaturer kan leda till ett mer fragmenterat DNA. Om endast ett värmeblock används ska provet stå i rumstemperatur efter inkuberingen vid 56 °C tills värmeblocket når 90 °C.

9. För att minimera RNA-innehållet i provet tillsätter du 2 µl RNase A (100 mg/ml) till den undre fasen och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur innan du fortsätter med steg 10. Låt provet svalna till rumstemperatur innan RNase A tillsätts.
10. Centrifugera vid full hastighet i 1 minut vid rumstemperatur.
11. Överför försiktigt provrör (innehållande båda faserna) till provbäraren för QIASymphony SP.
12. Fortsätt till extraktionen enligt anvisningarna i *handboken för QIASymphony DSP DNA Mini Kit* (använd 50 µl elueringsvolym.).

Protokoll: Förbehandlingsprotokoll för användning med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Detta förbehandlingsprotokoll är avsett för användning med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (för manuell extraktion) och är baserat på "QIAGEN tilläggsprotokoll: Rening av genomiskt DNA från FFPE-vävnad med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit och Deparaffinization Solution".

Viktigt att tänka på före start

- Utför alla centrifugeringsstegen i rumstemperatur (15–25 °C).
- Ekvilibrera alla buffrar till rumstemperatur. Ekvilibrera Deparaffinization Solution till 20–25 °C.
- Deparaffinization Solution, RNase A och Buffer ATL medföljer inte QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit och måste beställas separat (se "Beställningsinformation", sida 110).

Saker som måste göras före start

- Förvärm en termomixer eller uppvärmd skakinkubator till 56 °C för användning i steg 6 och 10. Om det inte finns någon termomixer eller uppvärmd skakinkubator tillgänglig, går det att använda ett värmeblock eller vattenbad istället.
- Om Buffer AL eller Buffer ATL innehåller precipitat ska du lösa upp precipitatet enligt protokollet som beskrivs i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.
- Kontrollera att Buffer AW1 och Buffer AW2 har förberetts i enlighet med instruktionerna i *handboken för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

Procedur

Starta endast med FFPE-block

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell. Skär i 5–10 µm tjocka sektioner.
OBS! Om provytan har exponerats för luft ska de första 2–3 snitten kasseras.
2. Placera omedelbart sektionerna i ett mikrocentrifugrör på 1,5 ml eller 2 ml (medföljer inte).
3. Fortsätt med steg 4 nedan (för alla prover).

Starta endast med FFPE-sektioner på objektglas

1. Lägg 1 droppe Deparaffinization Solution på varje objektglas med särskilda pipetter för provberedning.
2. Skrapa av provmaterialet med en skalpell för att samla in hela vävnaden. Placera det insamlade materialet i ett mikrocentrifugrör på 1,5 ml eller 2 ml (medföljer inte).
3. Fortsätt med steg 4 nedan (för alla prover).

För alla prover

4. Tillsätt 160 µl eller 320 µl Deparaffinization Solution (Tabell 3) och vortexblanda ordentligt i 10 sekunder.

Tabell 3. Erforderlig volym Deparaffinization Solution

Sektionstjocklek	Antal snitt	Volym Deparaffinization Solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

5. Centrifugera en kort stund för att samla upp provet i botten av röret.
6. Inkubera i 56 °C i 3 minuter och låt det kylas ner i rumstemperatur (15–25 °C).
7. Tillsätt 180 µl Buffer ATL, och vortexblanda.
8. Centrifugera i 1 minuter vid 11 000 x g (10 000 varv/min). Två faser visas (blå och färglös).
9. Tillsätt 20 µl proteinas K till den lägre, färglösa fasen. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
10. Inkubera vid 56 °C i 1 timme (eller tills provet är fullständigt lyserat).
11. Inkubera vid 90 °C i 1 timme.

Inkuberingen vid 90 °C i Buffer ATL häver delvis formaldehydmodificeringen av nukleinsyror. Längre inkuberingstider eller högre inkuberingstemperaturer kan leda till ett mer fragmenterat DNA.

OBS! Om du bara använder ett värmeblock, lämnar du provet i rumstemperatur (15–25 °C) efter inkuberingen i 56 °C i steg 10, tills dess att värmeblocket har uppnått 90 °C för steg 11.

12. Centrifugera 1,5 ml-röret som hastigast för att avlägsna droppar från lockets insida.
13. Överför den lägre, färglösa fasen till ett nytt 2 ml mikrocentrifugrör.
14. Tillsätt 2 µl RNase A (100 mg/ml) och inkubera i 2 minuter i rumstemperatur.
15. Fortsätt med steg 12 (tillsättning av Buffer AL) i *handboken för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* (använd 50 µl elueringsvolym).

Protokoll: ccfDNA-extraktion från plasmaprover

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är testat i kombination med följande DNA-extraktionssatser:

- QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.nr 937556) för automatiserad ccfDNA-extraktion (från plasmaprover)
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.nr 61504) för manuell ccfDNA-extraktion (från plasmaprover)

Viktigt att tänka på före start

Tillämpas för protokoll för automatiserad och manuell extraktion:

- Kontrollera att reagenserna för DNA-extraktion inte har passerat utgångsdatum och att de har transporterats och förvarats under rätt förhållanden.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.
- Startmaterial för ccfDNA-rening ska vara plasma förberedd från 2K-EDTA-helblodsprover. Proverna kan vara färska eller frysta (förutsatt att de inte har frysts ned och tinats upp mer än en gång).
- Koncentrationen av cirkulerande cellfria nukleinsyror i biologiska vätskor såsom plasma är vanligtvis låg och varierar avsevärt mellan individer. Därför kommer ccfDNA som extraheras från plasmaprover inte att kvantifieras eller normaliseras (ingen spädning) och används direkt i qPCR-reaktionen.
- För förvaring av DNA efter extraktion, se avsnitt "Genomiskt DNA och cirkulerande cellfria DNA-prover", sida 29.

Protokoll: Automatiserad ccfDNA-extraktion från plasmaprover med användning av QIASymphony SP

Om du använder QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (kat.nr 937556) för automatiserad extraktion utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande:

- Välj protokollet `circDNA_2000_DSP_V1` på instrumentet QIASymphony SP (protokolldetaljer finns i *QIASymphony SP-protokollblad circDNA_2000_DSP_V1*)
- ⚠️ Rekommenderad provvolym för `circDNA_2000_DSP` är 2 ml. Vi rekommenderar dock att du börjar med 2,4 ml för att förhindra att extraktionen misslyckas under den initiala pipetteringen, enligt vad som anges i "Felsökningsguiden" i *handboken för QIASymphony DSP Circulating DNA Kit*. Om det inte finns tillräckligt med prov tillsätter du steril PBS (medföljer inte) till provet upp till den erforderliga provvolymen innan du laddar provet.
- Använd 60 µl elueringsvolym.
- Ytterligare information om instrumentet QIASymphony SP finns i användarhandboken som medföljer instrumentet.

Protokoll: Manuell ccfDNA-extraktion från plasmaprover

Om du använder QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (kat.nr 61504) för manuell rening utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande:

- Rening av cirkulerande nukleinsyror utförs från 2 ml plasma.
- Ett vakuumgrenrör (t.ex. QIAvac 24 Plus med QIAvac Connecting System) och en vakuumpump som kan skapa ett vakuum på -900 till -800 mbar (t.ex. QIAGEN Vacuum Pump) krävs för protokollet.
- Använd 60 µl elueringsvolym.

Protokoll: gDNA-kvantifiering och normalisering

Saker som måste göras före start

Om du använder automatiserade extraktionsprocedurer ska du kontrollera kolumnen "Validity of result" (Giltighet för resultat) för varje prov i QIASymphony SP-resultatfilen när körningen är avslutad:

- Giltig status: Fortsätt till gDNA-kvantifiering.
- Oklar status: Kan bearbetas beroende på varifrån flaggan kommer (mer information om möjliga orsaker till "unclear" (oklar) flaggning finns i "Användarhandbok till QIASymphony SP/AS").
- Ogiltig status: Provet avvisas. Upprepa extraktionssteget.

Procedur

gDNA som extraherats från FFPE-prover ska kvantifieras.

Om den uppmätta koncentrationen är mindre än 4 ng/μl måste provet omextraheras med fler sektioner (högst åtta sektioner på 5 μm eller fyra sektioner på 10 μm).

Om den uppmätta koncentrationen är över 6 ng/μl måste provet spädas till 5 ng/μl med vattnet för spädning av prov som medföljer *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit enligt formeln:

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

Där

C_i: Initial koncentration av det extraherade gDNA

C_f: Slutlig målkoncentration = 5 ng/μl

V_f: Slutlig volym som krävs för att utföra en körning med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR (dvs. 20 μl + extra volym för pipetteringsfel)

Vi: Initial volym för det extraherade gDNA som ska pipetteras och spädas med vattnet för spädning av prov som medföljer *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (Vattenvolym som ska tillsättas = $V_f - V_i$)

Varje PCR-reaktion är optimerad för 25 ng gDNA spätt till en slutlig provvolym på 5 μ l. Eftersom varje prov testas med de fyra *EGFR*-reaktionsblandningarna behövs totalt 100 ng per testat prov.

OBS! Se till att rätt elueringsbuffert används för att kalibrera instrumentet för kvantifiering.

ccfDNA som extraherats från plasmaprover ska inte kvantifieras. Varje PCR-reaktion är optimerad för 5 μ l renat extraherat ccfDNA. Eftersom varje prov testas med de fyra *EGFR*-reaktionsblandningarna behövs totalt 20 μ l per testat prov.

Protokoll: EGFR-mutationsbedömning med qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet

Viktigt att tänka på före start

- Se till att operatören är utbildad i att använda instrumenten för qPCR. Vid behov kan utbildning om instrumentet tillhandahållas vid installationen (se "Beställningsinformation", sida 110).
- Läs "Försiktighetsåtgärder", sida 23 och bekanta dig med alla komponenter i satsen innan du använder den.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit måste köras på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* med Rotor-Gene AssayManager version 2.1 (eller senare) kombinerat med Gamma Plug-in version 1.0.0 (eller senare) associerad med den dedikerade analysprofilen för FFPE eller plasma.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, med programmet Rotor-Gene AssayManager och med Gamma Plug-in innan du startar protokollet. Se användarhandböckerna för instrumentet, Rotor-Gene AssayManager och Gamma Plug-in för information.
- Rotor-Gene AssayManager version 2.1 möjliggör automatisk tolkning av PCR-resultaten. Cykelparametrarna är låsta för körningen.
- Om du använder programmet Rotor-Gene AssayManager version 2.1, Gamma Plug-in och analysprofilen för första gången, referera till avsnittet "Bilaga A: Installera Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet, Gamma Plug-in och importera analysprofilen" på sida 103 för installationsanvisningar. Om programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in och analysprofilen redan är installerade och importerade i din dator, fortsätter du med instruktionerna nedan.

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

- Om du använder automatiserade extraktionsprocedurer ska du kontrollera kolumnen "Validity of result" (Giltighet för resultat) för varje prov i QIAAsymphony SP-resultatfilen när körningen är avslutad. Se "Protokoll: gDNA-kvantifiering och normalisering", sida 41.
- Om du använder gDNA som extraherats från FFPE ska provet kvantifieras och spädas till 5 ng/µl. Se "Protokoll: gDNA-kvantifiering och normalisering", sida 41.
- Om du använder ccfDNA som extraherats från plasma ska proven användas ospädda.

Konfigurera qPCR

Med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit rekommenderas det att testa sex DNA-prover i samma experiment för att optimera användningen av kontrollerna och reaktionsblandningarna. Det är dock möjligt att testa upp till 16 prover i samma experiment.

Saker som måste göras före start

- Kyl ned ditt Loading Block (72 x 0.1 ml tubes) i ett kylskåp (2–8 °C).
- Tina alla komponenter som behövs före varje användning.
OBS! Låt inte upptiningstiden överstiga 1 timme i rumstemperatur eftersom materialet då kan försämrats. Om det behövs längre tid kan du förvara komponenterna vid 2–8 °C i upp till 8 timmar.
- Rengör bänkytan som ska användas för beredning av PCR-blandningen för att minska risken för mall- eller nukleaskontaminering.
- Vortexblanda provrören som innehåller kontroller, primer- och sökfragmentblandningar samt PCR-masterblandning (3–5 sekunder) och centrifugera sedan kort före användning.

Procedur

1. Förbered de fyra PCR-reaktionsblandningarna i 1,5 ml eller 2 ml provrör (medföljer inte), dvs. blanda varje primer- och sökfragmentblandning (T790M- och L861Q-blandning, tilläggs- och G719X-blandning, L858R- och C797S-blandning eller borttagnings- och S768I-blandning) med PCR-masterblandning beroende på antalet prover som ska bearbetas.

Den volym som krävs av varje satskomponent för att göra reaktionsblandningarna visas i Tabell 4. Den slutliga PCR-reaktionsvolymen är 25 µl efter tillsats av 5 µl DNA-prov eller mall för körningskontroll. Extra volym ingår för att kompensera för pipetteringsvariationer och för att tillåta beredning av tillräcklig mängd reaktionsblandning för det planerade antalet testprover och kontroller, t.ex. sex prover plus två kontroller.

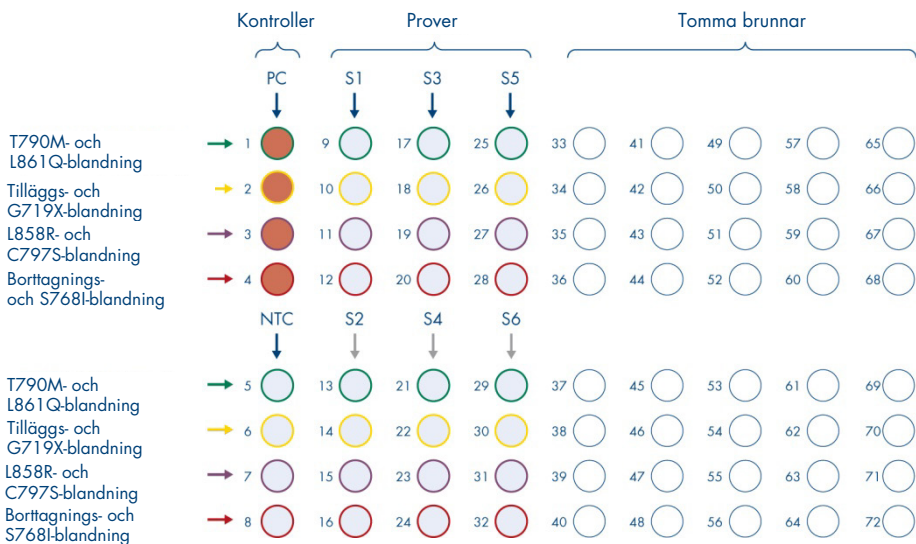
Tabell 4. Beredning av reaktionsblandningar


Komponent	1 reaktion (µl)	8 + 1 reaktioner (µl)*
EGFR-primer- och sökfragmentblandning	7,5	67,5
PCR-masterblandning	12,5	112,5
Total volym av reaktionsblandning	20	180
Distribution av reaktionsblandning	20 µl per rör	
Distribution av testprov	5 µl per rör	
Total volym per reaktion	25 µl	

* En extra reaktionsvolym inkluderas för att kompensera för pipetteringsfel: en extra brunn för upp till 10 brunnar och två extra brunnar för upp till 20 brunnar.

- Sätt tillbaka alla *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-komponenter i frysen för att undvika att materialet försämras.
- Vortexblanda reaktionsblandningarna i 3–5 sekunder och centrifugera en kort stund.
- Placera PCR-rören på remsa på ett kylt Loading Block (72 x 0.1 ml tubes) och dispensera 20 µl *EGFR*-reaktionsblandning per rör på remsa i enlighet med den laddningsblocks-konfiguration som visas i Figur 6.

OBS! Det rekommenderas att du doserar 20 µl av reaktionsblandningen genom omvänd pipettering.



Figur 6. Laddningsblocksconfiguration för ett experiment med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit för testning av sex prover. Positionerna 1–32 är enligt följande. PC: *EGFR*-positiv kontroll; NTC: Kontroll utan mall (vatten); Prov 1 (S1) till Prov 6 (S6): DNA-prover. Reaktionsblandningar: *EGFR* T790M- och L861Q-blandning, *EGFR* tilläggs- och G719X-blandning, *EGFR* L858R- och C797S-blandning, *EGFR* borttagnings- och S768I-blandning. Alla återstående positioner  är tomma brunnar.

OBS! Både FFPE- och plasma-DNA-prover kan köras i samma experiment. Detta kräver att man kör analysprofilerna för både FFPE och plasma i samma experiment och en specifik plattlayout. Se "Bilaga B: Köra analysprofilerna för FFPE och plasma i samma experiment" (sida 107) för mer information.

- Tillsätt 5 µl vatten för NTC i de avsedda NTC-rören (Figur 6) så att den totala volymen blir 25 µl. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned. Stäng alla rör som innehåller NTC.
- Vortexblanda och centrifugera en kort stund DNA-prover och *EGFR*-positiva kontroller (Positive Control, PC). Tillsätt sedan 5 µl prov eller PC-mall i motsvarande rör (Figur 6) så att den totala volymen blir 25 µl. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
- Stäng alla rör och kontrollera att det inte finns några luftbubblor i botten på rören.

OBS! Byt spets mellan varje tillsättning av mall för att undvika kontaminering.

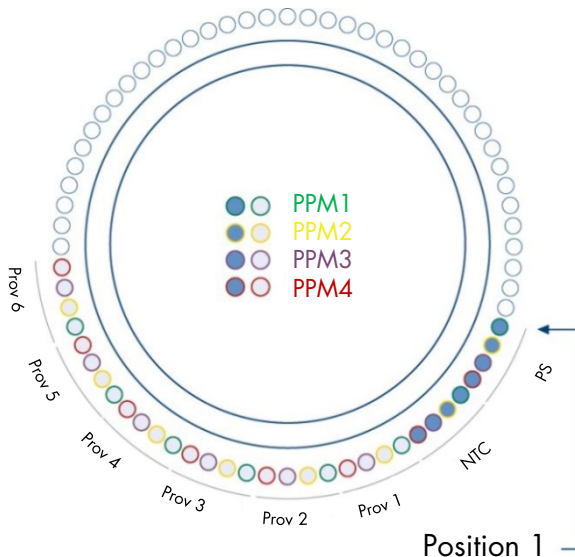
Protokoll: Förbered instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

- Placera rotorn med 72 brunnar på rotorhållaren i instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Fyll rotorn med rör på remsa enligt deras tilldelade positioner, med början på position 1 enligt Figur 7.

OBS! Se till att det första röret sätts in på position 1 och att rören på remsa placeras i rätt riktning och på rätt positioner enligt bilden.

- Alla oanvända positioner måste fyllas med tomma förslutna rör på remsa.

OBS! Vi rekommenderar att du behåller de fyra positiva kontrollerna i positionerna 1–4 och de fyra kontrollerna utan mall i positionerna 5–8 eftersom inställningen för automatisk analys i analysprofilerna baseras på denna placering. Om du använder en annan layout blir resultaten avvikande eller ogiltiga.



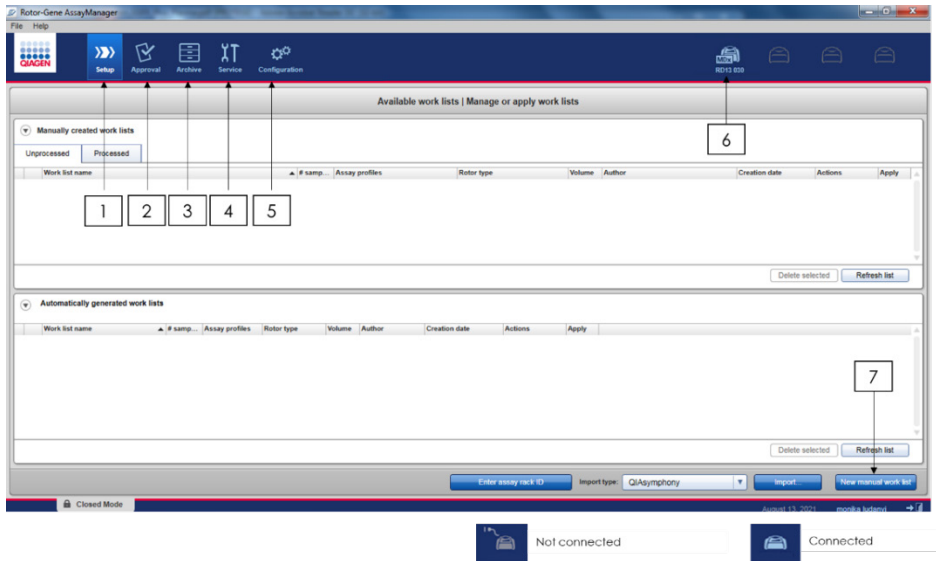
Figur 7. Rotorkonfiguration för ett experiment med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit. Från position 1 PC: EGFR-positiv kontroll; NTC: Kontroll utan mall (vatten); PPM 1: EGFR T790M- och L861Q-blandning; PPM 2: EGFR tillägs- och G719X-blandning; PPM 3: EGFR L858R- och C797S-blandning; PPM 4: EGFR borttagnings- och S768I-blandning; Prov 1 till Prov 6: DNA-prover. OBS! Alla kvarvarande positioner ska fyllas med tomma rör.

-
11. Sätt dit låsringen.
 12. Ladda instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med rotorn och låsringen. Stäng instrumentluckan.

Skapa en arbetslista och starta qPCR-körningen

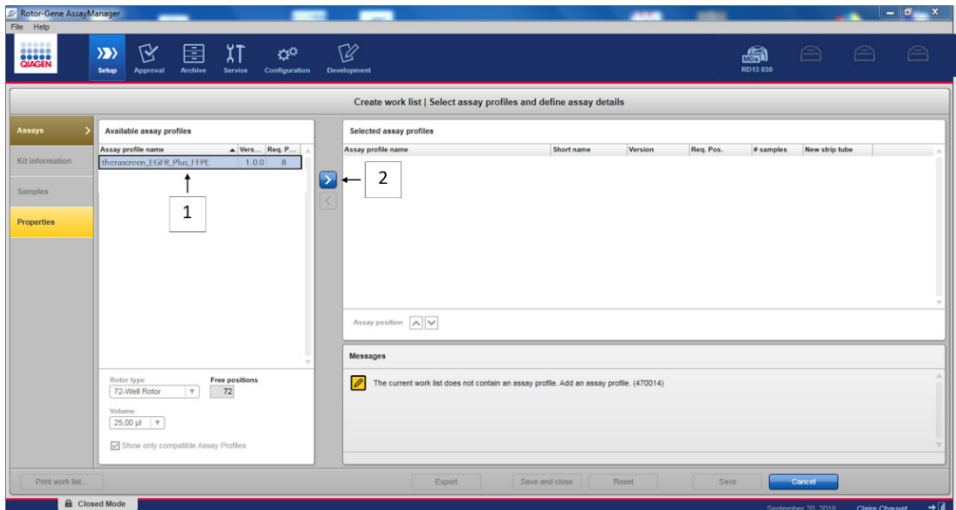
OBS! Arbetslistan kan skapas och sparas innan proverna förbereds eller när experimentet är konfigurerat på instrumentet, som det beskrivs i den här handboken.

13. Slå på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
14. Öppna programvaran **Rotor-Gene AssayManager** v2.1.
15. Logga in som en användare med behörigheten **Operator** (Operatör) i stängt läge. Klicka på **OK**. Följande fönster visas.



Figur 8. Rotor-Gene AssayManager v2.1.1. 1 = Fliken "Setup" (Installation). Den här fliken tillåter hantering eller tillämpning av arbetslistor 2 = Fliken "Approval" (Godkännande). Den här fliken låter dig hitta tidigare experiment. 3= Fliken "Archive" (Arkiv). Den här fliken låter dig hitta tidigare godkända experiment. 4 = Fliken Service. På den här fliken rapporteras ett granskningsspår för varje fil som skapats av programvaran. 5 = Fliken "Configuration" (Konfiguration). Den här fliken låter dig konfigurera alla programparametrar. 6 = instrumentikon för Rotor-Gene Q (RGQ); informerar användaren om huruvida en given cykler är ansluten. Upp till fyra RGQ-instrument kan anslutas till samma dator. 7 = "New manual work list" (Ny manuell arbetslista).

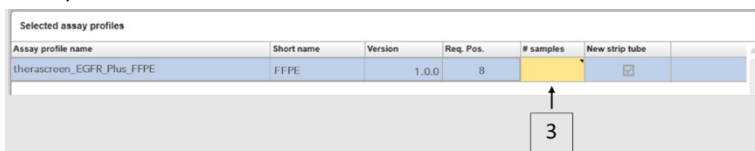
16. Kontrollera att RGQ identifieras korrekt av programvaran innan du startar körningen. Mer information finns i "Cycler Environment" (Cyklermiljö) i *Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.
17. Klicka på **New manual work list** (Ny manuell arbetslista) i arbetslistehanteraren (miljön "Setup" (Installation)) (Figur 8).
18. Markera relevant EGFR-analysprofil i listan över tillgängliga analysprofiler:
 - För testning av gDNA-prover från FFPE: `therascreen_EGFR_Plus_FFPE`
 - För testning av ccfDNA-prover från plasma: `therascreen_EGFR_Plus_Plasma`



Figur 9. Välj en analysprofil. 1 = Tillgängliga analysprofiler; 2 = Överföring av analysprofil till arbetslista

OBS! Det är möjligt att köra analysprofiler för både FFPE och plasma i samma experiment. Se "Bilaga B: Köra analysprofilerna för FFPE och plasma i samma experiment", sida 107, för mer information.

19. Klicka på Move (Flytta) för att överföra den valda analysprofilen till listan med Selected assay profiles (Valda analysprofiler).
20. Ange antalet prover i det motsvarande fältet.



Figur 10. Skapa arbetslistan: definition av analysinformation. 3 = antal prover

OBS! Antalet prover motsvarar inte antalet rör och inkluderar inte kontroller.

21. Välj fliken "Kit Information" (Satsinformation). Ange följande information om EGFR-satsen, som finns tryckt på etiketten på förpackningen till *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR kit:

- Materialnummer: 1114551
- Giltigt utgångsdatum
- Lotnummer

Figur 11. Skapa arbetslistan: Redigera satsinformationen. 4 = Kit bar code (Satsens streckkod). På den här fliken anges satsens streckkod (om streckkoden anges fylls de andra fälten i automatiskt). 5 = Material number (Materialnummer). 6 = Kit expiry date (Satsens utgångsdatum). 7 = Lot number (Lotnummer). Denna information finns på satsens förpackning.

OBS! Alla fält måste fyllas i och blir blå när giltig information har angetts.

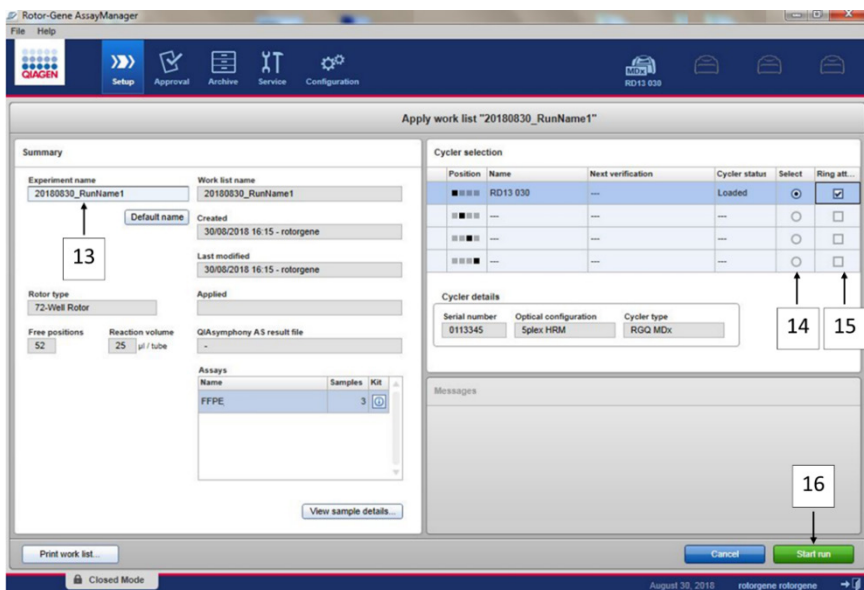
22. Väl fliken "Samples" (Prover). En lista med provinformation visas. Denna lista representerar den förväntade layouten för rotorn.
23. Ange providentifikationen i listan samt eventuell valfri provinformation som en kommentar för varje prov.

OBS! Kryssrutan "**is editable**" (är redigerbar) (Figur 13) anger om arbetslistan fortfarande är redigerbar eller inte. Om arbetslistan kan appliceras och inte ska ändras i efterhand ska denna kryssruta avmarkeras.

OBS! Arbetslistan kan appliceras direkt eller sparas och köras senare.

25. Markera kryssrutan **worklist is complete** (can be applied) (arbetslistan är klar (kan appliceras)).
26. Spara arbetslistan.
Valfritt: Arbetslistan kan skrivas ut, vilket kan vara till hjälp vid förberedelse och konfiguration av qPCR. Om du vill skriva ut arbetslistan klickar du på **Print work list** (Skriv ut arbetslista). Provinformationen inkluderas som en del av denna arbetslista.
27. Välj motsvarande arbetslista från arbetslistehanteraren och klicka på **Apply** (Tillämpa). Om arbetslistan fortfarande är öppen kan du också klicka på **Apply** (Tillämpa).
28. Ange experimentnamnet i fältet **Experiment name** (Experimentnamn).
29. I listan **Cycler selection** (Cyklerval) väljer du den cykler som ska användas.
OBS! Du måste använda ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument*.
30. Kontrollera att låsringen är korrekt fastsatt och markera kryssrutan **Ring Attached** (Ring fastsatt).
31. Klicka på **Start run** (Starta körning). qPCR-körningen startar (Figur 14).

* I vissa länder kan instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum maj 2011 eller senare användas. Tillverkningsdatumet kan utläsas från serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret har formatet "mmyynnn" där "mm" anger månaden i tillverkningsdatumet med siffror, "yy" anger de två sista siffrorna i tillverkningsåret och "nnn" är en unik identifieringskod för instrumentet.



Figur 14. Start av körning. 13 = Ange "Experiment name" (Experimentnamn); 14 = "Cycler selection" (Cyklerval); 15 = Bekräfta att låsringen är fastsatt; 16 = Klicka på "Start run" (Starta körning) för att starta körningen.

Visa och rapportera qPCR-resultat

De allmänna funktionerna i godkännandemiljön beskrivs i *Användarmanualen för Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

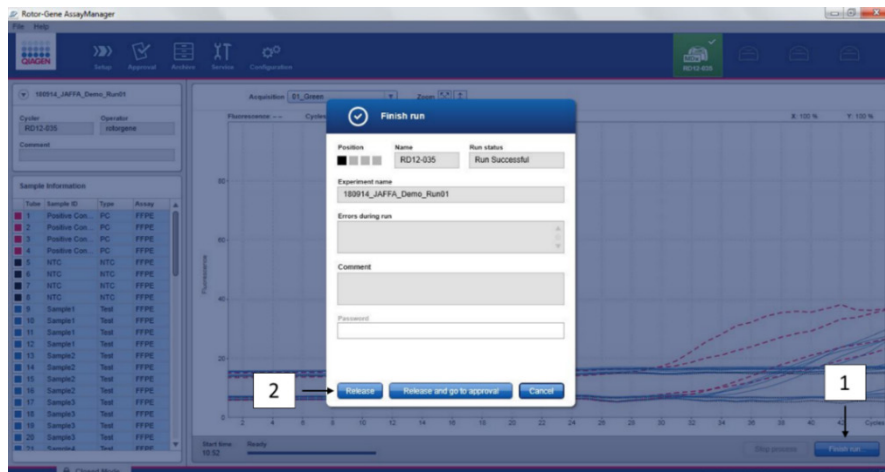
När en körning har slutförts och cyklern har låsts upp sparas experimentet i den interna databasen. Analysen av insamlade data utförs automatiskt beroende på det plugin-program som motsvarar analysprofilen och de regler och parametervärden som definieras av analysprofilen.

32. När körningen är avslutad klickar du på **Finish run** (Avsluta körning) (Figur 15).

OBS! Innan det här steget har slutförts sparas inte experimentet i den interna databasen.

33. Visa/låsa upp och godkänn körningen.

- Användare som är inloggade med behörigheten "Approver" (Godkännare) ska klicka på **Release and go to approval** (Visa/lås upp och fortsätt till godkänna).
- Användare som är inloggade med behörigheten "Operator" (Operatör) ska klicka på **Release** (Visa/lås upp).



Figur 15. Slutförande av körningen. "Finish run" (Avsluta körning) (1) och "Release" (Visa/lås upp) körning (2)

34. Visa/lås upp resultaten.

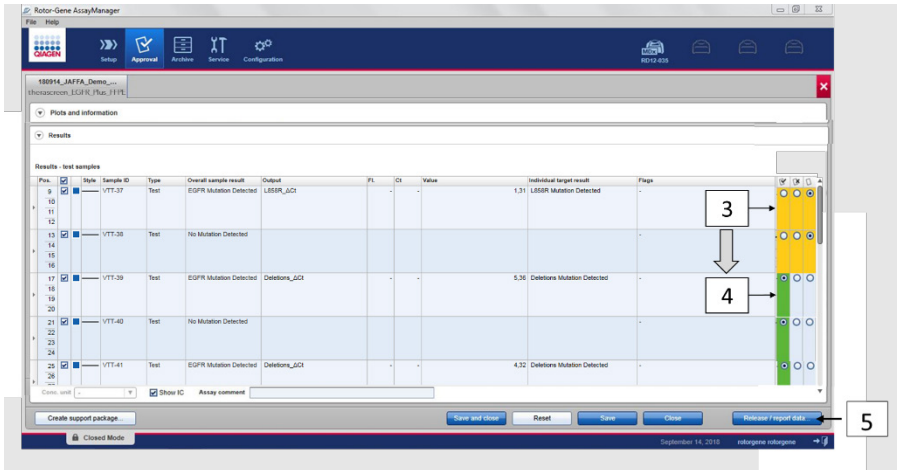
- Om du klickade på **Release and go to approval** (Visa/lås upp och fortsätt till godkänna) visas resultaten för experimentet i miljön "Approval" (Godkännande).
- Om du klickade på **Release** (Visa/lås upp) med behörighet som användare måste någon med behörigheten "Approver" (Godkännare) logga in och välja miljön "Approval" (Godkännande).

35. Filtrera fram analysen som ska godkännas genom att välja filteralternativ och klicka på **Apply** (Tillämpa). Välj önskad analys i listan över filterade analyser med hjälp av kryssrutan och klicka på **Start Approval** (Börja godkännande).

36. Använd alternativknapparna för att (Figur 16) godkänna eller avvisa prover.

OBS! Proverna kan avvisas om operatören gör fel i hanteringen eller om det förekommer ovanliga kurvor (artefakt).

37. Granska resultaten och klicka på **Release/Report data** (Visa/lås upp/rapportera data).



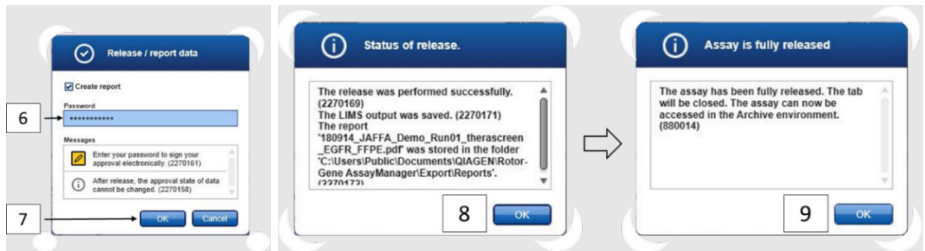
Figur 16. Granska och visa/läs upp data. Granska och godkänn (ü) eller avvisa (ü) resultaten för varje prov: rutans färg ändras från gul till t.ex. grön om dessa data är godkända (3, 4). Klicka sedan på "Release / report data" (Visa/lås upp/rapportera data) (5).

38. Ange lösenordet om det behövs och klicka på OK. Rapporten genereras i .pdf-format (Adobe Portable Document Format) och sparas automatiskt i den fördefinierade mappen. Som standard är sökvägen till mappen **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\Reports**.

OBS! Du kan ändra sökvägen och mappen i miljön "Configuration" (Konfiguration).

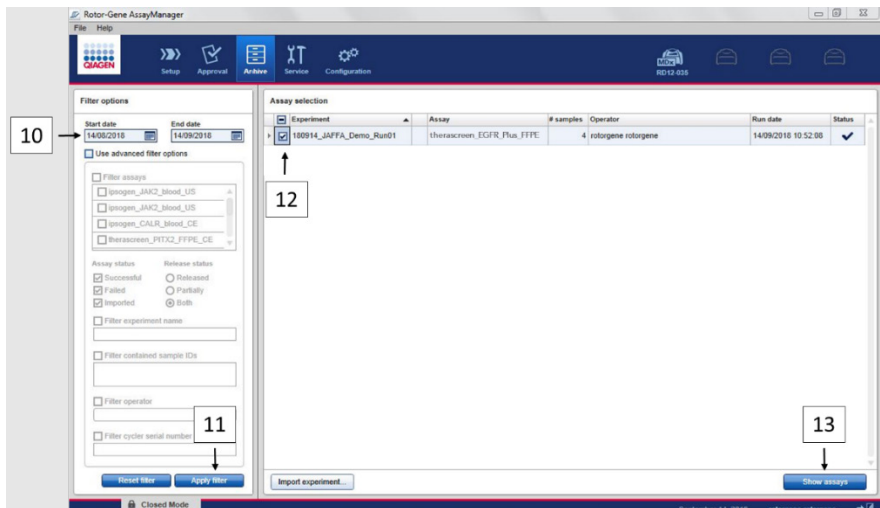
OBS! Samtidigt skapas en LIMS-fil automatiskt och sparas i den fördefinierade mappen. Som standard är sökvägen till mappen **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\LIMS**

39. Stäng pdf-filen och gå tillbaka till Rotor-Gene AssayManager. Klicka på **OK** vid varje fråga.



Figur 17. Release/Report data (Visa/lås upp/rapporterera data). Ange "password" (lösenord) (6) och klicka sedan på OK (7). En PDF-rapport genereras och öppnas. Stäng PDF-rapporten. En LIMS-fil genereras automatiskt och ett meddelande om visning/upplåsning visas. Klicka på OK (8). Analysen är nu helt frigjord. Klicka på OK för att gå till miljön "Archive" (Arkiv) (9).

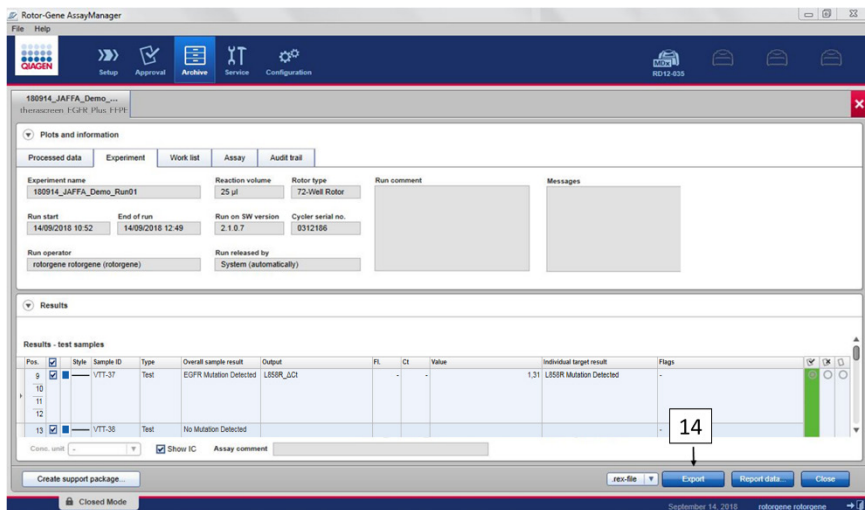
40. Gå till fliken "Archive" (Arkiv) för att exportera .rex-filen som motsvarar dessa rådata. Leta upp ditt experiment med hjälp av filteralternativen och klicka på "Show assays" (Visa analyser) (Figur 18)



Figur 18. Välja ditt experiment i miljön "Archive" (Arkiv). Du kan till exempel filtrera efter datum (10) och tillämpa filtret (11). Välj experimentet (12) och klicka på "Show assays" (Visa analyser) (13).

41. Klicka på **Export .rex file** (Exportera .rex-fil) och klicka på **OK** för att spara.

OBS! Du kan välja en plats för att spara .rex-filen (standardsökvägen är **C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Export\ExperimentsforClosedMode**). Du kan också ändra den här sökvägen och mappen på fliken "Specify the .rex file export destination" (Ange exportplats för .rex-filen).



Figur 19. Exportera .rex-filen genom att klicka på knappen "Export" (Exportera) (14).

OBS! Ett supportpaket från körningen krävs för felsökningshjälp från QIAGEN:s tekniska support. Supportpaket kan skapas från miljöerna "Approval" (Godkännande) eller "Archive" (Arkiv). Mer information finns i "Skapa ett supportpaket" i *Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Utöver supportpaketet kan granskningsspåret från tiden för incidenten ± 1 dag vara till god hjälp. Granskningsspåret finns i miljön "Service". Mer information finns i *Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

42. Ta ut materialet från Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet och kassera rören på remsa i enlighet med lokala säkerhetsregler.

Tolkning av resultat (om tillämpligt)

Analys av *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-resultat för varje kontroll och prov utförs automatiskt av Rotor-Gene AssayManager v2.1 associerad med Gamma Plug-in v1.0 och EGFR-analysprofilerna.

EGFR-analysprofilerna analyserar förstärkningsgrafer och kan invalidera avvikande kurvor beroende på deras form och brusamplitud. Om så är fallet associeras en flagga med den ogiltigförklarade kurvan (se Tabell 6, sida 63).

Kontroller

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analyserar körningskontrollerna:

- NTC kontrolleras avseende frånvaro av specifik amplifiering.
- Giltigheten för den positiva kontrollen baseras på huruvida CT-värdet uppfyller fördefinierade specifikationer.
- Om någon av de här körningskontrollerna inte överensstämmer kommer flaggan "ASSAY_INVALID" att utlösas. Om denna flagga utlöses anses körningen vara ogiltig och experimentet måste utföras på nytt (beslutsflöde för omtestningar visas i Figur 20).
- **OBS!** Rapporten som genereras i slutet av körningen visar resultaten som erhållits med körningskontroller, med ogiltigförklarande flaggor (se Tabell 6, sida 63) framför ogiltiga data.

Om alla kontrollerna i körningen överensstämmer analyserar Rotor-Gene AssayManager v2.1 testproverna. DNA-prover från både FFPE och plasma analyseras enligt samma process men med specifika kriterier som registreras i respektive analysprofil.

Prover

Exon 2 för intern kontroll

Giltigheten för exon 2 för intern kontroll baseras på huruvida Ct-värden uppfyller fördefinierade specifikationer. Den interna kontrollen måste vara giltig för att provresultaten ska kunna tolkas. En giltig intern kontroll visar att DNA-input och kvaliteten är tillräcklig och att det inte finns några interfererande ämnen. Vid ogiltighet hänvisas till det beslutsflöde som visas i Figur 20.

EGFR-mutationsdetektion

Förekomst eller frånvaron av EGFR-mutationer i varje testprov bedöms baserat på delta Ct mellan mutantamplifieringen och internkontrollamplifieringen (mål T790M_ΔCt, L861Q_ΔCt osv.) för FFPE-prover och baserat på mutantamplifieringen för plasmaprover (CT).

Semikvantifiering av EGFR-mutation

En semikvantitativ uppskattning av mutationskoncentrationen i ccfDNA från plasma ges för de berörda målen (listade i Sammanfattning och förklaring) i form av ett intervall med nedre och övre gränser. Antalet mutantkopior per milliliter plasma uppskattas, dvs. intervallets nedre och övre gränser ges av målen T790M_CN_LL, L861Q_CN_LL osv.

Resultaten för varje mål visas i kolumnen **Result** (Resultat) i rapporten.

Slutsatsen för analysen för varje prov visas i kolumnen **Overall Sample Result** (Totalt provresultat) i rapporten (Tabell 5).

Tabell 5. Totalt provresultat och åtgärder

Totalt provresultat	Provtyp	Beskrivning	Åtgärd
Valid (Giltigt)	Kontroll (Positiv kontroll, NTC)	Kontrollen är giltig	Ej relevant
Invalid (Ogiltigt)*	Kontroll (Positiv kontroll, NTC)	Kontrollen är ogiltig (CT-värde utanför det fördefinierade acceptabla intervallet)	Upprepa hela körningen (dvs. alla fyra EGFR-reaktionsblandningar, alla prover)
EGFR Mutation Detected (EGFR-mutationsdetektion)**	Testprov	Minst en EGFR-mutation detekterades†	Ej relevant
No Mutation Detected (Ingen mutation detekterad)**	Testprov	Ingen EGFR-mutation detekterades	Ej relevant
Invalid (Ogiltigt) (associerat med flaggan ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE)§	Testprov	Det detekterade CT-värdet ligger under det acceptabla intervallet för den interna kontrollen. DNA-input kan vara för hög.	Späd provet innan omtestning. Testa de berörda proverna på nytt med alla fyra EGFR-reaktionsblandningar i en ny qPCR-körning.
Invalid (Ogiltigt) (associerat med flaggan ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE)§	Testprov	Det detekterade CT-värdet ligger över det acceptabla intervallet för den interna kontrollen. Provet kanske inte innehåller tillräckligt med amplifierbart DNA eller kan innehålla en hämmare.	Testa de berörda proverna på nytt med alla fyra EGFR-reaktionsblandningar i en ny qPCR-körning. Om provet redan har testats på nytt en gång tidigare ska du upprepa extraktionssteget och testa det på nytt i en ny qPCR-körning. Om du misstänker förekomst av hämmare kan du försöka med att späda provet innan omtestning (endast för plasma). Ytterligare information finns i Tabell 6 på sida 63.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 5. Totalt provresultat och åtgärder (forts.)

Totalt provresultat	Provtyp	Beskrivning	Åtgärd
Invalid (Ogiltigt) (associerat med flaggan ASSAY_IC_NO_CT_VALUE)*	Testprov	Ingen signal upptäcktes för den interna kontrollen.	Testa de berörda proverna på nytt med alla fyra EGFR-reaktionsblandningar i en ny qPCR-körning.
Invalid (Ogiltigt) (annat)	Testprov	Ogiltighet på grund av kurvavikelser eller annan orsak (se Tabell 6, sida 63)	Om provet redan har testats på nytt en gång tidigare ska du upprepa extraktionssteget och testa det på nytt i en ny qPCR-körning. Om du misstänker förekomst av hämmare kan du försöka med att späda provet innan omtestning (endast för plasma). Ytterligare information finns i Tabell 6 på sida 63

* När kontrollerna är ogiltiga visas de ogiltiga CT-värdena mellan hakparanteser för information.

** För mutationer som omfattas av *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (listas i Tabell 1)

† För identifiering av detekterade EGFR-mutationer, se ΔCt -mål (t.ex. T790M ΔCt), kolumnen med målresultat (t.ex. T790M detekterat). För semikvantifieringsresultat (antal kopior per milliliter plasma för ccfDNA), se mål X_CN_LL och X_CN_UL (där X = mutationsnamn), kolumnvärde, för att få fram den nedre och övre gränsen för semikvantifieringsintervallet.

OBS! & ASSAY står för T790M_L861Q/INSERTIONS_G719X/L858R_C797S/DELETIONS_S768I

Flaggor

Ogiltiga resultat är associerade med flaggor som visas i kolumnen **Flag** (Flagga) i Rotor-Gene AssayManager-rapporten.

Ogiltigförklarande provflaggor som kan tilldelas ett prov eller mål under analysen med Rotor-Gene AssayManager v2.1 definieras i Tabell 6. Information om universella flaggor som inkluderas i Gamma Plug-in finns i *Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

Tabell 6. Definition av flaggor

Flagga	Beskrivning
ANALYSIS_FAILED	Analysen är ogiltig eftersom den misslyckades. Kontakta QIAGEN teknisk service
ASSAY_INVALID	Provet är ogiltigt eftersom minst en extern kontroll är ogiltig.
CONSECUTIVE_FAULT	Ett mål som användes vid beräkningen av det här målet är ogiltigt.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Förstärkningsgrafan med rådata visar en form som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat.
FLAT_BUMP	Förstärkningsgrafan visar en form som liknar en vägbula med svag upphöjning som avviker från det etablerade beteendet för den här analysen. Det finns en hög sannolikhet för felaktiga eller feltolkade resultat (t.ex. felbestämning av C_T -värde).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE	Ändringen av procentandel fluorescens för det här provet i förhållande till det provrör med störst fluorescensändring är lägre än en definierad gräns.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	Förstärkningsgrafan korsar tröskelvärdet mer än en gång. Ett entydigt C_T -värde kan inte bestämmas.
TARGET_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE*	En ogiltig signal har detekterats i kontrollen utan mall.
OTHER_TARGET_INVALID	Ett annat mål för samma prov är ogiltigt.
ASSAY_IC_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE& ASSAY_IC_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE&	Det detekterade C_T -värdet ligger utanför det acceptabla intervallet för den interna kontrollen i röret med positiv kontroll.
ASSAY_IC_PC_NO_CT_VALUE&	Ingen signal detekterades för den interna kontrollen i röret med positiv kontroll.
TARGET_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE** TARGET_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE**	Det detekterade C_T -värdet ligger utanför det acceptabla intervallet för en mutationsanalys i röret med positiv kontroll.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 6. Definition av flaggor (forts.)

Flagga	Beskrivning
TARGET_PC_NO_CT_VALUE**	Ingen signal detekterades för målkanalen i röret med positiv kontroll.
RUN_FAILED	Den ogiltiga analysen är ogiltig eftersom ett problem uppstått med cyklern eller cykleranslutningen.
RUN_STOPPED	Den ogiltiga analysen är ogiltig eftersom körningen har stoppats manuellt.
ASSAY_IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE&	Det detekterade C_T -värdet ligger under det acceptabla intervallet för den interna kontrollen i ett testprov. DNA-input kan vara för hög. Späd provet innan omtestning.
ASSAY_IC_NO_CT_VALUE&	Ingen signal detekterades för den interna kontrollen i ett testprov.
ASSAY_IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Det detekterade C_T -värdet ligger över det acceptabla intervallet för den interna kontrollen i ett testprov. Provet kanske inte innehåller tillräckligt med amplifierbart DNA eller kan innehålla en hämmare.
SATURATION	Rådata för fluorescensen mätas kraftigt innan brytpunkten på förstärkningsgrafan.
SPIKE	En topp i rådatafluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafan, men utanför det område där C_T bestäms.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	En topp har detekterats i förstärkningsgrafan nära C_T .
NO_BASELINE	Ingen initial baslinje har hittats. Den efterföljande analysen kan inte utföras.
STEEP_BASELINE	En brant stigande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafan.
STRONG_BASELINE_DIP	Ett kraftigt fall i baslinjen för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafan.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 6. Definition av flaggor (forts.)

Flagga	Beskrivning
STRONG_NOISE	Högt brus utanför tillväxtfasen i förstärkningsgrafan har detekterats.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Högt brus har detekterats i tillväxtfasen (exponentiella fasen) i förstärkningsgrafan.
TARGET_ΔCT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	Det detekterade ΔC_T är lägre än förväntat för en reaktionsblandning av testprov och målmutant
TARGET_CT_UNEXPECTED_EARLY_CT**	Det detekterade C_T är lägre än förväntat för en reaktionsblandning av testprov och målmutant
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	En vågliknande baslinje för rådata för fluorescensen har detekterats i förstärkningsgrafan.

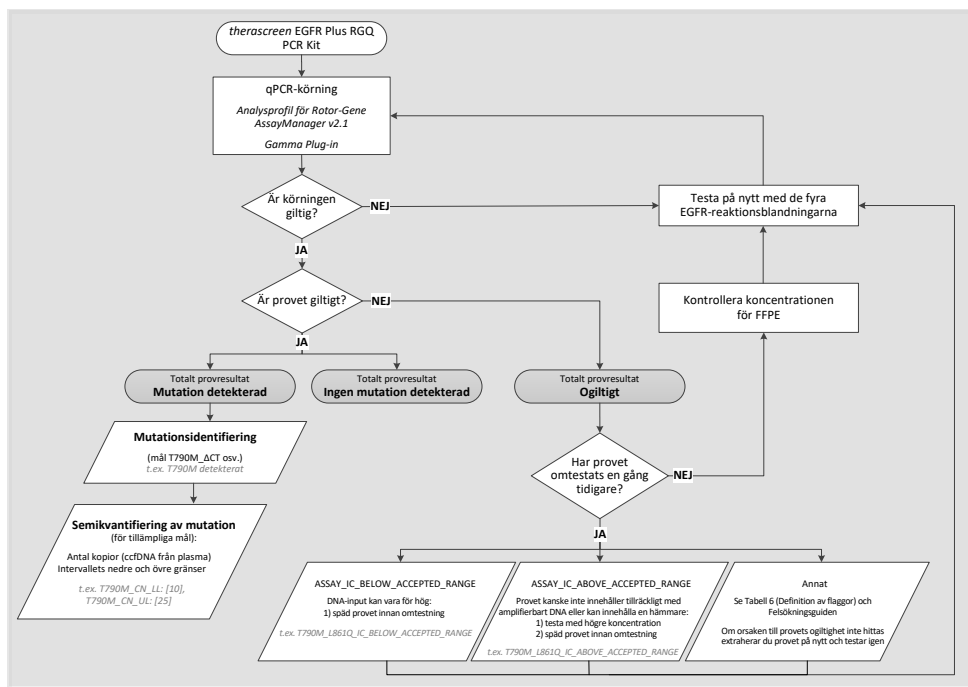
* TARGET står för T790M, L861Q, T790M_L861Q_IC, INSERTIONS, G719X, INSERTIONS_G719X_IC, L858R, C797S, L858R_C797S_IC, DELETIONS, S768I, DELETIONS_S768I_IC

** TARGET står för T790M, L861Q, INSERTIONS, G719X, L858R, C797S, DELETIONS, S768I & ASSAY står för T790M_L861Q/INSERTIONS_G719X/L858R_C797S/DELETIONS_S768I

Omtestning

För ogiltiga resultat finns information i Felsökningsguide, sida 95, om hur du undersöker orsaken till problemet och om möjligt identifierar eventuella fel som behöver korrigeras.

Proceduren för omtestning sammanfattas i Figur 20.



Figur 20. Beslutsflöde för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit.

Om en eller flera körkontroller är ogiltiga ska körningen upprepas med de 4 EGFR-reaktionsblandningarna. Om till exempel den positiva kontrollen inte uppfyller validitetskriterierna för T790M- och L861Q-blandningen, men är giltig för alla andra EGFR-reaktionsblandningar, ska de fyra blandningarna testas på nytt med alla prover.

Om ett eller flera prover är ogiltiga ska de berörda proverna testas på nytt med de 4 EGFR-reaktionsblandningarna. Beroende på flaggan om RGAM visar ska du späda provet innan du gör ett nytt test eller göra ett nytt test med högre koncentration.

Om orsaken till provets ogiltighet inte hittas:

-
- Kontrollera att proverna har hanterats och förvarats enligt beskrivningen i avsnitt "Förvaring och hantering av prover".
 - Extrahera ditt FFPE-prov på nytt med fler sektioner innan omtestning.
 - Extrahera ditt FFPE-prov på nytt genom att välja ett större tumörområde innan omtestning.
 - Observera att alla prestanda har fastställts med hjälp av DNA som extraherats från FFPE vid 5 ng/μl och/eller 5 μl renat ccfDNA som extraherats från plasma.

Andra förklaringar om provets ogiltighet finns i "Felsökningsguide", sida 95.

Begränsningar

Enbart resultaten från produkten ska inte ligga till grund för diagnos, utan de måste tolkas med hänsyn till resultat från alla relevanta kliniska studier eller laboratoriestudier.

Produkten ska användas av laboratoriepersonal som har utbildats i molekylärbioologiska procedurer, i in vitro-diagnostiska procedurer och i användning av QIASymphony SP-systemet, Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet, Rotor-Gene AssayManager och Gamma Plug-in.

Produkten är endast avsedd för användning på Rotor-Gene Q MDx real-time PCR-cykler, 5plex HRM-serien, kombinerad med Rotor-Gene AssayManager-programmet och Gamma Plug-in vid användning av de dedikerade analysprofilerna *therascreen* EGFR Plus.

Vi rekommenderar användning av Deparaffinization Solution (inklusive RNase A-behandling), QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit, QIASymphony DSP DNA Mini Kit och QIASymphony DSP Circulating DNA Kit.

För optimalt resultat krävs att anvisningarna i *Bruksanvisning för theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit* följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrade prestanda. Alla reagenser som medföljer *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma sats. Användning av reagenser från olika satsloter i samma körning kan påverka prestandan.

Det är viktigt att mängden gDNA från FFPE-provet utvärderas korrekt innan provanalys utförs med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit. Extraktionsproceduren ska upprepas om mängden gDNA inte är tillräcklig för mutationsanalys. gDNA ska spädas ut om koncentrationen är för hög för mutationsanalys.

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

therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit är endast validerat för plasma som samlats in i 2K EDTA och FFPE från patienter med NSCLC.

All användning av produkten tillsammans med andra märken och/eller ändring av komponenterna gör att QIAGEN:s garanti upphör att gälla.

Prestandaegenskaper

Blankgräns (Limit of Blank, LOB)

Blankgränsen (Limit of Blank, LOB) bestämdes med 77 NSCLC EGFR-vildtyps-FFPE-prover och 75 plasmaprover från friska donatorer (minst 60 mätningar per reagenslot, 3 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-loter användes). LOB bestämdes för varje angiven analys, som det lägsta erhållna LOB-värdet. LOB-resultaten sammanfattas i Tabell 7.

Tabell 7. Sammanfattning av blankgränsen för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit

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

Falskt positiva svar är under 1 % för alla EGFR-mål förutom för L858R i FFPE (1,2 %) och för tillägg i plasmaprover (1,08 %)

Detektionsgräns

Detektionsgränsen (Limit of Detection, LOD) för var och en av de 42 EGFR-mutationerna bestämdes på lågt EGFR-positiva FFPE- och plasmaprover (3 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-loter användes). LOD-resultaten sammanfattas i Tabell 8.

Tabell 8. Sammanfattning av detektionsgränsen för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit

Exon	Mutation	COSMIC-ID	Basskifte	FFPE Mutantprocent	Plasma Kopia per 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	Borttagningar	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 fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 8. Sammanfattning av detektionsgränsen för theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit (forts.)

Exon	Mutation	COSMIC-ID	Basskifte	FFPE Mutantprocent	Plasma Kopia per ml
19	Borttagningar	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 %	1 100
		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 fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 8. Sammanfattning av detektionsgränsen för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit (forts.)

Exon	Mutation	COSMIC-ID	Basskifte	FFPE Mutantprocent	Plasma Kopia per ml
20	S768I	6241	c.2303G>T	0,69 %	167
	Tillägg	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 %	150
	L861Q	6213	c.2582T>A	0,65 %	43

DNA-input

Den optimerade gDNA-input som ska användas i kombination med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utvärderades på EGFR-positiva FFPE-prover för 9 EGFR-mål (T790M, L861Q, G719A, G719C, G719S, L858R, C797Sa, C797Sb, och S768I) (3 olika gDNA-input, 10 mätningar per prov med input och 1 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot användes). Resultatet visade att den optimerade input som ska användas är 25 ng (5 ng/ μ L).

Den optimerade ccfDNA-input som ska användas i kombination med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utvärderades inte på plasmaprover.

Repeterbarhet

Repeterbarheten bestämdes för ett EGFR-positivt och ett negativt FFPE- och plasmaprov. För varje EGFR-analys bedömdes repeterbarheten för en viss EGFR-mutation, som testades på 2 mutationsnivåer (medelhög och låg). Varje nivå testades i två exemplar vid minst 43 körningar under 20 dagar, med minst 78 mätningar per mutationsnivå och per analys (3 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument, 3 operatörer och 3 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-loter användes). Den kvantitativa analysen av resultaten för repeterbarhet sammanfattas i Tabell 9 för FFPE-prover och i Tabell 10 för plasmaprover.

Tabell 9. Sammanfattning av resultaten för repeterbarhet för thetascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit på FFPE-prover

EGFR Plus-blandning	EGFR Plus-möd	Testad mutationsnivå	Mellan operatörer		Mellan instrument		Mellan satsloter		Mellan dagar		Mellan körningar		Inom körning		Totalt	
			SD*	CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	låg	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
		medelhög	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	låg	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
		medelhög	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
	Vildtyp	Ej 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	Tillägg	låg	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
medelhög			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		låg	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
		medelhög	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
Vildtyp		Ej 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	låg	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
	medelhög		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	låg	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
		medelhög	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
	Vildtyp	Ej 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_5768I	Borttagningar	låg	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
medelhög			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
5768I		låg	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
		medelhög	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
Vildtyp		Ej 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: Standardavvikelse

** %CV: Variationskoefficient

Tabell 10. Sammanfattning av resultaten för repeterbarhet för theascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit på plasmaprover

EGFR Plus-blandning	EGFR Plus-mål	Testad mutationsnivå	Mellan operatörer		Mellan instrument SD		Mellan satsloter		Mellan dagar		Mellan körningar		Inom körning		Totalt	
			SD*	%CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	låg	0,1	0,28	0	0	0,16	0,46	0	0	0,29	0,8	0,45	1,27	0,57	1,6
		medelhög	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	låg	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
		medelhög	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
	Vildtyp	Ej 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	Tillägg	låg	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
medelhög			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		låg	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
		medelhög	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
Vildtyp		Ej 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	låg	0,19	0,56	0	0	0,1	0,3	0,28	0,82	0,33	1	0,3	0,89	0,57
	medelhög		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	låg	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
		medelhög	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
	Vildtyp	Ej 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	Borttagningar	låg	0,66	1,99	0	0	0	0	0,18	0,54	0,84	2,52	0,28	0,84	1,12
medelhög			0,46	1,5	0	0	0	0	0	0	0,66	2,16	0,28	0,9	0,85	2,78
S768I		låg	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
		medelhög	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
Vildtyp		Ej 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: Standardavvikelse

** %CV: Variationskoefficient

En kvalitativ analys som utfördes på resultaten för repeterbarhet för FFPE och plasma visade att träffgraden för detektion av EGFR-mutationer är oberoende av analysatsens batch, Rotor-Gene Q-instrumentet och operatören.

Reproducerbarhet

Reproducerbarheten bestämdes på ett EGFR-positivt och ett negativt FFPE- och plasmaprover. För varje EGFR-analys bedömdes repeterbarheten för en viss EGFR-mutation, som testades på 2 mutationsnivåer (medelhög och låg). Varje nivå testades i 5 replikat vid minst 75 körningar (25 körningar per plats) under minst 5 dagar, med minst 70 mätningar per mutationsnivå och per analys (3 platser, ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument per plats, en operatör per plats och en *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot användes). Den kvantitativa analysen av resultaten för reproducerbarhet sammanfattas i Tabell 11 för FFPE-prover och i Tabell 12 för plasmaprover.

Tabell 11. Sammanfattning av resultaten för reproducerbarhet för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit på FFPE-prover

EGFR Plus-blandning	EGFR Plus-mål	Testad mutationsnivå	Inom körning		Mellan dagar		Mellan platser		Totalt	
			SD*	CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	låg	0,23	2,7	0,48	5,48	0,12	1,38	0,54	6,26
		medelhög	0,19	3,42	0,44	7,95	0,13	2,29	0,5	8,95
	L861Q	låg	0,22	4,85	0,7	15,48	0,31	6,81	0,79	17,59
		medelhög	0,21	8,7	0,66	27,6	0	0	0,69	28,93
	Vildtyp	Ej relevant	0,14	0,55	0,62	2,46	0,38	1,53	0,74	2,95
Ins_G719X	Tillägg	låg	0,28	5,29	0,21	4,02	0	0	0,35	6,64
		medelhög	0,15	7,11	0,15	6,87	0,09	3,99	0,23	10,66
	G719X	låg	0,25	4	0,2	3,14	0,29	4,56	0,43	6,83
		medelhög	0,18	4,18	0,22	5,11	0,26	6,01	0,39	8,92
	Vildtyp	Ej relevant	0,14	0,54	0,14	0,54	0,15	0,61	0,25	0,97
L858R_C797S	L858R	låg	0,27	3,4	0,15	1,92	0,33	4,11	0,45	5,67
		medelhög	0,22	4,23	0,15	2,92	0,31	5,96	0,42	7,87
	C797S	låg	0,3	4,97	0,12	2,07	0,12	1,93	0,35	5,72
		medelhög	0,19	5,23	0,16	4,52	0,2	5,59	0,32	8,89
	Vildtyp	Ej relevant	0,12	0,46	0,21	0,82	0,05	0,18	0,24	0,96
Del_S768I	Borttagningar	låg	0,24	4,16	0,24	4,16	0,19	3,33	0,37	6,53
		medelhög	0,15	4,43	0,11	3,12	0,16	4,65	0,25	7,14
	S768I	låg	0,26	3,29	0,2	2,54	0,14	1,85	0,35	4,55
		medelhög	0,21	3,66	0,28	4,76	0,13	2,25	0,37	6,41
	Vildtyp	Ej relevant	0,12	0,49	0,11	0,45	0,26	1,02	0,31	1,22

* SD: Standardavvikelse

** %CV: Variationskoefficient

Tabell 12. Sammanfattning av resultaten för reproducerbarhet för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit på plasmaprover

EGFR Plus-blandning	EGFR Plus-mål	Testad mutationsnivå	Inom körning		Mellan dagar		Mellan platser		Totalt	
			SD*	%CV**	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
T790M_L861Q	T790M	låg	0,34	0,93	0,26	0,73	0,14	0,4	0,45	1,25
		medelhög	0,2	0,58	0,22	0,66	0,24	0,73	0,38	1,14
	L861Q	låg	0,35	1,11	0,19	0,6	0,17	0,55	0,43	1,37
		medelhög	0,19	0,65	0,16	0,56	0,23	0,81	0,34	1,18
	Vildtyp	Ej relevant	0,18	0,67	0,86	3,28	0,47	1,8	1	3,8
	Ins_G719X	Tillägg	låg	0,29	0,93	0	0	0	0	0,3
medelhög			0,19	0,65	0	0	0	0	0,2	0,67
G719X		låg	0,39	1,3	0,64	2,15	0,85	2,86	1,13	3,81
		medelhög	0,24	0,87	0,33	1,19	0,25	0,9	0,48	1,72
Vildtyp		Ej relevant	0,19	0,72	0,21	0,82	0,16	0,63	0,33	1,26
L858R_C797S		L858R	låg	0,37	1,1	0,35	1,04	0,47	1,38	0,69
	medelhög		0,17	0,55	0,35	1,12	0,48	1,54	0,62	1,98
	C797S	låg	0,29	0,94	0,23	0,74	0,31	0,98	0,48	1,54
		medelhög	0,2	0,68	0,18	0,63	0,35	1,22	0,44	1,53
	Vildtyp	Ej relevant	0,3	1,04	0,38	1,31	0,34	1,18	0,59	2,05
	Del_S768I	Borttagningar	låg	0,3	0,91	0,38	1,16	0,54	1,62	0,73
medelhög			0,21	0,69	0,32	1,04	0,52	1,7	0,65	2,11
S768I		låg	0,17	0,53	0,27	0,84	0,39	1,21	0,5	1,57
		medelhög	0,2	0,66	0,17	0,56	0,28	0,92	0,39	1,26
Vildtyp		Ej relevant	0,17	0,65	0,19	0,71	0,3	1,13	0,39	1,49

* SD: Standardavvikelse

** %CV: Variationskoefficient

En kvalitativ analys som utfördes på resultaten för reproducerbarhet för FFPE och plasma visade att träffgraden för detektion av EGFR-mutationer är oberoende av platsen.

Interfererande ämnen

Totalt 36 potentiellt interfererande ämnen har testats på 2 EGFR-positiva och ett EGFR-negativt FFPE- och plasmaprov (Tabell 13). De endogena potentiellt interfererande ämnena och exogena ämnen som kan finnas i provet före DNA-beredningen blandades med proverna på en kliniskt relevant maximal nivå. De exogena potentiellt interfererande ämnena från arbetsflödena för DNA-beredningen blandades med DNA som extraherats på en beräknad värsta tänkbara nivå. Varje prov (kontroll och blandat med potentiellt interfererande ämnen) testades i 6 replikat, vilket resulterade i totalt 51 körningar (1 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot användes). Den kvantitativa analysen har inte visat att de testade ämnena har någon interfererande inverkan.

Tabell 13. Potentiellt interfererande ämnen testade på FFPE-prover

Testad substans	Testkoncentration
Formalin 4–10 %	4,10E-05 %
Paraffinvax	4,10E-05 %
Deparaffinization Solution	4,10E-05 %
ATL (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1,30E-05 %
Proteinas K	4,00E-05 %
RNAse A	1,99E-07 %
AL-buffert (QIAamp FFPE Lysis Buffer)	1,99E-03 %
Etanol 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 %

Tabell 14. Potentiellt interfererande ämnen testade på plasmaprover

Testad substans	Tesikoncentration
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 %
Etanol 96-100 %	1,25E-01 %
Buffer AVE (QIAamp Plasma Elution Buffer)	5,00E+00 %
MBS3 (QIA Symphony plasmalösning med magnetiska kulor)	3,48E-05 %
Proteinas K	7,49E-05 %
QSB4 (QIA Symphony Plasma Buffer)	5,57E-04 %
QSW8 (QIA Symphony Plasma Wash Buffer)	1,11E-01 %
QSW9 (QIA Symphony Plasma Wash Buffer)	4,62E-01 %
QSW10 (QIA Symphony Plasma Wash Buffer)	5,00E+00 %
QSE1/QSE2 (QIA Symphony Plasma Elution Buffer)	5,00E+00 %
Etylendiamintetraättisyra (EDTA)	3,39E+00 µmol/L
Okonjugerat bilirubin	684 µmol/L
Konjugerat bilirubin	475 µmol/L
Hemoglobin	10 g/L
Triglycerider	16,94 mmol/L
Xylen	684 µmol/L
Kloroform	5,00E+00 %

Specificitet och korsreaktivitet

Specificiteten och korsreaktiviteten för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit utvärderades genom att testa förmågan hos *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit att detektera och korrekt identifiera (om tillämpligt) EGFR-mutationen som visas i Tabell 1. För FFPE-proverna genomfördes studien på alla EGFR-målmutationer. Specificiteten för plasmaprover bedömdes på C797Sa- och C797Sb-målmutationer. Alla prover testades i ett exemplar per *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot. 3 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-loter användes. Studien visade att alla målmutationer detekterades av den förväntade EGFR-analysen och att ingen signal observerades med andra analyser.

Detektionen med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit av den icke-riktade sällsynta L858Q-mutationen bedömdes också genom att testa FFPE- och plasmaprover. Denna studie visade att L858Q-mutationen inte detekteras av C797S-analysen och att den kan detekteras av L858R-analysen vid hög mutationsprocent (FFPE) och högt antal kopior (plasma).

Korskontaminering och överföring

Korskontamineringen för de 4 arbetsflödena för EGFR Plus, dvs. med användning av de 4 metoderna för DNA-beredning, utvärderades vid olika förhållanden med alternerande EGFR-positiva och negativa prover. Minst 3 körningar av varje arbetsflöde för EGFR Plus utfördes (1 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot användes per arbetsflöde) och inget av de 4 arbetsflödena uppvisade korskontaminering.

Under bedömningen av korskontaminering utvärderades överföringen av de fyra arbetsflödena för EGFR Plus och ingen överföring mellan olika körningar kunde konstateras.

Tidsram i användning

Den maximala tidsramen mellan qPCR-plattberedningen och starten av qPCR-körningen bestämdes för varje EGFR-analys för en viss EGFR-mutation, testad på 1 låg mutationsnivå (ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument, 1 operatör, 1 *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit-lot användes). De 8 olika FFPE-positiva proverna har testats omedelbart efter qPCR-plattberedning och efter 3 timmar, 6 timmar och 24 timmars förvaring vid +2 °C/+8 °C. Den maximala acceptabla tidsramen är 24 timmar, men det rekommenderas att starta qPCR-körningen med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit så snart som möjligt efter förberedelse av plattan (dvs. efter att alla prover som ska testas har laddats).

Klinisk prestanda

Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod

Studien visade hög överensstämmelse mellan *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit och metoderna för analytisk noggrannhet. Använda referensmetoder och metoder för hantering av avvikelser: PNA qPCR – i Karachaliou et al., 2015 och Mayo-de-las-Casas et al., 2017; bidirektionell Sanger-sekvensering; Next-generation sequencing, *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit V2, CE (kat.nr 8741111) och *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, CE (kat.nr 8703111).

Resultaten analyserades för att bedöma positiv överensstämmelse i procent (Positive Percent Agreement, PPA), negativ överensstämmelse i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och total överensstämmelse i procent (Overall Percent Agreement, OPA) med avseende på EGFR-mutationsstatus (MT eller WT) och EGFR-mål (mutationsidentifiering) för FFPE- och plasmaprover mellan *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit och respektive referensmetod och följande metod för hantering av avvikelser.

I studien testades 170 FFPE-prover och 148 gav giltiga tolkningsbara resultat (148 provstatus och 155 målstatus).

När resultaten för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit jämfördes med resultaten för respektive referensmetod visade 4 EGFR-provstatus (MT eller WT) avvikelse. Efter analys med metod för hantering av avvikelser minskade antalet avvikande provstatus (MT eller WT) till en enda avvikande, falskt negativ provstatus. PPA, NPA och OPA med motsvarande tvåsidiga 95 % konfidensintervall (Confidence Intervals, CI) sammanfattas i Tabell 15 och Tabell 16.

Tabell 15. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per prov – jämförelse mellan *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit och referensmetod för FFPE-prover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	97,30 %	93,22 %	99,26 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	93,65 %	84,53 %	98,24 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	100,00 %	95,75 %	100,00 %

Tabell 16. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per prov efter undersökning av avvikelser för FFPE-prover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	99,32 %	96,29 %	99,98 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	98,33 %	91,06 %	99,96 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	100,00 %	95,89 %	100,00 %

När resultaten för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit jämfördes med resultaten för respektive referensmetod visade 9 EGFR-målstatus avvikelser (Tabell 17). Efter analys med metod för hantering av avvikelser minskade antalet avvikande målstatus till 3 avvikande, 2 falskt negativa och 1 falskt positiv målstatus (Tabell 18). PPA, NPA och OPA med motsvarande tvåsidiga 95 % konfidensintervall (Confidence Intervals, CI) sammanfattas i Tabell 19 och Tabell 20.

Tabell 17. Detaljerad FFPE-mutationsstatus per mål – jämförelse mellan *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit och referensmetod

	Referensmetod	WT	T790M	L861Q	Tillägg	G719X	L858R	C797S	Borttagningar	Ex21 MT	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit											
WT		85	1	-	-	2	-	-	2	1	91
T790M		2	2	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q		-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Tillägg		1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X		-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R		-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S		-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Borttagningar		-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Totalt		88	3	1	1	3	19	1	38	1	155

Tabell 18. Detaljerad FFPE-mutationsstatus per mål efter undersökning av avvikelser

Referensmetod och metod för hantering av avvikelser	WT	T790M	L861Q	Tillägg	G719X	L858R	C797S	Borttagningar	Ex21 MT	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit										
WT	89	-	-	-	2	-	-	-	-	91
T790M	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
L861Q	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Tillägg	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
G719X	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
L858R	-	-	-	-	-	19	-	-	-	19
C797S	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Borttagningar	-	-	-	-	-	-	-	36	-	36
Ex21 MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Totalt	90	4	1	1	3	19	1	36	-	155

Tabell 19. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per mål – jämförelse mellan *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit och referensmetod för FFPE-prover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	94,19 %	89,26 %	97,31 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	91,04 %	81,52 %	96,64 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	96,59 %	90,36 %	99,29 %

Tabell 20. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per mål efter undersökning av avvikelser för FFPE-prover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	98,06 %	94,44 %	99,60 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	96,92 %	89,32 %	99,62 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	98,89 %	93,96 %	99,97 %

I studien testades 106 plasmaprover och 106 gav giltiga tolkningsbara resultat (106 provstatus och 121 målstatus).

När resultaten för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit jämfördes med resultaten för respektive referensmetod visade 9 EGFR-provstatus (MT eller WT) avvikelse. Efter analys med metod för hantering av avvikelser minskade antalet avvikande provstatus (MT eller WT) till 3 avvikande, 1 falskt negativ och 2 falskt positiv provstatus. PPA, NPA och OPA med motsvarande tvåsidiga 95 % konfidensintervall (Confidence Intervals, CI) sammanfattas i Tabell 21 och Tabell 22.

Tabell 21. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per prov – jämförelse mellan *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit och referensmetod för plasmaprover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	91,51 %	84,49 %	96,04 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	87,27 %	75,52 %	94,73 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	96,08 %	86,54 %	99,52 %

Tabell 22. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per prov efter undersökning av avvikelser för plasmaprover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	97,17 %	91,95 %	99,41 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	97,96 %	89,15 %	99,95 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	96,49 %	89,89 %	99,57 %

När resultaten för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit jämfördes med resultaten för respektive referensmetod visade 18 EGFR-målstatus avvikelse (Tabell 23). Efter analys med metod för hantering av avvikelser minskade antalet avvikande målstatus till 5 avvikande, 3 falskt positiva och 2 falskt negativa målstatus (Tabell 24). PPA, NPA och OPA med motsvarande tvåsidiga 95 % konfidensintervall (Confidence Intervals, CI) sammanfattas i Tabell 25 och Tabell 26.

Tabell 23. Detaljerad mutationsstatus för plasma per mål – jämförelse mellan *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit och referensmetod

Referensmetod	WT	T790M	L861Q	Tillägg	L858R	C797S	Borttagningar	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit								
WT	49	6			6		1	62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Tillägg				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Borttagningar	4					1	30	35
Totalt	53	14	2	1	19	1	31	121

Tabell 24. Detaljerad mutationsstatus för plasma per mål efter undersökning av avvikelser

Referensmetod och metod för hantering av avvikelser	WT	T790M	L861Q	Tillägg	L858R	C797S	Borttagningar	Totalt
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit								
WT	60	1			1			62
T790M		8						8
L861Q			2					2
Tillägg				1				1
L858R					13			13
C797S								0
Borttagningar	3						32	35
Totalt	63	9	2	1	14	0	32	121

Tabell 25. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per mål – jämförelse mellan *therascreen EGFR Plus RGQ PCR Kit* och referensmetod för plasmaprover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	85,12 %	77,51 %	90,94 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	80,60 %	69,11 %	89,24 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	90,74 %	79,70 %	96,92 %

Tabell 26. Analys av överensstämmelse för total mutationsstatus per mål efter undersökning av avvikelser för plasmaprover

		Nedre gräns för konfidensintervall 95 %	Övre gräns för konfidensintervall 95 %
Total överensstämmelse i procent	95,87 %	90,62 %	98,64 %
Positiv överensstämmelse i procent (känslighet)	96,55 %	88,09 %	99,58 %
Negativ överensstämmelse i procent (specificitet)	95,24 %	86,71 %	99,01 %

Referenser

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.

Felsökningsguide

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

Kommentarer och förslag

Körningen är ogiltig på grund av ogiltig positiv kontroll

- | | |
|--|---|
| a) En komponent av reaktionsblandningen har inte tillsatts | Kontrollera att reaktionsblandningen har förberetts korrekt.
Kontrollera att alla komponenter för qPCR-reaktionsblandningen har tillsatts.
Upprepa qPCR-körningen. |
| b) Reaktionsblandningen har försämrats | Satsen har frysts ned och finats upp för många gånger, satsens innehåll har inte förvarats i $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, eller så har inte primer- och sökfragmentblandningarna skyddats från ljus.
Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se etiketten) för reagenserna och använd en ny sats.
Upprepa qPCR-körningen. |
| c) För liten volym pipetterad: Pipetteringsvolymen kan vara felaktig | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Kontrollera att 5 μl kontroll tillsatts.
Kontrollera och kalibrera om pipetterna innan qPCR-körningen upprepas. |
| d) Fel med instrumentet Rotor-Gene Q MDx | Kontrollera underhållsloggarna för instrumentet.
Upprepa qPCR-körningen. |
| e) Fel på tillbehör till Rotor-Gene Q MDx-instrumentet | 72-Well Rotor kan vara felaktigt låst.
Upprepa qPCR-körningen. |

Kommentarer och förslag

- | | | |
|----|--|--|
| f) | Inversion av rör på remsa och/eller prov-ID | Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
Upprepa qPCR-körningen. |
| g) | Kontroller saknas eller har laddats i en felaktig position | Kontrollera att rätt kontroll har laddats i rätt position.
Upprepa qPCR-körningen. |
| h) | Otillräcklig blandning av kontrollprover | Tiningen av kontrollerna slutfördes inte innan de laddades eller så blandades inte kontrollerna korrekt med reaktionsblandningen (pipettering upp och ner).
Upprepa qPCR-körningen. |
| i) | Ineffektiv röstängning | Röret stängdes inte effektivt, vilket ledde till dunstning vid qPCR-körningen.
Upprepa qPCR-körningen. |
| j) | Förvaringsvillkoren för en eller flera satskomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaringsförhållanden" (sida 26) | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på satsen) för reagenserna och använd en ny sats vid behov. |
| k) | Utgångsdatum för <i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit har passerats | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på satsen) för reagenserna och använd en ny sats vid behov. |
| l) | Felaktig förstärkningsgraf (artefakt) | Kontrollera motsvarande kurva för ovanliga kurvor (dvs. En rak linje).
Upprepa qPCR-körningen. |

Kommentarer och förslag

Körningen är ogiltig på grund av amplifiering i kontroll utan mall

- a) Korskontaminering eller kontamination av reagenserna
- Hantera alltid prover, satskomponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med god laboratoriesed för att undvika kontaminering via överföring (carryover).
Var noga med att byta spetsar mellan pipettering av olika reagenser eller vid laddning av olika rör. Förbered qPCR-reaktionsblandningen med därtill avsedda tillbehör (pipetter, spetsar osv.).
Förbered qPCR-reaktionsblandningen och NTC-reaktionen i ett anpassat utrymme där inget DNA-material (DNA, plasmid eller PCR-produkter) förs in.
Om korskontaminering har identifierats ska du byta ut alla reagenser.
Upprepa qPCR-körningen.
- b) Felaktig förstärkningsgraf (artefakt)
- Kontrollera motsvarande kurva för ovanliga kurvor (dvs. en rak linje).
Upprepa qPCR-körningen.
- c) Inversion av rör på remsa och/eller prov-ID
- Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen.
Upprepa qPCR-körningen.
- d) Fel med instrumentet Rotor-Gene Q MDx
- Kontrollera underhållsloggarna för instrumentet.
En felinriktad lins kan t.ex. orsaka högre bakgrund eller artefakt. Om linsjustering inte ingår i din underhållsplan kontaktar du QIAGEN teknisk service för mer information och eventuell åtgärd.

Provet är ogiltigt på grund av ingen eller låg amplifiering i den interna kontrollen

Kommentarer och förslag

- a) För låg DNA-koncentration i provet *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit är optimerat för en koncentration på 5 ng/μl (DNA från FFPE) och 5 μl renat extraherat ccfDNA från plasmaprover. Kontrollera koncentrationen (för FFPE). Upprepa qPCR-steget för provet.
- b) Dålig DNA-provqualität Kontrollera koncentrationen (för FFPE). Upprepa qPCR-steget med ett alternativt prov (helst nyskuret). Upprepa körningen med en högre provkoncentration. **OBS!** Testning av en högre gDNA-koncentration kan generera ett tidigare värde på exon 2 C_T, men ökar risken för hämning. Därför kan värdet på exon 2 C_T bli senare än med en lägre koncentration.
- c) Förekomst av hämmare i provet Späd provet och upprepa körningen med lägre provkoncentration. **OBS!** Testning av en lägre koncentration kan ge en tidigare exon 2-signal om det fanns hämmare i provet vid 5 ng/μl. Extrahera provet (FFPE) på nytt mer fler sektioner och upprepa körningen. **OBS!** Genom eluering av fler sektioner i samma volym kan koncentrationen för hämmaren ökas när provet normaliseras till 5 ng/μl.
- d) För liten volym pipetterad: Pipetteringsvolymen kan vara felaktig Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Kontrollera att 5 μl prov tillsatts. Kontrollera och kalibrera om pipetterna innan qPCR-körningen upprepas.
- e) Ineffektiv röstängning Röret stängdes inte effektivt, vilket ledde till dunstning vid qPCR-körningen. Upprepa qPCR-steget för provet.

Kommentarer och förslag

- f) Förvaringsvillkoren för en eller flera satskomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaringsförhållanden" (sida 26)
- g) Utgångsdatum för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit har passerats
- h) Onormal fluorescens
- Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på satsen) för reagenserna och använd en ny sats vid behov.
- Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på satsen) för reagenserna och använd en ny sats vid behov.
- Skriv inte på rören. Hantera rören försiktigt. Bär handskar. Kontrollera visuellt om PCR-reaktionsröret innehåller svarta magnetiska partiklar (från den automatiserade QIASymphony-extraktionen). Partiklar kan avlägsnas enligt beskrivningen i handböckerna för respektive extraktions-sats.

Provet är ogiltigt på grund av tidig amplifiering av den interna kontrollen i proverna

- a) För hög DNA-koncentration i provet
- therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit är optimerat för en koncentration på 5 ng/µl (FFPE).
För gDNA från FFPE: Kontrollera DNA-koncentrationen. Om DNA-koncentrationen inte ligger på denna nivå, späd DNA.
För ccfDNA från plasma: Späd provet.
Upprepa qPCR-steget för provet.
- b) För stor volym pipetterad: Pipetteringsvolymen kan vara felaktig
- Kontrollera pipetteringsschemat och iordningställandet av reaktionen. Kontrollera att 5 µl prov tillsatts.
Kontrollera och kalibrera om pipetterna innan qPCR-körningen upprepas för provet.
- c) Förstärkningsgrafan kan vara felaktig
- Kontrollera motsvarande kurva för falskt positiva (dvs. en rak kurva i stället för exponentiell amplifiering).
Upprepa qPCR-steget för provet.

Kommentarer och förslag

- d) Onormal fluorescens Skriv inte på rören. Hantera rören försiktigt. Bär handskar. Kontrollera visuellt om PCR-reaktionsröret innehåller svarta magnetiska partiklar (från den automatiserade QIASymphony-extraktionen). Partiklar kan avlägsnas enligt beskrivningen i handböckerna för respektive extraktionssats.
- e) Fel med instrumentet Rotor-Gene Q MDx Kontrollera underhållsloggarna för instrumentet. En felinriktad lins kan t.ex. orsaka högre bakgrund. Om linsjustering inte ingår i din underhållsplan kontakter du QIAGEN teknisk service för mer information och eventuell åtgärd.

Provet är ogiltigt på grund av oväntat tidigt Δ CT eller CT

- a) Provet är ogiltigt – CT för lågt eller under cutoff-intervallet Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet och var uppmärksam på blandningsstegen.













Kvalitetskontroll



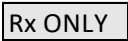

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Kvalitetskontroll av hela satsen har utförts på ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Den här satsen är tillverkad enligt standarden ISO 13485. Analyscertifikat finns tillgängliga på begäran på www.qiagen.com/support.

Symboler

Följande symboler kan finnas i bruksanvisningen eller på förpackningar och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
 Σ <N>	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer (dvs. komponentetikett)
	Komponenter
	Innehåller
	Antal
	GSI-artikelnummer
R_n	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare

Symbol	Symbolförklaring
	Läs bruksanvisningen
	Utsätt inte för direkt solljus
	Endast för receptbelagd användning
	Varning/försiktighet

Kontaktinformation

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

Bilaga A: Installera Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet, Gamma Plug-in och importera analysprofilen

Viktigt att tänka på före start


- Programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 måste installeras på datorn som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet. Du kan hämta programvaran från produktsidan för Rotor-Gene AssayManager v2.1 på www.qiagen.com/9025620 > **Resources** > **Operating Software** (> Resurser > Programvara). Detaljerad information om installation av Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application finns i *Användarhandboken till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.
- Det krävs ett specifikt plugin-program för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit: Gamma Plug-in. För att hämta den senaste versionen av plugin-programmet går du till produktsidan för Rotor-Gene AssayManager v2.1 på www.qiagen.com/9025620 > **Resources** > **Operating Software** (> Resurser > Programvara). Detta plugin-program måste installeras på en dator som redan har Rotor-Gene AssayManager version 2.1 eller senare installerat.
- *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit kräver även en analysprofil. Den här analysprofilen innehåller alla parametrar som behövs för PCR-cykling och automatiserad dataanalys. Två analysprofiler finns tillgängliga för användning med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:
 - En dedikerad för testning av gDNA-prover från FFPE: **therascreen_EGFR_Plus_FFPE**
 - En dedikerad för testning av ccfDNA-prover från plasma:
therascreen_EGFR_Plus_Plasma
- Analysprofilerna motsvarar .iap-filer som kan hämtas från produktsidan för *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit på www.qiagen.com. Analysprofilerna måste importeras till Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet.

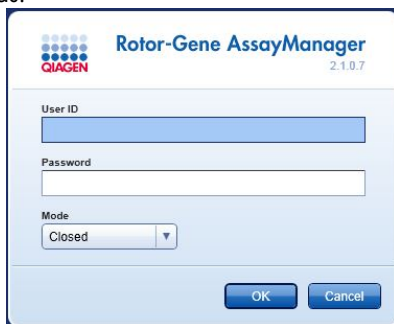
Procedur

Information om installationen av Gamma Plug-in och import av analysprofilerna till Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet finns nedan.

Installation och import av Gamma Plug-in och analysprofilen beskrivs i *Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* och i *Användarhandbok till Gamma Plug-in*.

1. Hämta Gamma Plug-in från QIAGEN:s webbplats.
2. Dubbelklicka på filen **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_x.msi** ($x \geq 0$) för att installera den och följ installationsanvisningarna. En detaljerad beskrivning av den här processen finns i avsnittet om installation av plugin-program i *Användarhandbok till Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.
3. När plugin-programmet har installerats måste en person med administratörsrättigheter för programmet Rotor-Gene AssayManager v2.1 importera den senaste versionen av analysprofilen på följande sätt:
 - 3a. Gå till Windows Explorer och spara AP:n i denna mapp: "
C:\Documents and settings\Public\Documents\QIAGEN\Rotor-Gene AssayManager\Import\AssayProfiles.

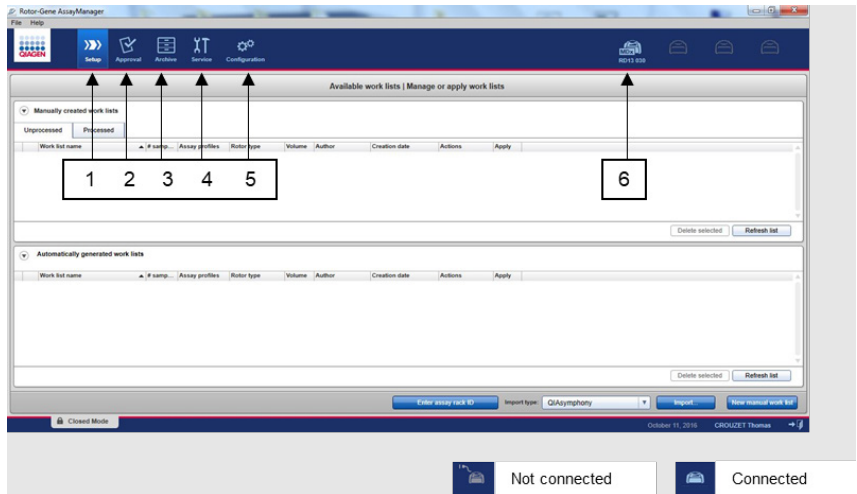
- 3b. Klicka på Rotor-Gene Assay Manager v2.1-ikonen.  Inloggningsfönstret visas.



Figur 21. Rotor-Gene AssayManager v2.1.

- 3c. Ange ditt användar-ID och lösenord. Lämna alternativet **Mode** (Läge) som **Closed** (Stängt). Klicka på **OK**.

Arbetsytan i Rotor-Gene AssayManager visas.



Figur 22. Rotor-Gene AssayManager v2.1.1. 1 = Fliken "Setup" (Installation). Den här fliken tillåter hantering eller tillämpning av arbetslistor 2 = Fliken "Approval" (Godkännande). Den här fliken låter dig hitta tidigare experiment. 3= Fliken "Archive" (Arkiv). Den här fliken låter dig hitta tidigare godkända experiment. 4 = Fliken Service. På den här fliken rapporteras ett granskningsspår för varje fil som skapats av programvaran. 5 = Fliken "Configuration" (Konfiguration). Den här fliken låter dig konfigurera alla programparametrar. 6 = instrumentikon för Rotor-Gene Q (RGQ); informerar användaren om huruvida en given cykler är ansluten. Upp till fyra RGQ-instrument kan anslutas till samma dator.

- 3d. För en systemomfattande processsäkerhet ska du utföra dessa obligatoriska konfigurationsinställningar för det stängda läget:

- Välj fliken "Settings" (Inställningar) i miljön "Configuration" (Konfiguration).
- Markera kryssrutorna för **Material number required** (Materialnummer krävs), **Valid expiry date** (Giltigt utgångsdatum) och **Lot number required** (Lotnummer krävs) på panelen "Work list" (Arbetslista) under "Closed mode" (Stängt läge).

OBS! Dessa konfigurationsinställningar kan endast utföras av någon med administratörsrättigheter.


- 3e. I miljön "Configuration" (Konfiguration) väljer du fliken "Assay Profiles" (Analysprofiler).
- 3f. Klicka på **Import** (Importera).
- 3g. I dialogrutan "Open file" (Öppna fil) väljer du **therascreen_EGFR_Plus_FFPE_V1_0_0.iap** som den första EGFR-analysprofilen.
- 3h. Klicka på "Open" (Öppna).
Analysprofilen laddas och läggs till i listan över tillgängliga analysprofiler som kan användas i miljön "Setup" (Installation).
- 3i. Upprepa steg 3e–3h för att ladda och lägga till **therascreen_EGFR_Plus_Plasma_V1_0_0.iap** som den andra analysprofilen.
OBS! Samma version av en analysprofil kan inte importeras två gånger.

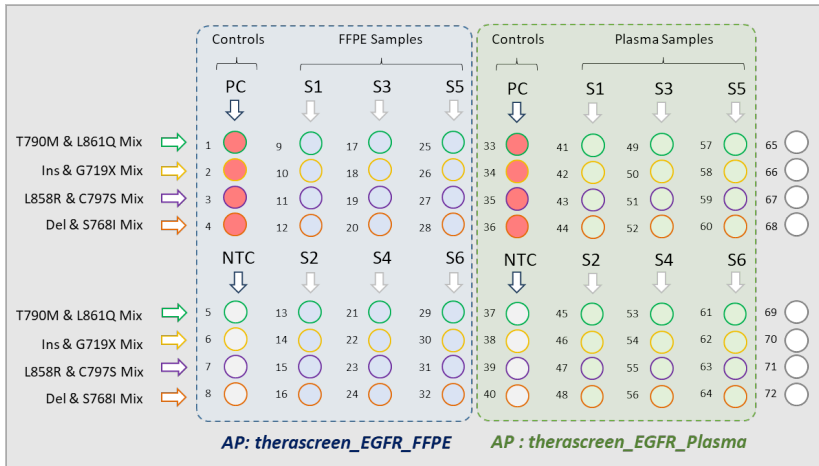
Bilaga B: Köra analysprofilerna för FFPE och plasma i samma experiment

Två analysprofiler finns tillgängliga för användning med *therascreen* EGFR Plus RGQ PCR Kit:

- För testning av gDNA-prover från FFPE: **therascreen_EGFR_Plus_FFPE**
- För testning av ccfDNA-prover från plasma: **therascreen_EGFR_Plus_Plasma**.

Så här kör du analysprofilerna för både FFPE och plasma i samma experiment:

1. Konfigurera qPCR-experimentet enligt anvisningarna i "Konfigurera qPCR" och "Protokoll: Förbered instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM" i "Protokoll: EGFR-mutationsbedömning med qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM-instrumentet" (med start på sida 43).
 -  En specifik plattlayout (Figur 23) krävs när du kör de två analysprofilerna i samma experiment:
 - Kontroller (positiv kontroll, NTC) måste tillsättas två gånger och placeras i brunnarna som föregår proverna för varje provtyp (FFPE och plasma), enligt Figur 23.
 - Alla prover med samma provtyp (FFPE eller plasma) måste testas i efterföljande brunnar. Ordningen i vilken de två provtyperna testas (dvs. FFPE eller plasma först) spelar ingen roll.
 - Det får inte finnas några tomma brunnar mellan den sista brunnen som innehåller ett prov från den första provtypen (t.ex. brunn 32 med S6 FFPE i Figur 23) och den första brunnen som innehåller den positiva kontrollen associerad med testningen av den andra provtypen (t.ex. den positiva kontrollen i brunn 33 associerad med analysprofilen för plasma i Figur 23).

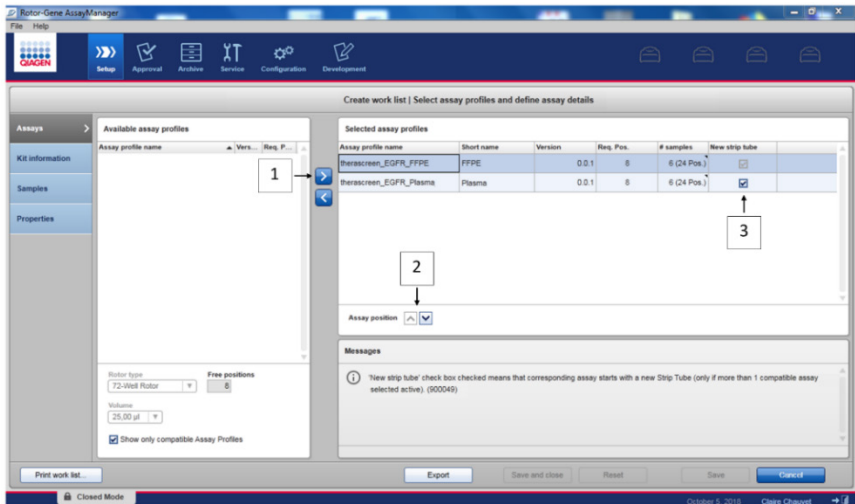


Figur 23. Plattlayout för att testa FFPE- och plasmaprover i samma qPCR-experiment. PC: EGFRv3 positiv kontroll; NTC: kontroll utan mall (vatten); AP: analysprofil; reaktionsblandningar: EGFRv3 T790M- och L861Q-blandning, EGFRv3 tilläggs- och G719X-blandning, EGFRv3 L858R- och C797S-blandning, EGFRv3 borttagnings- och S768I-blandning. Prov 1 (S1) till Prov 6 (S6): DNA-prover. ○ = tomma brunnet.

2. Fortsätt till steg 13–17 i proceduren "Skapa en arbetslista och starta qPCR-körningen" (med start på sida 48).
3. Importera de två analysprofilerna efter varandra enligt anvisningarna i steg 18 och 19 i "Skapa en arbetslista och starta qPCR-körningen" (sida 48). Se till att analysprofilerna importeras i rätt ordning enligt plattlayouten. Om du till exempel använder layouten från Figur 23 importerar du först analysprofilen för FFPE och sedan för plasma.

OBS! Analysprofilens position kan ändras vid behov för att säkerställa att analysprofilerna läses i rätt ordning (Figur 24).

4. Markera kryssrutan **New strip tube** (Nytt stripör) för att ange att motsvarande analys börjar med ett nytt stripör (Figur 24).



Figur 24. Analysposition. 1 = välj och överför de två analysprofilerna till arbetslistan.

2 = Analyspositionen kan ändras. Flytta analysprofilen uppåt eller nedåt med hjälp av pilarna.

3 = Markera kryssrutan "New strip tube" (Nytt stripörör).

5. Fortsätt proceduren från steg 20, sida 48.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> EGFR Plus RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: T790M- och L861Q-blandning, tilläggs- och G719X-blandning, L858R- och C797S-blandning, borttagnings- och S768I-blandning, PCR-masterblandning, EGFR-positiv kontroll, RNase/DNase-fritt vatten	874611
Rotor-Gene Q och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (Green, Yellow, Orange, Red, Crimson) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002032
Loading Block 72 x 0,1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanals-pipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
72-Well Rotor	För placering av Strip Tubes and Caps, 0.1 ml; kräver Locking Ring 72-Well Rotor	9018903

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Locking Ring 72-Well Rotor	För låsning av Strip Tubes and Caps, 0.1 ml i 72-Well Rotor	9018904
Rotor Holder	Metallfri hållare för placering av rör och Rotor-Discs® i rotorer	9018908
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106
Rotor-Gene AssayManager v2.1	Programvara för rutintestning i kombination med instrumenten Rotor-Gene Q och Rotor-Gene Q MDx	9024203
Rotor-Gene AssayManager v2.1 License (1)	Separat licens för installation av Rotor-Gene AssayManager v2.1-programmet på 1 dator	9025620
QIASymphony SP*		
QIASymphony SP System	QIASymphony provberedningsmodul: inkluderar installation och utbildning, 1 års garanti på delar och arbete	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony provberedningsmodul: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete	9001297
Relaterade produkter		
Deparaffinization Solution (16 ml)	2 x 8 ml Deparaffinization Solution	19093

* För QIASymphony SP-tillbehör, se relevanta handböcker.

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Deparaffinization Solution (50 ml)	1 x 50 ml Deparaffinization Solution	939018
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-beredningar: 50 QIAamp MinElute®-kolonner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	För 50 beredningar: QIAamp Mini-kolonner, buffertar, bärar-DNA, QIAGEN Proteinase K och rör	61504
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	För 192 beredningar på vardera 200 µl: Inkluderar 2 reagenskassetter och enzymställ plus tillbehör	937236
QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	Reagenskassetter, tillbehör och flaskor med proteinas K för 192 beredningar på vardera 2 000 µl eller 4 000 µl	937556
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 enheter/ml, lösning)	19101
Buffer ATL (4 x 50ml)	4 x 50 ml lyseringsbuffert	939016

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive handbok eller användarmanual för QIAGEN-satsen. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-satsen finns tillgängliga på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisjoner

Revision	Beskrivning
R1 mars 2022	Startversion

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom

Avtal om begränsad licens för *therascreen*[®] EGFR Plus RGQ PCR Kit

Användning av denna produkt innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. Dessa protokoll har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Panelen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otilåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser panelen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Köpet av den här produkten ger användaren rätt att utföra diagnostiska analyser för human *in vitro*-diagnostik. Inget allmänt patent eller licens av något slag förutom den här specifika rättigheten ingår i köpet.

Varumärken: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], *therascreen*[®], QIAamp[®], QIAasymp[®], 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, med ensamrätt.

