

September 2019

Brugsanvisning til *therascreen*[®] PIK3CA RGQ PCR Kit (håndbog)



Version 1

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug

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

Til brug med QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit

Til brug med QIAamp[®] DSP Circulating Nucleic Acid Kit



REF

873111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Tyskland

R2 **MAT**

1116336DK

Sample to Insight



Indholdsfortegnelse

Tilsligtet anvendelse	5
Procedurens begrænsninger	6
Opsummering og forklaring af testen	8
Funktionsprincip	10
Mutationsreaktionsblandinger	10
Platform og software	15
Medfølgende materialer	16
Kit-indhold	16
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	17
Advarsler og forholdsregler	19
Almene forsigtighedsregler	20
Opbevaring og håndtering af reagenser	22
Forsendelsesbetingelser	22
Opbevaringsbetingelser	22
Stabilitet	22
Prøveopbevaring og -håndtering	24
Opbevaring af prøve	26
Procedure	27
DNA-ekstrahering fra FFPE-prøver	27
DNA-ekstrahering fra plasmaprøver	29
Påvisning af <i>PIK3CA</i> -mutationer	30
Udførelse af en <i>PIK3CA</i> -mutationsanalysekørsel	36

Resultater	50
Analyse.....	50
Flag, der kan genereres af <i>therascreen</i> PIK3CA Assay Profile i Rotor-Gene AssayManager v2.1	52
Ydelseskarakteristik: Vævsprøver	56
Analytisk ydeevne: Vævsprøver	56
Tomgrænse (LoB): Vævsprøver	56
Påvisningsgrænse (LoD): Vævsprøver	57
Inputområde for genomisk DNA: Vævsprøver	58
ΔC_T -grænseværdier: Vævsprøver	59
Effekten af DNA-input på ΔC_T -værdier (linearitet): Vævsprøver.....	60
Analysens specificitet (krydsreaktivitet/specificitet): Vævsprøver.....	61
Interferens: Vævsprøver	62
Lottenes indbyrdes udskiftelighed: Vævsprøver.....	64
Prøvehåndtering: Vævsprøver	64
Repeterbarhed og reproducerbarhed: Vævsprøver.....	65
Krydskontaminering/analytisk overførsel: Vævsprøver	68
Nøjagtighed: Sammenligning med den analytiske referencemetode (vævsprøver)	69
Klinisk ydeevne: Vævsprøver.....	71
Ydelseskarakteristik: Plasmaprøver	76
Analytisk ydeevne: Plasmaprøver	76
Tomgrænse (LoB): Plasmaprøver	76
Påvisningsgrænse (LoD): Plasmaprøver.....	77
Inputområde for genomisk DNA: Plasmaprøver	78

ΔC _T -grænseværdier: Plasmaprøver.....	79
Effekten af DNA-input på ΔC _T -værdier (linearitet): Plasmaprøver	80
Analysens specificitet (krydsreaktivitet/specificitet): Plasmaprøver	80
Interferens: Plasmaprøver	81
Løttenes indbyrdes udskiftelighed: Plasmaprøver	82
Prøvehåndtering: Plasmaprøver	82
Repeterbarhed og reproducerbarhed: Plasmaprøver	83
Validering af blodprøvetagningsrør	87
Nøjagtighed: Sammenligning med den analytiske referencemetode (plasmaprøver)..	88
Klinisk ydeevne: Plasmaprøver	89
Fejlfindingsvejledning.....	95
Litteraturhenvisninger.....	97
Kontaktoplysninger	97
Symboler	98
Bestillingsinformation.....	100
Revisionshistorik for dokumentet	102

Tilsigtet anvendelse

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit er en kvalitativ real-time PCR-test til påvisning af 11 mutationer i phosphatidylinositol 3-kinase katalytisk underenhed alfa (*PIK3CA*)-genet (Exon 7: C420R; Exon 9: E542K, E545A, E545D [kun 1635G>T], E545G, E545K, Q546E, Q546R og Exon 20: H1047L, H1047R, H1047Y) ved anvendelse af genomisk DNA (gDNA) ekstraheret fra formalinfikset, paraffinindlejret (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) brysttumorbvæv eller cirkulerende tumor-DNA (ctDNA) fra plasma afledt fra K₂EDTA-antikoaguleret perifert fuldblod tappet fra patienter med brystcancer.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit er beregnet til brug som en ledsagende diagnostisk test til at hjælpe klinikere med at identificere brystcancerpatienter, der muligvis er egnet til behandling med PIQRAY® (alpelisib) baseret på et resultat med detekteret *PIK3CA*-mutation. Patienter, hvis FFPE-vævs- eller plasmaprøve giver et positivt testresultat med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit for tilstedeværelse af én eller flere *PIK3CA*-mutationer, er egnet til behandling med PIQRAY (alpelisib). Patienter, hvis plasmaprøve giver et negativt resultat med denne test, bør indstilles til test af en FFPE-tumorbvævsprøve for tilstedeværelse af *PIK3CA*-mutationer.

FFPE-tumorbprøver behandles med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit med henblik på manuel prøveklargøring. K₂EDTA-antikoagulerede plasmaprøver af perifert venøst fuldblod behandles ved hjælp af QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit med henblik på manuel prøveklargøring. For begge prøvetyper bruges Rotor-Gene Q (RGQ) MDx 5plex HRM-instrumentet til automatisk forstærkning og påvisning.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit er vitro-diagnostisk medicinsk udstyr.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit skal anvendes af uddannet laboratoriepersonale i et professionelt laboratiemiljø.

Procedurens begrænsninger

- Dette dokument med brugsanvisninger skal læses grundigt af brugeren, inden *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit anvendes.
- De fremkomne resultater ved brug af produktet skal fortolkes i forbindelse med alle relevante kliniske fund eller laboratoriefund og må ikke bruges som eneste grundlag for en diagnose.
- Prøver med resultater som "No Mutation Detected" (Ingen mutation påvist) kan indeholde *PIK3CA*-mutationer, der ikke påvises af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.
- Analytiske og kliniske ydeevnedata i forbindelse med påvisning af følgende *PIK3CA*-mutationer: E545A, E545D, Q546E, Q546R og H1047Y blev kun fastslået ved hjælp af kunstige plasmaprøver (cellelinje-DNA tilsat i plasma), ikke ved anvendelse af kliniske prøver fra populationen for tilsigtet brug.
- Påvisning af mutationer afhænger af prøvens integritet og mængden af amplificerbart DNA. Testproceduren skal gentages, hvis analyse af DNA'et i prøven indikerer, at mængden og/eller kvaliteten enten ikke er tilstrækkelig, eller koncentrationen er for høj til mutationsanalyse.
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit anvendes i en PCR-procedure. Som med alle PCR-procedurer kan prøver blive kontamineret med eksterne kilder til DNA i testmiljøet og DNA'et i den positive kontrol. Udvis forsigtighed for at undgå kontamination af prøver og kit-reagenser.
- Hvis prøven indeholder mindre end den procentdel af mutante alleler, der kan påvises af *therascreen* PIK3CA RGQ Kit, vil det give resultatet "No Mutation Detected" (Ingen mutation påvist).
- Det vides ikke, om *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit viser krydsreaktivitet (hvilket giver resultatet "Mutation Detected" (Mutation påvist)) med yderligere *PIK3CA*-mutationer end dem, der er anført som biomarkører, der påvises af kittet.

- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er en kvalitativ test. Testen giver ikke kvantitative målinger af allelfrekvensen af mutant allel (MAF, Mutant Allele Frequency), der er til stede i en prøve.
- Det vides ikke, hvordan det påvirker ydeevnen af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, hvis der introduceres mikrobiel kontamination under analyseprocedurer. Operatørerne skal udvise passende forsigtighed for at undgå introduktion af mikrobielle kontaminanter under testprocedurerne og bør ikke bruge kitkomponenterne, hvis der observeres tegn på mikrobiel vækst.
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er kun til brug med DNA, der er ekstraheret fra FFPE-brystcancervæv eller plasmaprøver fremstillet af K₂EDTA-antikoaguleret perifert venøst fuldblod tappet fra brystcancerpatienter.
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er kun beregnet til brug med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (til vævsprøver) eller QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (til plasmaprøver).
- *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er kun beregnet til brug, når alle reaktionsblandinger anvendes.
- Produktet må kun bruges af personale med særlig kompetence og uddannelse inden for in vitro-diagnostiske procedurer og betjening af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter.
- Produktet er udelukkende beregnet til brug med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cycler. Der må ikke anvendes nogen anden termocycler med optisk påvisning i realtid med dette produkt.
- Brugsanvisningen til *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (håndbog) skal følges fuldstændigt for at opnå optimale resultater. Fortynding af reagenserne anbefales ikke og vil medføre tab af ydelse.
- Denne håndbog er beregnet til brug med Rotor-Gene AssayManager softwareversion 2.1 med automatiseret mutationspåvisning.
- Vær opmærksom på de udløbsdatoer og opbevaringsbetingelser, der er trykt på æsken og på etiketterne til samtlige komponenter. Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

Opsummering og forklaring af testen

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-signalvejen regulerer forskellige cellulære funktioner, herunder celleproliferation, overlevelse, translationel regulering af proteinsyntese, glukosemetabolisme, cellemigration og angiogenese (1). Aktivering af somatiske missense-mutationer af *PIK3CA* (phosphatidylinositol 3-kinase katalytisk underenhed alfa)-genet, der øger kinaseaktiviteten af PI3K α -proteinet, er blevet identificeret i tumorvæv og er blevet knyttet til cellulær transformation i mange forskellige humane cancerformer (2), herunder hormonreceptorpositiv (HR+) brystcancer (3).

Brystcancer er den hyppigste cancerform, der diagnosticeres hos kvinder, og den næsthypigste årsag til cancerrelateret død (4) I 2018 blev det anslået, at 266.120 kvinder i USA ville blive diagnosticeret med brystcancer (hvilket repræsenterer ca. 30 % af alle cancerformer hos kvinder), og at 40.920 dødsfald ville blive registreret (5). I Europa blev det forudset, at 92.700 kvinder ville dø af brystcancer i 2018 (6). Brystcancer hos mænd er sjældent, hvor <1 % af diagnoserne af brystcancer er blandt mandlige patienter (4); men de anbefalede behandlinger er dog de samme for begge køn.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit en kvalitativ, in vitro-diagnostisk real-time PCR-test, der udføres på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Den anvender primere fra det refraktoriske allel-mutationssystem (ARMS, Allele Refractory Mutation System), hydrolyseprober og PCR-clamp-teknologier til påvisning af 11 mutationer (Tabel 1) i exon 7, 9 og 20 i *PIK3CA*-onkogent mod en baggrund på vildtype (WT, Wild Type) DNA.

Tabel 1. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, analysemaal

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

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

Funktionsprincip

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit består af seks separate reaktionsblandinger til PCR-forstærkning:

- Fem mutationsspecifikke reaktioner rettet mod exon 7, 9 og 20 i *PIK3CA*-genet
- Én kontrolreaktion rettet mod exon 15

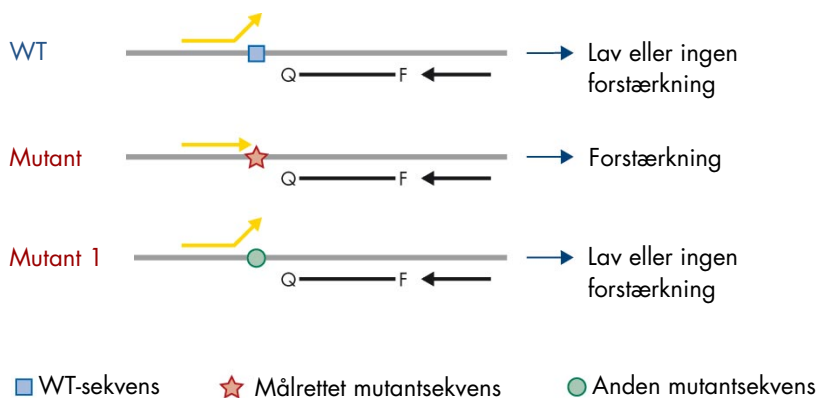
Hovedkomponenterne i kittet er forklaret nedenfor.

Mutationsreaktionsblandinger

Muteret DNA amplificeres og påvises selektivt ved mutationsspecifikke reaktionsblandinger ved anvendelse af mutationsspecifikke ARMS-primere, prober (hydrolyseprober og korte højspecifikke prober) og PCR-clamps. Mutationsreaktioner påvises i kanalerne Green, Yellow og Crimson på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

ARMS

Allele-specifik forstærkning opnås med ARMS, som anvender muligheden for, at *Taq* DNA-polymerase kan skelne mellem en matchet og en ikke matchet base i 3'-enden af en PCR-primer. Når primeren er fuldstændigt matchet, fortsætter forstærkningen med fuld effektivitet. Når 3'-basen ikke er matchet, kan der kun forekomme baggrundsforstærkning på et lavt niveau. En muteret sekvens forstærkes derfor selektivt, selv i prøver hvor størsteparten af DNA'et ikke bærer mutationen (Figur 1).

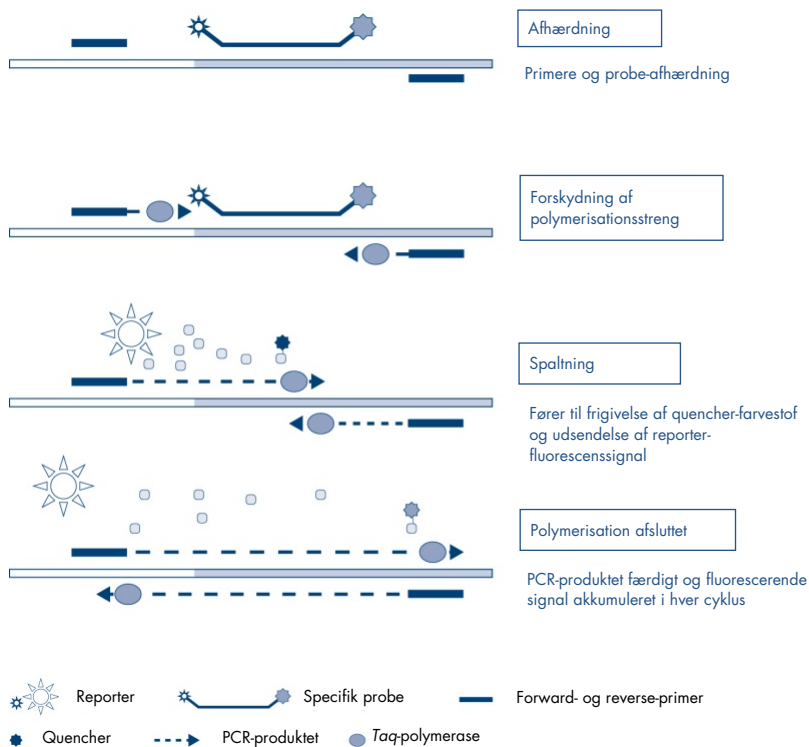


Figur 1. Identifikation af specific mutation med ARMS PCR. WT: Vildtype. Q-F: Dobbelfarve-probe. ⇨: Forward- og reverse-primer.

Hydrolyseprober

Hydrolyseprober afhæres i et DNA-område, der er amplificeret med et specifikt sæt primere. Efterhånden som *Taq*-polymerasen udvider primeren og syntetiserer den spirende streng, nedbryder 5'- til 3'-exonukleaseaktiviteten af *Taq*-polymerasen proben, hvilket fører til frigivelse af fluorofor og udledning af fluorescens.

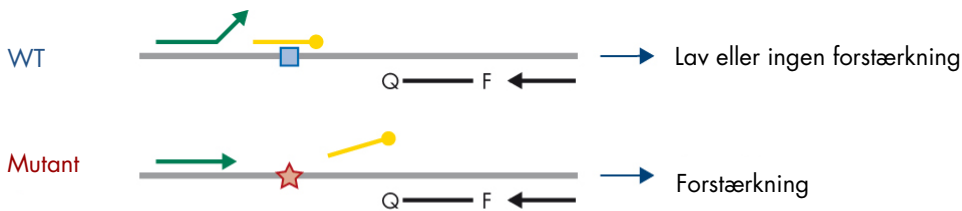
Stigningen i fluorescenssignalet detekteres kun, hvis målsekvensen er komplementær til primerne og proben og dermed amplificeres under PCR (Figur 2).



Figur 2. Reaktionsprincipper med hydrolyseprober.

PCR-clamp

PCR-clamps muliggør selektiv forstærkning af det mutante allel. PCR-clamps, der er perfekt tilpasset vildtype-sekvensen, binder til vildtype-skabelonen og forhindrer forstærkning ved at forstyrre primereelongeringen. 3'-enden af PCR-clampen blokeres med tilsætningen af en fosfatgruppe for at forhindre elongering af vildtype-sekvensen (Figur 3).



- WT-sekvens
- ★ Målrettet mutantsekvens
- 3'-phosphat-oligonukleotid (CLAMP)

Figur 3. PCR-clamp-teknologi. WT: Vildtype. Q-F: Dobbelfarve-probe. ⇄: Forward- og reverse-primer.

Kontrolreaktion

Kontrolreaktionsblandingen (rør 1) indeholder en forward- og reverse-primer og mærket probe (påvist i kanalen Green) for at amplificere en kort sekvens af exon 15 i *PIK3CA*-genet. Kontrolreaktionen bruges til at bestemme, om der er et passende niveau af DNA, der kan forstærkes i prøven, og er en faktor i de analytiske beregninger til bestemmelse mutationsstatus.

Intern kontrol

Hver af reaktionsblandingerne indeholder en intern kontrol, der er udviklet til at påvise fejl i reaktionen (f.eks. ved tilstedeværelsen af hæmmere). Den interne kontrol anvender en ikke-*PIK3CA*-relateret oligonukleotidmålsekvens, umærkede forward- og reverse-primere og en hydrolyseprobe mærket med en orange fluorofor.

Positiv kontrol

Den positive kontrol (PC-røret, Positive Control) omfatter en blanding af fem plasmider, der repræsenterer hver af de 11 mutationer, og kontrollen. Påvisning af mutationer inden for de acceptable områder bekræfter den korrekte funktion i hver af kittets reaktionsblandinger.

Negativ kontrol

Ikke-skabelon-kontrollen (NTC-røret) indeholder nukleasefrit vand til brug ved "Ikke-skabelon-kontrol"-reaktionen (NTC, No Template Control). NTC fungerer som en negativ kontrol og identificerer potentiel kontamination under analyseopsætningen.

Prøvediluent

Prøvediluenten (Dil.-røret) indeholder nukleasefrit vand.

Platform og software

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit er udviklet specifikt til brug sammen med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet, der kører med en pc, hvor følgende er installeret:

- Rotor-Gene AssayManager® version 2.1
- Gamma Plug-in version 1.0.0
- *therascreen*_PIK3CA_FFPE Assay Profile version 1.0.1 til analyse af vævsprøver
- *therascreen*_PIK3CA_Plasma Assay Profile version 1.0.1 til analyse af plasmaprøver

Se brugervejledningen til *Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* for at få oplysninger om Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet skal vedligeholdes i overensstemmelse med kravene i brugervejledningen.

Se brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* og Se brugervejledningen til *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in* for at få yderligere oplysninger om softwaren.

Kørselsparametre

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet er programmeret til forskellige cyklusparametre (eller "kørsler") med *therascreen* PIK3CA Assay Profiles. Analyseprofilerne indeholder PCR-kørselsparametre og beregner resultaterne. Parametrene for analysens termiske PCR-cykluser er følgende:

- Opbevares ved 95 °C i 15 minutter for at aktivere *Taq* DNA-polymerase.
- PCR for 45 cykluser ved 95 °C i 30 sekunder for at denaturere og 60 °C i 1 minut for at afhærde og udvide.

Medfølgende materialer

Kit-indhold

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)		
Katalognr.		873111
Antal reaktioner		24
Indhold	Hættefarve	Volumen
PIK3CA Reaction Mix 1 (PIK3CA-reaktionsblanding 1)	Rød	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 2 (PIK3CA-reaktionsblanding 2)	Lilla	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 3 (PIK3CA-reaktionsblanding 3)	Orange	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 4 (PIK3CA-reaktionsblanding 4)	Gul	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 5 (PIK3CA-reaktionsblanding 5)	Grøn	750 µl
PIK3CA Reaction Mix 6 (PIK3CA-reaktionsblanding 6)	Blå	750 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> -DNA-polymerase) (<i>Taq</i>)	Mintgrøn	85 µl
PIK3CA Positive Control (PIK3CA positiv kontrol) (PC)	Beige	250 µl
Water for No Template Control (vand til ikke-skabelon-kontrol) (NTC)	Hvid	1,9 ml
Nuclease-free water for Dilution (Nukleasefrit vand til fortynding) (Dil.)	Hvid	1,9 ml
Brugsanvisning til <i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (Håndbog)		1

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Sørg for, at instrumenterne før anvendelse regelmæssigt kontrolleres og kalibreres efter producentens anvisninger.

Reagenser

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, katalognr. 60404, se "DNA-ekstrahering fra FFPE-prøver", side 27) eller QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, katalognr. 61504, se "DNA-ekstrahering fra plasmaprøver", side 27)
- DNAZap™ PCR-nedbrydende opløsninger
- Distel High Level Laboratory Disinfectant og isopropylalkohol (IPA, isopropyl alcohol)

Forbrugsartikler

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps til brug med 72-brøndsrotor (QIAGEN katalognr. 981103 eller katalognr. 981106)
- Nukleasefri, mikrocentrifugerør med lav DNA-binding til klargøring af masterblandinger
- Nukleasefri pipettespidser med aerosolbarrierer

Udstyr

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

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

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

- Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in og "therascreen_PIK3CA_FFPE" og/eller "therascreen_PIK3CA_Plasma" analyseprofil
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til prøveklargøring
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til forberedelse af PCR-masterblanding
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til dosering af DNA-skabelon
- Bordcentrifuge* med rotor til 1,5 ml rør
- Thermomixer*, opvarmet orbital inkubator*, varmeblok* eller vandbad*, der kan inkubere ved 56 °C, 70 °C og 90 °C
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (kat.nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (kat.nr. 19419)
- Vacuum Pump (kat.nr. 84010) eller tilsvarende pumpe, der kan frembringe et vakuum på -800 til -900 mbar
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion (QIAGEN, kat.nr. 9018901)
- Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes, aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 96 x 0,2 ml PCR-rør (QIAGEN, katalognr. 9018905)
- 72-Well Rotor, til opbevaring af Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, reaktionsvolumener på 10-50 µl; Kræver Locking Ring 72-Well Rotor (QIAGEN, katalognr. 9018903)
- Locking Ring 72-Well Rotor, til låsning af Strip Tubes and Caps, 0.1 ml i 72-Well Rotor (QIAGEN, katalognr. 9018904)

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug.

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit skal anvendes af uddannet laboratoriepersonale i et professionelt laboratoriemiljø.

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

Kun til brug sammen med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Se sikkerhedsinformationen vedrørende Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet i den brugervejledning, der følger med instrumentet.

Kun vævsprøver: Kun til brug sammen med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Sikkerhedsinformation vedrørende QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (katalognr. 60404) kan ses i *håndbogen til QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit*.

Kun plasmaprøver: Kun til brug sammen med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit.

Sikkerhedsinformation vedrørende QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (katalognr. 61504) kan ses i *håndbogen til QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

Almene forsigtighedsregler

- Testen er beregnet til brug med FFPE-brystcancer vævsprøver eller K₂EDTA-plasmaprøver fra brystcancerpatienter.
- Alle kemikalier og alt biologisk materiale er potentielt farligt. Det er usandsynligt, at FFPE-prøvemateriale og nukleinsyrer fremstillet heraf er smittefarlige, men alle plasmaprøver skal håndteres som potentielt farlige. De lokale sundheds- og sikkerhedsprocedurer skal altid overholdes.
- Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til de lokale sikkerhedsprocedurer.
- Reagenserne til *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er fortyndet optimalt. Fortynd ikke reagenserne yderligere, da dette kan resultere i forringet pålidelighed. Brug ikke reaktionsvolumener (reaktionsblanding plus prøve) på under 25 µl.
- Alle reagenser, der leveres med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Reagenserne i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit må ikke udskiftes og heller ikke udskiftes indbyrdes mellem forskellige *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, da det kan resultere i forringet pålidelighed.
- Brug kun den *Taq* DNA-polymerase (rør med *Taq*), som leveres med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Den må ikke udskiftes med *Taq* DNA-polymerase fra andre QIAGEN-kit eller med *Taq* DNA-polymerase fra en anden leverandør.
- Se brugervejledningen til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet for at få flere oplysninger om advarsler, forholdsregler og procedurer.
- Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre kontamination af kontrollen og reaktionsblandingsreagenserne med de syntetiske materialer, der findes i det positive kontrolreagens.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre krydskontaminering mellem prøver. Sæt omgående hætte på rørene efter tilsætning af hver prøve.

-
- Foretag grundig dekontaminering af isætningsblokken, inden den anvendes til klargøring af analysemasterblandinger. Det anbefales at bruge DNAZap PCR-nedbrydende opløsninger efterfulgt af laboratoriedesinfektionsmiddel af typen Distel High Level Laboratory Disinfectant og IPA-vaskebuffer. Isætningsblokken skal være tør inden brug.
 - Brug særskilte, velegnede pipetter til klargøring af reaktionsblandinger og tilsætning af positive kontrolreagenser.
 - Udfør klargøring og dispensering af reaktionsblandinger i et område, der er adskilt fra det, der bruges af den positive kontrol.
 - Fluorescensmærkede molekyler i reaktionsblandingsreagenserne er lysfølsomme. Beskyt kontrol- og reaktionsblandingsreagenser mod lys for at undgå fotoblekning.
 - Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet må ikke åbnes, før kørslen er afsluttet.
 - Rotor-Gene Q-rør må ikke åbnes, når kørslen er afsluttet.
 - Der skal udvises forsigtighed for at sikre korrekt test af prøver og forhindre forkert prøveangivelse, fejl ved isætning og pipetteringsfejl.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Forsendelsesbetingelser

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit sendes på tøris og skal være frosset ved modtagelse. Hvis en eller flere af komponenterne i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ikke er frosne ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en følgeseddel, en brugsanvisning eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til QIAGENs tekniske serviceafdeling eller lokale distributører (besøg www.qiagen.com).

Opbevaringsbetingelser

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit skal straks efter modtagelse opbevares ved -30 til -15 °C i en fryser med konstant temperatur og beskyttes mod lys.

Når *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit opbevares under de anførte opbevaringsbetingelser, er det stabilt indtil den anførte udløbsdato.

Stabilitet

Når de er åbnet, kan reagenser opbevares i den originale emballage ved -30 til -15 °C i 12 måneder eller indtil den udløbsdato, der er angivet på emballagen. Undgå gentagen optøning og indfrysning. Et reagens må højst indfryses og optøs fem gange.

Reagenserne skal optøs ved stuetemperatur i mindst 1 time (og højst 4,5 timer) inden brug. Når reagenserne er klar til brug, kan PCR-reaktionerne opsættes. Rotor-Gene Q-rør, der indeholder masterblandinger og prøve-DNA, skal sættes i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med det samme. Når PCR-reaktionerne er klargjort, må den samlede tid fra opstarten til kørslen ikke overstige 7,5 timer, hvis proceduren udføres ved stuetemperatur.

Bemærk: Dette tidsrum omfatter både PCR-opsætningen og -opbevaringen.

Bemærk: Fluorescensmærkede molekyler i reaktionblandingsreagenserne er lysfølsomme. Beskyt kontrol- og reaktionsblandingsreagenser mod lys for at undgå fotoblekning.

Reagenserne i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er fortyndet optimalt, og der er ikke behov for yderligere oprensning eller behandling før brug.

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


Prøveopbevaring og -håndtering

Prøvehåndtering: Væv

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit er beregnet til brug med gDNA, der er ekstraheret fra resekerede FFPE-tumorstøvsprøver fra brystcancerpatienter og prøver indsamlet fra brystcancerpatienter ved hjælp af grov nålsbiopsi (CNB, Core Needle Biopsy). Tumorer er heterogene med hensyn til både genotype og phenotype. Mutationspositive tumorer kan indeholde vildtype-DNA, og lignende histologi kan vise områder af ikke-tumorstøvsprøve.

Sådan klargøres vævsprøver til DNA-ekstrahering:

- Vævsprøven fikseres i 10 % neutralt bufret formalin (NBF, Neutral Buffered Formalin) ved hjælp af standardmaterialer og -metoder og indstøbes i paraffin. Ved hjælp af en mikrotom skal man skære 5 µm serielle sektioner fra paraffinblokken og montere dem på objektglas.
- Få en uddannet person (f.eks. en patolog) til at undersøge en sektion, der er farvet med hæmatoxylin og eosin (Hæmatoxylin & Eosin, H&E), for tumorindhold og effektivt tumorområde (ETA, Effective Tumor Area). Markér det farvede objektglas for at definere interesseområdet (ROI, Region Of Interest). Brug serielle sektioner til DNA-ekstrahering. Bemærk: De farvede sektioner må ikke bruges til DNA-ekstrahering.
- Skrab overskydende paraffin bort fra vævet med en ny, steril skalpel.

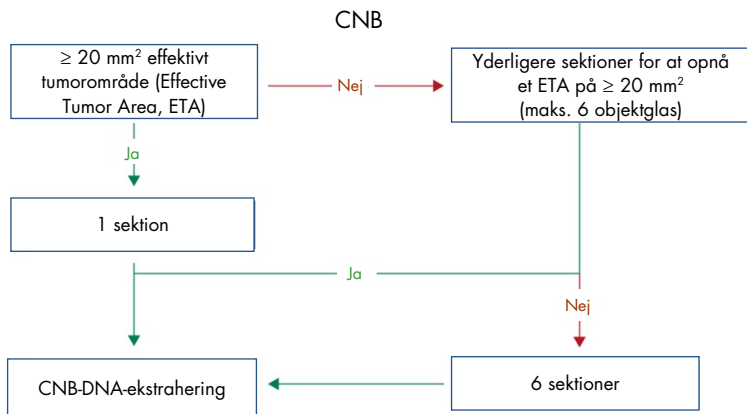
<p>FORSIGTIG</p> 	<p>Brug tørre skalpeller. Udfør ikke dette trin i laminar strømning eller stinkskaab.</p>
--	---

- Skrab tumorstøvsprøvet bort fra objektglassene og ind i mærkede mikrocentrifugeringsrør med en ny skalpel for hver prøve.

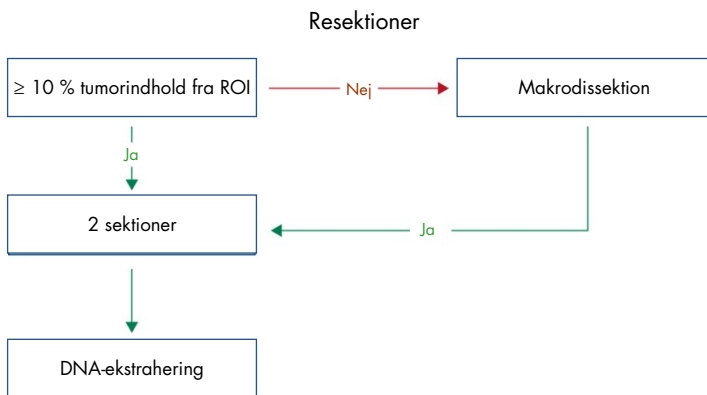
Mærk, håndter og opbevar tumorstøvsprøver, blokke, objektglas, prøver og mikrocentrifugeringsrør klar til ekstrahering på en kontrolleret måde i henhold til lokale procedurer.

Der er to separate workflows ved brug af henholdsvis resecerede FFPE-tumorstøvsprøver og FFPE-CNB-prøver (Figur 4).

A



B



Figur 4. Workflow, som skal anvendes ved oprensning af kliniske prøver med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. A: FFPE-CNB-prøver. B: Reseerede FFPE-tumorstøvsprøver.

Prøvehåndtering: Plasma

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit er beregnet til brug med DNA, der er isoleret fra K₂EDTA-antikoagulerede plasmaprøver fra brystcancerpatienter. Alle plasmaprøver skal håndteres som potentielt farlige.

Perifert venøst fuldblod indsamlet i K₂EDTA-blodprøvetagningsrør skal forarbejdes med henblik på opnåelse af plasma inden for fire timer efter blodprøvetagning. Hvis denne tidsgrænse overskrides, kan det medføre genomisk DNA-kontamination af prøven. Yderligere oplysninger om isolation af plasma fra fuldblod kan ses i appendiks A i *håndbogen til QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit*.

Plasmaprøver skal opbevares ved -80 °C. Alle frosne plasmaprøver skal ekvilibreres til stuetemperatur inden brug.

Mærk, håndter og opbevar prøver og mikrocentrifugeringsrør klar til ekstrahering på en kontrolleret måde i henhold til lokale procedurer.

Opbevaring af prøve

Inden DNA-ekstrahering skal FFPE-blokke og -objektglas opbevares ved stuetemperatur (15-25 °C), og plasma skal opbevares ved -80 °C. DNA kan opbevares efter ekstrahering og inden test. Tabel 2 og Tabel 3 indeholder anbefalinger med hensyn til maksimal opbevaringstid og opbevaringsbetingelser for prøver og DNA efter ekstrahering.

Tabel 2. Anbefalet opbevaringstid for gDNA ekstraheret fra FFPE-væv

Opbevaring	Anbefalet maksimal opbevaringstid
Fryser (fra -30 til -15 °C)	5 uger
Køleskab (2-8 °C)	1 uge
Fryser (-80 °C)	33 måneder

Tabel 3. Anbefalede opbevaringsbetingelser og anbefalet opbevaringstid for plasma og ctDNA ekstraheret fra plasma

Prøve	Opbevaring	Anbefalet maksimal opbevaringstid
Plasma	Fryser (-80 °C)	11 måneder
Ekstraheret ctDNA	Fryser (fra -30 til -15 °C)	4 uger

Procedure

DNA-ekstrahering fra FFPE-prøver

DNA skal ekstraheres med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (katalognr. 60404).

Bemærk: *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er udviklet ved hjælp af DNA ekstraheret med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Der må ikke anvendes andre DNA-ekstraheringsprodukter.

DNA-ekstraheringen skal udføres i henhold til instruktionerne i *håndbogen til QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* med følgende bemærkninger:

- Brug det antal objektglas og de elueringsvolumener, der anbefales i nedenstående afsnit ("FFPE-vævsresektionsprøver (RES-prøver)" og "FFPE-CNB-prøver" på side 28 i denne håndbog).
- Hvis vævet ikke er pelletteret efter den første centrifugering, skal der udføres endnu en centrifugering.
- Sørg for at bruge ethanol af molekylærbiologisk kvalitet* til alle nødvendige trin.
- Efter fjernelse af ethanol skal det åbne rør inkuberes ved 15-40 °C i 10 minutter, så eventuel resterende ethanol fordamper.

* Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer, såsom metanol eller methylethylketon.

FFPE-vævsresektionsprøver (RES-prøver)

- Hvis RES-prøverne har $\geq 10\%$ tumorindhold i interesseområdet (region of interest, ROI), skal hele vævsområdet skraves bort fra to sektioner (4-5 μm) og ind i mærkede mikrocentrifugeringsrør med en ny skalpel for hver prøve. Hvis prøverne har $< 10\%$ tumorindhold i ROI'et, skal der udføres makrodissektion, og det er i så fald kun tumor-ROI'et fra to sektioner, der skal skraves ind i mærkede mikrocentrifugeringsrør med en ny skalpel for hver prøve.
- Der skal udføres proteinase K-fordøjelse i 1 time for resecerede vævsprøver.
- For RES-prøvers vedkommende skal oprenset gDNA elueres i 120 μl Buffer ATE (inkluderet i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) efter 10 minutters inkubation på kolonnen.

FFPE-CNB-prøver

- For CNB-prøvers vedkommende skal der bruges et passende antal sektioner på 4-5 μm for at opnå det minimale påkrævede effektive tumorområde (effective tumor area, ETA) på 20 mm^2 ud fra maksimalt seks sektioner. Brug så få sektioner som muligt (1-6) for at opnå et ETA på 20 mm^2 .
- Hvad angår prøver, hvor det ikke er muligt at opnå et ETA på 20 mm^2 med de maksimale seks sektioner, skal der udføres test ved brug af seks sektioner.
- Der skal udføres proteinase K-fordøjelse i 1 time for CNB-prøver.
- For CNB-prøvers vedkommende skal oprenset genomisk DNA elueres i 70 μl Buffer ATE (inkluderet i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) efter 10 minutters inkubation på kolonnen.

DNA-ekstrahering fra plasmaprøver

DNA skal ekstraheres med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (katalognr. 61504) i henhold til de nedenfor beskrevne forskrifter for oprensning af ctDNA fra plasmaprøver.

Bemærk: *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er udviklet ved hjælp af DNA ekstraheret med QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit. Der må ikke anvendes andre DNA-ekstraheringsprodukter.

DNA-ekstraheringen skal udføres i henhold til instruktionerne vedrørende den klassiske protokol i *håndbogen til QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit* med følgende bemærkninger:

- Startvolumen af plasmaet er 2 ml.
- Hvis en volumen på 2 ml ikke er tilgængelig, skal volumen justeres til 2 ml ved hjælp af fosfat-bufret saltvand (phosphate buffered saline, PBS).
- Alle centrifugeringstrin udføres ved stuetemperatur (15–25°C).
- Sluk for vakuumpet mellem de enkelte trin for at sikre, at der anvendes et ensartet, jævnt vakuum under protokoltrinnene.
- Proteinase K-volumen skal være 250 µl.
- Det oprensede ctDNA skal elueres i 70 µl Buffer AVE (inkluderet i QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit).
- QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit må kun bruges manuelt.
- Sørg for at bruge ethanol af molekylærbiologisk kvalitet* til alle nødvendige trin.
- Opbevar det oprensede ctDNA ved -30 til -15 °C.

Bemærk: Alle analyser i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit genererer korte PCR-produkter. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit fungerer imidlertid ikke med meget fragmenteret DNA. Prøven er kun gyldig, hvis det ekstraherede DNA er inden for kontrol C_T-arbejdsområdet ($\geq 24,68$ og $\leq 31,68$).

* Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer, såsom metanol eller methylethylketon.

Påvisning af *PIK3CA*-mutationer

Denne protokol er til påvisning af *PIK3CA*-mutationer.

Vigtige anvisninger før start

- Der kan bedømmes op til 24 prøver over fire kørsler med den *PIK3CA*-reaktionsblanding, der er inkluderet i hvert kit. Det er optimalt at benytte fire kørsler med maksimalt seks prøver i hver. Mindre prøvebatchstørrelser betyder, at der kan testes færre prøver med hvert *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit*.
- Prøven skal testes ved brug af alle de reaktionsblandinger, der er inkluderet i *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit*.
- Det er ikke muligt at analysere blandede batches bestående af både vævs- og plasmaprøver i samme PCR-kørsel. PCR-batches skal bestå af enten vævsprøver eller plasmaprøver.
- *Taq*-DNA-polymerasen (rør med *Taq*) eller blandinger, der indeholder *Taq*-DNA-polymerase, må ikke vortexblandes, da dette kan inaktivere enzymet.
- Pipetter *Taq*-DNA-polymerasen ved forsigtigt at placere pipettens spids lige under væskens overflade, så spidsens yderside ikke dækkes af overskydende enzym.

Ting, der skal gøres før start

- Sørg for, at alle kørsler udføres med Rotor-Gene AssayManager v2.1, Gamma Plug-in og enten "*therascreen_PIK3CA_FFPE*" Assay Profile (vævsprøver) eller "*therascreen_PIK3CA_Plasma*" Assay Profile" (plasmaprøver). Sørg for, at den relevante software er installeret, inden Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet tages i brug, og følg de relevante instruktioner vedrørende kørselsstart og dataanalyse ("*Udførelse af en PIK3CA-mutationsanalysekørsel*" på side 36).

- Før hver brug skal alle reagenser, heriblandt *Taq*-DNA-polymerase (rør med *Taq*), og DNA-prøver optøs helt i mindst 1 time (og højst 4,5 timer) ved stuetemperatur (15-25 °C), blandes ved at vende dem 10 gange og centrifugeres kortvarigt for at samle alt indhold i bunden af røret.
- Sørg for, at PCR-isætningsblokken er dekontamineret korrekt (se "Almene forsigtighedsregler", side 20) og tør.

Procedure

1. Optø alle reaktionsblandinger, vand til ikke-skabelon-kontrollen, *Taq*-DNA-polymerase, positiv PIK3CA-kontrol og DNA-prøver ved stuetemperatur (15-25 °C) i mindst 1 time og højst 4,5 timer.
2. Bland alle reagenser grundigt efter 1 time ved at vende hvert rør 10 gange for at undgå lokaliserede saltkoncentrationer. Centrifuger alle reagenser kortvarigt for at samle alt indhold i bunden af røret.

Bemærk: *Taq*-DNA-polymerasen (rør med *Taq*) eller blandinger, der indeholder *Taq*-DNA-polymerase, må ikke vortexblandes, da dette kan inaktivere enzymet.

3. Mærk seks mikrocentrifugeringsrør (medfølger ikke) ifølge Tabel 4. Klargør tilstrækkelige mængder masterblanding (kontrol- og mutationsreaktionsblandinger) plus *Taq*-DNA-polymerase til DNA-prøverne, en positiv PIK3CA-kontrolreaktion og en ikke-skabelon-kontrolreaktion i henhold til de volumener, der er anført i Tabel 4.

Masterblandingerne indeholder alle de komponenter, der er nødvendige ved PCR, undtagen prøven.

Bemærk: Når masterblandingen klargøres, tilsættes det relevante rør først den nødvendige volumen af kontrol- eller mutationsreaktionsblandingen, og *Taq*-DNA-polymerasen tilsættes til sidst.

Tabel 4. Forberedelse af analysemasterblandinger

Reaktionsblandingsrør	Volumen af reaktionsblanding ($n^* + 3$)	Volumen af <i>Taq</i> -DNA-polymerase ($n^* + 3$)
Rør med RM 1	$19,83 \mu\text{l} \times (n + 3)$	$0,17 \mu\text{l} \times (n + 3)$
Rør med RM 2	$19,83 \mu\text{l} \times (n + 3)$	$0,17 \mu\text{l} \times (n + 3)$
Rør med RM 3	$19,83 \mu\text{l} \times (n + 3)$	$0,17 \mu\text{l} \times (n + 3)$
Rør med RM 4	$19,83 \mu\text{l} \times (n + 3)$	$0,17 \mu\text{l} \times (n + 3)$
Rør med RM 5	$19,83 \mu\text{l} \times (n + 3)$	$0,17 \mu\text{l} \times (n + 3)$
Rør med RM 6	$19,83 \mu\text{l} \times (n + 3)$	$0,17 \mu\text{l} \times (n + 3)$

* n = antal DNA-prøver. Værdien n må ikke være højere end seks, da seks er det maksimale antal prøver i en kørsel. Tre ekstra reaktioner er inkluderet for at sikre tilstrækkelig dækning til PCR-opsætningen og kontrollerne.

- Sæt hætte på røret med masterblandingen, og vend det 10 gange for at sikre grundig blanding af masterblandingen. Udfør kortvarig centrifugering for at sikre, at blandingen er i bunden af røret.
- Anbring det relevante antal PCR 4-båndrør (hvert bånd har fire rør, og PCR 4-båndrør medfølger ikke) i isætningsblokken i henhold til Tabel 4, så snart masterblandingerne er klar. Sæt ikke hætte på båndrørene. Tilsæt straks 20 μl af den relevante masterblanding til hvert PCR-båndrør.

Bemærk: Lad hætteerne blive i plastikbeholderen, til de skal bruges.

Bemærk: Se rørlayoutet til opsætning af reaktionsblandingerne i Tabel 4.

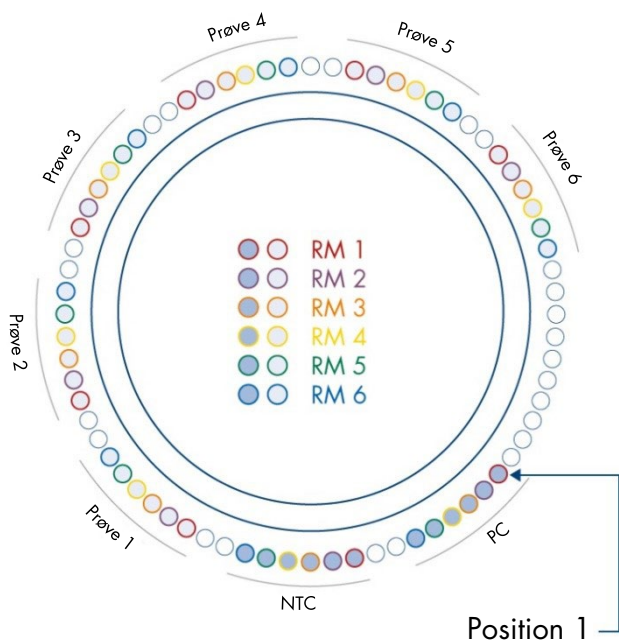
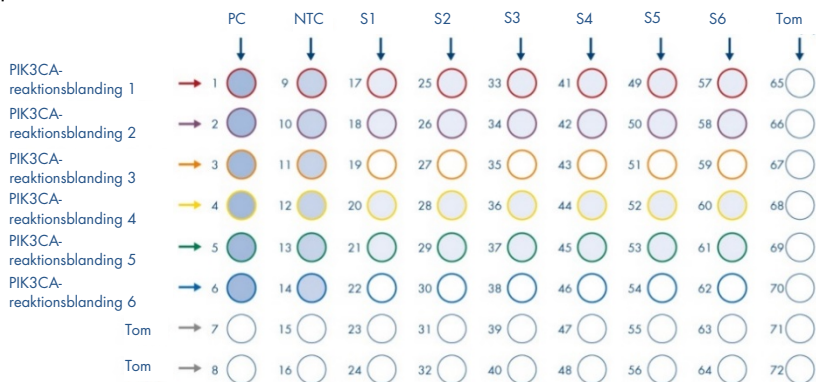
Tabel 5. Kørselslayout i isætningsblokken til påvisning af *PIK3CA*-mutationer

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

Bemærk: Hvert rør skal indeholde en samlet reaktionsvolumen på 25 µl (20 µl masterblanding, der er klargjort i henhold til Tabel 4, samt 5 µl NTC/prøve/PC). Tallene angiver positioner i isætningsblokken og indikerer den endelige rotorposition. E: Tom.

- Tilsæt straks 5 µl vand til ikke-skabelon-kontrol til NTC-rørene (rørposition 9-14), og sæt hætte på rørene.
- Tilsæt 5 µl af hver DNA-prøve til prøverørene, og sæt hætte på rørene umiddelbart efter tilsætning af hver prøve for at forhindre krydskontaminering mellem prøverne.
- Tilsæt 5 µl positiv *PIK3CA*-kontrol til PC-rørene (rørposition 1-6), og sæt hætte på rørene.
- Brug en sprittusch til at mærke hætteerne på de første rør i den laveste numeriske position i hvert PCR 4-båndrør (f.eks. positionerne 1, 5 og 9 osv.) for at angive, i hvilken retning rørene skal sættes i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentets 72-brønds rotor.
- Placer alle PCR 4-båndrør i de korrekte positioner i 72-brønds rotoren i henhold til kørselslayoutet (Tabel 5 og Figur 5). Vær ekstra omhyggelig med at sikre, at rørene sættes i de korrekte positioner i 72-brønds rotoren (rørpositionen i 72-brønds rotoren skal stemme overens med rørpositionen i isætningsblokken).

Bemærk: Der skal sættes et tomt rør med hætte på i alle ubenyttede positioner på rotoren. Dette sikrer, at Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentets termiske effektivitet opretholdes.



Figur 5. Plade- og rotoropsætning til et eksperiment med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. PC: Positiv kontrol. S: DNA-prøve. NTC: Ikke-skabelon-kontrol (vand).


FORSIGTIG

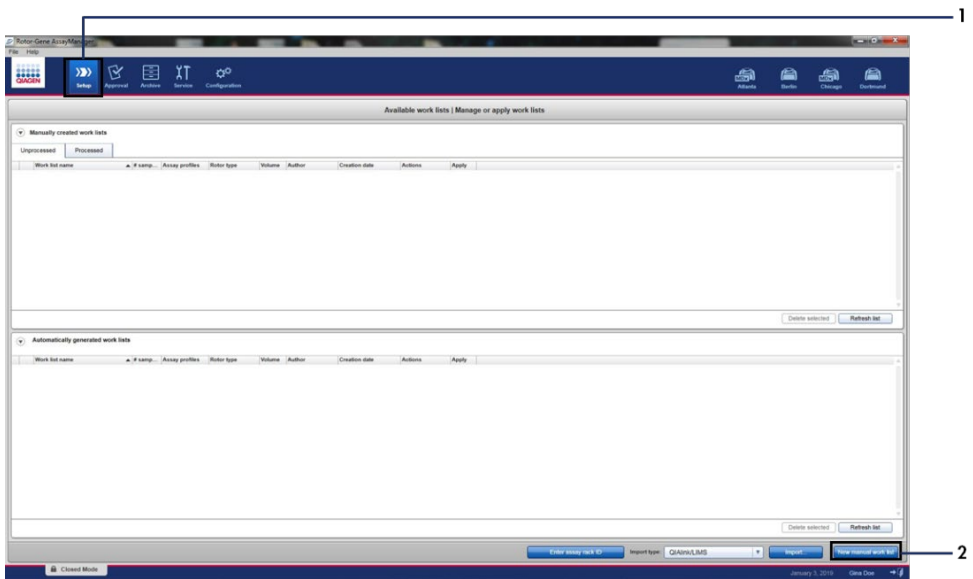


Rør skal sættes i rotoren som angivet i Figur 5, da det automatiske analysesæt i analyseprofilen er baseret på dette layout. Hvis der anvendes et andet layout, opnås der afvigende resultater.

11. Placer straks 72-brønds rotoren i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Kontrollér, at-låseringen (leveres sammen med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) er placeret oven på rotoren for at sikre rørene under kørslen, og at instrumentlåget er lukket.
12. Start kørslen ved at følge instruktionerne i næste afsnit, "Udførelse af en PIK3CA-mutationsanalysekørsel".


Udførelse af en PIK3CA-mutationsanalysekørsel

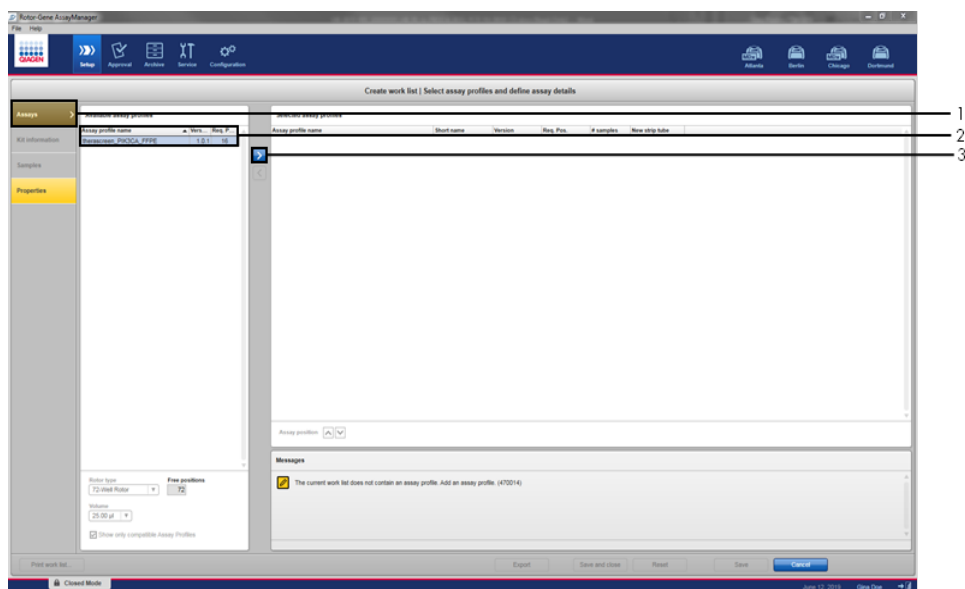
13. Dobbeltklik på ikonet for Rotor-Gene AssayManager v2.1 () på skrivebordet på den bærbare computer, der er tilsluttet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
14. Miljøet "Setup" (Opsætning) vises som standard. Klik på New manual worklist (Ny manuel arbejdsliste) for at oprette en ny arbejdsliste (Figur 6).



Figur 6. Opretelse af en ny manuel arbejdsliste. 1 = fanen "Setup" (Opsætning); 2 = "New manual work list" (Ny manuel arbejdsliste).

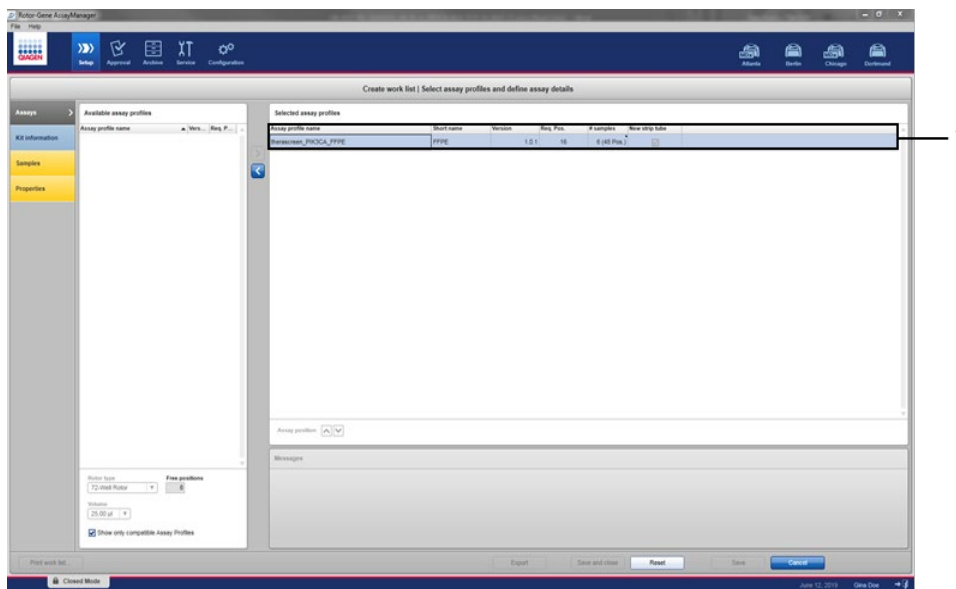
15. Vælg fanen "Assays" (Analyser) til venstre i hovedvinduet. Klik på *therascreen_PIK3CA_FFPE Assay Profile* (hvis der er tale om vævsprøver) eller *therascreen_PIK3CA_Plasma Assay Profile* (hvis der er tale om plasmaprøver) på listen over tilgængelige analyseprofiler, og klik på den blå pil for at vælge analyseprofilen. Peg på analyseprofilen for at se hele navnet, hvis det er forkortet (Figur 7).

<p>FORSIGTIG</p> 	<p>Kontrollér, at der er valgt korrekt analyseprofil for den aktuelle prøvetype.</p>
--	--



Figur 7. Oprettelse af en ny manuel arbejdsliste: Valg af analyseprofilnavn. 1 = fanen "Assays" (Analyser); 2 = tilgængelige analyseprofiler, når der er valgt "therascreen_PIK3CA_FFPE" eller "therascreen_PIK3CA_Plasma"; 3 = vælg analyseprofilen.

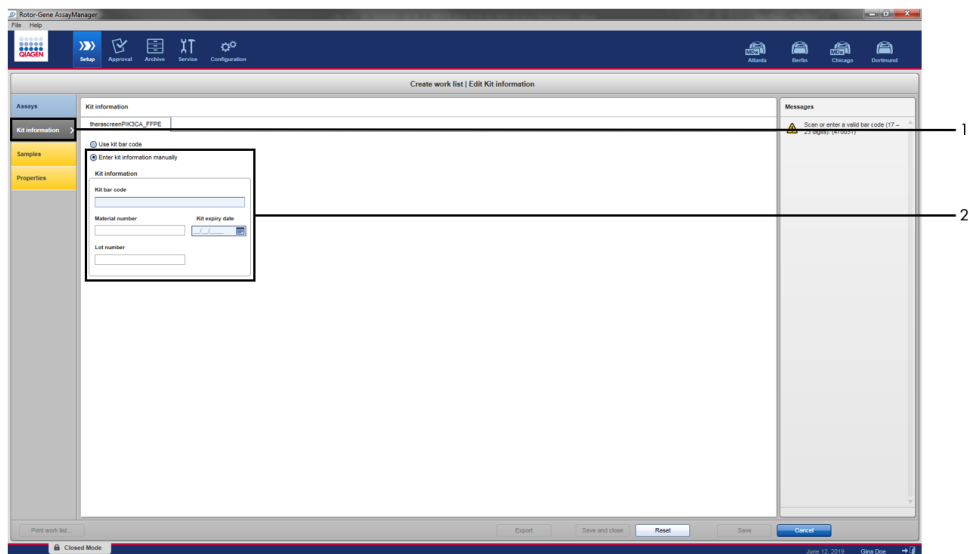
16. Indtast det antal testprøver, der skal testes (uden at medtage antallet af kørselskontroller), i vinduet "Selected assay profiles" (Valgte analyseprofiler) (Figur 8).



Figur 8. Hovedvinduet til oprettelse af arbejdslist. 1 = tilføj antallet af prøver.

17. Klik på fanen "Kit information" (Kitoplysninger). Vælg Enter kit information manually (Indtast kitoplysninger manuelt), og indtast følgende kitoplysninger (Figur 9):

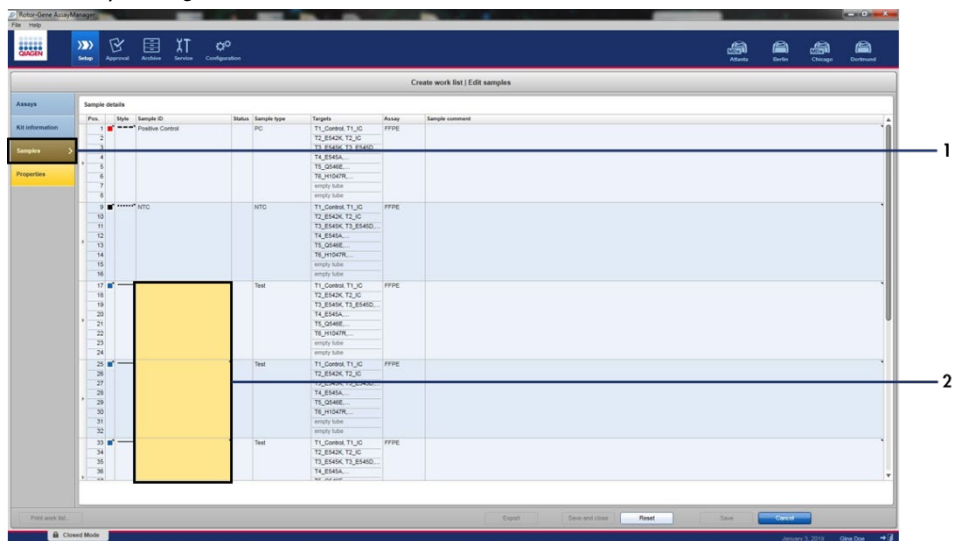
- Kit bar code (Kitstregkode)
- Material number (Materialenummer)
- Lot number (Lotnummer)
- Kit expiry date (Kitudløbsdato)



Figur 9. Hovedvinduet til oprettelse af arbejdslist. 1 = fanen "Kit information" (Kitoplysninger); 2 = indtast kitoplysningerne.

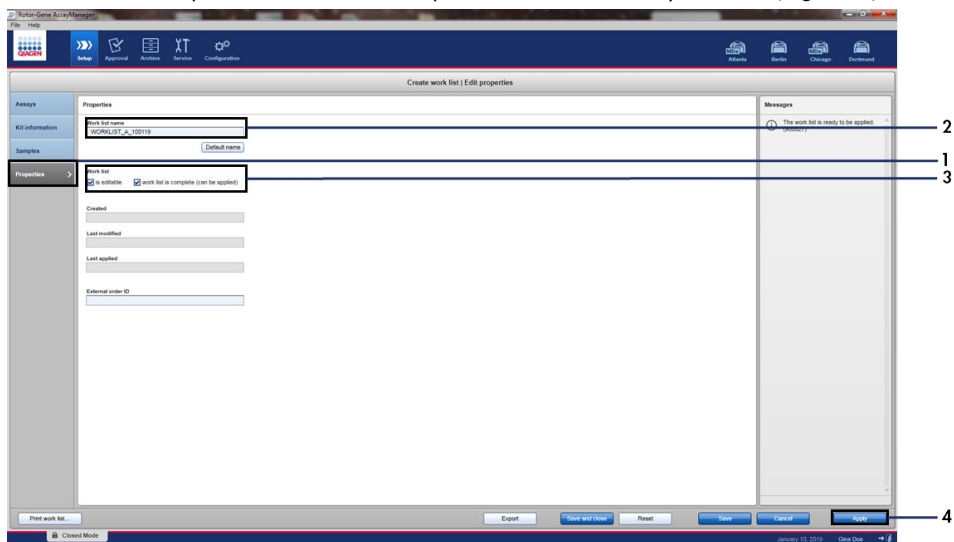
18. Klik på fanen "Samples" (Prøver) for at indtaste prøveoplysninger. Indtast prøvenavnene manuelt (Figur 10).

Bemærk: Sørg for at indtaste korrekte prøvenavne, inden Rotor-Gene AssayManager-kørslen startes.



Figur 10. Hovedvinduet til oprettelse af arbejdslist. 1 = fanen "Samples" (Prøver); 2 = Indtast prøvenavne.

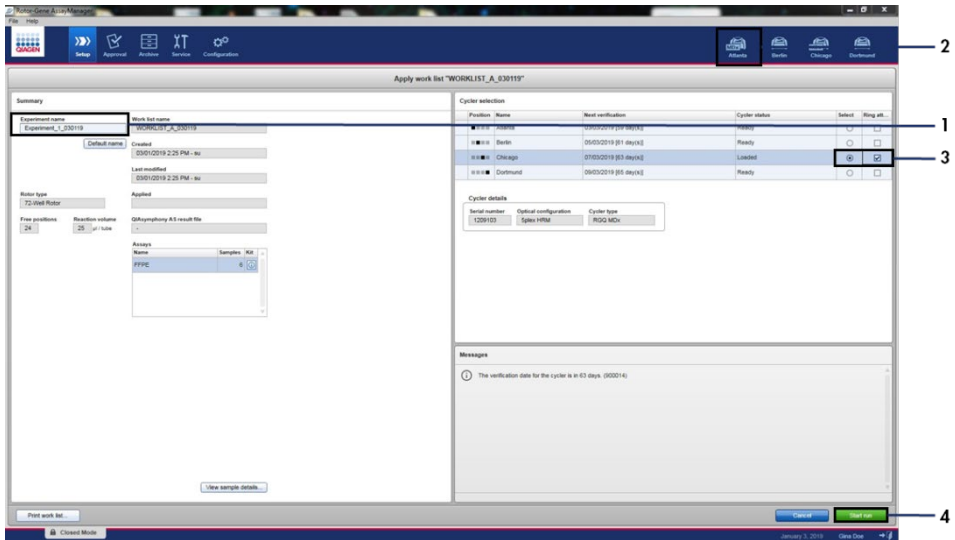
19. Klik på fanen "Properties" (Egenskaber), og indtast arbejdslistens navn. Kontrollér efter indtastning af arbejdslistens navn, at afkrydsningsfelterne "is editable" (kan redigeres) og "work list is complete" (arbejdslisten er færdig) er markeret. Klik på Apply (Anvend) nederst til højre for at anvende arbejdslisten. Der vises et nye vindue (Figur 11).



Figur 11. Hovedvinduet til oprettelse af arbejdslist. 1 = fanen "Properties" (Egenskaber); 2 = indtast arbejdslistens navn; 3 = vælg "is editable" (kan redigeres) og "work list is complete" (arbejdslisten er færdig); 4 = "Apply" (Anvend).

20. Indtast eksperimentnavnet i feltet Experiment name (Eksperimentnavn). Vælg en cyclus på listen over tilgængelige cyclere, og kontrollér, at afkrydsningsfeltet Ring attached (Ring fastgjort) er markeret (Figur 12).

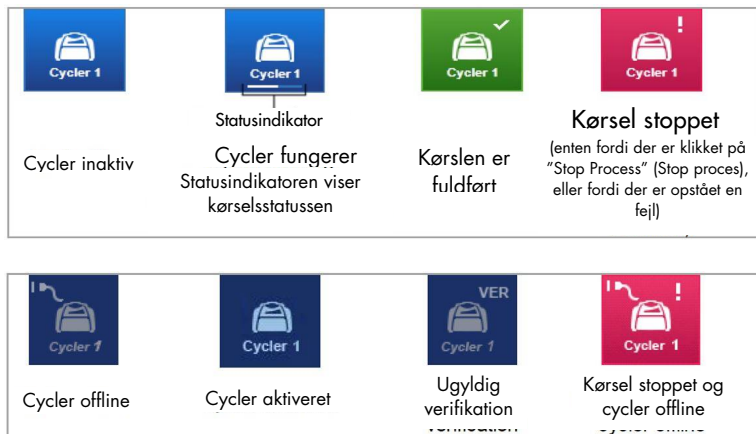
Klik på Start run (Start kørsel), når alle trin er fuldført. RGQ-ikonet øverst til venstre på skærbilledet bliver grønt som angivelse af, at kørslen er startet.



Figur 12. Anvendelse af arbejdsliste og kørselsstart. 1 = indtast eksperimentnavn; 2 = instrumentvalg; 3 = kontrollér, at "Ring attached" (Ring fastgjort) er valgt; 4 = start kørsel.

Bemærk: Ikonet "Cycler" skifter udseende afhængigt af kørselsstatus og -resultat. En udførlig beskrivelse af disse cycler-ikoner kan ses i *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application*.

Eksempler på cycler-ikoner er vist i Figur 13.

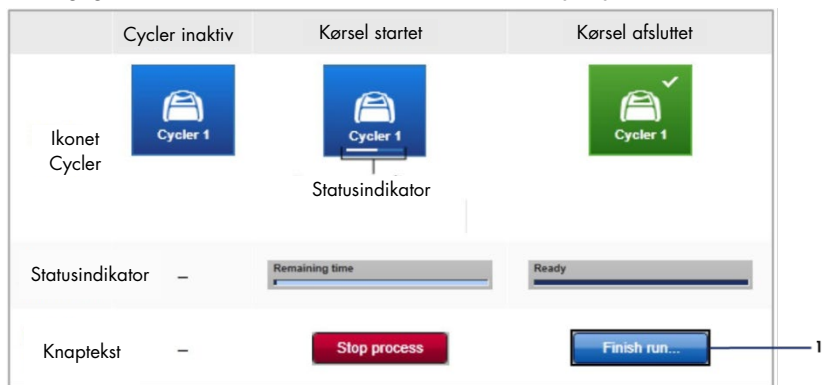


Figur 13. Cycler-ikoner, der kan blive vist.

21. Klik på Finish run (Afslut kørsel), når kørslen er fuldført. Dialogboksen "Release and go to approval" (Frigiv, og fortsæt til godkendelse) åbnes (Figur 14).

Bemærk: Under kørslen vises og opdateres amplifikationskurverne i realtid. Den resterende tid kan ses på en statusindikator nederst til venstre.

Vigtigt: Vinduet må ikke lukkes, mens kørslen er i gang.



Figur 14. Afslutning af en kørsel. 1 = "Finish run" (Afslut kørsel).

22. Klik på Release and go to approval (Frigiv, og fortsæt til godkendelse) for at åbne fanen "Approval" (Godkendelse), og frigiv Rotor-Gene Q-instrumentet (Figur 15). RGQ-ikonet øverst til højre på skærbilledet skifter farve fra grønt til blå som angivelse af, at instrumentet er klar til en ny kørsel. En kørsel skal frigives og godkendes, uanset om den er fuldført korrekt eller ej. En liste over mulige fejl og fejlkoder i Rotor-Gene AssayManager kan ses i *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application* og *brugervejledningen til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

✓ Finish run

Position	Name	Run status
■ ■ ■	Chicago	Run Successful

Experiment name
Experiment_1_030119

Errors during run

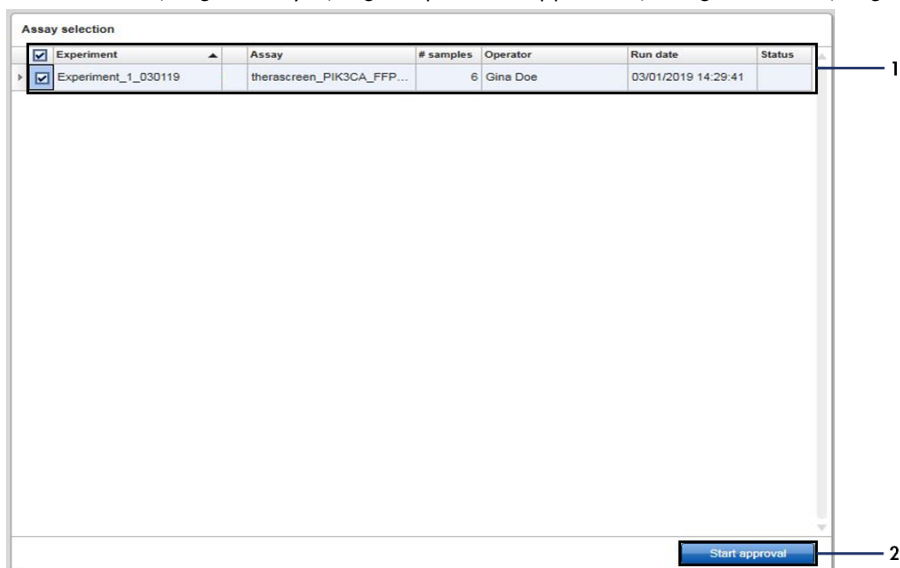
Comment

Password

Release Release and go to approval Cancel 1

Figur 15. Pop op-vinduet "Finish Run" (Afslut kørsel). 1 = "Release and go to approval" (Frigiv, og gå til godkendelse).

23. Vælg eksperimentet i den del i godkendelsesmiljøet, der hedder "Assay selection" (Valg af analyse), og klik på "Start approval" (Start godkendelse) (Figur 16).



Figur 16. Start af frigivelsesprocessen i miljøet "Approval" (Godkendelse). 1 = Analyse valgt til godkendelse, 2 = "Start approval" (Start godkendelse).

Oplysninger om "Raw data" (Rådata), "Processed data" (Behandlede data), "Experiment" (Eksperiment), "Assay" (Analyse) og "Audit trail" (Historikpost) kan findes i afsnittet "Plots and information (Plots og oplysninger) (1). Analyseresultater kan findes i afsnittet "Results" (Resultater) (2).

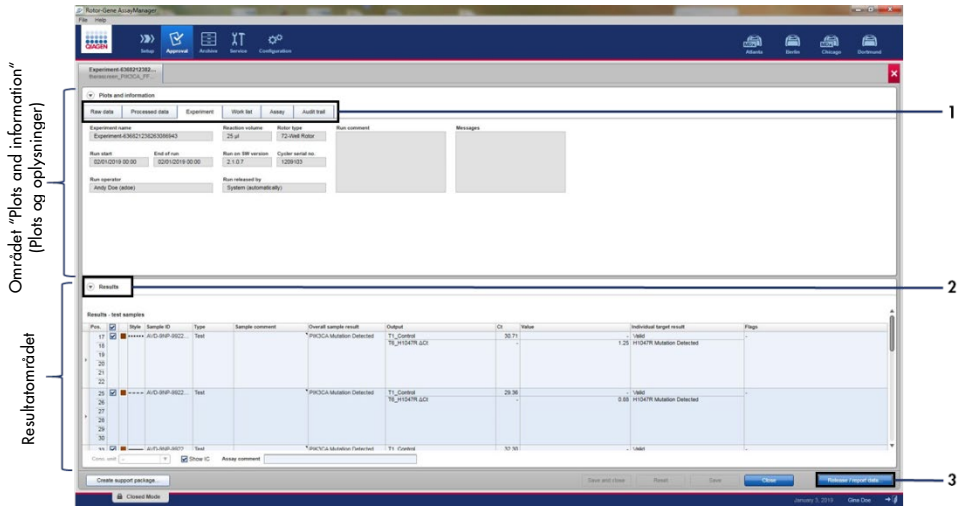
Hvis den positive kontrol og ikke-skabelon-kontrollen er inden for et acceptabelt område, vil kolonnen "Sample Status" (Prøvestatus) rapportere en gyldig status; i modsat fald rapporteres en ugyldig prøvestatus.

Hvis en af kørselskontrollerne mislykkes, bliver kørslen ugyldig. Alle prøver vil blive markeret som ASSAY_INVALID.

Se "Flag, der kan genereres af theascreen PIK3CA Assay Profile i Rotor-Gene AssayManager v2.1" (side 52) for at få instruktioner om, hvad der herefter skal gøres.

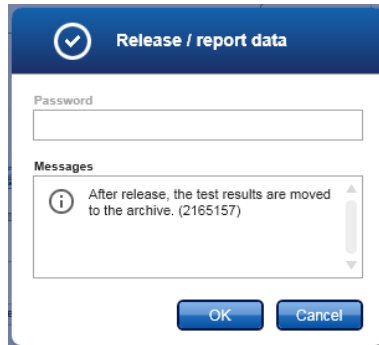
Bemærk: Analyseprofilen indeholder alle reglerne for automatisk analyse og prøveanalyse samt resultatfortolkning. Softwaren vurderer således automatisk gyldigheden eller ugyldigheden af prøver og kontroller.

24. Klik på Release/report data (Frigiv/rapportér data). Vinduet "Release/report data" (Frigiv/rapportér data) åbner (Figur 17).



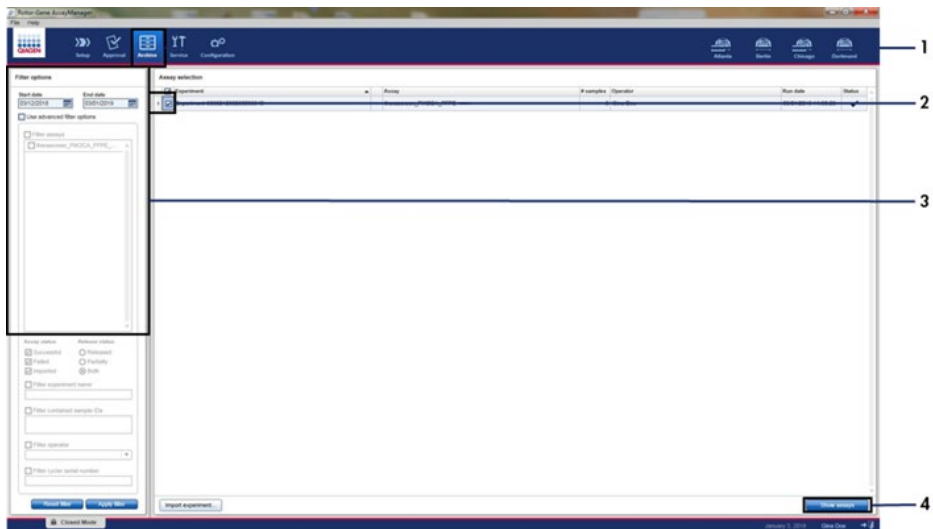
Figur 17. Eksempel på hovedvinduet med analyseresultater. 1 = Fanen "Experiment" (Eksperiment) i området "Plots and information" (Plots og oplysninger). 2 = Resultatområdet, 3 = "Release/report data" (Frigiv/rapportér data)

25. Klik på OK for at gemme eksperimentet i arkivet og oprette et LIMS-output og en kørselsrapport (Figur 18). Kørselsrapporter og LIMS-eksporter gemmes i standardrapportbiblioteket. Standardbiblioteket findes i "Default data export directories" (Standardbiblioteker til dataeksport) på fanen "Configuration" (Konfiguration).



Figur 18. Eksempel på vinduet "Release/report data" (Frigiv/rapportér data).

26. For at få vist et eksperiment, der er gemt i eksperimentarkivet, skal du klikke på Archive (Arkiv) og søge efter eksperimentet ved hjælp af søgekriterierne i afsnittet "Filter Options" (Filtreringsindstillinger). Klik på Apply filter (Anvend filter) for at søge. Vælg et eksperiment ved at markere afkrydsningsfeltet ud for det eksperiment, du vil have vist, og klik på Show assays (Vis analyser) (Figur 19).



Figur 19. Eksempel på hovedvinduet "Experiment Archive" (Eksperimentarkiv). 1 = Fanen "Archive" (Arkiv), 2 = Søgeindstillinger, 3 = Valg af eksperimentnavn, 4 = Fanen "Show assays" (Vis analyser).

Resultater

Analyse- og mutationsbestemmelser udføres automatisk af *therascreen* PIK3CA Assay Profile, når en kørsel er afsluttet. De følgende oplysninger forklarer, hvordan *therascreen* PIK3CA Assay Profile udfører analyse- og mutationsbestemmelserne.

Analyse

PCR-cyklussen, hvor fluorescensen fra en bestemt reaktion overskrider de foruddefinerede tærskelværdier, der gives af *therascreen* PIK3CA Assay Profile, defineres som C_T -værdien. C_T -værdier angiver kvantiteten af bestemt input-DNA. Lave C_T -værdier angiver højere input-DNA-niveauer, og høje C_T -værdier angiver lavere input-DNA-værdier. Reaktionen, hvor fluorescensen overskrider tærskelværdien ved eller før denne C_T -værdi, klassificeres som positive.

Ved at anvende kontrolreaktionen til at vurdere DNA-prøven, er det muligt ud fra de C_T -værdier, der opnås, at bestemme, om prøverne indeholder DNA-niveauer, der er egnet til analyse, og hvilke prøver, der kræver fortynding forud før analyse.

Vurdering af prøverne ved hjælp af forskellige mutationsreaktionsblandinger med henblik på at bestemme deres respektive C_T -værdier giver *therascreen* PIK3CA Assay Profile mulighed for at udføre en beregning for at bestemme ΔC_T -værdien af prøven ved hjælp af følgende ligning:

$$\Delta C_T = [\text{mutationsanalyse } C_T\text{-værdi}] - [\text{kontrolanalyse } C_T\text{-værdi}]$$

Baseret på fastlagte analytiske C_T - og ΔC_T -værdier bestemmer *therascreen* PIK3CA Assay Profile mutationsstatussen for DNA-prøverne, og det rapporteres, hvis en prøve indeholder en eller flere mutationer.

Kørselskontrollerne (PC, NTC og IC) vurderes for at sikre, at der opnås acceptable C_T -værdier, og at reaktionerne er fuldført korrekt.

Hvis prøvekontrollens C_T -værdi er lavere end det acceptable område, betyder det, at DNA-inputtet er for højt, og at prøven skal fortyndes som beskrevet i "Flag, der kan genereres af theascreen *PIK3CA* Assay Profile i Rotor-Gene AssayManager v2.1", side 52.

Alle disse vurderinger udføres automatisk, og der er ikke behov for manuel fortolkning. Systemet kontrollerer automatisk kørselsgyldigheds- og prøvegyldighedskriterierne, og mutationsstatus rapporteres ikke i tilfælde af en ugyldig prøve eller kørsel.

Rotor-Gene AssayManager-softwareversion 2.1 beregner resultaterne af hvert biomarkørmål ved at kombinere alle relevante analyseresultater i henhold til kerneanalysealgoritmer som f.eks. normalisering og prøve- og analyseregler, som er defineret i den tilsvarende analyseprofil.

De følgende resultater kan tildeles til en individuelt prøve:

- *PIK3CA* Mutation Detected (*PIK3CA*-mutation påvist)
- "No Mutation Detected" (ingen mutation påvist)
- INVALID (UGYLDIGT): Hvis prøven tildeles et eller flere flag, der er defineret til at fastsætte målresultatet til "INVALID" (UGYLDIGT) under analysen med Rotor-Gene AssayManager-softwareversion 2.1.

Bemærk: Hvis der opstod en fejl under kørslen, skal prøverne i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM kasseres og på ikke testes igen.

Flag, der kan genereres af *therascreen* PIK3CA Assay Profile i Rotor-Gene AssayManager v2.1

Alle mulige flag svarende til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in er angivet i *brugervejledning til Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in*.

I Tabel 6 vises de mulige flag, der kan genereres af *therascreen* PIK3CA Assay Profiles, deres betydning og de handlinger, der skal foretages.

Flagnavnene konstrueres til at give oplysninger om det påvirkede komponent i kittet, prøven eller den påvirkede kontrol og fejltilstanden.

For eksempel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = den positive kontrols (PC) kontrolanalyse (CTRL_ASSAY) mislykkedes (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = ikke-skabelon-kontrollens (NTC) interne kontrol (INT_CTRL) mislykkedes (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = prøvens (SAMPLE) kontrolanalyse (CTRL) har en høj koncentration (HIGH_CONC)

Tabel 6. Softwareflag, der anvendes af PIK3CA-analyseprofilerne

Flag	Betydning	Handling
IC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ugyldig kørsel. IC-værdien er over specifikationsområdet i PC- eller NTC-rør. Ugyldig prøve. IC-værdien i prøven er over specifikationsområdet.	Gentag kørslen. Udfør én ny test af prøven. Hvis prøvens IC C_T -værdi stadig er over det acceptable område efter den nye test, skal prøven re-ekstraheres. Hvis prøvens IC-værdi stadig er over det acceptable område efter re-ekstrahering og to testkørsler, skal prøven rapporteres som ubestemmelig.
(PC)_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ugyldig kørsel. PC-værdien er over specifikationsområdet.	Gentag kørslen.
(PC)_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Ugyldig kørsel. PC-værdien er under specifikationsområdet.	Gentag kørslen.
IC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	Ugyldig kørsel. IC-værdien er under specifikationsområdet i PC- eller NTC-rør. Ugyldig prøve. IC-værdien i prøven er under specifikationsområdet.	Gentag kørslen. Udfør én ny test af prøven. Hvis prøvens IC C_T -værdi stadig er under det acceptable område efter den nye test, skal prøven re-ekstraheres. Hvis prøvens IC-værdi stadig er under det acceptable område efter re-ekstrahering og to testkørsler, skal prøven rapporteres som ubestemmelig.
UNEXPECTED_CT_VALUE	Ugyldig kørsel. Der er registreret en ugyldig C_T -værdi i NTC.	Gentag kørslen.
NO_CT_VALUE	Ugyldig PC- eller IC-værdi. Der er ingen C_T -værdi for PC i PC-rør eller for IC i PC- og NTC-rør. Ugyldig prøve. Der er ingen C_T -værdi i prøven.	Gentag kørslen. Udfør én ny test af prøven. Hvis der stadig ikke er nogen IC C_T -værdi i prøven efter den nye test, skal prøven re-ekstraheres. Hvis der stadig ikke er nogen IC-værdi i prøven efter re-ekstrahering og to testkørsler, skal prøven rapporteres som ubestemmelig.

Tabel fortsættes på næste side

Tabel 6. Softwareflag, der anvendes af PIK3CA-analyseprofilerne (fortsat)

Flag	Betydning	Handling
DNA_INPUT_TOO_HIGH	Ugyldig prøve. Prøvekontrollens C_T -værdi er under kontrollens arbejdsområde.	Prøven er for koncentreret og skal fortyndes. Følg instruktionerne under "Kontrollens C_T -værdi", side 54.
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	Ugyldig prøve. Prøvekontrollens C_T -værdi er over kontrollens arbejdsområde.	Udfør én ny test af prøven. Hvis kontrollens C_T -værdi stadig er over kontrollens arbejdsområde efter den nye test, skal prøven re-ekstraheres. Hvis kontrollens C_T -værdi stadig er over kontrollens arbejdsområde efter re-ekstrahering og to testkørsler, skal prøven rapporteres som ubestemmelig.
T1_CONTROL_NO_CT_VALUE	Ugyldig prøve. Der er ingen C_T -værdi for prøven i prøvekontrolrørene.	Udfør én ny test af prøven. Hvis prøven ikke har nogen C_T -værdi efter den nye test, skal prøven re-ekstraheres. Hvis prøven stadig ikke har nogen C_T -værdi efter re-ekstrahering og to testkørsler, skal prøven rapporteres som ubestemmelig.

Bemærk: Hvis en prøve, der er blevet testet igen, er ugyldig af en anden årsag efter gentagelse, klassificeres dette stadig som en ny gentagelse, og prøven skal i så fald re-ekstraheres.

Kontrollens C_T -værdi

Der er to mulige flag for ugyldig prøve på grund af kontrollens C_T -værdi:

- **DNA_INPUT_TOO_HIGH:** Prøven er for koncentreret og overbelaster mutationsanalyserne. Prøven skal fortyndes, så der kan opnås et gyldigt prøveresultat. Prøver skal fortyndes med det udgangspunkt, at C_T stiger med 1, når der fortyndes 1:1. Prøver skal fortyndes med det vand, der medfølger i kittet (vand til fortynding [Dil.]).

Sådan beregnes den nødvendige kontrol-C_T-forskydning (X_R), og sådan anslås den nødvendige fortyndingsfaktor (Tabel 7):

$$X_R = 25 - X \text{ (FFPE-prøve)}$$

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

hvor 25 (for FFPE-prøve) eller 27 (for plasmaprøve) tildeles kontrol-C_T-målværdien for den fortyndede prøve, og X er en faktisk kontrol-C_T-værdi for den prøve, der skal fortyndes.

Hvis X ikke er et heltal, skal der rundes op til næste heltal (eksempelvis skal 2,1 rundes op til 3,0). Denne værdi er X_R. Den nødvendige fortyndingsfaktor kan ses i Tabel 7.

Tabel 7. Beregning af fortyndingsfaktor

X _R	Fortyndingsfaktor	Prøveforhold	Fortyndingsforhold
1	2 gange	1	1
2	4 gange	1	3
3	8 gange	1	7
4	16 gange	1	15
5	32 gange	1	31
6	64 gange	1	63
7*	128 gange	1	127
8*	256 gange	1	255

* Kun plasmaprøve.

- ABOVE_ACCEPTED_RANGE og T1_CONTROL_NO_CT_VALUE: Kvantiteten af DNA er utilstrækkelig til mutationsanalyse. Test prøven igen, hvis der er tilstrækkeligt DNA-eluat (> 30 µl). Hvis der stadig ikke er en tilstrækkelig mængde DNA efter den nye test, skal der foretages re-ekstrahering fra nye FFPE-sektioner eller en ny plasmaprøve. Hvis dette ikke er muligt, skal prøven rapporteres som ubestemmelig.

Ydelseskarakteristik: Vævsprøver

Analytisk ydeevne: Vævsprøver

De specifikke ydelseskarakteristika for *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev bestemt i undersøgelser med anvendelse af FFPE-vævsprøver indsamlet fra brystcancerpatienter og 12 humane FFPE-cellelinjeprøver (FFPE-cellelinjeprøver), der indeholdt kendte *PIK3CA*-mutationer, som analysen påviser, samt én *PIK3CA*-vildtype-prøve (dvs. ingen mutationer hævdet påvist med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i exon 7, 9 og 20).

Tomgrænse (LoB): Vævsprøver

I CLSI-retningslinje EP17-A2 defineres LoB som "det højeste måleresultat, der sandsynligvis vil blive observeret (med en angivet sandsynlighed) for en tom prøve. For *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er dette datapunktet, der svarer til den øverste 95 %-percentil i de mutationsnegative prøver. LoB blev bestemt ved analyse af 56 individuelle kliniske vildtype-FFPE-prøver (30 RES-prøver og 26 CNB-prøver) testet in duplo pr. prøve for hvert af tre lot *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, hvilket genererede 336 datapunkter i alt. LoB-værdierne for hver af de mutationsanalyser (med hensyn til ΔC_T), der påvises af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, blev verificeret til at være over de ΔC_T -grænseværdier, der blev bestemt for hver af analyserne, og er sammenfattet nedenfor sammen med de opnåede falsk positiv-bestemmelsesrater.

Tabel 8. Oversigt over LoB-resultater

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

Påvisningsgrænse (LoD): Vævsprøver

Der blev udført en undersøgelse for at bestemme LoD for hver af de 11 *PIK3CA*-mutationer. LoD blev defineret som den laveste mængde mutant-DNA på en baggrund af vildtype-DNA, hvor en mutationsprøve giver positive resultater i 95 % af testresultaterne (C_{95}). LoD'erne for de 11 *PIK3CA*-mutationsanalyser i *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit er rapporteret som MAF. For at bestemme LoD for hver mutation blev der klargjort kliniske FFPE-brystcancerprøver eller FFPE-cellelinje-DNA med forskellige procentvise mutationer ved lavt DNA-input med seriel fortynding i en klinisk FFPE-vildtypebaggrund. For hver *PIK3CA*-mutation blev procentdelen af korrekte bestemmelser vurderet på forskellige fortyndingsniveauer ved brug af af tre forskellige lot af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit med 24 replikater testet pr. kitlog pr. fem til seks MAF-niveauer. LoD for hver analyse blev beregnet med en probitmetode (Tabel 9). Den endelige LoD-værdi for hver mutation blev bestemt som den højeste værdi (med hensyn til MAF) for alle lot af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. For at verificere LoD blev mutationsprøver ved den bestemte LoD testet, og den positive testrate blev verificeret i undersøgelsen af repeterbarhed og reproducerbarhed.

Tabel 9. LoD for plasmaprøver fastslået ved brug af kliniske plasmaprøver med lavt DNA-input udvundet af kliniske FFPE-prøver og FFPE-cellelinjeprøver

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

MAF: Hyppighed af mutant allel.

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

[†] LoD-værdier blev fastlagt ved hjælp af DNA fra cellelinjeprøver.

[‡] LoD-værdier blev fastlagt ved hjælp af DNA fra kliniske prøver.

Inputområde for genomisk DNA: Vævsprøver

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit anvender ikke en specifik koncentration af DNA bestemt ved spektrofotometri. DNA-input er baseret på kontrolreaktionens C_T -resultat, som bruges til at indikere, at der er tilstrækkeligt amplificerbart DNA i prøven. Kontrollens C_T -arbejdsområde blev fastslået ved brug af i alt 20 kliniske FFPE-vildtypeprøver, hvilket genererede 107 datapunkter. Kontrollens C_T -arbejdsområde blev indstillet ved brug af beregnede toleranceintervaller. Kontrolreaktionens C_T -område blev fastlagt til 23,23 til 33,38 C_T .

ΔC_T -grænseværdier: Vævsprøver

Analysens grænseværdi er en specifik ΔC_T -værdi, der bruges til at bestemme, om en prøve klassificeres som positiv eller negativ for en *PIK3CA*-mutation. Prøver, der genererer ΔC_T -værdier på eller under grænseværdien, klassificeres som *PIK3CA*-mutationspositive (dvs. *PIK3CA*-mutation påvist), og genererede ΔC_T -værdier over grænseværdien klassificeres som *PIK3CA*-mutationsnegative (dvs. ingen mutation påvist). En blanding af cellelinjeprov, kliniske prøver og præekstraheret cellelinje-DNA blev anvendt til at bestemme grænseværdierne for hver mutation. Grænseværdierne blev valgt med hensyn til de følgende parametre: brøkdelen af falsk positive, brøkdelen af falsk negative og analysefølsomhed.

Grænseværdien for hver analyse i *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit er vist i Tabel 10.

Tabel 10. Grænseværdier for hver mutationsanalyse ved test af DNA fra vævsprøver

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

Effekten af DNA-input på ΔC_T -værdier (linearitet): Vævsprøver

DNA-inputniveauet defineres som den samlede kvantitet af amplificerbart DNA i en prøve som bestemt af C_T -værdierne fra *PIK3CA*-kontrolreaktionen. For at vise, at ydeevnen af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit er konsistent i hele kontrolreaktionens C_T -område (23,23 til 33,38), blev en seriel fortynding med 9 niveauer med varierende DNA-inputniveauer, hvor de øvre og nedre niveauer lå uden for kontrolreaktionens C_T -arbejdsområde (23,23 til 33,38 C_T), evalueret med mutationspositive prøver. Der blev anvendt tre forskellige prøvetyper i denne undersøgelse: kliniske FFPE-resektionsprøver, FFPE-cellelinjeprøver og gDNA præekstraheret fra cellelinjer. MAF'erne blev holdt konstante, mens DNA-input blev varieret. C_T -målværdierne for fortyndingsniveau 1 og 9, for hver mutation, var henholdsvis cirka 23,00 og 33,50. Begge værdier skulle helst ligge uden for kontrolreaktionens C_T -område.

Evalueringen blev udført med brug af ét lot af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit med tre replikater testet pr. DNA-niveau. Dataene blev analyseret under anvendelse af regressionsanalyse for at bestemme det lineære interval. For at analysen kan bestemmes som lineær i hele DNA-inputområdet, må der ikke være nogen ændring i hele områdets ΔC_T , dvs. der er ingen statistisk signifikant lineær, kvadratisk eller kubisk effekt. Samlet set stemte de ΔC_T -værdier, der blev målt ved forskellige samlede DNA-inputniveauer, overens for hele arbejdsområdet i *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit med hensyn til mutation E542K, E545D, E545G, E545A, H1047Y, Q546E, C420R og H1047R, dvs. disse analyser viste ingen statistisk signifikant p-værdi ($p > 0,05$) for de lineære, kvadratiske og kubiske virkninger, der blev anvendt for alle de testede modeller. E545K-, Q546R- og H1047L-analyserne er ikke lineære for ΔC_T i det samlede testede DNA-inputområde. Der blev observeret et lineært område for E545K-analysen mellem C_T 24,08 og 31,02. Der blev observeret et lineært område for Q546R-analysen mellem C_T 24,28 og 32,69. Der blev observeret et lineært område for H1047L-analysen mellem C_T 25,74 og 31,61. I en undersøgelse blev fastslået, at de ikke-lineære virkninger ikke havde nogen indflydelse på ydeevnen af E545K- og H1047L-analyserne. Imidlertid blev der fastslået en effekt på Q546R-analysens ydeevne. Prøver ved LoD kan kaldes falsk negative, når DNA-inputtet er højt (omtrentlig Control C_T 23); men sandsynligheden for at dette forekommer, er imidlertid ekstremt lav, nemlig ca. 0,0052 %.

Analysens specificitet (krydsreaktivitet/specificitet): Vævsprøver

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit består af seks separate reaktionsblandinger til: en enkelt kontrolreaktion, der påviser et område i exon 15 af *PIK3CA*-genet, og 11 mutationsanalyser, der påviser *PIK3CA*-mutationer. Der er ingen reaktion, som specifikt måler *PIK3CA*-vildtypesekvensen ved exon 7, 9 eller 20. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultatet "No Mutation Detected" (Ingen mutation påvist) udledes ved fraværet af positive mutationsresultater.

For at vurdere, hvorvidt der er taget korrekt højde for krydsreaktivitet mellem mutationer, der påvises af analysen, i indstillingen af de analytiske grænseværdier, blev kliniske mutant-positive prøver og cellelinjeprøver testet in duplo ved hjælp af tre lot af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ved lavt DNA-input og lav MAF% og højt DNA-input og høj MAF% (hvilket genererede i alt 240 datapunkter). I denne undersøgelse var der ét tilfælde af krydsreaktivitet mellem E545D og H1047R og ét tilfælde mellem C420R og H1047R. Der var også fire tilfælde af mutant uspecifik forstærkning mellem den høje MAF-prøve E545A og H1047L. Samlet set viste 6/240 datapunkter mutant uspecifik forstærkning. De seks datapunkter, der viste mutant uspecifik forstærkning, var sporadiske og ikke i overensstemmelse med andre replikater fra den samme prøve. Disse resultater blev derfor ikke betragtet som et resultat af krydsreaktivitet. Dog blev der observeret PCR-krydsreaktivitet mellem H1047L og H1047R. Denne krydsreaktivitet er ensrettet (dvs. hvis der ses en dobbelt H1047R- og H1047L-prøve, rapporteres dette kun som "H1047R Mutation Detected" (H1047R-mutation påvist)). Denne regel er indarbejdet i den automatiserede algoritme "*therascreen*_PIK3CA_FFPE" Assay Profile.

Interferens: Vævsprøver

Virkingen af nekrotisk væv

For at evaluere den potentielle interferens af indhold af nekrotisk væv i FFPE-brystcancerprøver på ydeevnen af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, blev kliniske FFPE-prøver fra SOLAR-1 med både *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultater og NGS (next generation sequencing)-resultater analyseret. Der blev evalueret i alt 180 mutant-negative *PIK3CA*-prøver med NGS og 199 mutant-positive *PIK3CA*-prøver ved NGS, heriblandt CNB- og RES-prøver. Procentdel med nekrose, identificeret af en patolog, varierede fra 0 til 10% for mutant-negative og 0 til 20% for mutant-positive prøver.

For både mutant-positive og mutant-negative FFPE-prøver havde 20 prøver *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultater, der ikke stemte overens med de forventede NGS-resultater. Disse resultater var fra 17 mutant-negative og to mutant-positive prøver med mindre end 5% nekrotisk indhold og en mutant-negativ prøve med mindre end 10% nekrotisk indhold; det er derfor usandsynligt, at nekrose var årsagen til de afvigende resultater. Resultaterne understøtter brugen af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit med FFPE-brystcancerprøver med indhold af nekrotisk væv op til 20%.

Indvirkninger af hæmoglobin og eksogene stoffer

Effekten af potentielle interfererende stoffer, der blev introduceret fra FFPE-ekstraktionssættet (et eksogent stof) eller fra selve prøven (hæmoglobin), på analysens ydeevne, blev målt ved sammenligning af ΔC_T mellem interferenttilsatte og kontroltilsatte ekstrakter af hver mutant og sammenligning af de korrekte bestemmelser for vildtype-DNA-prøver.

De endogene stoffer, der var til stede i den DNA-ekstraheringsproces, der blev testet, var:

- Paraffinvoks
- Xylen
- Ethanol

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

Prøver, der skulle have tilsat eksogene interfererende stoffer, blev først normaliseret til C_T 30,00 og derefter fortyndet med vildtype (ligeledes normaliseret til C_T 30,00) for at give det forventede ΔC_T ved en MAF, der repræsenterede $3 \times \text{LoD}$. Prøver tilsat hæmoglobin (endogent interfererende stof) under ekstraktionsprocessen blev ikke normaliseret til C_T 30,00 eller fortyndet til $3 \times \text{LoD}$ før mutationsvurderingen, men anvendt umiddelbart efter ekstraktion. Dette var for at undgå at fjerne enhver variabilitet, der måtte være fremkaldt af det interfererende stof.

Undersøgelsen krævede fremstilling af et testprøvesæt og et tom-prøvesæt (Buffer ATE for eksogene stoffer og vand for hæmoglobin). Testprøvesættet indbefattede alle mutant- og vildtypeprøver tilsat et interfererende stof. Tom-prøvesættet indbefattede mutant- og vildtypeprøver tilsat det relevante kontrolstof. Prøver, der blev testet med hæmoglobin, blev tilsat under ekstraktionsprocessen for at afspejle, hvad der ville blive introduceret via FFPE-prøven. Testkoncentrationen af hæmoglobin og det anslåede væsvolumen, der blev anvendt i ekstraktionsprocessen, var baseret på CLSI-retningslinjer (CLSI EP7-A2, Appendix D (Tillæg D), 2005, Interference Testing in Clinical Chemistry (Interferenstestning i klinisk kemi); Approved Guideline (Godkendt retningslinje)). Den anbefalede testkoncentration af hæmoglobin, der er angivet i EP07-A, tillæg D, 2005, er 2 mg/ml. Prøver, der blev testet med potentielle eksogene interfererende stoffer, fik stofferne tilsat efter normalisering til C_T 30,00 og fortynding til $3 \times \text{LoD}$ i en koncentration, der repræsenterer det højeste (værste tilfælde) gennemførlige niveau af det interfererende stofoverførsel til en prøve ($10 \times$ koncentration). I alt seks replikater af hver kombination af prøve/interfererende stof blev testet med ét lot af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Alle bestemmelser af mutation i både mutant- og vildtypeprøver var som forventet. Hvor der blev observeret en markant forskel mellem prøverne

med tilsat stof og kontrolprøverne, var dette inden for acceptabel laboratorienøjagtighed for analysen og var derfor inden for analysens indbyggede variabilitet. Resultaterne viste, at disse stoffer ikke interfererede med resultatbestemmelsen med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Lottenes indbyrdes udskiftelighed: Vævsprøver

therascreen PIK3CA RGQ PCR System anvender QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit til isolering af DNA og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit til forstærkning af DNA og påvisning af *PIK3CA*-mutationsstatus. Lot til lot-reproducerbarhed og blev vist ved hjælp af tre lot af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit og tre lot af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Den samlede procentdel af korrekte bestemmelser for alle lot for alle mutationspositive prøver og vildtypeprøver var 96,8% (363/375).

Prøvehåndtering: Vævsprøver

Reproducerbarheden i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit blev undersøgt ved hjælp af sektioner fra tre FFPE-prøveblokke; fire kliniske *PIK3CA*-mutantprøver fra brystcancerpatienter, seks *PIK3CA*-mutantcellinjeksprøver og én klinisk vildtypeprøve fra brystcancerpatient. For hver prøve blev der udført ekstraktioner in triplo af to operatører på tre centre, hvilket gav i alt 18 datapunkter pr. prøve. På hvert center blev testningen udført ved hjælp af ét lot af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit- og ét lot af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-reagenser. Alle gyldige mutant- og vildtypeprøveresultater gav det forventede samlede mutationsstatusresultat (korrekt bestemmelse = 100 %, 18/18 for hver prøve). Samlet set for alle specifikke *PIK3CA*-mutationsbestemmelser var andelen af korrekte bestemmelser 97,92 %, hvilket understøtter reproducerbarheden og repeterbarheden for *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i det præanalytiske trin med DNA-isolering.

Repeterbarhed og reproducerbarhed: Vævsprøver

Præcisionen og reproducerbarheden i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev undersøgt ved test af DNA ekstraheret fra kliniske FFPE-brystcancerprøver for *PIK3CA*-mutationerne E542K, E545G, E545K, H1047L, H1047R og Q546R og FFPE-cellelinjeprøver for *PIK3CA*-mutationerne C420R, E545A, E545D, H1047Y, Q546E og Q546R. Kliniske FFPE-brystprøver af vildtypen blev også inkluderet i undersøgelsen (Tabel 11).

For at vise repeterbarheden blev prøver ved to mutationsniveauer (LoD og 3x LoD) testet in duplo med to kørsler pr. dag af tre operatører på 20 ikke-sammenhængende dage, hvilket resulterede i 120 datapunkter på ét center (beliggende i Storbritannien) med undtagelse af prøver ved LoD med E545A- og Q546R *PIK3CA*-mutationer. Prøver med E545A- og Q546R-mutationer blev evalueret i seks dage på ét undersøgelsessted af tre operatører med to kørsler og fire replikater og i alt 144 målinger for at vise repeterbarheden. Af hensyn til reproducerbarheden blev der udført to kørsler pr. dag pr. operatør (tre operatører pr. center) på yderligere to undersøgelsessteder (begge i USA) over 10 dage for at opnå yderligere 60 datapunkter for hvert ekstra undersøgelsessted med undtagelse af prøver ved LoD med E545A- og Q546R-*PIK3CA*-mutationer.

Prøver ved LoD med E545A- og Q546R-*PIK3CA*-mutationer blev evalueret i seks dage på yderligere to undersøgelsessteder af tre operatører med to kørsler og fire replikater og i alt 144 målinger pr. undersøgelsessted, så der i alt blev opnået 432 målinger fra tre undersøgelsessteder. På hvert undersøgelsessted blev prøver testet ved hjælp af to lot af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (tre lot fra tre undersøgelsessteder). Ét af to lot af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit blev brugt til at ekstrahere DNA fra FFPE-prøver. Prøver blev fremstillet ved lave DNA-inputniveauer med en kontrol-C_T-værdi på cirka 30 som mål.

Mutationspositive prøver blev kun kørt med kontrolreaktionsblandingen og den relevante reaktionsblanding af mutationen af interesse. Der blev kørt vildtypeprøver med alle reaktionsblandinger.

Andelen af korrekte bestemmelser for hver prøve er vist i Tabel 11 med henblik på repeterbarhed.

Tabel 11. Analysens repeterbarhed – andel af korrekte bestemmelser for *PIK3CA*-mutationer testet i DNA-prøver udvundet af FFPE-vævsprøver

Exon	Mutation	Mutationsniveau	Brøkmæssig andel af gyldige resultater	Korrekte bestemmelser, %	Nedre tosidet 95 % CI
IR	Vildtype	IR	108/120	90,00	83,18
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	119/119	100,00	96,95
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545A	LoD*	144/144	100,00	97,47
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD	118/120	98,33	94,11
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	139/140	99,29	96,08	
	3 x LoD	119/119	100,00	96,95	
20	H1047L	LoD	117/120	97,50	92,87
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	117/120	97,50	92,87
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97

IR: Ikke relevant.

* Prøver ved LoD med E545A- og Q546R *PIK3CA*-mutationer blev evalueret i seks dage på ét center af tre operatører med to kørsler og fire replikater og i alt 144 målinger.

Table 12. Analysens reproducibility – andel af korrekte bestemmelser for *PIK3CA*-mutationer testet i DNA-prøver udvundet af FFPE-vævsprøver

Exon	Mutation	Mutationsniveau	Brøkmæssig andel af gyldige resultater	Korrekte bestemmelser, %	Nedre tosidet 95 % CI
IR	Vildtype	IR	222/240	92,50	88,41
7	C420R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
9	E542K	LoD	237/239	99,16	97,01
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD*	431/432	99,77	98,73
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	238/240	99,17	97,02
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545K	LoD	238/240	99,17	97,02
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546E	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	Q546R	LoD*	421/424	99,29	97,95
		3 x LoD	239/239	100,00	98,47
20	H1047L	LoD	230/240	95,83	92,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047R	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	H1047Y	LoD	234/240	97,50	94,64
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47

IR: Ikke relevant.

* Prøver ved LoD med E545A- og Q546R *PIK3CA*-mutationer blev evalueret i seks dage på tre undersøgelsessteder af tre operatører med to kørsler og fire replikater og i alt 144 målinger pr. undersøgelsessted, så der i alt blev opnået 432.

Der blev anvendt en varianskomponentanalyse for at anslå standardafvigelsen for variabiliteten mellem kit, mellem kørsler, mellem operatører, mellem instrumenter, mellem dage

og inden for samme analyse med henblik på repeterbarhed og reproducerbarhed. Den samlede standardafvigelse (SD, standard deviation) for alle varianskomponenter var $\leq 1,32 \Delta C_T$ for LoD og $\leq 0,63 \Delta C_T$ for 3 x LoD for alle testede *PIK3CA*-mutationer i reproducerbarhedstesten. Blandt alle mutantpanelsmedlemmer var SD $\leq 0,17 \Delta C_T$ for LoD og $\leq 0,16 \Delta C_T$ for 3 x LoD mellem lot (lottes indbyrdes udskiftelighed). SD for variabiliteten inden for samme analyse (repeterbarhed) var $\leq 1,24 \Delta C_T$ for LoD og $\leq 0,53 \Delta C_T$ for 3 x LoD.

Krydskontaminering/analytisk overførsel: Vævsprøver

Formålet med denne undersøgelse var at vurdere *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit, når meget *PIK3CA*-mutationspositive prøver blev testet sammen med *PIK3CA*-mutationsnegative prøver. I undersøgelsen blev sandsynligheden for krydskontaminering i hele testproceduren (DNA-ekstrahering og efterfølgende test med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit) undersøgt.

Undersøgelsen blev udført med H1047R (mutationen med den højeste forekomst) og vildtype-FFPE-cellelinjeprøver. To uafhængige sæt prøver, som blev betegnet henholdsvis "Set A" (Sæt A) og "Set B" (Sæt B), blev ekstraheret i henhold til en foruddefineret ekstraheringsmatrix, der havde til formål at skabe risiko for krydskontaminering mellem prøver. Ekstraktionerne blev udført af to operatører. Der blev i alt udført 18 ekstraktioner (ni pr. sæt) for de mutationspositive prøver (H1047R-prøverne). Der blev i alt udført 42 ekstraktioner (21 pr. sæt) for vildtypeprøverne. Ekstrakterne blev vurderet for mutation på tværs af ti PCR-kørsler. Der blev opsat fem på hinanden følgende kørsler pr. prøvesæt af samme operatør ved brug af det samme udstyr og Rotor-Gene Q-instrument, uden at der blev udført andre mellemliggende kørsler ved brug af dette instrument. Ekstrakterne blev testet med kontrolanalysereaktionsblandingen (*therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-rør 1) og mutationen af interesse (*therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-rør 6).

Den registrerede procentdel med hensyn til korrekte mutationsbestemmelser for gyldige vildtypeprøver var 100 %. Der blev med andre ord ikke registreret krydskontaminering af vildtypeprøverne fra mutantprøvers side ved brug af samme procedure for DNA-ekstraktion og kørselsopsætning.

Nøjagtighed: Sammenligning med den analytiske referencemetode (vævsprøver)

For at påvise nøjagtigheden af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i forhold til en valideret NGS-analyse blev der udført en nøjagtighedsundersøgelse ved brug af kliniske FFPE-prøver fra brystcancerpatienter, som var randomiseret i SOLAR-1-forsøget, og for hvilke der var et tilstrækkeligt antal tilgængelige prøver til test med NGS-sammenligningsanalysen. Ud af disse 453 kliniske prøver levede 385 op til NGS-sammenligningsanalysens prøvekrav med hensyn til vævsvolumen og tumorindhold, og 379 gav et gyldigt resultat for NGS.

Prøver med gyldige resultater for både NGS og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev analyseret med NGS som reference for at vurdere den procentvise positive overensstemmelse (positive percent agreement, PPA), den procentvise negative overensstemmelse (negative percent agreement, NPA) og den procentvise samlede overensstemmelse (overall percent agreement, OPA). Disse procentdele og de tilsvarende tosidede konfidensintervaller (confidence intervals, CI) på 95 %, beregnet ved hjælp af metoden med Clopper-Pearson-ekstrakt, er opsummeret i Tabel 13.

Tabel 13. Analyse af overensstemmelse for FFPE-vævsprøver

Mål	Procentdel af overensstemmelse (N)	Tosidet 95 % CI
Positiv procentvis overensstemmelse	99,0 (197/199)	96,4, 99,9
Negativ procentvis overensstemmelse	90,0 (162/180)	84,7, 94,0
Samlet procentvis overensstemmelse	94,7 (359/379)	92,0, 96,7

Hvad angår de 20 afvigende resultater for samlet mutationsstatus, gav to prøver med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-negative resultater NGS-positive resultater, og 18 prøver med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-positive resultater gav NGS-negative resultater. Begge de to prøver med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-negative resultater, som gav NGS-positive resultater, blev påvist med NGS ved MAF-niveauer under LoD for *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Ud af de 18 prøver, der blev bestemt som værende positive med *therascreen* PIK3CA

RGQ PCR Kit og negative med NGS, var 11 lave positive (inden for én ΔC_T fra grænseværdien ved brug af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit og derfor lave positive prøver). Ét tilfælde blev påvist som H1047L (3140A>T) med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, men som H1047I (3139_3140CA>AT) med NGS-analysen. Årsagen til de seks øvrige afvigende resultater blev ikke registreret.

Tabel 14 viser PPA for målet med NGS som ortogonal metode.

Tabel 14. Analyse af overensstemmelse for FFPE-vævsprøver ved specifik mutation

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

* Alle 11 PIK3CA-mutationer blev påvist i vævsprøve i SOLAR-1-forsøget (Tabel 15).

Klinisk ydeevne: Vævsprøver

therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit er beregnet til brug som en ledsagende diagnostisk test til at hjælpe klinikere med at identificere brystcancerpatienter, der muligvis er egnet til behandling med PIQRAY (alpelisib) baseret på et resultat med én eller flere detekterede *PIK3CA*-mutationer i kliniske FFPE-vævsprøver fra brystcancerpatienter.

Kliniske resultatdata

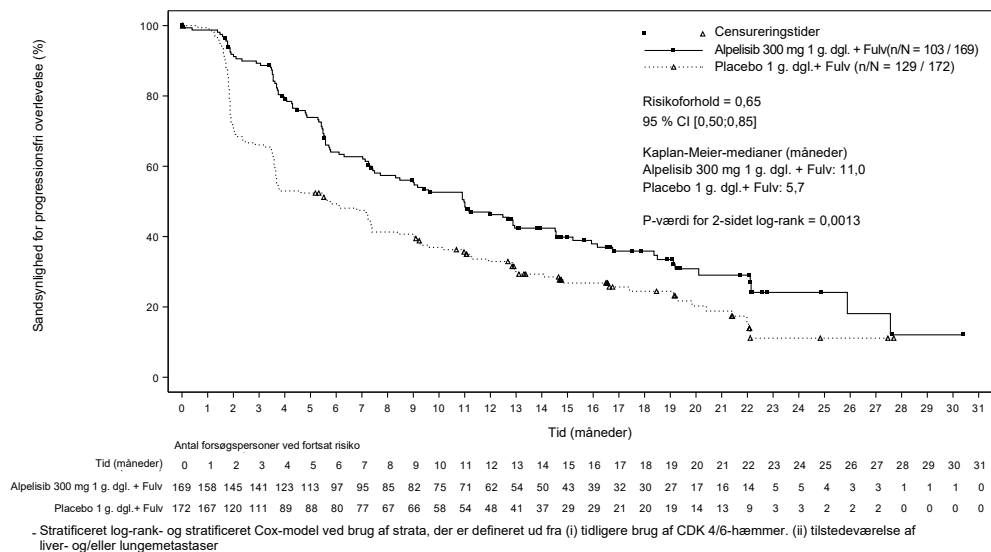
SOLAR-1-undersøgelsen, CBYL719C2301, var et randomiseret, dobbeltblindet, placebokontrolleret, internationalt, klinisk fase III-forsøg på flere forsøgscentre, der skulle bestemme effektiviteten og sikkerheden ved behandling med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant sammenlignet med placebo plus fulvestrant hos mænd og postmenopausale kvinder med HR+, HER2-negativ avanceret brystcancer, der var progredieret under eller efter behandling med aromatasehæmmer. I alt 572 brystcancerpatienter blev indrullet i to kohorter, hhv. med eller uden en *PIK3CA*-mutation. Patienterne blev randomiseret til at få enten PIQRAY (alpelisib) 300 mg plus fulvestrant eller placebo plus fulvestrant i et forhold på 1:1. Randomisering blev stratificeret efter tilstedeværelse af lungecancer og/eller levermetastaser og tidligere behandling med CDK4/6-hæmmer(e).

Undersøgelsens primære endepunkt var progressionsfri overlevelse (PFS, Progression-Free Survival) ved anvendelse af RECIST-version 1.1 (RECIST, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) hos patienter med fremskreden brystcancer, som var indrullet med en *PIK3CA*-mutation. Øvrige sekundære endepunkter var blandt andre PFS for patienter uden *PIK3CA*-mutation, samt samlet overlevelse (OS, Overall Survival), samlet responsrate (ORR, Overall Response Rate) klinisk fordel (CBR, Clinical Benefit Rate) med *PIK3CA*-kohorte (dvs. med eller uden *PIK3CA*-mutation).

PIK3CA-mutationsstatus for screening og indrulling af patienter blev fastlagt centralt ved hjælp af en klinisk forsøgsanalyse (CTA, Clinical Trial Assay) eller QIAGEN *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ved at teste tumorprøver fra patienter med FFPE-brystcancer. Af de 572 patienter, der blev randomiseret i SOLAR-1, blev 177 patienter (30,9 % af forsøgspopulationen, heriblandt

172 *PIK3CA*-mutationspositive og fem *PIK3CA*-mutationsnegative patienters) randomiseret ved brug af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Alle øvrige patienter (395) blev randomiseret ved brug af CTA (69,1 % af forsøgspopulationen, heriblandt 169 *PIK3CA*-mutationspositive og 226 *PIK3CA*-mutationsnegative patienter).

PIQRAY (alpelisib) i kombination med fulvestrant viste bedre resultater end fulvestrant alene for det primære endepunkt, PFS, efter investigator vurdering ved brug af RECIST 1.1 i-*PIK3CA*-mutantkohorten. En anslået 35 % risikoreduktion i sygdomsprogression eller død blev observeret til fordel for behandlingssarmen med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant i forhold til behandlingssarmen med placebo plus fulvestrant (risikoforhold [HR, Hazard ratio] = 0,65; 95 % CI: 0,50, 0,85; $p = 0,0013$, baseret på en tosidet stratificeret log-rank-test). Median PFS blev forlænget med klinisk betydningsfulde 5,3 måneder, fra 5,7 måneder i behandlingssarmen med placebo plus fulvestrant til 11,0 måneder i behandlingssarmen med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant (Figur 20).



Figur 20. Kaplan-Meier diagram af PFS ved behandling af patienter med *PIK3CA*-mutation, som var randomiseret i SOLAR-1.

Prøver fra 395 patienter, som var randomiseret ved brug af CTA, blev testet igen retrospektivt med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, hvilket gav 389 prøver, som kunne evalueres med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (98,5 %), og seks patientprøver, som ikke kunne evalueres med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (Tabel 16).

Tabel 15. Prævalens af *PIK3CA*-mutationer, som blev påvist med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i vævsprøver i det kliniske forsøg SOLAR-1

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

* En *PIK3CA*-mutationspositiv patient kan have mere end én mutation.

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

N = antal *PIK3CA*-mutationspositive patienter identificeret ud fra FFPE-vævsprøver i SOLAR-1.

Tabel 16. Fordeling af retrospektivt gentestede (CTA-indrullerede) forsøgspersoner (hele analysesættet, CTA-indrullerede)

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit-resultater	CTA-positive N = 169	CTA-negative (N = 226)	I alt (N = 395)
Valid (Gyldig)	169 (100,0%)	220 (97,3%)	389 (98,5%)
Positive (Positiv)	164 (97,0%)	11 (4,9%)	175 (44,3%)
Negative (Negativ)	5 (3,0%)	209 (92,5%)	214 (54,2%)
Invalid (Ugyldig)	0 (0%)	6 (2,7%)	6 (1,5%)

For at vurdere overensstemmelsen mellem CTA og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev overensstemmelsesindekserne PPA, NPA og OPA, sammen med de respektive tosidede 95 %-konfidensintervaller for Clopper-Pearson-ekstrakt, beregnet.

Tabel 17 viser det *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-evaluerbare undersæt ved brug af CTA som reference og indikerer en høj grad af overensstemmelse mellem CTA- og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultaterne.

Tabel 18 anvender *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit som reference og indikerer en høj grad af overensstemmelse mellem CTA- og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultaterne.

Tabel 17. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i forhold til CTA (med CTA som reference)

Mål for overensstemmelse	Procentvis overensstemmelse, %	Tosidet 95 % CI
Positiv procentvis overensstemmelse (PPA, Positive Percent Agreement)	97,0	93,2, 99,0
Negativ procentvis overensstemmelse (NPA, Negative Percent Agreement)	95,0	91,2, 97,5
Samlet procentvis overensstemmelse (OPA, Overall Percent Agreement)	95,9	93,4, 97,6

Tabel 18. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i forhold til CTA (med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit som reference)

Mål for overensstemmelse	Procentvis overensstemmelse, %	Tosidet 95 % CI
Positiv procentvis overensstemmelse (PPA, Positive Percent Agreement)	93,7	89,0, 96,8
Negativ procentvis overensstemmelse (NPA, Negative Percent Agreement)	97,7	94,6, 99,2
Samlet procentvis overensstemmelse (OPA, Overall Percent Agreement)	95,9	93,4, 97,6

Tabel 19 viser estimater af PPA, NPA og OPA, der er genberegnet for tilpasning til berigelsen grundet de seks manglende *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultater i de CTA-mutationsnegative patienter.

Tabel 19. *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i forhold til CTA (med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit som reference)

Mål for overensstemmelse	Procentvis overensstemmelse, %	Tosidet 95 % CI
Positiv procentvis overensstemmelse (PPA, Positive Percent Agreement)	93,6	90,1, 97,0
Negativ procentvis overensstemmelse (NPA, Negative Percent Agreement)	97,7	95,6, 99,5
Samlet procentvis overensstemmelse (OPA, Overall Percent Agreement)	95,9	93,8, 97,8

Den primære PFS-analyse for den kliniske anvendelighed af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit viste tilsvarende klinisk effektivitet som den, der blev fastslået i SOLAR-1-undersøgelsen. Analysen af undersættet af patienter, der blev testet mutantpositive med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit (347 patienter), viste, at patienter, der var randomiseret til behandlingsarmen med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant, havde en anslået 36 % lavere risiko for sygdomsprogression eller død (HR = 0,64; 95 % CI: 0,48, 0,85) end patienter, der var randomiseret til behandlingsarmen med placebo plus fulvestrant.

Følsomhedsanalyser vurderede betydningen af de manglende data fra *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit om PFS og viste, at resultaterne var robuste over for manglende data. For eksempel, når man antager, at de seks manglende *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-resultater var uoverensstemmede med CTA-resultaterne, havde disse *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-mutationspositive patienter, der blev randomiseret til behandlingsarmen med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant, en anslået 37 % lavere risiko for sygdomsprogression eller død (HR = 0,63; 95 % CI [0,47, 0,84]) end patienter, der var randomiseret til behandlingsarmen med placebo plus fulvestrant.

Alle CTA-indrullerede mutationspositive patienter var egnet til evaluering med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, og kun seks CTA-indrullerede mutationspositive patienter var uegnet til evaluering med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Følgelig var der ingen bias i resultaterne som følge af evaluerbarhed af prøverne i undersøgelsen.

PFS blev også anslået i populationen, som var negative med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, og der blev ikke observeret nogen PFS-fordel for disse (HR = 0,85; 95 % CI: 0,58, 1,25).

Ydelseskarakteristik: Plasmaprøver

Analytisk ydeevne: Plasmaprøver

De specifikke ydelseskarakteristika for *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev bestemt i undersøgelser med anvendelse af kliniske plasmaprøver indsamlet fra brystcancerpatienter, kunstige plasmaprøver omfattende plasma fra rask donor (HD, healthy donor) tilsat fragmenteret cellelinje-DNA fra 11 humane cellelinjeprøver, som indeholder kendte *PIK3CA* mutationer, som analysen påviser, og én *PIK3CA*-vildtype-cellelinjeprøve (dvs. ingen mutationer, som hævdes påvist med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i exon 7, 9 og 20).

Tomgrænse (LoB): Plasmaprøver

I CLSI-retningslinje EP17-A2 defineres tomgrænsen (LoB, Limit of Blank) som "det højeste måleresultat, der sandsynligvis vil blive observeret (med en angivet sandsynlighed) for en tom prøve. For *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit er dette datapunktet, der svarer til den øverste 95 %-percentil i de tomme prøver. For at vurdere ydeevnen af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i fravær af skabelon og for at sikre, at en prøve med vildtype-DNA ikke genererer et analytisk signal, der kan indikere en lav koncentration af mutation, blev i alt 60 unikke HD-prøver tilsat serielt fortyndet fragmenteret vildtype-*PIK3CA*-DNA ved seks inputniveauer testet in triplo i en undersøgelse, der fulgte vejledningen i CLSI-retningslinje EP17-A2 til bestemmelse af LoB for hver mutationsanalyse. Alle mutationsanalyser gav LoB-værdier over grænseværdien for deres respektive mutationer. LoB for de *PIK3CA*-mutanter, der blev påvist af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i plasmaprøver, er vist nedenfor (Tabel 20).

Tabel 20. Oversigt over LoB-resultater

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

Påvisningsgrænse (LoD): Plasmaprøver

Ved hjælp af kunstige plasmaprøver blev der udført en undersøgelse for at bestemme LoD for hver af de 11 *PIK3CA*-mutationer. LoD blev defineret som den laveste mængde mutant-DNA på en baggrund af vildtype-DNA, hvor en mutationsprøve giver positive resultater i 95 % af testresultaterne (C_{95}).

For at bestemme LoD for hver mutation blev prøver med forskellig procentmæssig mutation fremstillet ved lavt DNA-input og testet med *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* (Tabel 21). LoD for hver analyse blev beregnet med en probitmetode. LoD for 11 kunstige mutantprøver blev fastslået ved brug af tre forskellige lot af *therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit* med 24 replikater testet pr. kitlot pr. niveau. Et undersæt af mutationer blev verificeret ved brug af kliniske plasmaprøver ved den fastsatte LoD.

Tabel 21. LoD for plasmaprøver fastslået ved brug af kliniske plasmaprøver med lavt DNA-input og kunstige plasmaprøver

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

MAF: Hyppighed af mutant allel.

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

[†] LoD-værdier blev fastlagt ved hjælp af cellelinjeprøver.

^{††} LoD-værdier blev verificeret ved hjælp af kliniske plasmaprøver.

Inputområde for genomisk DNA: Plasmaprøver

Kontrollens C_T -arbejdsområde blev indstillet ved brug af beregnede toleranceintervaller og LoB-værdier. Kontrolanalysens C_T -arbejdsområde blev bestemt ved brug af i alt 30 individuelle vildtypeprøver på 10 ml med forskellige vildtype-DNA-koncentrationer (120 observationer). Den endelige kontrolanalysens C_T -arbejdsområde blev indstillet til en C_T -værdi fra 24,69 til 31,68, hvilket gav et konfidensniveau på 98 % for 95 % af populationen for tilsigtet brug.

ΔC_T -grænseværdier: Plasmaprøver

Der blev anvendt kunstige plasmaprøver til at fastlægge grænseværdierne for hver mutation. Ud over statistisk analyse af ΔC_T -værdier blev LoB-værdier og designkrav med hensyn til antal falsk positive og falsk negative resultater brugt til at fastlægge acceptable grænseværdier.

De fastlagte grænseværdier og er vist i Tabel 22.

Tabel 22. Fastlagte grænseværdier for hver mutationsanalyse ved test af DNA fra plasmaprøver

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

Effekten af DNA-input på ΔC_T -værdier (linearitet): Plasmaprøver

DNA-inputniveauet defineres som den samlede kvantitet af amplificerbart DNA i en prøve som bestemt af C_T -værdierne fra *PIK3CA*-kontrolreaktionen. For at vise, at ydeevnen af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit er konsistent i hele kontrolreaktionens C_T -område (24,69 til 31,68), blev en seriel fortynding med 8 niveauer fremstillet for hver af de 11 *PIK3CA*-mutationsanalyser (fragmenteret DNA ekstraheret fra cellelinjepøver). C_T -målværdierne for fortyndingsniveau 1 og 8 for hver mutation skulle gerne være over og under kontrolreaktionens C_T -område. Overordnet set var de ΔC_T -værdier, der blev målt ved forskellige samlede DNA-inputniveauer, ensartede med hensyn til mutationer inden for arbejdsområdet for *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit.

Analysens specificitet (krydsreaktivitet/specificitet): Plasmaprøver

For at vurdere, hvorvidt der er taget korrekt højde for krydsreaktivitet mellem mutationer, der påvises af analysen, i indstillingen af de analytiske grænseværdier, blev mutant-positive kunstige plasmaprøver, med højt og lavt DNA-input, fortyndet til høje og lave MAF-mål og testet in duplo ved hjælp af tre lot af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit. Der blev observeret krydsreaktivitet mellem H1047L- og H1047R-analyserne. Det blev imidlertid fastslået, at denne krydsreaktivitet er ensrettet (dvs. hvis der ses en dobbelt H1047R- og H1047L-prøve, rapporteres dette kun som "H1047R Mutation Detected" (H1047R-mutation påvist)). Denne regel er indarbejdet i den automatiserede algoritme "*therascreen*_*PIK3CA*_Plasma Assay Profile".

Interferens: Plasmaprøver

Endogene stoffer

Potentielle endogene interfererende stoffer, der kan være til stede i plasmaprøverne, blev testet i kunstige mutant- og vildtypeprøver i koncentrationer baseret på CLSI-retningslinje EP7-A2:

- Hæmoglobin (2 g/l)
- Triglycerider (37 mmol/l)
- EDTA (3,4 µmol/l)
- Koffein (308 µmol/l)
- Albumin (30 mg/ml)
- Konjugeret bilirubin (342 µmol/l)
- Ukonjugeret bilirubin (342 µmol/l)

Resultaterne viste, at disse stoffer ikke interfererede med resultaterne af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Eksogene stoffer

Potentielle eksogene interfererende stoffer, der var til stede i DNA-ekstraktionsprocessen, blev testet i mutant- og vildtypeprøver ved koncentrationer under antagelse af en 10% overførsel fra ekstraktionsprocessen:

- Ethanol
- Proteinase K
- Buffer ACL
- Buffer ACB
- Buffer ACW1
- Buffer ACW2

Resultaterne viste, at disse stoffer ikke interfererede med resultaterne af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit.

Lottenes indbyrdes udskiftelighed: Plasmaprøver

therascreen PIK3CA RGQ PCR System anvender QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit til ekstrahering af DNA og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit til forstærkning af DNA og påvisning af *PIK3CA*-mutationsstatus. Lot til lot-reproducerbarhed og -udskiftelighed blev vist ved hjælp af tre lot fra QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit og ét lot fra *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. Den samlede procentdel af korrekte bestemmelser for alle lot for alle mutationspositive prøver og vildtypeprøver var 100%.

Prøvehåndtering: Plasmaprøver

For at vise, at forskellige laboratorier vil opnå acceptable resultater, når der startes fra den samme plasmaprøve, blev der udført ekstraktioner på tre forskellige centre. Der blev anvendt kunstige prøver til alle 11 mutationer såvel som en klinisk *PIK3CA*-vildtypeplasmaprøve. Der blev fremstillet 18 x 2 ml alikvoter af hver prøve, og disse alikvoter blev randomiseret og opdelt i 18 ekstraktionssæt. Disse ekstraktionssæt blev derefter fordelt ligeligt på de tre testcentre (ét internt QIAGEN-center i Storbritannien og yderligere to eksterne centre i USA); seks ekstraktioner pr. forsøgscenter. Test af DNA ekstraheret fra prøvealiquoterne ved brug af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev udført på det interne QIAGEN-center. Når man sammenligner resultaterne fra hver prøve for alle tre centre, var procentdelen af korrekt mutationsbestemmelse for *PIK3CA* mutationspositive prøver og vildtypeprøver 100%.

Repeterbarhed og reproducerbarhed: Plasmaprøver

Repeterbarheden af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev undersøgt ved test af DNA ekstraheret fra cellelinjeprøver, der repræsenterede alle 11 mutationer, der påvises af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit ved 1x LoD og 3x LoD.

Repeterbarheden blev vurderet ved at teste disse prøver på et center på 20 ikke-sammenhængende dage ved anvendelse af tre Rotor-Gen Q-instrumenter og af tre operatører, hvilket genererede i alt 120 replikater pr. prøve (Tabel 23).

Tabel 23. Analysens repeterbarhed – andel af korrekte bestemmelser for *PIK3CA*-mutationer testet i DNA-prøver udvundet af plasmaprøver

Exon	Mutation	Mutationsniveau	Brøkmæssig andel af gyldige resultater	Korrekte bestemmelser, %	Nedre tosidet 95 % CI
IR	Vildtype	C _T 30	114/120	95,00	89,43
7	C420R	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
9	E542K	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E542A	LoD	119/120	99,17	95,44
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545D	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545G	LoD	119/120	99,17	95,44
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	E545K	LoD*	111/120	92,50	86,24
		3x LoD*	120/120	100,00	96,97
	Q546E	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
Q546R	LoD*	115/120	95,83	90,54	
	3x LoD*	120/120	100,00	96,97	
20	H1047L	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047R	LoD	110/120	91,67	85,21
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97
	H1047Y	LoD	120/120	100,00	96,97
		3 x LoD	120/120	100,00	96,97

* For E545K og H1047R var den anvendte LoD hhv. 1,99 og 1,44. LoD tilpasset og bekræftet i en efterfølgende undersøgelse. Den tilpassede LoD blev anvendt i en efterfølgende undersøgelse (Tabel 24).

Reproducerbarheden blev målt ved at teste kunstige prøver ved prøveniveauerne på 1x LoD og 3x LoD på tre forskellige centre (ét internt QIAGEN-center i Storbritannien og yderligere to eksterne centre i USA). Alle disse prøver blev testet på hvert center på 10 ikke-sammenhængende dage ved anvendelse af tre Rotor-Gen Q-instrumenter og af tre operatører, hvilket genererede i alt 60 replikater pr. prøve (Tabel 24).

Tabel 24. Analysens reproducerbarhed – andel af korrekte bestemmelser for *PIK3CA*-mutationer testet i DNA-prøver udvundet af plasmaprøver fordelt på alle centre

Exon	Mutation	Mutationsniveau	Brøkmæssig andel af gyldigt resultat	Korrekte bestemmelser, %	Nedre tosidet 95 % CI
IR	WT	C:30	223/238	93,70	89,82
7	C420R	LoD	237/238	99,58	97,68
		3 x LoD	238/238	100,00	98,46
9	E542K	LoD	237/240	98,75	96,39
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545A	LoD	239/240	99,58	97,70
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545D	LoD	240/240	100,00	98,47
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47
	E545G	LoD	237/240	98,75	96,39
		3 x LoD	239/239	100,00	98,47
	E545K	LoD*	432/432	100,00	99,15
		3 x LoD	240/240	100,00	89,47
	Q546E	LoD	238/238	100,00	98,46
		3 x LoD	238/238	100,00	98,46
Q546R	LoD*	232/240	96,67	93,54	
	3 x LoD	240/240	100,00	98,47	
20	H1047L	LoD	236/238	99,16	97,00
		3 x LoD	238/238	100,00	98,46
	H1047R	LoD	430/432	99,54	98,34
		3 x LoD	236/236	100,00	98,45
	H1047Y	LoD	239/240	99,58	97,70
		3 x LoD	240/240	100,00	98,47

* Prøver ved revideret LoD med E545K og H1047R (ifølge Tabel 21) blev evalueret i seks dage på tre undersøgelsessteder af tre operatører med to kørsler og fire replikater og i alt 144 målinger pr. undersøgelsessted, så der i alt blev opnået 432 målinger fra alle tre undersøgelsessteder. I Tabel 25 ses den positive procentvise overensstemmelse (positive percentage agreement, PPA) for målet med NGS som ortogonal metode.

Der blev anvendt en varianskomponentanalyse for at anslå standardafvigelsen for variabiliteten mellem kit, mellem kørsler, mellem operatører, mellem instrumenter, mellem dage og inden for samme analyse med henblik på repeterbarhed og reproducerbarhed. Den samlede standardafvigelse (SD, standard deviation) for alle varianskomponenter var $\leq 1,34 \Delta C_T$ for LoD og $\leq 0,73 \Delta C_T$ for $3 \times$ LoD for alle testede *PIK3CA*-mutationer i reproducerbarhedstesten. Blandt alle mutantpanelsmedlemmer var $SD \leq 0,20 \Delta C_T$ for LoD og $\leq 0,10 \Delta C_T$ for $3 \times$ LoD mellem lot (lottenes indbyrdes udskiftelighed). SD for variabiliteten inden for samme analyse (repeterbarhed/præcision) lå i området fra $0,415 \Delta C_T$ til $1,407 \Delta C_T$ for LoD og $0,206 \Delta C_T$ til $0,583 \Delta C_T$ for $3 \times$ LoD.

Validering af blodprøvetagningsrør

Den indvirkning, som tidsrummet for separation af blod i plasma har på plasmaprøve kvaliteten og de deraf følgende resultater, blev bestemt ved hjælp af kunstige blodprøver for H1047R (den hyppigst forekommende mutation), og fuldblodsprøver fra raske frivillige blev brugt som vildtypeprøver. Blodprøver blev indsamlet i K_2EDTA -rør på 10 ml fra fire donorer (otte rør pr. donor). Der blev genereret kunstige blodprøver ved at tilsætte *PIK3CA* H1047R-mutantfragmenteret cellelinje-DNA til blodprøvetagningsrør fra to donorer efter blodprøvetagning. Blodprøverne blev separeret i plasma efter cirka 1, 2, 3 og 4 timer. DNA blev ekstraheret fra plasmaprøverne ved hjælp af QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit, og hvert mål blev testet ved hjælp af *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit i 16 replikater.

Alle testede prøver blev bestemt korrekt på hvert tidspunkt. Der var desuden ingen statistisk signifikant forskydning med hensyn til de ΔC_T -værdier, der blev registreret for *PIK3CA* H1047R-mutantprøven.

Ved denne undersøgelse blev det påvist, at tidsrummet for separation af blod i plasma ikke har nogen betydning med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit, hvis behandlingen finder sted inden for fire timer.

Nøjagtighed: Sammenligning med den analytiske referencemetode (plasmaprøver)

For at påvise nøjagtigheden af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit blev der udført en undersøgelse med prøver fra det kliniske forsøg SOLAR-1 i forhold til en valideret NGS-analyse. Der blev udført test med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit og NGS-analyse for *PIK3CA*-ændringer ved hjælp af DNA fra 552 kliniske plasmaprøver fra det kliniske forsøg SOLAR-1.

DNA-prøver med både NGS- og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-gyldige resultater (542/552 prøver) blev analyseret for at vurdere procentdelen af positiv overensstemmelse (PPA, positive percent agreement), procentdelen af negativ overensstemmelse (NPA, negative percent agreement) og procentdelen af overordnet overensstemmelse (OPA, overall percent agreement). Disse procentdele sammen med de tilsvarende tosidede 95 % konfidensintervaller (CI) er opsummeret i Tabel 25.

Tabel 25. Analyse af overensstemmelse for DNA-prøver udvundet af plasmaprøver

Mål	Procentdel af overensstemmelse (N)	Nedre 95 % CI
Positiv procentvis overensstemmelse	97,39 (149/153)	93,44
Negativ procentvis overensstemmelse	91,26 (355/389)	88,00
Samlet procentvis overensstemmelse	92,99 (504/542)	90,50

De 38 afvigende resultater blandt procentdelen af den overordnede overensstemmelse viste følgende:

- Fire prøver (0,7%) var Wild-Type (Vildtype) (dvs. No Mutation Detected (Ingen mutation påvist) med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, men men Mutation Detected (Mutation påvist) med NGS.
- 34 prøver (6,3%) gav Mutation Detected (Mutation påvist) med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, men var Wild-Type (Vildtype) med NGS.

- Tabel 26 viser PPA for målet med NGS som ortogonal metode.

Tabel 26. Analyse af overensstemmelse for DNA-prøver udvundet af plasmaprøver ud fra mutation

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

* 6/11 *PIK3CA*-mutationer blev påvist med plasmaprøver i SOLAR-1-undersøgelsen (Tabel 31).

Klinisk ydeevne: Plasmaprøver

therascreen *PIK3CA* RGQ PCR Kit er beregnet til brug som en ledsagende diagnostisk test til at hjælpe klinikere med at identificere brystcancerpatienter, der muligvis er egnet til behandling med PIQRAY (alpelisib) baseret på tilstedeværelsen af en eller flere *PIK3CA*-mutationer påvist i K₂EDTA-antikoagulerede plasmaprøver af perifert venøst fuldblod.

K₂EDTA-antikoagulerede plasmaprøver af perifert venøst fuldblod indsamlet fra brystcancerpatienter randomiseret i SOLAR-1 inden påbegyndelse af undersøgelsesbehandling (baseline) blev testet retrospektivt med *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit for at evaluere den kliniske anvendelighed af denne prøvetype til bestemmelse af *PIK3CA*-mutationsstatus og til at evaluere overensstemmelse mellem vævs- og plasmaresultater.

Resultater af overensstemmelsesanalyse

Overensstemmelsen mellem *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit ved brug af plasmaresultater og *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit ved brug af vævsresultater er vist i Tabel 27. Af de 328 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-vævspositive patienter var 179 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-plasmapositive. Af de 215 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-vævsnegative patienter var 209 *therascreen* *PIK3CA* RGQ PCR Kit-plasmanegative. Der var ingen ugyldige plasmaresultater.

Tabel 27. Tabel for overensstemmelse mellem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævsresultater og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmaresultater

<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit, plasma	<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit, væv			
	Positiv	Negativ	Ugyldig	I alt
Positiv	179	6	1	186
Negativ	149	209	5	363
Ugyldig	0	0	0	0
I alt	328	215	6	549

Overensstemmelse (PPA, NPA og OPA) mellem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasma- og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævsresultaterne blev beregnet ved hjælp af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævsresultater som reference (Tabel 28). Punktestimerne for PPA, NPA og OPA var hhv. 55 %, 97 % og 72 %.

Tabel 28. Overensstemmelse mellem *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmaresultater og *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævsresultater ved hjælp af *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævsresultater som reference

Mål for overensstemmelse	Procentdel af overensstemmelse (N)	95 % CI*
Positiv procentvis overensstemmelse	55% (179/328)	(49,0, 60,1)
Negativ procentvis overensstemmelse	97% (209/215)	(94,0, 99,0)
Samlet procentvis overensstemmelse	72% (388/543)	(67,5, 75,2)

* 95 % CI beregnet med Clopper-Pearson-ekstraktionsmetoden.

Bekræftende test af plasmaprøver med en valideret NGS-referencetestmetode bekræftede 91 % af plasmaresultaterne med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit. For de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævspositive patienter, der var *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmanegative, bekræftede NGS de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmanegative resultater i 80 % af tilfældene. Af de seks afvigende *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositive *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævsnegative patienter, blev fem bekræftet som plasmapositive med NGS.

Analyse af progressionsfri overlevelse (PFS, Progression-Free Survival)

PFS for PIQRAY (alpelisib) i kombination med fulvestrant for den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositive population (N = 185) blev observeret som værende til fordel for behandlingsarmen med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant sammenlignet med behandlingsarmen med placebo plus fulvestrant med en anslået reduktion på 46 % i risiko for sygdomsprogression eller død (HR = 0,54, 95 % CI: 0,33, 0,88) (Tabel 29). Til sammenligning var PFS HR i den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævspositive population 0,64 (95 % CI: 0,48, 0,85) og 0,65 (95 % CI: 0,50, 0,85) i SOLAR-1 PIK3CA-mutantkohorten bestemt ud fra vævsanalysen taget ved indrullering.

Tabel 29. PFS-analyse hos de *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositive patienter

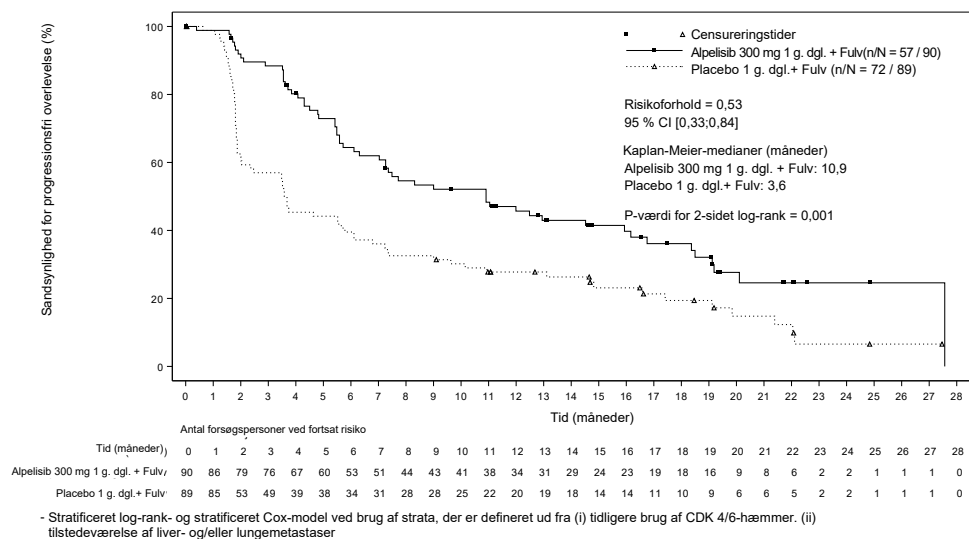
PFS (N)	HR (95 % CI)
	PIQRAY 300 mg 1 g. dgl. + fulv/placebo 1 g. dgl. + fulv*
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositive (185)	0,54 (0,33, 0,88)

* HR og 95 % CI beregnet ved hjælp af berigelsestilpasning.

PFS HR for de 179 *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævspositive *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositive patienter var 0,53 (95 % CI: 0,33, 0,84). Median PFS var 10,9 måneder for behandlingsarmen med PIQRAY (alpelisib) plus fulvestrant versus 3,6 måneder for behandlingsarmen med placebo plus fulvestrant (Tabel 30, Figur 21).

Tabel 30. Progressionsfri overlevelse (måneder) i *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævspositive, *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositive patienter

Progressionsfri overlevelse	PIQRAY 300 mg 1 g. dgl. + fulv N=90	Placebo 1 g. dgl. + fulv N=89	HR (95 % CI)
			PIQRAY 300 mg 1 g. dgl. + fulv/placebo 1 g. dgl. + fulv
Ingen hændelser (%)	57 (63,3)	72 (80,9)	0,53 (0,33, 0,84)
PD (%)	55 (61,1)	67 (75,3)	–
Død (%)	2 (2,2)	5 (5,6)	–
Antal censurerede (%)	33 (36,7)	17 (19,1)	–
Median (95 % CI)	10,9 (7,0, 16,2)	3,6 (2,0, 5,8)	–



Figur 21. Kaplan-Meier-diagram af PFS ud fra behandling hos *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-vævspositive *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasmapositive patienter.

Tabel 31. Prævalens af *PIK3CA*-mutationer, som blev påvist med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit i plasmaprøver i det kliniske forsøg SOLAR-1

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

* En *PIK3CA*-mutationspositiv patient kan have mere end én mutation.

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

N = antal *PIK3CA*-mutationspositive patienter identificeret ud fra plasmaprøve i SOLAR-1.

Konklusioner om sikkerhed og effektivitet

Den kliniske nøjagtighedsundersøgelse opfyldte acceptkriterierne for PPA for mutationspositive prøver og NPA for mutationsnegative prøver, hvilket bekræftede, at plasmaprøverne med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit genererede nøjagtige resultater for både biomarkør-positive og -negative prøver for tilsigtet brug.

Overensstemmelsen mellem resultaterne for plasmaprøver med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit og vævsprøver med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit for NPA var 97 % og viste en lav risiko for falsk positive prøver. Et falsk negativt resultat kan forhindre en patient i at få adgang til behandling med et potentielt gavnligt lægemiddel. Der var 55 % PPA for plasma/væv, hvilket indikerer, at plasmanegative patienter kan være PIK3CA-mutationspositive med vævsprøver. Når patienternes plasma viste PIK3CA-mutationsnegative resultater med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, skulle der derfor testes en vævsprøve med henblik på bekræftelse af PIK3CA-mutationsstatus.

Den kliniske effektivitet af PIQRAY (alpelisib) i kombination med fulvestrant for den *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit-plasma- PIK3CA-mutationspositive population, identificeret med *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit, blev vist med en anslået reduktion på 46 % i risiko for sygdomsprogression eller død sammenlignet med placebo plus fulvestrant (HR = 0,54, 95 % CI: 0,33, 0,88).

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlsøgningsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. For yderligere information henvises også til siden "Frequently Asked Questions" (Hyppigt stillede spørgsmål) hos vores tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende informationen og protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Markering med "No C_T value" (Ingen C_T-værdi) i positiv kontrol (PC, positive control)

- | | |
|---|---|
| a) Ukorrekt konfiguration af PCR | Kontrollér din pipetteringsplan, og gentag PCR'en. |
| b) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med de instruktioner, der er angivet i "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 22 | Kontrollér opbevaringsbetingelserne for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt kit. |

Markering for "Unexpected C_T value" (Uventet C_T-værdi) i NTC

Der forekom kontamination under klargøring af PCR	Kontrollér, at området er blevet dekontamineret. Gentag PCR'en med nye reagenser. Hvis det er muligt, skal PCR-rørene lukkes straks efter tilsætning af den prøve, der skal testes. Sørg for, at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.
---	---

Markering for "Above acceptable range" (Over acceptabelt område) eller "Below acceptable range" (Under acceptabelt område) i PC

Der opstod en fejl under klargøring af PCR'en	Gentag PCR med nøjagtig pipettering.
---	--------------------------------------

Markering for "DNA input too high" (DNA-input for højt) i prøverøret

Prøven er for koncentreret	Fortynd prøven for at øge C _T -værdi. Prøver skal fortyndes med det vand, der medfølger i kittet (vand til fortynding [Dil.]).
----------------------------	---

Markering for "Above acceptable range" (Over acceptabelt område) i prøverøret

Utilstrækkeligt DNA-startskabelon i prøven

Vævsprøver: Udført testen én gang til. Hvis systemet viser det samme flag endnu en gang, skal DNA re-ekstraheres ved hjælp af to objektglas fra samme prøve af reseceret væv og et tilstrækkeligt antal objektglas for CNB-prøver til, at der kan opnås 20 mm², hvorefter PCR-kørslen gentages. Hvis systemet efter re-ekstraktion viser det samme flag for prøven, skal der udføres en ny test. Hvis flaget vises igen, er prøven ikke egnet til brug. Den skal i så fald registreres som "ubestemmelig", og der skal ikke udføres yderligere test.

Plasmaprøver: Udført testen én gang til. Hvis systemet viser det samme flag endnu en gang, skal DNA re-ekstraheres ved hjælp af 2 ml patientplasma. Hvis systemet efter re-ekstraktion viser det samme flag for prøven, er den ikke egnet til brug. Den skal i så fald registreres som "ubestemmelig", og der skal ikke udføres yderligere test. Gentag eventuelt testen med en ny blodplasmaprøve.

Markering for "IC above acceptable range" (IC over acceptabelt område) i prøverøret

Der opstod en fejl under klargøring af PCR'en, eller der er en hæmmer i reaktionen

Vævsprøver: Udført testen én gang til. Hvis systemet viser det samme flag endnu en gang, skal DNA re-ekstraheres ved hjælp af to objektglas fra samme prøve af reseceret væv eller et tilstrækkeligt antal objektglas for CNB-prøver til, at der kan opnås 20 mm², hvorefter PCR-kørslen gentages. Hvis systemet efter re-ekstraktion viser det samme flag for prøven, skal der udføres en ny test. Hvis flaget vises igen, er prøven ikke egnet til brug. Den skal i så fald rapporteres som "ubestemmelig", og der skal ikke udføres yderligere test.

Plasmaprøver: Udført testen én gang til. Hvis systemet viser det samme flag endnu en gang, skal DNA re-ekstraheres ved hjælp af 2 ml patientplasma. Hvis systemet efter re-ekstraktion viser det samme flag for prøven, er den ikke egnet til brug. Den skal i så fald registreres som "ubestemmelig", og der skal ikke udføres yderligere test. Gentag eventuelt testen med en ny blodplasmaprøve.

Markering med "No C_T value" (Ingen C_T-værdi) i T1-kontrol (prøve)

Ingen amplificerbar DNA-skabelon i prøven

Vævsprøver: Udført testen én gang til. Hvis systemet viser det samme flag endnu en gang, skal DNA re-ekstraheres ved hjælp af to objektglas fra samme prøve af reseceret væv og et tilstrækkeligt antal objektglas for CNB-prøver til, at der kan opnås 20 mm², hvorefter PCR-kørslen gentages. Hvis systemet efter re-ekstraktion viser det samme flag for prøven, skal der udføres en ny test. Hvis flaget vises igen, er prøven ikke egnet til brug. Den skal i så fald registreres som "ubestemmelig", og der skal ikke udføres yderligere test.

Plasmaprøver: Udført testen én gang til. Hvis systemet viser det samme flag endnu en gang, skal DNA re-ekstraheres ved hjælp af 2 ml patientplasma. Hvis systemet efter re-ekstraktion viser det samme flag for prøven, er den ikke egnet til brug. Den skal i så fald registreres som "ubestemmelig", og der skal ikke udføres yderligere test. Gentag eventuelt testen med en ny blodplasmaprøve.

Litteraturhenvisninger














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

Kontaktoplysninger

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

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
	Mærkning efter europæisk standard
	Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> reaktioner
	Holdbarhedsdato
	medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Beskyt mod direkte lys
	Globalt handelsvarenummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen (håndbog), og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning

Symbol

Symboldefinition



Producent



Læs brugsanvisningen



Forsigtig

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
<i>therascreen</i> PIK3CA RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaktioner: 6 reaktionsblandinger, positiv kontrol, <i>Taq</i> DNA-polymerase, vand til NTC og vand til fortynding af prøven	873111
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargøringer: QIAamp MinElute®-kolonner, proteinase K, buffere og indsamlingsrør (2 ml)	60404
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit		
QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit (50)	Til 50 DNA-klargøringer: QIAamp MinElute-kolonner, proteinase K, buffere og Collection Tubes (2 ml)	61504
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse ikke inkluderet	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: inklusive 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse	9002033

PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 tyndvæggede rør til 1000 reaktioner på 20-50 µl	981005
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 72 x 0,1-ml rør	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml PCR Tubes	Aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktion med en etkanalspipette i 96 x 0,2-ml PCR-rør	9018905
72-Well Rotor	Til opbevaring af Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, reaktionsvolumener på 10-50 µl; kræver Locking Ring 72-Well Rotor	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Til at låse Strip Tubes and Caps, 0.1 ml i 72-Well Rotor	9018904
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Til ctDNA-oprensning	19413
QIAvac Connecting System	Til ctDNA-oprensning	19419
Vacuum Pump	Til ctDNA-oprensning; eller tilsvarende pumpe, der kan frembringe et vakuum på -800 til -900 mbar	84010

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser findes i håndbogen eller brugervejledningen til det pågældende QIAGEN-kit. Håndbøger og brugervejledninger til QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGENS tekniske service eller den lokale distributør.

Revisionshistorik for dokumentet

Dato	Ændringer
R1, juni 2019	Første udgivelse
R2, september 2019	Rettelse til kolonnen Hyppighed i Tabel 15; Rettet typografiske fejl; Layoutopdateringer

Siden er med vilje tom

Siden er med vilje tom

Aftale om begrænset licens til *therascreen* PIK3CA RGQ PCR Kit

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

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

Meddelelse til køberen: Ved køb af dette produkt tildeles køber samtidig en begrænset ret, som ikke kan videregives til andre, til brug af den pågældende mængde af produktet til udførelse af den patentbeskyttede proces med peptidnukleinsyre (peptide nucleic acid, PNA) alene med henblik på købsrelaterede aktiviteter inden for området human diagnostik i henhold til den medfølgende QIAGEN-brugsanvisning eller -indlægseddél. Ved køb af dette produkt erklærer køber sig indforstået med, at følgende ikke er tilladt: (1) videresalg af produktet i nogen som helst form, (2) brug af produktet til retsmedicinske formål og (3) brug af produktet til andre formål end dem, der er angivet i denne licens til begrænset brug. Yderligere oplysninger om anskaffelse af rettigheder i henhold til patenter, som tilhører Applied Biosystems LLC, kan fås ved henvendelse til vores afdeling for licenser (Licensing Department, Thermo Fisher Scientific, 5791 Van Allen Way, Carlsbad CA 92008: phone (760) 603-7200: email outlicensing@lifetech.com).

Opdaterede licensvilkår og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser kan ses på adressen www.qiagen.com.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager®, *therascreen*® (QIAGEN Group); DNAzap™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.); PIQRAY® (Novartis AG). Registrerede navne, varemærker osv. anvendt i dette dokument må ikke, selv når de ikke specifikt er markeret som sådan, betragtes som værende juridisk ubeskyttede.

1116336 Sep-19 HB-2635-001 © 2019 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com