

Juni 2020

Handbok för *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit



Version 2



För in vitro-diagnostisk användning

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



874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, Tyskland



1121935SE

Innehåll

Avsedd användning	5
Sammanfattning och förklaring	6
Testprincipen	9
Material som medföljer	13
Kitinnehåll	13
Material som behövs men inte medföljer	14
Varningar och försiktighetsåtgärder	16
Allmänna säkerhetsåtgärder	16
Förvaring och hantering av reagenser	18
Leveransvillkor	18
Förvaring	18
Hantering och förvaring av prover	20
Procedur	21
Extraktion och beredning av DNA	21
Protokoll: Provbedömning	22
Protokoll: EGFR-mutationsdetektion	34
Tolkning av resultat (automatiskt)	47
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR-analyspaketets flaggor	49
Felsökningsguide	53
Kvalitetskontroll	54
Begränsningar	54

Prestandaegenskaper	56
Analytisk prestanda	56
Blankgräns (Limit of Blank, LOB), arbetsintervall, cutoff-värden och ΔC_T -cutoff-intervall	56
Effekt av DNA-input på ΔC_T -värden	57
Korsreaktivitet	57
Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod	58
Värden för detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)	59
Interferens	61
Reproducerbarhet	62
Klinisk prestanda	66
Kliniska resultatdata: GIOTRIF®	66
Kliniska resultatdata: IRESSA®	68
Referenser	70
Symboler	72
Bilaga A: Manuellt protokoll för <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit	73
Allmän information	73
Protokoll: Skapa en temperaturprofil	73
Procedur (manuell)	84
Protokoll: Provbedömning (manuell)	84
Protokoll: EGFR-mutationsdetektion (manuell)	84
Protokoll: konfiguration av <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q	85
Tolkning av resultat (manuellt)	90
Programinställningar för analys	90

Analys av provbedömningsdata	92
Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata	93
Bilaga B: Installation av <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package	101
Kontaktinformation	104
Beställningsinformation	105
Dokumentrevisioner	107

Avsedd användning

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är ett in vitro-diagnostiskt test för detektion av 29 somatiska mutationer i EGFR-genen. Det ger en kvalitativ bedömning av mutationsstatusen i tumörprover tagna från patienter med icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Resultaten ska hjälpa läkarna att identifiera patienter med NSCLC som är sannolikt lämpade för behandling med EGFR-tyrosinkinashämmare.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit testar DNA-prover som extraherats från formalinfixerad paraffinbäddad (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) tumörvävnad tagen från patienter med NSCLC, och körs på ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Det ska användas av utbildad personal i en professionell laboratoriemiljö.

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

Sammanfattning och förklaring

Mutationer i EGFR-onkogenen förekommer i cancerformer hos människor (1, 2). Förekomsten av de här mutationerna korrelerar med respons på behandling med vissa tyrosinkinashämmare (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) hos patienter med NSCLC (3–8). Sådana mutationer i EGFR-onkogenen förekommer hos den allmänna populationen av patienter med NSCLC, med en frekvens på ca 10 % hos patienter från USA, Europa eller Australien och upp till 30 % hos patienter från Japan och Taiwan (1, 2, 9).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är ett kit färdigt för användning för detektion av 29 mutationer i den cancerrelaterade EGFR-genen med PCR-teknik (Polymerase Chain Reaction, PCR) på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Med teknikerna Scorpions® (10) och ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (11) möjliggör *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit detektion av 29 mutationer i exon 18, 19, 20 och 21 i EGFR-onkogenen mot en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA (tabell 1).
Sammanfattningsvis:

- 19 borttagningar i exon 19 (detekterar närvaron av vilken som helst av de 19 borttagningarna men särskiljer dem inte)
- Tre tillägg i exon 20 (detekterar närvaron av vilket som helst av de tre tilläggen men särskiljer dem inte)
- G719X (detekterar närvaron av G719S, G719A eller G719C men särskiljer dem inte)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

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

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basskifte
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Borttagningar	12384	2237_2255>T
		12387	2239_2258>CA
		12419	2238_2252>GCA
		12422	2238_2248>GC
		13551	2235_2252>AAT
		12678	2237_2251del15
		6218	2239_2247del9
		12728	2236_2253del18
		12367	2237_2254del18
		6210	2240_2251del12
		6220	2238_2255del18
		6223	2235_2249del15
		6225	2236_2250del15
		6254**	2239_2253del15
		6255	2239_2256del18
		12369**	2240_2254del15
		12370	2240_2257del18
12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C		
12383	2239_2251>C		

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]:
<http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basskifte
20	S768I	6241	2303G>T
	Tillägg	12376	2307_2308insGCCAGCGTG
		12378	2310_2311insGGT
		12377	2319_2320insCAC
	T790M	6240	2369C>T
21	L858R	6224	2573T>G
	L861Q	6213	2582T>A

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

** Mutationerna COSM6254 (2239_2253del15) och COSM12369(2240_2254del15) resulterar i borttagning av 15 baspar från EGFR-sekvensen. Samma slutsekvens genereras av bägge mutationerna och de går inte att skilja åt från varandra. Därmed har mutationen COSM6254 (2239_2253del15) tagits bort från den senaste versionen av COSMIC (v83) och bägge mutationer representeras av COSM12369 (2240_2254del15). Det här följer HGVS-riktlinjen för att representera den mesta 3'-borttagningen. *therascreen* EGFR-testet skiljer inte mellan någon av de 19 borttagningsmutationerna och alla positiva borttagningar kallas "Deletions" [Borttagningar]. Den här ändringen påverkar enbart dokumentationen och inte kitet eller dess förmåga att detektera enskilda mutationer.

Testprincipen

therascreen EGFR RGQ PCR Kit består av åtta separata PCR-amplifieringsreaktionsmixar: sju mutationsspecifika reaktioner i exon 18, 19, 20 och 21 i EGFR-onkogenen och en vildtyp-kontroll i exon 2. De viktigaste komponenterna i kitet förklaras nedan.

ARMS

Allel- eller mutationsspecifik amplifiering uppnås med hjälp av ARMS. *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) är effektivt när det gäller att skilja på en matchning och en felmatchning vid 3'-ändan av en PCR-primer. Specifikt muterade sekvenser amplifieras selektivt, även i prover där majoriteten av sekvenserna inte bär på mutationen. När primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3'-basen inte matchar sker endast bakgrundsamplifiering på låg nivå.

Scorpions

Detektion av amplifiering utförs genom att använda Scorpions. Scorpions är bifunktionella molekyler med en PCR-primer som är kovalent bunden till en prob. Fluoroforen i proben samverkar med en quencher, även den integrerad i proben, som minskar fluorescensen. När proben binder till amplikonet under PCR separeras fluoroforen och quenchern, vilket leder till en detekterbar ökning av fluorescensen.

Kitets format

Åtta analyser ingår i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit:

- En kontrollanalys (CTRL)
- Sju mutationsanalyser

Samtliga reaktionsmixar innehåller reagenser för att detektera mål som är märkta med karboxyfluorescein (FAM™), och en intern kontrollanalys som är märkt med hexaklorofluorescein (HEX™). Den interna kontrollanalysen möjliggör detektion av hämmare, vilka kan leda till att ett falskt negativt resultat uppstår. FAM-amplifiering kan konkurrera ut internkontrollamplifieringen och syftet med internkontrollen är helt enkelt att visa att om det inte finns någon FAM-amplifiering är resultatet sant negativt och inte en misslyckad PCR-reaktion.

Analyser

therascreen EGFR RGQ PCR Kit består av en procedur i två steg. I det första steget utförs kontrollanalysen för att bedöma den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov. I det andra steget utförs både mutations- och kontrollanalyser för att bestämma förekomst eller frånvaro av mutant-DNA.

Kontrollanalys

Kontrollanalysen, märkt med FAM, används för att bedöma den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 2 i EGFR-genen. Primrarna och Scorpions-proberna har utformats så att de undviker kända EGFR-polymorfismer.

Mutationsanalys

Varje mutationsanalys innehåller en FAM-märkt Scorpions-prob och en ARMS-primer för urskiljning mellan vildtyps-DNA och ett specifikt mutant-DNA.

Kontroller

Obs! Alla experimentkörningar måste innehålla positiva och negativa kontroller.

Positiv kontroll

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1–8. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit innehåller EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) som ska användas som mall i den positiva kontrollreaktionen. De positiva kontrollresultaten bedöms för att garantera att kitet fungerar inom de angivna acceptanskriterierna.

Negativ kontroll

Varje körning måste innehålla en negativ kontroll ("kontroll utan mall": No Template Control, NTC) i rör 9–16. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit innehåller vatten för NTC som ska användas som "mall" i kontrollen utan mall. Kontrollen utan mall används för att bedöma potentiell kontaminering under körningskonfigurationen samt för att bedöma effekten hos den interna kontrollreaktionen.

Bedömning av internkontrollreaktion

Varje reaktionsmix innehåller en internkontroll (Internal Control, IC) utöver målreaktionen. Ett misslyckande indikerar antingen förekomst av hämmare som kan leda till ett felaktigt resultat eller en felaktig hantering av det aktuella röret vid förberedelsen. IC använder en icke-EGFR-relaterad oligonukleotid-målsekvens, en omärkt primer och en Scorpions-primer märkt med HEX för att särskilja den från FAM-märkta Scorpions-primers i kontroll- och mutationsreaktionerna. FAM-amplifiering kan konkurrera ut IC-amplifieringen så att det genererade IC C_T (HEX)-värdet kan hamna utanför angivet intervall. FAM-resultaten är fortfarande giltiga för dessa prover.

Provbedömning

Vi rekommenderar starkt att använda kontrollreaktionsmixen (CTRL-rör) som medföljer *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit för att bedöma den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 2 i EGFR-genen. Vi rekommenderar iordningställande av prover med endast kontrollanalysen och att använda EGFR PC som en positiv kontroll och vatten för "mallen" som kontroll utan mall.

Obs! DNA-bedömningar bör baseras på PCR och kan variera i kvantifiering beroende på avläsningar av absorbans. Extra kontrollreaktionsmix (CTRL-rör) medföljer för bedömning av kvalitet och kvantitet av DNA i prover innan analysen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Plattform och programvara

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är särskilt utformat för att användas med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet är programmerat för olika cykelparametrar eller "körningar" med hjälp av *therascreen* EGFR CE Assay Package.

therascreen EGFR CE Assay Package består av två mallar: "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (för provbedömning) och "therascreen EGFR CE Locked Template" (för detektion av EGFR-mutationer). De här mallarna innehåller PCR-körningsparametrarna och beräknar resultaten.

Det är även möjligt att använda *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit med programmet Rotor-Gene Q version 2.3 i öppet läge (dvs. utan Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Mer information finns i Bilaga A: Manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Material som medföljer

Kitinnehåll

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Katalognr.				874111
Antal reaktioner				24
Färg	Identitet	Rör-ID		Volym
Röd	Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix)	1	CTRL	2 × 600 µl
Lila	T790M Reaction Mix (T790M-reaktionsmix)	2	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (reaktionsmix för borttagningar)	3	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R-reaktionsmix)	4	L858R	600 µl
Grön	L861Q Reaction Mix (L861Q-reaktionsmix)	5	L861Q	600 µl
Gul	G719X Reaction Mix (G719X-reaktionsmix)	6	G719X	600 µl
Grå	S768I Reaction Mix (S768I-reaktionsmix)	7	S768I	600 µl
Blå	Insertions Reaction Mix (Reaktionsmix för tillägg)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-positiv kontroll)	9	Positiv kontroll	300 µl
Mintfärgad	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeras)	Taq	2 × 80 µl	2 × 80 µl
Vit	Nuclease-free water for No Template Control (Nukleasfritt vatten för kontroll utan mall)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Vit	Nuclease-free water for Dilution (Nukleasfritt vatten för spädning)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
<i>Handbok för theascreen EGFR RGQ PCR Kit</i>				1

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Reagenser

- DNA-extraktionskit (se Extraktion och beredning av DNA)

Förbrukningsartiklar och allmän laboratorieutrustning

- Pipetter avsedda* (justerbara) för provberedning
- Särskilda pipetter* (justerbara) för beredning av PCR-huvudmix
- Särskilda pipetter* (justerbara) för dosering av DNA-mall
- DNase-, RNase- och DNA-fria pipettspetsar med filter (för att undvika korskontaminering, pipettspetsar med aerosolbarriär rekommenderas)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, för användning med 72-well rotor (kat.nr. 981103 eller 981106)
- DNase-, RNase- och DNA-fria mikrocentrifugrör för beredning av huvudmixar
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett (kat.nr 9018901)
- Termomixer*, uppvärmd skakinkubator*, värmeblock* eller vattenbad* som klarar inkubation på 90 °C
- Bänkcentrifug* med rotor för 2ml-reaktionsrör
- Vortexblandare*

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

Utrustning för PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Yellow (detektion av FAM respektive HEX) * †
- Programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller högre
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package, version 3.0.6 (finns tillgängligt för nedladdning på produktwebbsidan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Version 2 på www.qiagen.com. Navigera till Product Resources [Produktresurser] > Supplementary Protocols [Tilläggsprotokoll] om du vill ladda ner analyspaketet.)

Obs! Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package-programvaran kräver programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare.

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

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

Varningar och försiktighetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

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

Säkerhetsinformation om instrumentet Rotor-Gene Q finns i användarmanualen som medföljer instrumentet.

Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsregler.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Lägg alltid särskild vikt vid följande.

- Testet är avsett för användning med FFPE NSCLC-vävnadsprover.
- Förvara och extrahera positivt material (prover och positiva kontroller) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem i reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Iakttag största försiktighet för att förhindra att PCR kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial. Vi rekommenderar att separata, för ändamålet avsedda, pipetter används för iordningställande av reaktionsmixar och tillsats av DNA-mall. Beredning och fördelning av reaktionsmixar ska utföras i ett område avskilt från området där mall tillsätts. Rotor-Gene Q-rör får inte öppnas efter att PCR-körningen har avslutats. Detta för att förhindra laboratoriekontaminering från produkter efter PCR-körningen.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.

-
- Reagenser till *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit har späts ut optimalt. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda. Använd inte reaktionsvolym (reaktionsmix plus prov) på mindre än 25 µl då det ökar risken för ett falskt negativt resultat.
 - Alla reagenser som medföljer *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Byt inte ut reagenserna i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit eller mellan olika *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit eftersom prestandan då kan påverkas.
 - Använd endast det *Taq* DNA-polymeras (*Taq*-rör) som medföljer i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Byt inte ut det mot *Taq* DNA-polymeras från andra kit av samma typ eller annan typ, och byt inte heller ut det mot *Taq* DNA-polymeras från en annan leverantör.
 - Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Obs! Iaktta försiktighet med betoning på att undvika felaktig provinmatning, laddningsfel och pipetteringsfel för att säkerställa korrekt provtestning.

Obs! Reagenserna är validerade för manuellt iordningställande. Om en automatisk metod används kan antalet möjliga reaktioner minska eftersom reagenserna måste fylla "dödvolymer" på dessa instrument.

Förvaring och hantering av reagenser

Leveransvillkor

therascreen EGFR RGQ PCR Kit levereras på torris och måste frysas vid ankomst. Om *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit inte är fruset vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, handbok, eller reagenser i leveransen ska du kontakta QIAGENs tekniska serviceavdelning eller din lokala distributör (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Förvaring

therascreen EGFR RGQ PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 till -15 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus. Scorpions (liksom alla fluorescensmärkta molekyler) måste skyddas mot ljus för att undvika fotoblekning och förlorad prestanda. Vid korrekt förvaring i originalförpackningen enligt rekommendationerna är kitet hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15 °C i 12 månader eller som längst fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Vi rekommenderar att kitet tinas högst åtta gånger.

Reagenserna måste tinas i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme och maximalt 4,5 timmar. När reagenserna är klara för användning kan PCR-reaktionerna göras i ordning och Rotor-Gene Q-rören som innehåller huvudmixarna och DNA-provet ska omgående laddas i ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Den totala tiden från start av PCR-konfigurationen till körningens start ska inte överskrida:

-
- 6 timmar vid förvaring i rumstemperatur

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

- 18 timmar vid förvaring i kyl (2–8 °C)

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

Obs! För garanterad optimal aktivitet och effekt måste Scorpions (liksom alla fluorescensmärkta molekyler) skyddas mot ljus för att undvika fotoblekning.

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

Hantering och förvaring av prover

Obs! Alla prover måste behandlas som potentiellt infektiöst material.

Provmaterialiet måste vara mänskligt, genomiskt DNA extraherat från FFPE-vävnad. Proverna måste transporteras enligt standardmässig patologisk metod för att garantera provets kvalitet.

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

Så här förbereder du vävnadsprover för DNA-extraktion:

- Använd standardmaterial och -metoder och fixera vävnadsprovet i 10 % neutralbuffrat formalin (NBF) och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- Låt en utbildad person (t.ex. en patolog) bedöma ett H&E-färgat (Hematoxilyn & Eosin) snitt för att bekräfta förekomst av tumör.
- De färgade snitten får inte användas för DNA-extraktion.
- Förvara alla FFPE-block och objektglas i rumstemperatur (15–25 °C). Objektglas kan förvaras i rumstemperatur i upp till 1 månad innan DNA-extraktion.

Procedur

Extraktion och beredning av DNA

Prestandaegenskaper för kitet togs fram med hjälp av DNA som extraherats med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 60404). Den här satsen ska användas för DNA-beredning, om det är tillgängligt i ditt land. Om du använder QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 56404) som har likvärdig funktion, utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande:

- Använd inte QIAGENs Deparaffinization Solution. Använd endast xylen-/etanolmetoden för deparaffinisering enligt beskrivningen i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Använd etanol som är avsedd för molekylärbio­logibruk* för alla steg.
- Skrapa ned hela vävnadsområdet från två snitt i ett märkt mikrocentrifugrör med hjälp av en ny skalpell för varje prov.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 11 i *handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) måste utföras i 1 timme \pm 5 minuter i $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 12 i *handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) måste utföras i 1 timme \pm 5 minuter i $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Använd inte RNase-steget som beskrivs i *handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Proverna måste elueras med 120 μl elueringsbuffert (ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (steg 20 i *handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*).
- Genomiskt DNA kan förvaras i $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1 vecka efter extraktion, eller i -30 till $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i upp till 8 veckor innan användning.

Obs! Alla analyser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ger korta PCR-produkter. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit fungerar emellertid inte på mycket fragmenterat DNA.

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

Protokoll: Provbedömning

Det här protokollet ska användas vid bedömning av den totala mängden amplifierbart DNA i prover med "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" i Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package för automatisk provanalys.

Obs! Information om manuell bedömning av DNA-prover finns i Bilaga A: *Manuellt* protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Viktigt att tänka på före start

- För att erhålla korrekta resultat, se till att det beskrivna blandningsförfarandet utförs vid varje blandningssteg i analyskonfigurationen.
- Upp till 24 prover kan bedömas med den tillgängliga kontrollreaktionsmixen.
- Innan du startar proceduren ska du läsa avsnittet Allmänna säkerhetsåtgärder.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM innan du startar protokollet. Se användarmanualen till instrumentet.
- Vortexblanda inte *Taq* DNA-polymeraset (*Taq*-rör) eller någon mix som innehåller *Taq* DNA-polymeras, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* genom att placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.
- Använd kontrollreaktionsmix (CTRL-rör) för att bedöma DNA innan testning.
Obs! Det är viktigt att använda kontrollreaktionsmix enligt beskrivningen nedan för den här bedömningen och inte spektrofotometri eller någon annan metod. Kraftigt nedbrutet DNA kanske inte amplifieras fastän primrarna genererar korta DNA-fragment.
- För effektiv användning av reagenserna i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ska DNA-proverna indelas i batcher i så stor utsträckning som möjligt för att skapa fullständiga körningar. Testning av enskilda prover eller ett mindre antal prover ökar förbrukningen av reagenser och minskar det totala antal prover som kan testas med ett enstaka *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Saker som måste göras före start

- Kontrollera att *therascreen* EGFR CE Assay Package-programvaran är installerad innan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet används första gången (se Bilaga B: Installation av *therascreen* EGFR CE Assay Package).
- Före varje användning måste alla reagenser tinas ordentligt i minst 1 timme och högst 4,5 timmar i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom att vända 10 gånger och centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Se till att *Taq* håller rumstemperatur (15–25 °C) före varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.
- Blanda genom att vända 10 gånger och centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.

Procedur

1. Tina kontrollreaktionsmix (CTRL), nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (No Template Control, NTC) och EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme och högst 4,5 timmar.

Tiderna för upptining av reagenser, PCR-konfiguration och förvaring innan start av körningen anges i tabell 2.

Tabell 2. Upptiningstider, tider för PCR-konfiguration och förvaringstemperaturer

Minsta upptiningstid	Max upptiningstid	Förvaringstemperatur efter PCR-konfiguration	Maximal tid för PCR-konfiguration och förvaring
1 h	4,5 h	Rumstemperatur (15–25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2-8 °C	18 h

Obs! PCR-konfiguration utförs i rumstemperatur (15–25 °C). Termen "förvaring" avser tiden mellan slutförande av PCR-konfigurationen och start av PCR-körningen på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Obs! Få upp *Taq* till rumstemperatur (15–25 °C) samtidigt som de andra reagenserna (se Förvaring och hantering av reagenser). Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

2. När reagenserna har tinat ska du blanda dem genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer och sedan centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
3. Bered tillräckligt med huvudmix för kontroll (kontrollreaktionsmix [CTRL] plus *Taq*) för DNA-proverna, en EGFR PC-reaktion och en NTC-reaktion enligt volymerna som anges i tabell 3. Inkludera reagenser för ett extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Obs! Huvudmixen innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Tabell 3. Beredning av huvudmix för kontrollanalys

Komponent	Volym
Kontrollreaktionsmix (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
<i>Taq</i> DNA-polymeras (<i>Taq</i>)	0,5 µl × (n + 1)
Total volym	20 µl/reaktion

* n = antal reaktioner (prover plus kontroller). Bered tillräckligt med huvudmix för ett extra prov (n + 1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen. Värdet n ska inte överstiga 26 (24 prover plus 2 kontroller).

Obs! Vid beredning av huvudmixen läggs den volym kontrollreaktionsmix som krävs till i det aktuella röret först och *Taq* läggs till sist.

4. Blanda huvudmixen noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Placera det korrekta antalet rör i laddningsblocket enligt layouten i tabell 4. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje PCR-rör.

Locken ligger kvar i sin plastbehållare tills de behövs. För bedömning av DNA-prover ska huvudmix för kontrollanalys tillsättas i ett PC-rör, ett NTC-rör och i ett rör för varje prov.

Tabell 4. Layout för DNA-provbedömningsanalyser i laddningsblocket. Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

Analys	Position								
Kontroll	1 [PC]	9	17	25	-	-	-	-	-
Kontroll	2 [NTC]	10	18	26	-	-	-	-	-
Kontroll	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Kontroll	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Kontroll	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Kontroll	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Kontroll	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Kontroll	8	16	24	-	-	-	-	-	-

5. Tillsätt omedelbart 5 µl vatten för NTC i röret i position 2 och förslut röret.
6. Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (rörpositionerna 3–26) och förslut rören.
7. Tillsätt 5 µl EGFR PC i röret i position 1 och förslut röret.

Obs! Var noga med att inte göra fel vid laddning eller pipettering så att du säkerställer att rätt mängd NTC, prover och PC tillsätts i rätt rör. Markera rörens lock för att visa i vilken riktning rören ska laddas på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

8. När alla PCR-rör har förslutits ska du göra en visuell kontroll av provrörens fyllnadsnivå för att säkerställa att prov har tillsatts i alla rör.
9. Vänd alla PCR-rör 4 gånger för att blanda prover och reaktionsmixar.
10. Placera PCR-rören på remsa i sina korrekta positioner i 72-well rotorn enligt layouten i tabell 4.

Om rotorn inte är fullbelagd fyller du alla tomma positioner på rotorn med förslutna, tomma rör.

11. Placera omedelbart 72-Well rotorn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Se till att låsringen (tillhör till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.

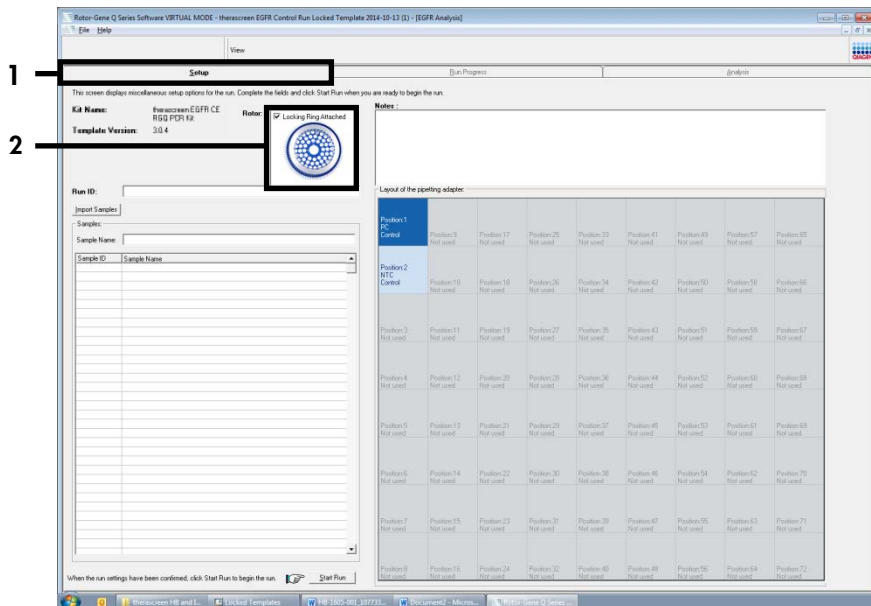
Obs! Om du använder manuell bedömning av prover, se information i Bilaga A: *Manuell* protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

12. Starta Rotor-Gene Q-programvaran genom att dubbelklicka på ikonen *therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template [therascreen EGFR CE låst mall för kontrollkörning] på skrivbordet till den dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx-instrumentet (Figur 1).



Figur 1. EGFR CE EGFR CE låst mall -ikon för kontrollkörning (bedömning av prover).

13. Fliken "Setup" [Konfiguration] öppnas som standard (Figur 2). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera sedan kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.



Figur 2. Fliken "Setup" [Konfiguration] (1) och rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast] (2).

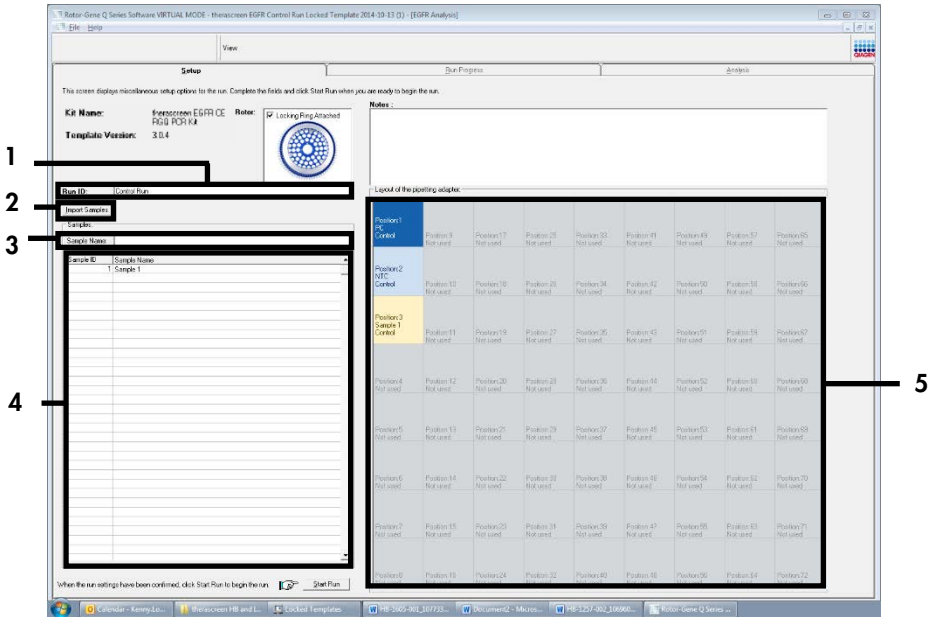
14. Skriv in körnings-ID i fältet Run ID [Körnings-ID] enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i fältet Sample Name [Provnamn] enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur]-tangenten.

Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" [Prov-ID] (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] på höger sida med provnamnet (Figur 3).

Obs! Alternativt kan provnamn som sparats i formaten *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaavgränsade värden) importeras via funktionen "Import Samples" [Importera prover]. Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden.

Obs! Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] att provnamnet som har lagts till markeras genom en ändring av färgen och att provnamnet är i provpositionen (Figur 3).

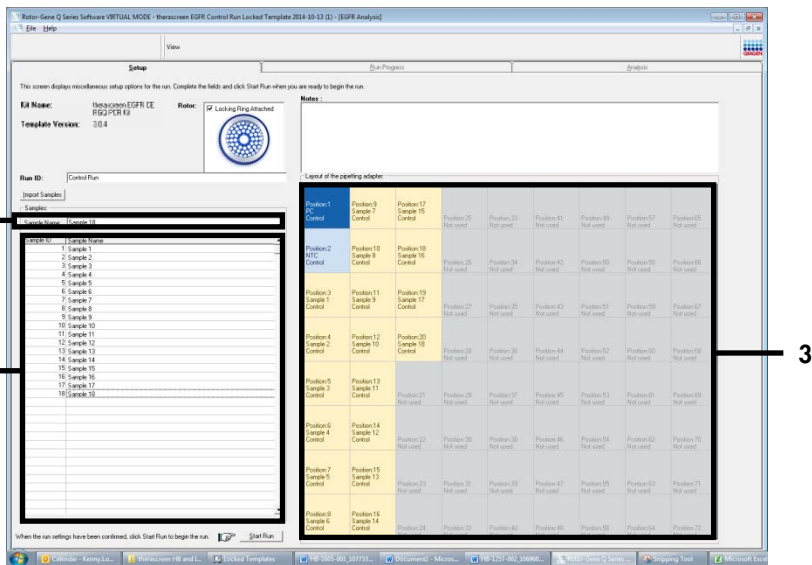
Obs! Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].



Figur 3. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn]. 1 = Dialogfältet "Run ID" [Körnings-ID]; 2 = Panelen "Import Samples" [Importerera prover]; 3 = Dialogfältet "Sample Name" [Provnamn]; 4 = "Sample List" [Provlista]; 5 = Panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].

15. Upprepa steg 14 för att ange namnen på alla ytterligare prover (Figur 4).

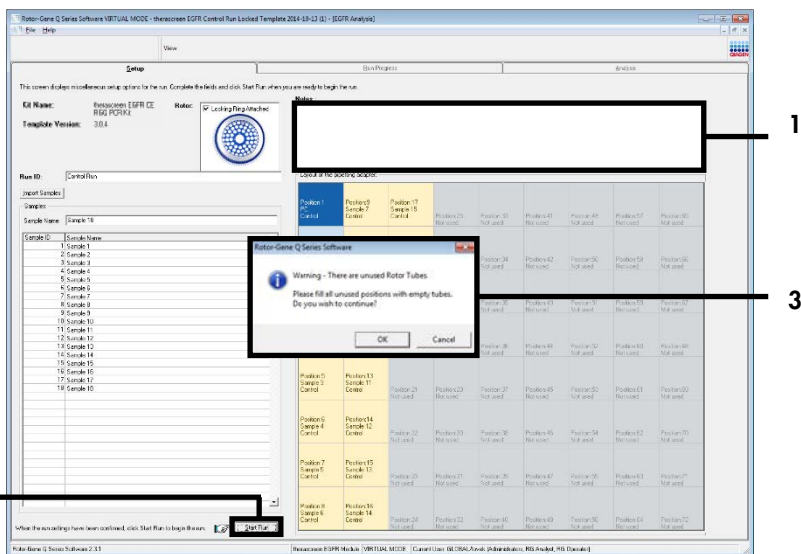
Obs! Om du vill redigera ett provnamn klickar du Sample Name [Provnamn] i provlistan så visas det valda provet i fältet Sample Name [Provnamn] ovan. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur]-tangenten för att uppdatera namnet.



Figur 4. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" [Provnamn], 1 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 2 = "Sample List" [Provlista], 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].

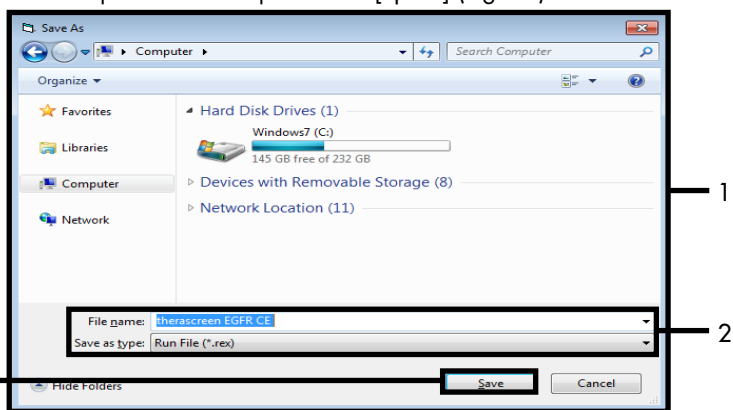
16. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i fältet "Notes" [Anteckningar] om det behövs, klicka sedan på "Start Run" [Starta körning] (Figur 5).

Obs! Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (Figur 5) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med förslutna, tomma rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med förslutna, tomma rör och klicka på OK för att fortsätta. Fönstret "Save As" [Spara som] öppnas.



Figur 5. Fältet "Notes" [Anteckningar] (1), knappen "Start Run" [Starta körning] (2) och "Warning" [Varning] för använda rotorpositioner (3).

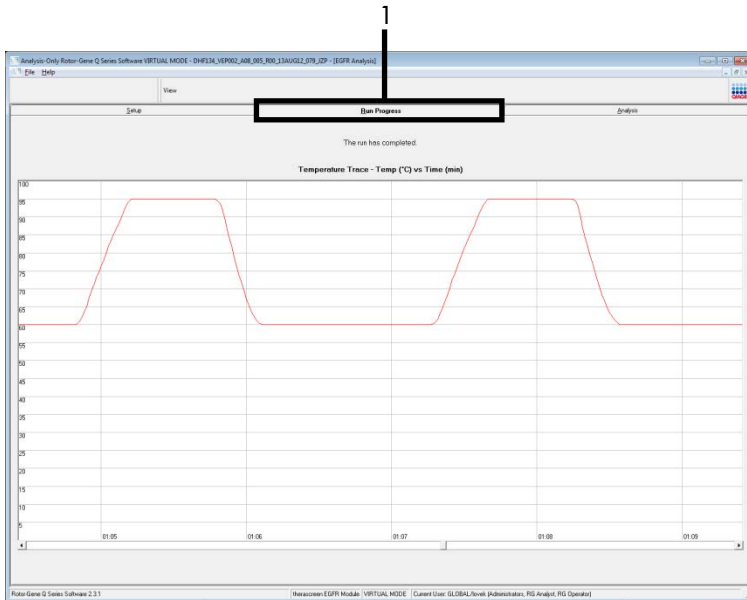
17. Välj ett lämpligt Välja och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen. Klicka på "Save" [Spara] (Figur 6).



Figur 6. Fönstret "Save As" [Spara som] (1), 2 = fältet "File Name" [Filnamn] och "Save as type" [Spara som typ], 3 = "Save" [Spara].

PCR-körningen startar.

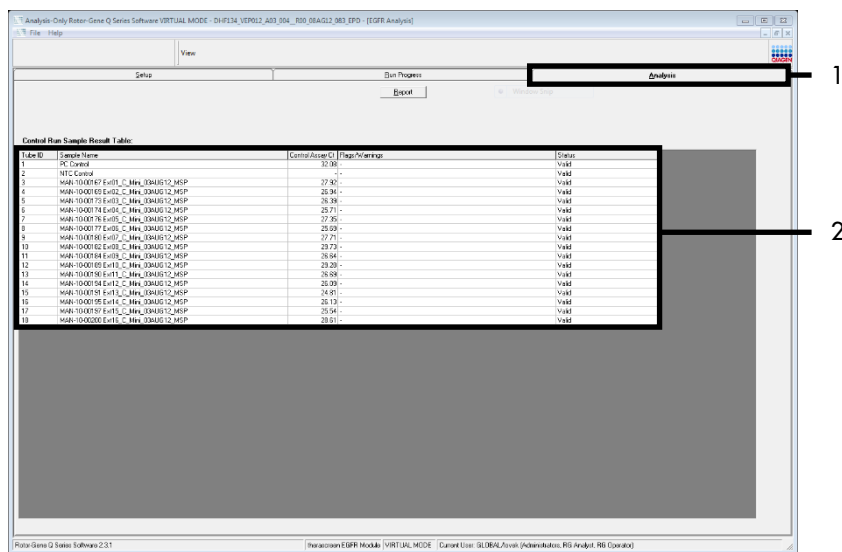
Obs! När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (Figur 7).



Figur 7. Fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] (1).

Obs! När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" [Analys]. Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på den (Figur 8).

Obs! En förklaring av beräkningsmetoden ges i avsnittet "Tolkning av resultat (automatiskt)".



Figur 8. Fliken "Analysis" [Analys] (1) och rapportering av resultat (2 = "Control Run Sample Result Table" [Provsresultattabell för kontrollkörning])

Kontrollresultat rapporteras på följande sätt i "Control Run Sample Result Table" [Provsresultattabell för kontrollkörning] (Figur 8).

Körningskontroller (PC och NTC, rörpositioner 1 respektive 2). Om resultaten ligger inom acceptabla intervaller visas "Valid" [Giltigt]. Annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].

$C_T > 31,10$ för provets kontrollreaktion visas som "Invalid" [Ogiltigt]. Mängden DNA är inte tillräcklig för mutationsanalys. Testa om provet. Om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du mer tumörvävnad om det finns tillgängligt.

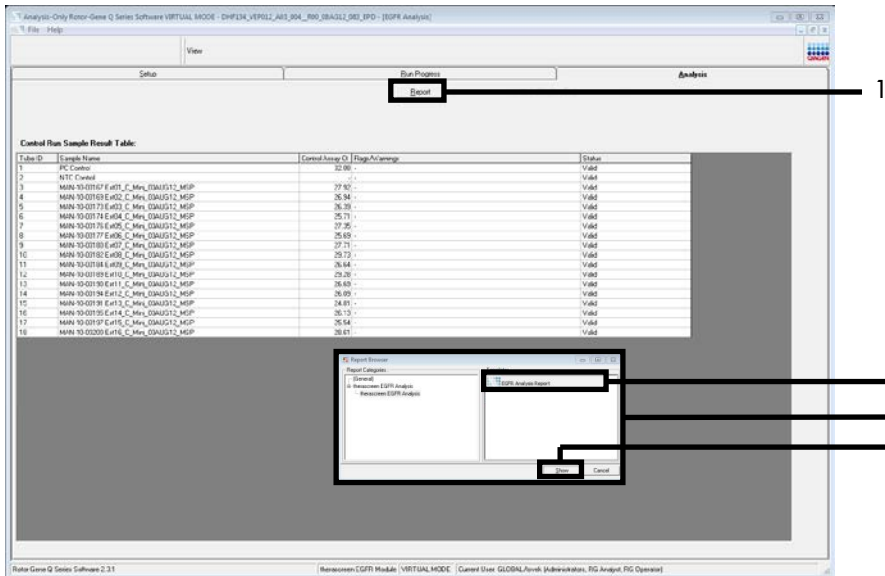
$C_T < 23,70$ för provets kontrollreaktion visas som "Invalid" [Ogiltigt]. DNA-koncentrationen är för hög för mutationsanalys. Späd med nukleasfritt vatten för spädning (Dil.) och gör om testet. Späd till ett C_T -värde på 23,70–31,10. En 1:1-spädning ökar C_T -värdet med ca 1,0.

C_T på 23,70–31,10 för provets kontrollreaktion ($23,70 \leq$ kontroll- C_T -värde $\leq 31,10$) visas som "Valid" [Giltigt]. DNA-koncentrationen är lämplig för mutationsanalys.

Obs! Om det behövs en ny extraktion eller spädning upprepar du kontrollreaktionen för att bekräfta att DNA-koncentrationen är lämplig för användning.

18. Klicka på "Report" [Rapport] om du vill skapa en rapportfil. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] öppnas. Välj "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport] under "Templates" [Mallar] klicka sedan på "Show" [Visa] (Figur 9).

Obs! Om du vill spara rapporter på en annan plats i Web Archives-format klickar du på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



Figur 9. Välj "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport]. 1 = "Report" [Rapport], 2 = fönstret "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = alternativet "EGFR Analysis Report" [EGFR-analysrapport], 4 = "Show" [Visa].

Protokoll: EGFR-mutationsdetektion

Detta protokoll är avsett för detektion av EGFR-mutationer. När ett prov har klarat DNA-provbedömningen kan det testas med EGFR-mutationsanalyser som använder automatisk programvara.

Obs! Information om manuell mutationsdetektion finns i Bilaga A: Manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Viktigt att tänka på före start

- För att erhålla korrekta resultat, se till att det beskrivna blandningsförfarandet utförs vid varje blandningssteg i analyskonfigurationen. Innan du startar proceduren ska du läsa avsnittet Allmänna säkerhetsåtgärder.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM innan du startar protokollet. Se användarmanualen till instrumentet.
- Ett prov kan testas med EGFR-mutationsanalyserna när det har klarat DNA-provbedömningen.
- För effektiv användning av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit måste prover grupperas i en batchstorlek på sju. Mindre batchstorlekar innebär att färre prover kan testas med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Ett prov måste testas med alla reaktionsmixar som medföljer i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Vortexa inte *Taq* eller någon mix som innehåller *Taq* eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* genom att försiktigt placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.

Saker som måste göras före start

- Kontrollera att *therascreen* EGFR CE Assay Package-programvaran är installerad innan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet används första gången (se Bilaga B: Installation av *therascreen* EGFR CE Assay Package).

- Före varje användning måste alla reagenser tinas ordentligt i minst 1 timme och högst 4,5 timmar i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom att vända 10 gånger och centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Blanda genom att vända 10 gånger och centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Se till att *Taq* håller rumstemperatur (15–25 °C) före varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

Procedur

1. Tina alla reaktionsmixrör, vatten för NTC och EGFR PC i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme och högst 4,5 timmar.

Tiderna för upptining av reagenser, PCR-konfiguration och förvaring innan start av körningen anges i tabell 5.

Tabell 5. Upptiningstider, tider för PCR-konfiguration och förvaringstemperaturer

Minsta upptiningstid	Max upptiningstid	Förvaringstemperatur efter PCR-konfiguration	Maximal tid för PCR-konfiguration och förvaring
1 h	4,5 h	Rumstemperatur (15–25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2-8 °C	18 h

Obs! PCR-konfiguration utförs i rumstemperatur (15–25 °C). Förvaring avser tiden mellan slutförande av PCR-konfigurationen och start av PCR-körningen på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Obs! Se till att *Taq* (*Taq*-rör) har rumstemperatur (15–25 °C) samtidigt som de andra reagenserna (se Förvaring och hantering av reagenser). Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

2. När reagenserna har tinat ska du blanda dem genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer och sedan centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.

3. Bered tillräckligt med huvudmixar för analys (analysreaktionsmix plus Taq för DNA-proverna, en EGFR PC- och en NTC-reaktion enligt volymerna som anges i tabell 6. Inkludera reagenser för ett extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Huvudmixarna innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Tabell 6. Beredning av huvudmixar för analys

Analys	Reaktionsmixrör	Volym reaktionsmix	Volym för Taq DNA-polymeras (Taq-rör)
Kontroll	CTRL	19,5 µl × (n + 1)*	0,5 µl × (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Borttagningar	Del	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L858R	L858R	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
L861Q	L861Q	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
G719X	G719X	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
S768I	S768I	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Tillägg	Ins	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)

* n = antal reaktioner (prover plus kontroller). Bered tillräckligt med huvudmix för ett extra prov (n + 1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen. Värdet n ska inte överstiga sju (plus kontroller) eftersom sju är det maximala antalet prover som får plats i en körning.

4. Blanda huvudmixarna för analys noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Placera det korrekta antalet rör i laddningsblocket enligt layouten i tabell 7. Tillsätt omedelbart 20 µl av rätt huvudmix för analys i varje PCR-rör.

Locken ligger kvar i sin plastbehållare tills de behövs.

Tabell 7. Layout för kontroll- och mutationsanalyser i laddningsblocket. Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

Analys	Kontroller		Position						
	Positiv kontroll	NTC	Provnummer						
			1	2	3	4	5	6	7
Kontroll	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Borttagningar	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Tillägg	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Tillsätt omedelbart 5 µl vatten för NTC i rören i position 9–16 och förslut rören.
- Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (rörpositionerna 17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64, och 65–72) och förslut rören.
- Tillsätt 5 µl EGFR PC i rören i position 1–8 och förslut rören.

Var noga med att inte göra fel vid laddning eller pipettering så att du säkerställer att rätt mängd NTC, prover och EGFR PC tillsätts i rätt rör.

Varje rör ska innehålla en total reaktionsvolym på 25 µl (20 µl huvudmix för analys som har beretts i steg 3 (tabell 6) plus 5 µl NTC/prov/PC). Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

Markera rörens lock för att visa i vilken riktning rören ska laddas på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

- När alla PCR-rör har förslutits ska du göra en visuell kontroll av provrörens fyllnadsnivå för att säkerställa att prov har tillsatts i alla rör.
- Vänd alla PCR-rör 4 gånger för att blanda prover och reaktionsmixar.

10. Placera PCR-rören på remsa i sina korrekta positioner i 72-well rotorn enligt layouten i tabell 7.

Maximalt 7 prover kan inkluderas i varje PCR-körning. Om rotorn inte är fullbelagd fyller du alla tomma positioner på rotorn med förslutna, tomma rör.

11. Placera omedelbart 72-Well rotorn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Se till att låsringen (tillhör till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.

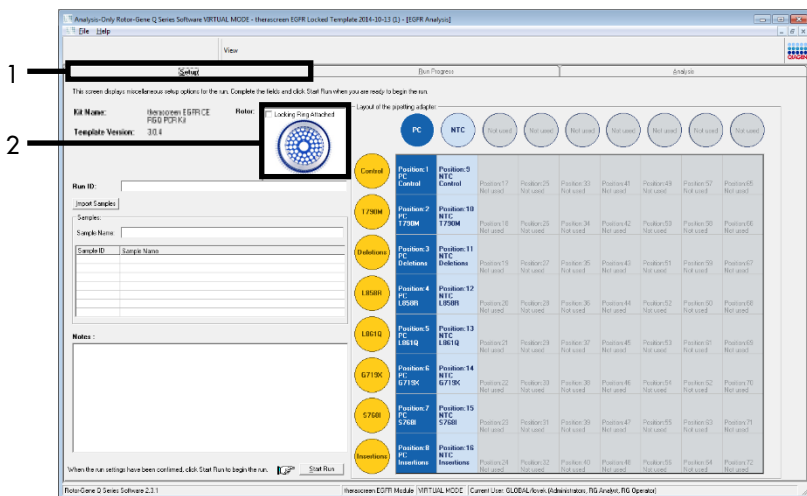
Obs! Om du använder manuell EGFR-mutationsdetektion, se information i "Bilaga A: manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

12. Starta Rotor-Gene Q-programvaran genom att dubbelklicka på ikonen *therascreen* EGFR CE Locked Template [*therascreen* EGFR CE låst mall] på skrivbordet till den bärbara dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet (Figur 10).



Figur 10. Ikonen EGFR CE Locked Template [EGFR CE låst mall] (EGFR-mutationsdetektion).

13. Fliken "Setup" [Konfiguration] öppnas som standard (Figur 11). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera sedan kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.



Figur 11. Fliken "Setup" [Konfiguration] (1) och rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast] (2).

14. Skriv in körnings-ID i fältet Run ID [Körnings-ID] enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i fältet Sample Name [Provnamn] enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur]-tangenta.

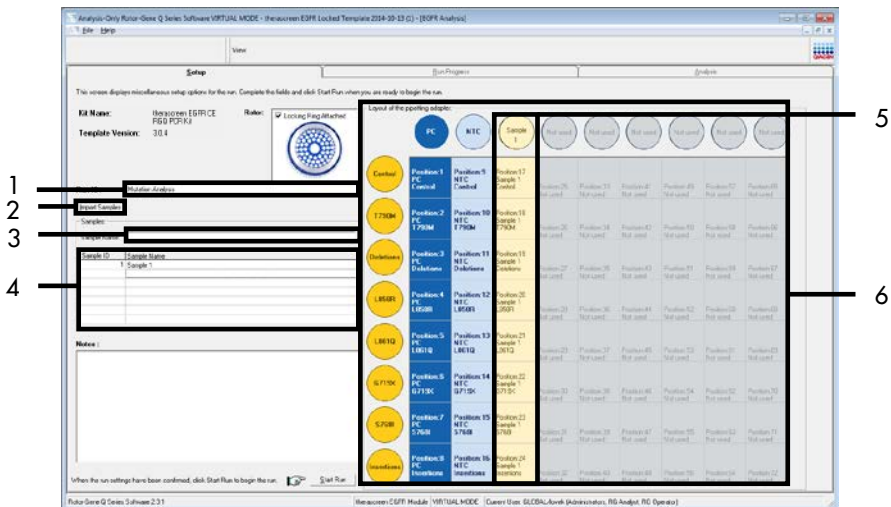
Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" [Prov-ID] (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] på höger sida med provnamnet (Figur 12).

Obs! Alternativt kan provnamn som sparats i formaten *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaavgränsade värden) importeras via knappen "Import Samples" [Importera prover]. Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden.

Obs! Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] att provnamnet som har lagts till markeras genom en ändring av färgen och att provnamnet är i provpositionen (Figur 12).

Obs! Maximalt 7 prover kan läggas till. Prov-ID (i provcirkelarna) tilldelas automatiskt från 1 till 7.

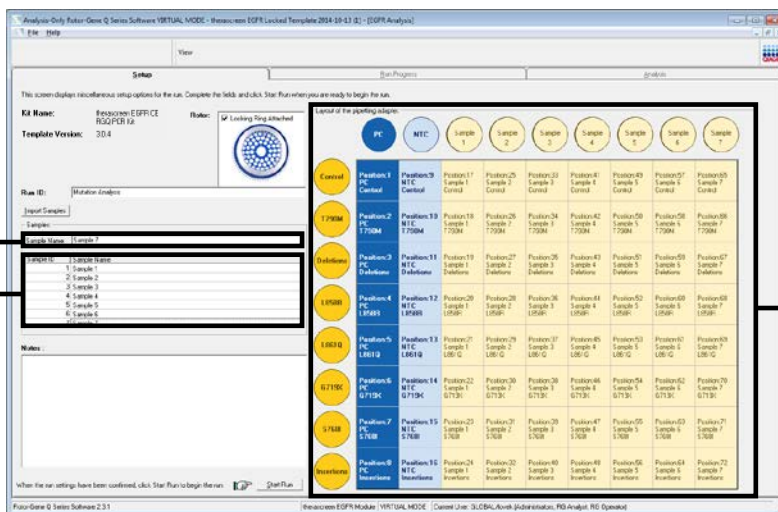
Obs! Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].



Figur 12. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn]. 1 = fältet "Run ID" [Körnings-ID], 2 = knappen "Import Samples" [Importerera prover], 3 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 4 = "Sample List" [Provlista], 5 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn], 6 = markerad provcirkel och kolumn med 8 analyser under panelen.

15. Upprepa steg 14 för att ange namnen på alla ytterligare prover (Figur 13).

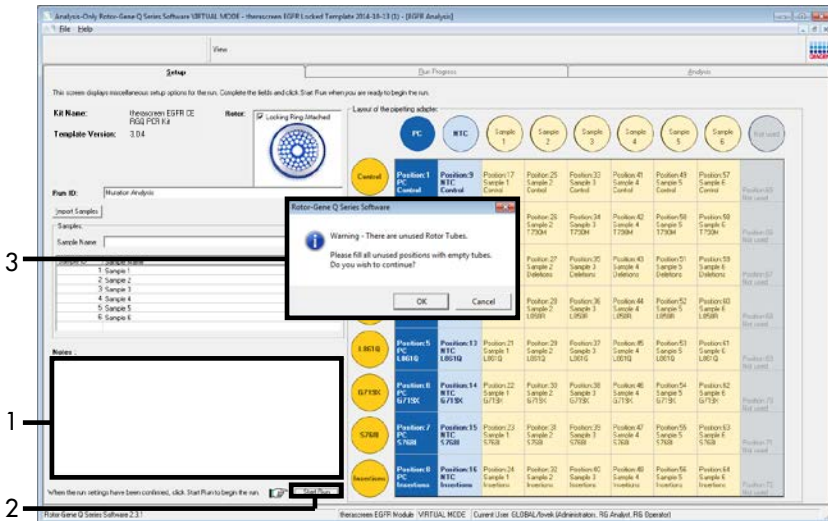
Obs! Om du vill redigera ett provnamn klickar du Sample Name [Provnamn] i provlistan visas det valda provet i fältet Sample Name [Provnamn] ovan. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur-] tangenten för att uppdatera namnet.



Figur 13. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" [Provnamn]. 1 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 2 = "Sample List" [Provlista], 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].

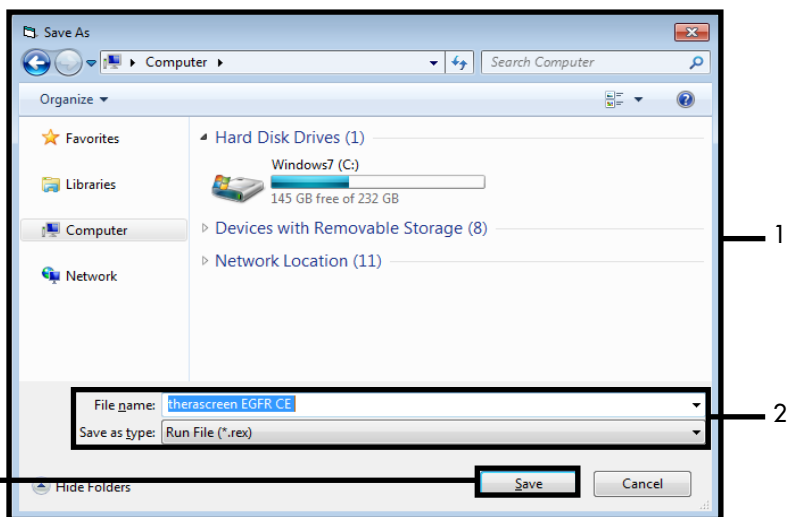
16. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i fältet "Notes" [Anteckningar] om det behövs, klicka sedan på "Start Run" [Starta körning] (Figur 14).

Obs! Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (Figur 14) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med förslutna, tomma rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med förslutna, tomma rör och klicka på OK för att fortsätta.



Figur 14. Fältet "Notes" [Anteckningar] (1), knappen "Start Run" [Starta körning] (2) och "Warning" [Varning] för oanvända rotorpositioner (3).

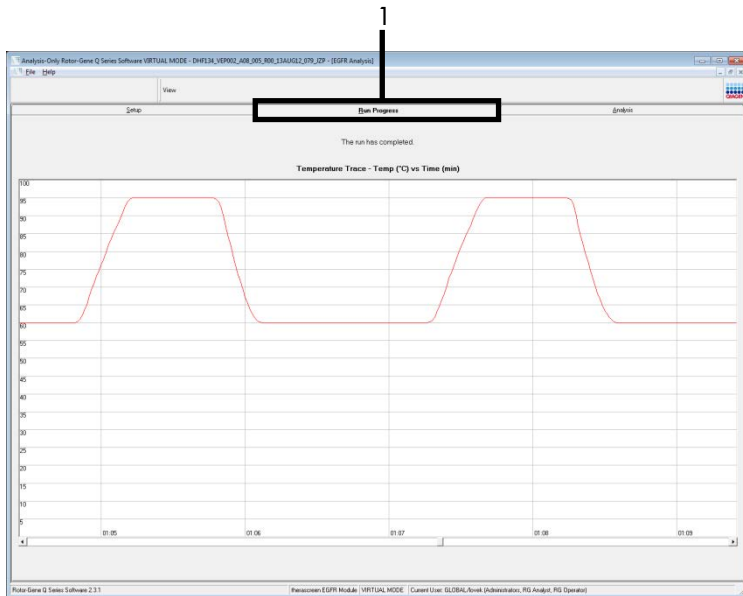
17. Fönstret "Save As" [Spara som] öppnas. Ange ett lämpligt filnamn och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen. Klicka på Save [Spara] (Figur 15).



Figur 15. Fönstret "Save As" [Spara som] (1). 2 = fälten "File Name" [Filnamn] och "Save as type" [Spara som typ], 3 = "Save" [Spara].

PCR-körningen startar.

Obs! När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (Figur 16).

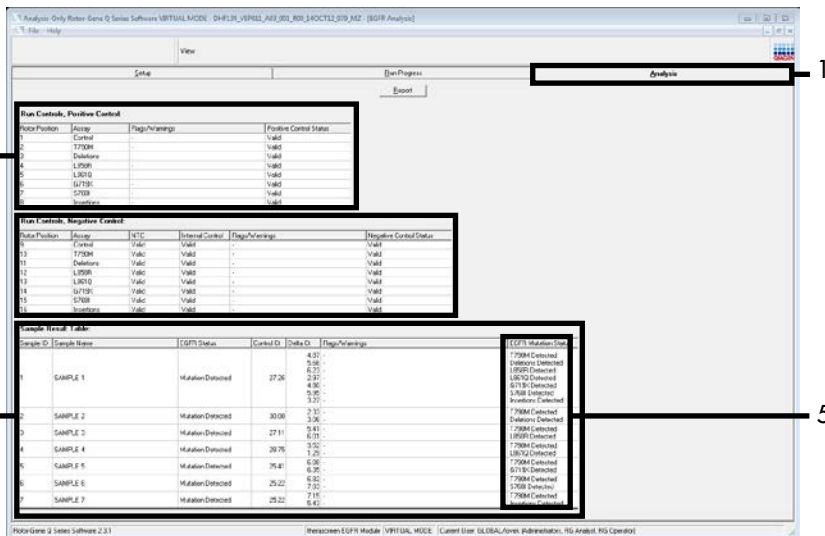


Figur 16. Fliken "Run Progress" [Körningsförlopp].

När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" [Analys].

Obs! Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på den (Figur 17).

Obs! En förklaring av beräkningsmetoden ges i avsnittet "Tolkning av resultat (automatiskt)".



Figur 17. Fliken "Analysis" [Analys] (1) och rapportering av resultat. 2 = panelen "Run Controls, Positive Control" [Körningskontroller, positiv kontroll], 3 = panelen "Run Controls, Negative Control" [Körningskontroller, negativ kontroll], 4 = "Sample Result Table" [Tabell med provresultat], 5 = panelen "Mutation Status" [Mutationsstatus].

Analysresultat rapporteras på följande sätt (Figur 18).

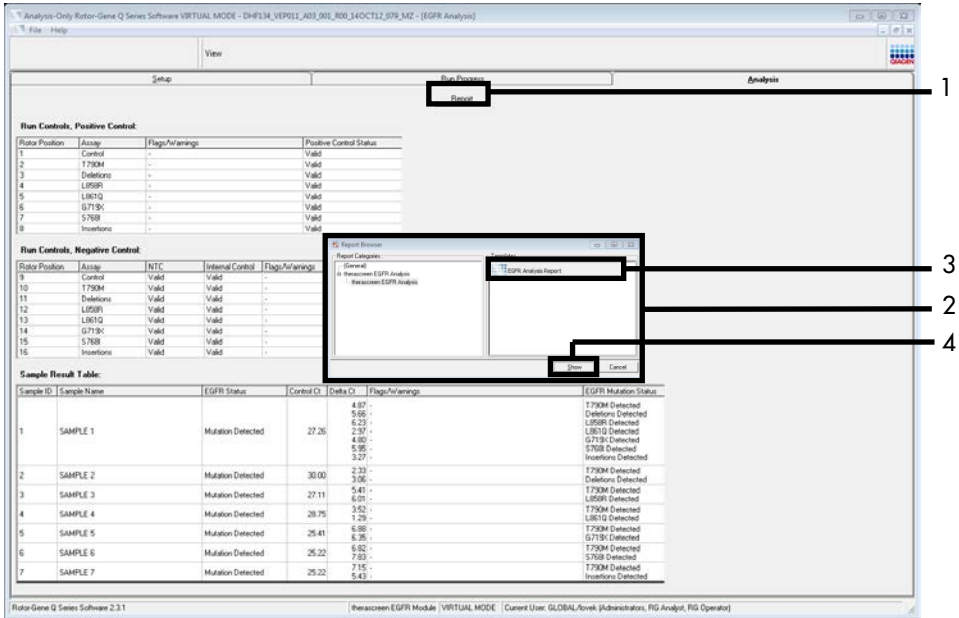
Run Controls, Positive Control [Körningskontroller, positiv kontroll]: Om resultaten ligger inom det acceptabla intervallet visas "Valid" [Giltigt] för "Positive Control Status" [Status för positiv kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].

Run Controls, Negative Control [Körningskontroller, negativ kontroll]: Om både resultatet "NTC" och "Internal Control" [Internkontroll] ligger inom de acceptabla intervallen visas "Valid" [Giltigt] för "Negative Control Status" [Status för negativ kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].

Sample Result Table [Tabell med provresultat]: Specifika mutationer rapporteras för de mutationspositiva proverna i kolumnen "EGFR Mutation Status" [EGFR-mutationsstatus].

18. Klicka på "Report" [Rapport] om du vill skapa en rapportfil. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] öppnas. Välj "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport] under "Templates" [Mallar] klicka sedan på "Show" [Visa] (Figur 18).

Obs! Om du vill spara på en annan plats i Web Archives-format klickar du på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



Figur 18. Väija "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport]. 1 = "Report" [Rapport], 2 = panelen "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport], 4 = "Show" [Visa].

Tolkning av resultat (automatiskt)

Analysen och mutationsbestämningarna utförs automatiskt av *therascreen* EGFR Assay Package när en körning har slutförts. Följande information förklarar hur *therascreen* EGFR-analyspaketet gör analysen och mutationsbestämningarna.

Obs! Information om manuell analys av resultat finns i avsnitt Tolkning av resultat (manuellt).

PCR-cykeln vid vilken fluorescensen från en viss reaktion går över ett tröskelvärde definieras som C_T -värdet. C_T -värdena indikerar mängden av ett specifikt input-DNA. Låga C_T -värden indikerar högre nivåer av input-DNA och höga C_T -värden indikerar lägre nivåer av input-DNA. Reaktionen med ett C_T -värde klassificeras som positiva amplifieringar.

Programmet Rotor-Gene Q interpolerar fluorescenssignaler mellan två registrerade värden (vilka som helst). C_T -värdena kan därför vara vilket reellt tal som helst (inte begränsat till heltal) i intervallet från 0 till 40. För *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är tröskelvärdet inställt på 0,075 relativa fluorescensenheter för den Green (FAM) kanalen och 0,02 för den Yellow (HEX) kanalen. De här värdena konfigureras automatiskt i *therascreen* EGFR-analyspaketet. Körningskontrollerna (PC, NTC och IC) bedöms för att säkerställa att acceptabla C_T -värden uppfylls och att reaktionerna utförs korrekt.

Provet ΔC_T -värden beräknas för varje mutationsanalys med hjälp av ekvationen:

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

Prover klassas som mutationspositiva om de ger ett ΔC_T -värde som ligger inom ΔC_T -cutoff-intervallet för den analysen. Över ΔC_T -cutoff-intervallet kan provet antingen innehålla mindre än den procentandel mutation som kan detekteras av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (bortom gränsen för analyserna) eller så är provet mutationsnegativt och rapporteras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad]. Under ΔC_T -cutoff-intervallet rapporteras provet som "Invalid" [Ogiltigt].

Ingen amplifiering i mutationsreaktioner räknas som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad]. ΔC_T -värden som beräknas genom bakgrundsamplifiering förväntas vara högre än den övre cutoff-gränsen för ΔC_T -cutoff-intervallet och provet klassas som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad].

Analysresultaten visas som "Mutation Detected" [Mutation detekterad], "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad], "Invalid" [Ogiltigt] eller, om en körningskontroll misslyckas, "Run Control Failed" [Körningskontrollen misslyckades]. För de mutationspositiva proverna rapporteras specifika mutationer. En tumör kan innehålla mer än en mutation. I sådana fall kommer mer än en mutation att rapporteras.

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR-analyspaketets flaggor

Tabell 8 (nästa sida) listar de flaggor som kan genereras av Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR-analyspaketet, deras betydelse och vilka åtgärder som kan vidtas.

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

Till exempel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = kontrollanalysen (CTRL_ASSAY) för den positiva kontrollen (Positive Control, PC) har misslyckats (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = internkontrollen (INT_CTRL) för kontrollen utan mall (No template Control, NTC) har misslyckats (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = provet (SAMPLE) för kontrollanalysen (CTRL) har hög koncentration (HIGH_CONC).

Tabell 8. Flaggor, betydelse och åtgärder som ska vidtas

Flagga	Betydelse	Åtgärd
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C _T utanför intervallet för positiv kontroll i kontrollreaktionen.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C _T utanför intervallet för en eller flera mutationskontrollreaktioner.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (kontrollreaktionsmix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (mutationsreaktionsmix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen ovanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen är nedanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INVALID_CT	Ogiltig PCR-körning – ogiltigt FAM (mindre än gränsvärdet) för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
NTC_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i negativ kontroll kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltigt prov – fluorescensdata i provkontrollen kan inte tolkas.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa de relevanta proverna. Var uppmärksam på blandningsstegen.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Ogiltigt prov – FAM C _T är för lågt i provkontrollen.	Späd provet för att öka kontroll-C _T -värdet. Den här spädningen ska beräknas baserat på antagandet att spädning 1:1 med vattnet som medföljer kitet kommer att öka C _T med 1,0. När provet har späts ut ska du konfigurera en ny mutationsbedömning och upprepa provet. Om provet har späts efter DNA-provbedömningskörningen fortsätter du direkt med EGFR-mutationsdetektionskörning med det spädda provet.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Flagga	Betydelse	Åtgärd
SAMPLE_CTRL_FAIL	Ogiltigt prov – FAM C _T är för högt i provkontrollreaktionen.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat och om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du 2 ytterligare FFPE-vävnadssnitt om sådana finns tillgängliga. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den här extraktionen. Om provet är ogiltigt upprepar du PCR-körningen med den andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T för högt (eller inget C _T) för internkontroll (HEX), FAM-kanalen mutationsnegativ.	För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat, ingen ytterligare testning krävs. Späd ut provet med vattnet som medföljer kitet baserat på antagandet att spädning 1:1 kommer att öka C _T för kontrollreaktionen med 1,0. Kontrollera att den slutliga volymen är >40 µl (t.ex. 40 µl DNA och 40 µl vatten från röret märkt med DIL). Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från två ytterligare FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den här extraktionen. Om den andra extraktionen är ogiltig så späd ut enligt beskrivningen ovan. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutationsrör ogiltigt – C _T HEX för lågt för provet (internkontroll)	För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat, ingen ytterligare testning krävs. Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du 2 ytterligare FFPE-vävnadssnitt om sådana finns tillgängliga. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den här extraktionen. Om den ger ett ogiltigt resultat upprepar du PCR-körningen med den andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Flagga	Betydelse	Åtgärd
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsrör ogiltigt – fluorescensdata i internkontroll kan inte tolkas.	<p>För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat; ingen ytterligare testning krävs.</p> <p>Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du 2 ytterligare FFPE-vävnadssnitt om sådana finns tillgängliga. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den här extraktionen. Om den ger ett ogiltigt resultat upprepar du PCR-körningen med den andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	En eller flera mutationer för ett prov är positiva, och samtidigt är en eller flera mutationer för samma prov ogiltiga.	<p>För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat, ingen ytterligare testning krävs.</p> <p>För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med ett INVALID (Ogiltigt) resultat som erhållits i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: Testa om provet med alla reaktionsmixar efter den specifika åtgärden för ogiltigflaggan. Om flaggan SAMPLE_INT_CTRL_FAIL genereras i kombination med en annan flagga för det berörda provet måste åtgärden för spädning av provet från flaggan SAMPLE_INT_CTRL_FAIL följas. Konfigurera en ny PCR-körning och testa om provet.</p> <p>För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med ett INVALID (Ogiltigt) resultat som erhållits i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix vid den upprepade PCR-körningen gäller: Extrahera provet från 2 ytterligare FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning med alla reaktionsmixar för att testa den här extraktionen.</p> <p>Om provet uppvisar ett ogiltigt resultat igen för en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix ska du upprepa provet med alla reaktionsmixar efter den specifika åtgärden för ogiltigflaggan. Om SAMPLE_INT_CTRL_FAIL genereras i kombination med en annan flagga för det berörda provet måste åtgärden för spädning av provet från flaggan SAMPLE_INT_CTRL_FAIL följas. Konfigurera en ny PCR-körning och testa om provet.</p> <p>Om flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID observeras vid upprepandet får provet en obestämd mutationsstatus.</p>

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Flagga	Betydelse	Åtgärd
MUTATION_EARLY_CT	Ogiltigt prov – ΔC_T är för lågt eller så är C_T under cutoff-intervallet	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Var uppmärksam på blandningsstegen.

Felsökningsguide

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

Kommentarer och förslag på åtgärd

NTC-proverna visar positiva resultat i Green FAM-kanalen

Kontaminering har uppstått vid beredning av PCR

Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat.

Stäng om möjligt PCR-rören direkt när du har tillsatt det prov som ska testas.

Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet.

Ingen signal med den EGFR-positiva kontrollen

a) Den valda fluorescenskanalen för PCR-dataanalysen överensstämmer inte med protokollet.

För dataanalys väljer du fluorescenskanalen Cycling Green för analytisk EGFR PCR och fluorescenskanalen Cycling Yellow för internkontroll-PCR.

b) Felaktig programmering av temperaturprofilen för Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet

Jämför temperaturprofilen med protokollet. Upprepa körningen vid felaktighet.

Kommentarer och förslag på åtgärd

- | | |
|--|---|
| c) Felaktig konfiguration av PCR | Kontrollera dina arbetssteg med hjälp av pipetteringsschemat och upprepa PCR om det behövs. |
| d) Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaring och hantering av reagenser" (sida 18) | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på kitet) för reagenserna och använd ett nytt kit vid behov. |
| e) Utgångsdatum för <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit har passerats | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på kitet) för reagenserna och använd ett nytt kit vid behov. |

Kvalitetskontroll

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

Begränsningar

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

Produkten är avsedd att användas endast av personal som fått särskild utbildning i in vitro diagnostiska procedurer och Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.

Produkten är endast avsedd för användning på en Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cykler.

För optimalt resultat krävs att anvisningarna i *handboken för theascreen EGFR RGQ PCR Kit* följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrade prestanda.

Det är viktigt att mängden och kvaliteten hos DNA i provet utvärderas korrekt innan provanalys utförs med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Ytterligare kontrollreaktionsmix tillhandahålls för att bestämma om C_T-värdet är godkänt för analysen. Absorbansavläsningar ska inte användas då de inte överensstämmer med C_T-värden i fragmenterade DNA-prover.

Primrarna i EGFR reaktionsmix för borttagningar har utformats för att rikta in sig mot flera Exon 19-borttagningar som sträcker sig från nukleotiderna 55174772 till 55174795 (GRCh38 chr7), ett intervall på 23 bp.

Även om Exon 19-borttagningsanalysen har validerats analytiskt och demonstrerats detektera 14 specificerade borttagningar inom Exon 19 (se listan i Tabell 1 i den här bruksanvisningen) så är det dock möjligt att ytterligare mutationer (inklusive men inte begränsat till ytterligare Exon 19 infogningar och L747P-mutationen) amplificeras av Borttagningsprimeruppsättningen.

Om de finns ger sådana ytterligare mutationer upphov till resultatet "Deletions Detected" [Borttagningar detekterade] för ett givet patientprov.

Dessutom är det möjligt att L858Q-mutationen detekteras av L858R-analysen. Om den finns i ett patientprov kan L858Q-mutationen därmed ge upphov till resultatet "L858R Detected" [L858R detekterad].

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

Prestandaegenskaper

Analytisk prestanda

De specifika prestandaegenskaperna för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit fastställdes med hjälp av studier av FFPE-vävnadsprover tagna från NSCLC-patienter och mänskliga FFPE-cellinjer (FFPE-cellinjer). FFPE-cellinjerna genererades med hjälp av en cellinje från lungcancer (A549) för att skapa cellinjer som innehåller de önskade specifika EGFR-mutationerna. När vävnadsprover eller cellinjer inte var tillgängliga användes plasmid-DNA.

Blankgräns (Limit of Blank, LOB), arbetsintervall, cutoff-värden och ΔC_T -cutoff-intervall

Totalt 417 FFPE-prover testades i en studio enligt instruktionerna i NCCLS EP17-A (2004) (12) för att bestämma LOB och ΔC_T -cutoff-värden för varje mutationsanalys. Dessutom bestämdes arbetsintervallet. ΔC_T -cutoff-intervallen visas i Tabell 9.

Tabell 9. Fastställda ΔC_T -cutoff-intervall för varje mutationsanalys

Analys	C_T -intervall	ΔC_T -cutoff-intervall (ΔC_T)
T790M	0,00 till 40,00	$-10,00 \geq$ till $\leq 7,40$
Borttagningar	0,00 till 40,00	$-10,00 \geq$ till $\leq 8,00$
L858R	0,00 till 40,00	$-10,00 \geq$ till $\leq 8,90$
L861Q	0,00 till 40,00	$-10,00 \geq$ till $\leq 8,90$
G719X	0,00 till 40,00	$-10,00 \geq$ till $\leq 8,90$
S768I	0,00 till 40,00	$-10,00 \geq$ till $\leq 8,90$
Tillägg	0,00 till 40,00	$-10,00 \geq$ till $\leq 8,00$

Kontrollreaktionens C_T -intervall fastställdes från 23,70 till 31,10 C_T .

Analysens cutoff-värden och arbetsintervall verifierades med hjälp av standarder och ytterligare FFPE-prover. Under verifieringen bedömdes cutoff-värdena efter förmågan att särskilja korrekt mutation i en bakgrund med vildtyps-DNA genom att bedöma varje analys med genomiskt input-DNA med hög koncentration och mutations-input-DNA med hög koncentration (se Korsreaktivitet). Effekten av input-DNA på mutationsklassificering bedömdes också (se Effekt av DNA-input på ΔC_T -värden). En nedre gräns för intervallet har introducerats för att exkludera en PCR-fluorescensartefakt.

För att bedöma prestandan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vid frånvaro av mall och för att säkerställa att ett blankprov eller ett prov med vildtyps-DNA inte genererar en analytisk signal som kan indikera en låg koncentration av mutation, utvärderades prover utan mall och NSCLC EGFR-vildtyps-DNA. Resultaten visade inga positiva mutationsklassificeringar för NTC-prover och för FFPE-vildtypsprover.

Effekt av DNA-input på ΔC_T -värden

DNA-inputnivån definieras som den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov enligt bestämningen av kontrollreaktionens C_T -värden. För att påvisa att prestandan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är konsekvent över intervallet för kontrollreaktionens C_T -värde (23,70–31,10) testades alla 7 EGFR-mutationsanalyser mot en 6-punkters, 1 till 3-spädningsserie (DNA som extraherats från FFPE-cellinjer). C_T -målvärdet för spädning 1 för varje mutation var ca 24,70. Den slutliga spädningen, som gav ett C_T på ca 32–33, låg utanför kontrollreaktionens C_T -intervall. Generellt var de ΔC_T -värden som mättes upp vid olika nivåer av total DNA-input konsekventa över hela arbetsintervallet för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Korsreaktivitet

Vildtyps-EGFR DNA vid hög DNA-input testades för att bedöma den icke-specifika amplifieringen. Resultaten visade att de lägsta ΔC_T -värdena överskred de fastställda cutoff-värdena, vilket indikerade att icke-specifik amplifiering inte förekom.

FFPE-cellinjer vid hög DNA-input testades mot alla reaktionsmixar för att bedöma potentiell korsreaktivitet. Resultaten visade ingen påverkan orsakad av korsreaktivitet mellan mutantreaktioner. Minimi- ΔC_T -värdena var samtliga högre än de respektive cutoff-värdena för analysen för alla icke-matchande reaktionsmixar och DNA-prover.

Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod

En studie påvisade överensstämmelsen i mutationsdetektion för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i relation till bidirektionell Sanger-sekvensering. I den här studien testades 360 FFPE-prover.

Prover med giltiga resultat för både Sanger och *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit analyserades för att bedöma den positiva överensstämmelsen i procent (Positive Percent Agreement, PPA), den negativa överensstämmelsen i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och den totala överensstämmelsen i procent (Overall Percent Agreement, OPA). De här procentvärdena tillsammans med de motsvarande tvåsidiga 95-procentiga konfidensintervallen (KI) sammanfattas i tabell 10.

Tabell 10. Analys av överensstämmelse

Mätning	Överensstämmelse i procent (N)	95 % KI
Positiv överensstämmelse i procent	99,4% (157/158)	96,5–100,0 %
Negativ överensstämmelse i procent	86,6% (175/202)	81,2–91,0 %
Total överensstämmelse i procent	92,2% (332/360)	89,0–94,8 %

För de 28 diskordanta resultaten för total överensstämmelse i procent:

- 1 (3,6 %) prov var vildtyp (dvs. ingen mutation detekterad) med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit men hade resultatet mutation detekterad med Sanger-sekvensering.
- 27 (96,4 %) prover hade resultatet mutation detekterad med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit men var vildtyp med Sanger-sekvensering.

Värden för detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)

En studie utfördes för att fastställa LOD för var och en av de 29 EGFR-mutationerna. LOD definierades som den lägsta andelen mutant-DNA i en bakgrund med vildtyps-DNA då ett mutantprov ger mutationspositiva resultat för 95 % av testresultaten (C_{95}).

För att bestämma LOD för varje mutation preparerades prover med olika procentvärden för mutation vid låga och höga input-DNA-koncentrationer och testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (tabell 11). LOD för varje analys beräknades med logistisk regression. För att verifiera LOD testades mutationsprover vid fastställd LOD och den positiva testandelen verifierades.

Tabell 11. LOD fastställd med kliniska FFPE-prover, FFPE-celinjer eller plasmider vid låga och höga DNA-inputnivåer

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basskifte	LOD (% mutant)	
				Låga	Höga
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	— [¶]
19	Borttagningar	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	— [¶]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	— [¶]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	— [¶]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	— [¶]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]
		12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basskifte	LOD (% mutant)	
				Låga	Höga
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Tillägg	12376	2307_2308insGCCAGCGT G	11,61 [†]	– [†]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]:
<http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] LOD-värden fastställdes med cellinjer

[‡] LOD-värden fastställdes med plasmider

[§] LOD-värden fastställdes med kliniska prover

[†] Har inte bedömts

Interferens

Effekter av nekrotisk vävnad

Kliniska NSCLC FFPE-prover med ett innehåll av nekrotisk vävnad på upp till 50 % för både EGFR-mutant- och vildtypsprover interfererade inte med resultaten från bestämningen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Exogena substanser

Potentiellt interfererande substanser som förekom i DNA-extraktionsprocessen testades i mutanta prover och vildtypsprover vid 10x-koncentration: paraffinvax, xylén, etanol och Proteinase K. Resultaten visade att de här substanserna inte interfererade med resultaten från bestämningen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reproducerbarhet

Reproducerbarhet mellan loter

Testsystemet *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit använder två separata kit: QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit eller QIAamp DNA FFPE Tissue Kit för isolering av DNA, och *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit för amplifiering av DNA och detektion av EGFR-mutationsstatus. Reproducerbarhet och utbytbarhet mellan loter påvisades med hjälp av 3 loter av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit och 3 loter av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Den totala procentandelen korrekta bestämningar mellan loter för EGFR-mutationsanalysen var 97,8 % (317/324) och för vildtypsprover var den 100 % (379/379).

Hantering av prover

Reproducerbarheten för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit undersöktes med snitt som togs från tre FFPE-provblock: ett prov med borttagningsmutation (2235-2249 del15) i exon 19, ett prov med mutationen L858R i exon 21 och ett vildtypsprov. För varje prov utfördes extraktioner i duplikat på 3 platser och testades i 3 dagar (ej i följd) under en period av 6 dagar, vilket gav totalt 18 datapunkter per prov. På varje plats utförde 2 operatörer testning med 1 lot av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 lot per plats, totalt 3 loter) i kombination med samma lot av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-reagenser på samtliga platser. Alla resultat för mutanta prover och vildtypsprover var giltiga och gav det förväntade resultatet vid bestämningen (korrekt bestämning = 100 %, 18/18 för varje prov), vilket gav stöd för reproducerbarheten och repeterbarheten för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vid det föranalytiska steget av DNA-isoleringen.

Precision och reproducerbarhet

Precisionen och reproducerbarheten för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit undersöktes genom att testa DNA som extraherats från kliniska NSCLC FFPE-prover eller FFPE-cellinjer och som representerade alla sju mutationsanalyser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Kliniska NSCLC FFPE-vildtypsprover ingick också i studien (tabell 12).

En utformad studiematris implementerades för att bedöma analysens reproducerbarhet genom att testa prover på 3 laboratorier (platser) med 3 loter av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 loter på 3 platser) med 2 operatörer per plats och 2 instrument per plats, där varje prov (som preparerats på en nivå nära LOD) testades i duplikat under totalt 16 dagar. Reproducerbarheten för varje individuell mutation testades under icke efterföljande dagar på varje plats. Andelen korrekta bestämningar visas i Tabell 12, nästa sida.

Tabell 12. Analysens reproducerbarhet – andel korrekta bestämningar för testade EGFR-mutationer

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Bestämningar		% korrekta
			Korrekta/totalt	% korrekta	Nedre ensidiga 95 % CI
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Borttagningar	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
	Tillägg	12376	92/92	100	96,80
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Vildtyp	–	–	77/78	98,72	94,06

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]:
<http://cancer.sanger.ac.uk/>.

En varianskomponentanalys användes för att uppskatta standardavvikelsen och de 95-procentiga konfidensintervallen för variabilitet inom körningar, mellan körningar, mellan dagar, mellan loter och mellan platser. Den totala variationskoefficienten (Coefficient of Variation, CV) var $\leq 14,11\%$ för alla EGFR-mutationer som testades med samtliga varianskomponenter. För alla mutanta prover i panelen var procentandelen CV $\leq 8,33\%$ mellan loter, mellan dagar och mellan körningar. Procentandelen CV för variabilitet inom körning (repetierbarhet/precision) låg mellan 5,99 och 13,49 %.

Klinisk prestanda

Kliniska resultatdata: GIOTRIF®

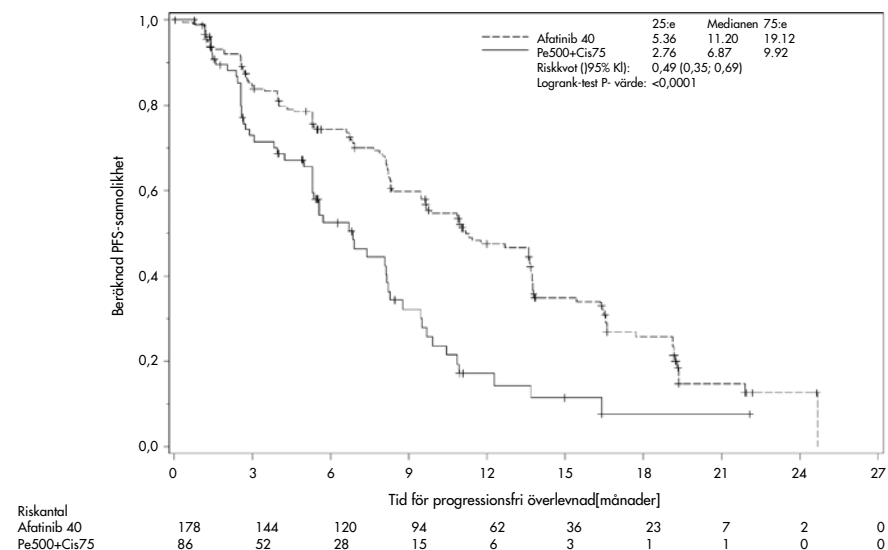
Den kliniska studien LUX-Lung 3 var en internationell, öppen, randomiserad fas 3-multicenterstudie av afatinib jämfört med kemoterapi som första linjens behandling för patienter med lungadenocarcinom i fas IIIB eller IV som innehöll en EGFR-aktiverande mutation (ClinicalTrials.gov-nr NCT00949650). Lämpligheten för patienter för deltagande i den kliniska studien bestämdes genom att testa EGFR-mutationsstatusen hos patienten med hjälp av analys vid klinisk studie (Clinical Trial Assay, CTA). Retrospektiva tester av vävnadsprover genomfördes med hjälp av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En överbryggande studie genomfördes för att bedöma överensstämmelsen mellan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit och CTA-analysen.

Baserat på testresultaten från CTA-analysen var 345 patienter i den randomiserade gruppen (afatinib: 230 patienter; kemoterapi: 115 patienter). Det primära effektiva utfallet var progressionsfri överlevnad (Progression-Free Survival, PFS) enligt bedömning av en oberoende granskningskommitté (Independent Review Committee, IRC). Av de 345 randomiserade patienterna testades tumörprover från 264 patienter (afatinib: 178 patienter; kemoterapi: 86 patienter) retrospektivt med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En statistiskt signifikant förbättring av PFS enligt bedömning av IRC påvisades för patienter som randomiserats till afatinib jämfört med de som randomiserats till kemoterapi i en allmän CTA+ population och i den *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-populationen. Resultaten för det totala utfallet sammanfattas i tabell 13 och Figur 19.

Tabell 13. Klinisk nytta hos patienter som testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i den kliniska LUX-Lung 3-studien

Parameter	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-population n = 264		CTA-positiv population, n = 345	
	Kemoterapi n = 86	Afatinib n = 178	Kemoterapi n = 115	Afatinib n = 230
Progressionsfri överlevnad (Progression-Free Survival, PFS)				
Antal dödsfall eller progressioner, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
Median-PFS (månader)	6,9	11,2	6,9	11,1
Median-PFS 95 % CI	5,3; 8,2	9,7, 13,7	5,4, 8,2	9,6, 13,6
Riskkvot		0,49		0,58
Riskkvot 95 % CI		0,35, 0,69		0,43, 0,78
P-värde (stratifierat log-ranktest)*		<0,0001		<0,001

* Stratifierat efter EGFR-mutationsstatus och ras.



Figur 19. Kaplan-Meier-kurva över progressionsfri överlevnad (PFS) enligt oberoende bedömning efter behandlingsgrupp (*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-population).

Analys av delmängden för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ (n = 264) visade att hos de patienter som behandlades med afatinib ökade PFS-tiden signifikant (median-PFS 11,2 jämfört med 6,9 månader) och sannolikheten för progressiv sjukdom eller dödsfall minskade (HR = 0,49, 95 % KI [0,35; 0,69], p < 0,0001) jämfört med de patienter som behandlades med kemoterapi. Den observerade kliniska nyttan hos delmängden patienter som testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit var jämförbar med den som observerades i den fullständiga studiepopulationen (n = 345).

Kliniska resultatdata: IRESSA®

Studien IRESSA Follow-up Measure (IFUM) var en fas 4, öppen engrupsstudie (NCT01203917) för att bedöma effekten och säkerheten/toleransen för gefitinib som första linjens behandling av kaukasiska patienter med EGFR-mutationspositiv lokalt framskriden eller metastaserande NSCLC fas IIIA/B/IV. IFUM-studien utformades för att utvärdera den objektiva svarsfrekvensen enligt RECIST-kriterier hos presumtiva kaukasiska patienter med EGFR-mutant NSCLC.

Lämpliga patienter skulle ha en borttagning i EGFR-exon 19, L858R, L861Q eller G719X-substitutionsmutation och ingen T790M- eller S768I-mutation eller exon 20-tillägg i tumörprover enligt presumtiv bestämning med hjälp av CTA. Retrospektiva tester av prover från patienter som screenats för den kliniska IFUM-studien genomfördes med hjälp av det tillhörande diagnostiska *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En överbryggande studie genomfördes för att bedöma överensstämmelsen för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit med CTA-analysen som användes för att välja ut patienter till den kliniska IFUM-studien. Den övergripande överensstämmelsen mellan de två analyserna för detektion av EGFR-exon 19-borttagningar och L858R-mutation var 98,2 % (n = 700/713; 95 % CI: 96,9 %, 99,0 %) med PPA på 88,2 % (n = 90/102; 95 % CI: 80,4 %, 93,8 % och NPA på 99,8 % (n = 610/611; 95 % CI: 99,1 %, 100,0 %).

CTA-testresultat erhöles för 859 screenade patienter, av vilka 106 patienter var lämpliga för behandling med gefitinib. Av 859 prover med ett CTA-resultat så var 765 prover tillgängliga för testning retrospektivt med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, inklusive 87 prover som var EGFR-mutationspositiva med både CTA och *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Det primära effektiva utfallet var objektiv svarsfrekvens (objective response rate, ORR) enligt bedömning vid en blindad oberoende central granskning (Blinded Independent Central Review, BICR) och av utredare. Den observerade kliniska nyttan hos delmängden patienter som testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit var jämförbar med den som observerades i den fullständiga studiepopulationen.

Resultaten för det totala utfallet sammanfattas i tabell 14.

Tabell 14. Klinisk nytta hos patienter som testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i den kliniska IFUM-undersökningen

Parameter	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+-population, n = 87	CTA-positiv population, n = 106
Objektiv svarsfrekvens (Objective Response Rate, ORR) enligt BICR		
Antal svar (N)	42	53
ORR, % (95 % CI)	48,3 (38,1-58,6)	50,0 (40,6-59,4)
Mediantid för svar (månader)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
Objektiv svarsfrekvens (Objective Response Rate, ORR) enligt utredare		
Antal svar (N)	62	74
ORR, % (95 % CI)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Mediantid för svar (månader)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

BICR: Blinded independent central review (Blindad oberoende central granskning); CI: Confidence interval (Konfidensintervall); CTA: Clinical trial assay (Analys vid klinisk studie).

Obs! Kit-positiva är resultat som är positiva för exon 19-borttagningar/L8585R/L861Q/G719X.

Givet att *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit inte användes för att välja patienter för den kliniska IFUM-studien utfördes ytterligare effektivitetsanalyser för att överväga patienter som inte inkluderades i studien eftersom de testats negativt med CTA men kunde ha testats positivt med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (dvs. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), liksom patienter som var inskrivna i studien men som inte hade giltiga omtestningsresultat från *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (dvs. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit okänt/CTA+). Resultaten från alla de hypotetiska analyserna liknade generellt resultaten från den primära effektivitetsanalysen.













Referenser

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* 23, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525.
3. Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J. Clin. Oncol.* 24, 3340.
4. Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 13014.
5. Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. *J. Clin. Oncol.* 24 (18S) (Suppl), Abstr 7020.
6. Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May 3 June 2008. *J. Clin. Oncol.* 26 (15S) (Suppl), Abstr 8070.
7. Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* 15, 2442.
8. Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J. Clin. Oncol.* 26 (May 20 suppl), abstr 8038.

-
9. Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 12, 4416s.
 10. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
 11. Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline*, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
	Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner
	Utgångsdatum
	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer
	Skyddas mot ljus
	GS-artikelnummer
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen (handboken) och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
	Läs bruksanvisningen innan användning
	lakttag försiktighet

Bilaga A: Manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Det här avsnittet innehåller instruktioner om hur *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit används med programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare i öppet läge (dvs. utan Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Allmän information

- En lista med det material som behövs finns på Material som behövs men inte medföljer.
- Fullständiga instruktioner om provberedning och provlayout finns i Protokoll: Provbedömning och Protokoll: EGFR-mutationsdetektion.
- Säkerställ inför varje körning att cykelparametrarna är korrekta.

Protokoll: Skapa en temperaturprofil

Innan du startar skapar du en temperaturprofil för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-analysen. Cykelparametrarna är desamma för både DNA-provbedömning och EGFR-mutationsdetektion.

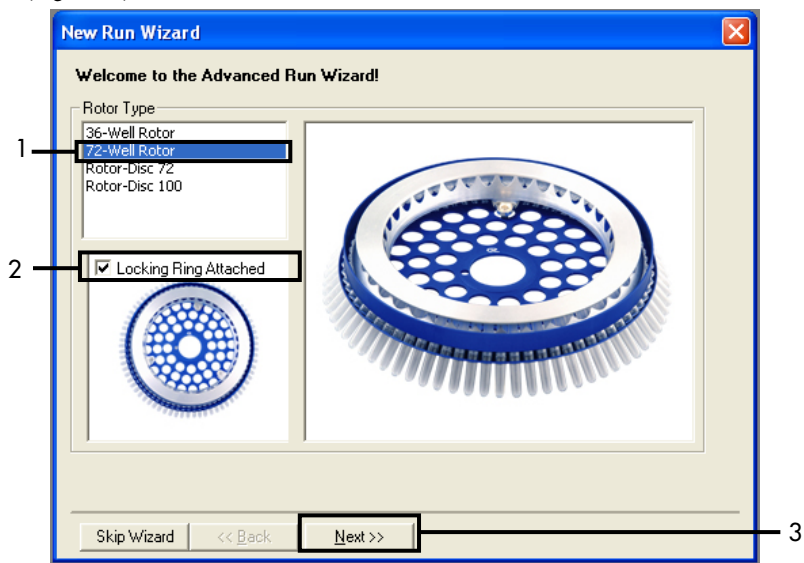
Procedur

En sammanfattning av cykelparametrarna visas i tabell 15.

Tabell 15. Temperaturprofil

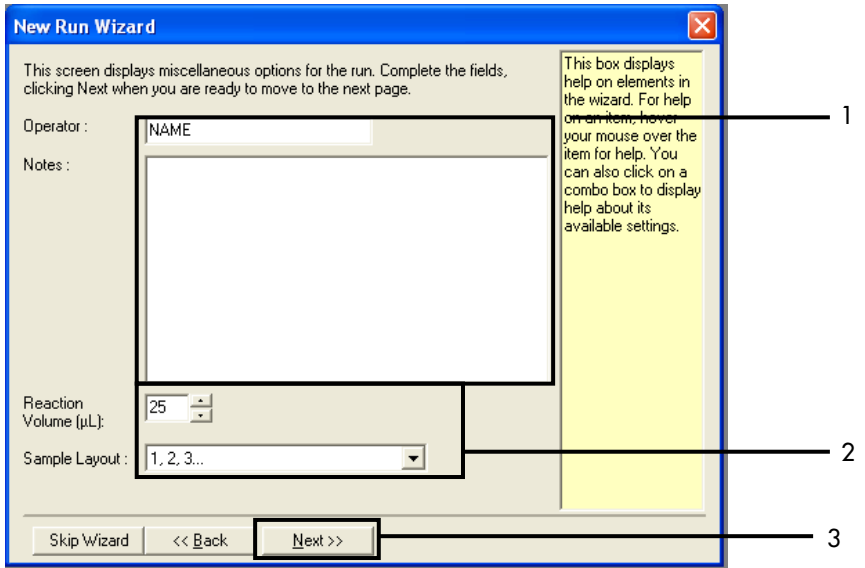
Cyklar	Temperatur	Tid	Datahämtning
1	95 °C	15 minuter	Ingen
40	95 °C	30 sekunder	Ingen
	60 °C	60 sekunder	Green och Yellow

1. Dubbelklicka på programikonen för Rotor-Gene Q-programmet 2.3 på skrivbordet på den dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
2. För att skapa en ny mall väljer du "Empty Run" [Tom körning] och klickar sedan på "New" [Ny] för att komma till "New Run Wizard". [Guide för ny körning].
3. Välj "72-Well Rotor" [Rotor med 72 brunnar] som rotortyp. Bekräfta att låsringen sitter fast och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Klicka på "Next" [Nästa] (Figur 20).



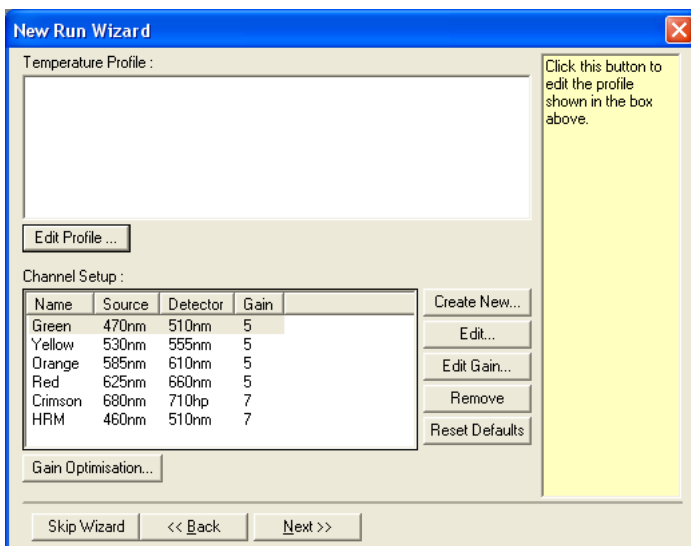
Figur 20. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning). 1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = "Next" [Nästa].

4. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och ange reaktionsvolymen 25. Kontrollera att 1, 2, 3... har angetts i fältet Sample Layout [Provlayout]. Klicka på "Next" [Nästa] (Figur 21).



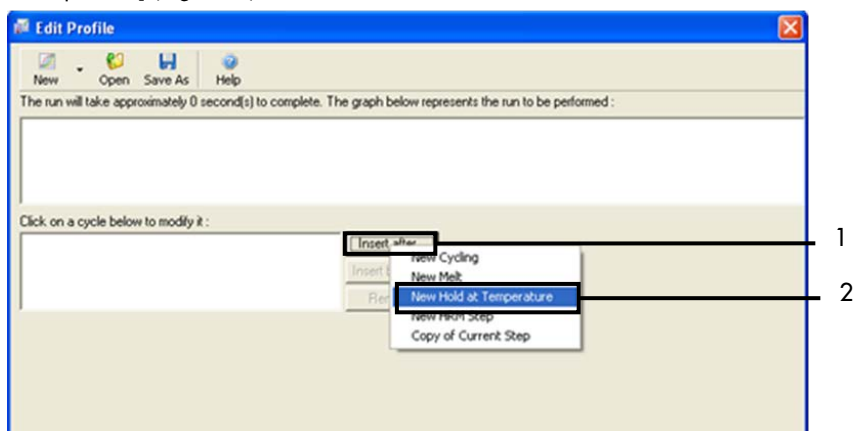
Figur 21. Ange namn på operatör och reaktionsvolym. 1 = dialogfältet "Operator" [Användare] och dialogfältet "Notes" [Anteckningar], 2 = fältet "Reaction Volume" [Reaktionsvolym] och fältet "Sample Layout" [Provlayout], 3 = "Next" [Nästa].

5. Klicka på "Edit Profile" [Ändra profil] i dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] (Figur 22) och kontrollera körningsparametrarna enligt följande steg.



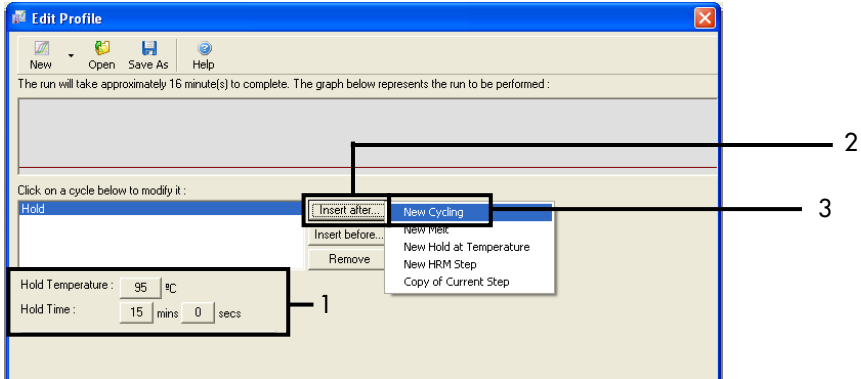
Figur 22. "Edit Profile" [Ändra profil] i "New Run Wizard" [Guide för ny körning].

6. Klicka på "Insert after" [Infoga efter] och välj "New Hold at Temperature" [Ny bibehållning vid temperatur] (Figur 23).



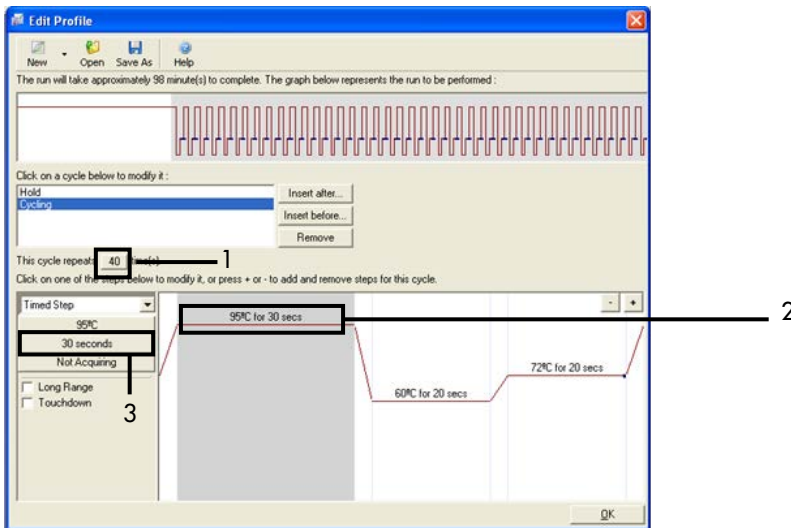
Figur 23. Infoga ett initialt inkubationssteg. 1 = "Insert after" [Sätt in efter], 2 = "New Hold at Temperature" [Ny hålltemperatur].

7. Sätt värdet i fältet Hold Temperature [Hålltemperatur] till 95 °C och värdet i fältet Hold Time [Hålltid] till 15 mins 0 secs [15 min 0 sek]. Klicka på Insert After [Infoga efter], välj sedan New Cycling [Ny cykling] (Figur 24).



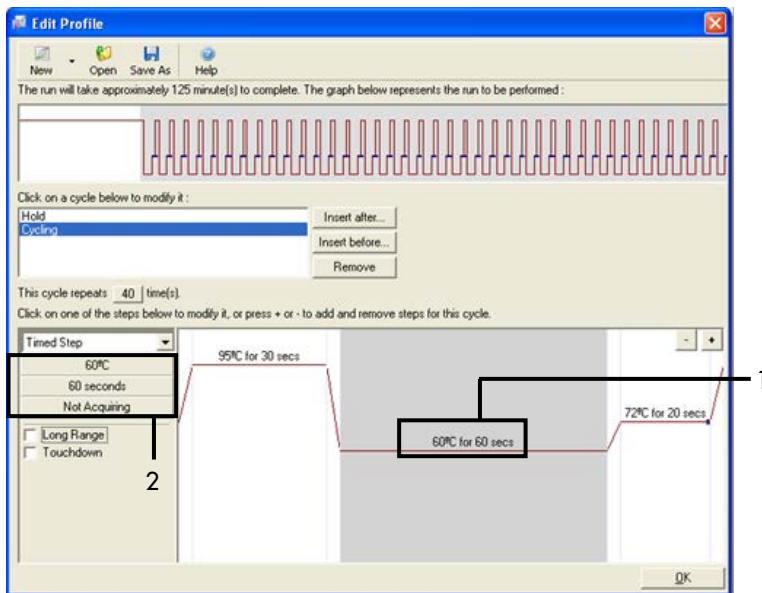
Figur 24. Initialt inkubationssteg vid 95 °C. 1 = "Hold Temperature and Hold Time" [Bibehållen temperatur och bibehållen tid], 2 = "Insert after" [Sätt in efter], 3 = "New Cycling" [Ny cykling].

8. Ställ in antalet cykelrepetitioner till 40. Välj det första steget och ställ in på 95 °C i 30 sekunder (Figur 25).



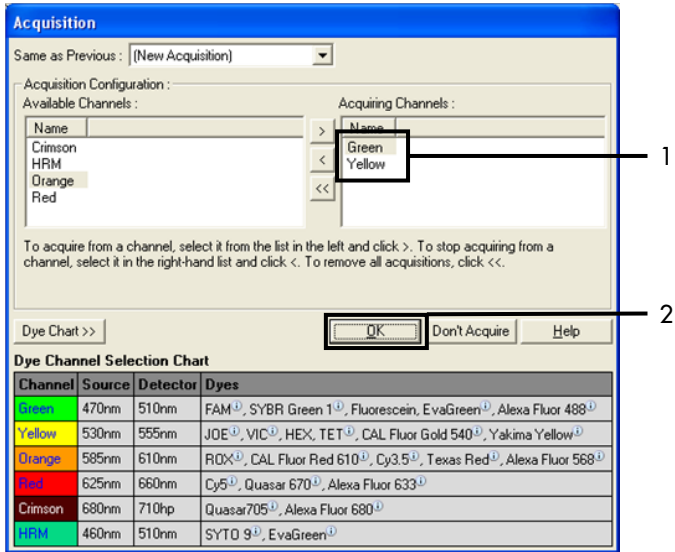
Figur 25. Cyklingssteg vid 95 °C. 1 = rutan "Cycle repeats" [Cykelrepetitioner], 2 = temperaturinställning för det första steget, 3 = tidsinställning för det första steget.

9. Markera det andra steget och ställ in på 60 °C i 60 sekunder. Klicka på Not Acquiring [hämtar inte] för att aktivera datahämtning under det här steget (Figur 26).



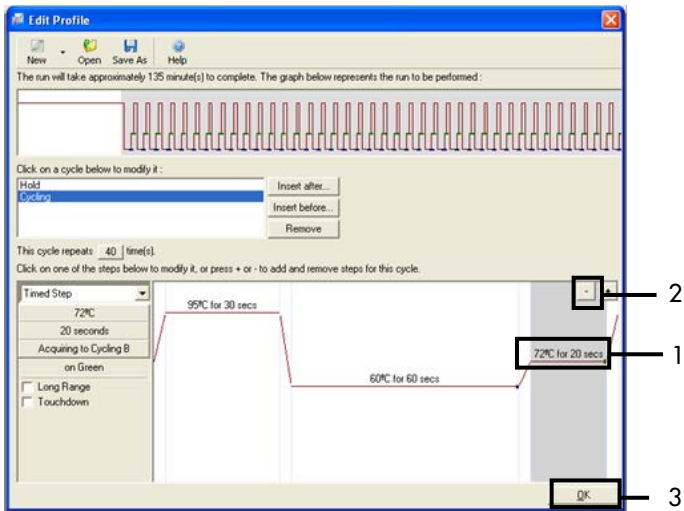
Figur 26. Cyklingssteg vid 60 °C. 1 = temperatur- och tidsinställning för andra steget, 2 = "Not Acquiring" [Hämtar inte].

10. Välj Green och Yellow som hämtningskanaler. Klicka på > för att överföra dessa kanaler från listan Available Channels [Tillgängliga kanaler] till avsnittet Acquiring Channels [Hämtar kanaler]. Klicka på OK (Figur 27).



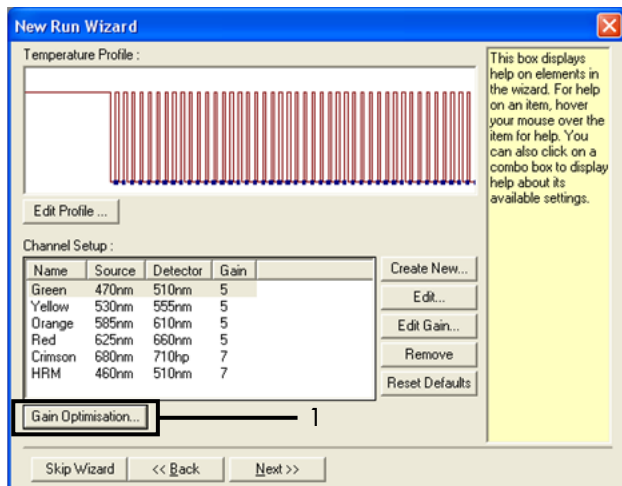
Figur 27. Hämtning vid cyklingssteg vid 60 °C. 1 = valda kanaler, 2 = "OK."

11. Markera det tredje steget och tryck - för att radera. Klicka på OK (Figur 28).



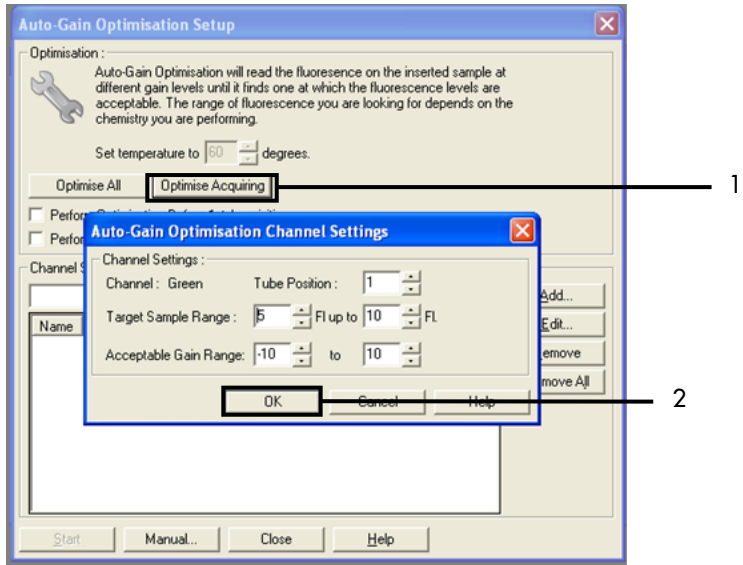
Figur 28. Ta bort förlängningssteg. 1 = tredje steget, 2 = "Delete" [Ta bort], 3 = "OK".

12. I nästa dialogruta klickar du på Gain Optimisation [optimering av förstärkning] (Figur 29).



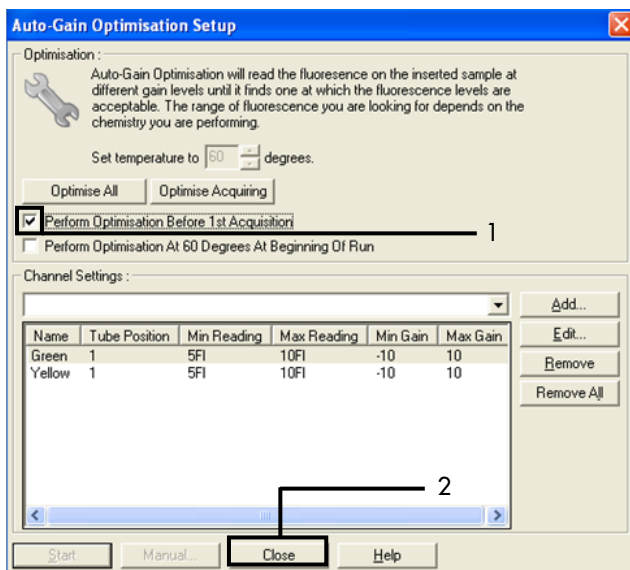
Figur 29. Gain optimisation [Optimering av förstärkning] (1).

13. Klicka på "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning]. Kanalinställningarna för varje kanal visas. Klicka på OK för att godta dessa standardvärden för bägge kanaler (Figur 30).



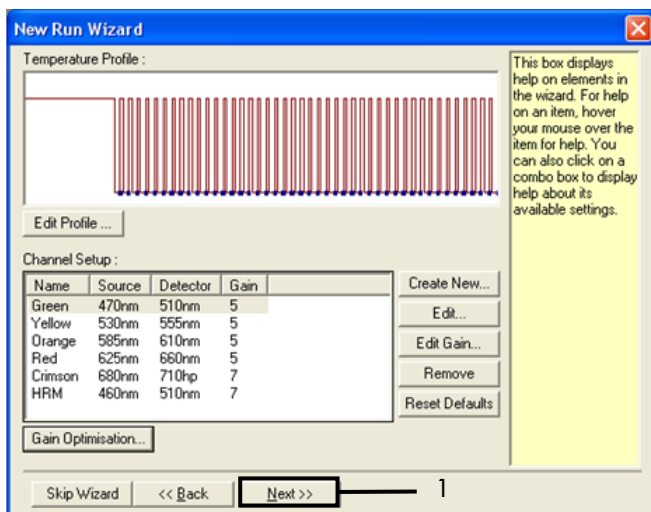
Figur 30. Automatisk nivåoptimering för Green-kanalen. 1 = "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning], 2 = "OK".

14. Markera kryssrutan Perform Optimisation before 1st Acquisition [Utför optimering för första hämtning], klicka på Close [Stäng] för att återgå till guiden (Figur 31).



Figur 31. Val av Green och Yellow kanaler. 1 = kryssrutan "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" [Utför optimering före första hämtning], 2 = "Close" [Stäng].

15. Klicka på Next [Nästa] (Figur 32). Klicka på Save Template [Spara mall] för att spara *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-mallen (*.ret-filen) på en lämplig plats.



Figur 32. "Next" [Nästa] (1).

Procedur (manuell)

Protokoll: Provbedömning (manuell)

Det här protokollet används för att bedöma den totala mängden amplifierbart DNA i prover och ska utföras innan EGFR-mutationsanalys.

- Bered proverna enligt beskrivningen i avsnittet Protokoll: Provbedömning, fram till steg 11.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet enligt beskrivningen i avsnitt Protokoll: konfiguration av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet Analys av provbedömningsdata.

Protokoll: EGFR-mutationsdetektion (manuell)

- När ett prov har klarat provbedömningen kan det testas för att detektera EGFR-mutationer.
- Förbered proverna enligt beskrivningen i avsnittet Protokoll: EGFR-mutationsdetektion, fram till steg 11.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet enligt beskrivningen i avsnitt Protokoll: konfiguration av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata.

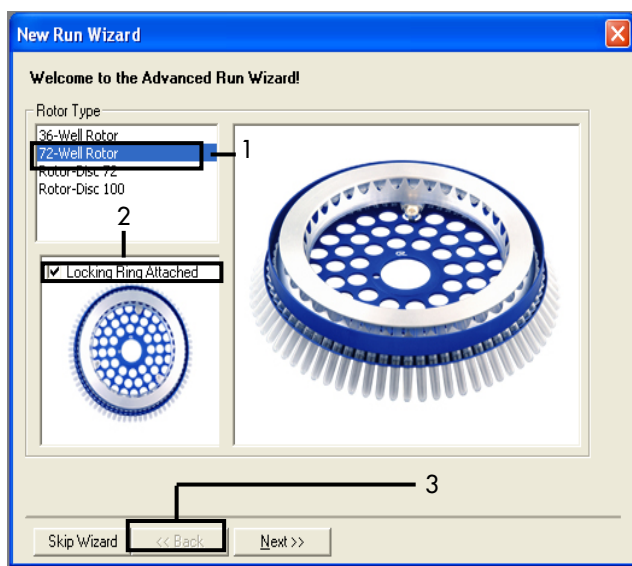
Protokoll: konfiguration av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q

Procedur

1. Öppna programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare och öppna motsvarande temperaturprofil (*.ret-fil) för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

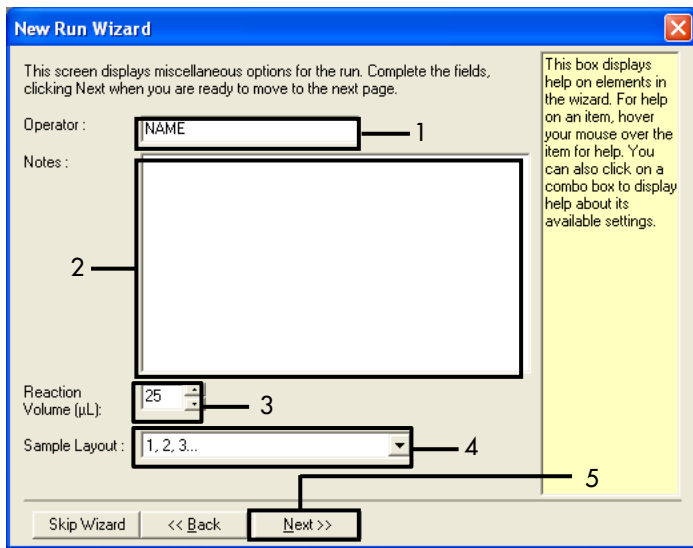
Instruktioner om hur du skapar temperaturprofilen och kontrollerar körningsparametrarna finns i Protokoll: Skapa en temperaturprofil.

2. Kontrollera att rätt rotor har valts och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Klicka på Next [Nästa] (Figur 33).



Figur 33. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och välkomstfönstret. 1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = "Next" [Nästa].

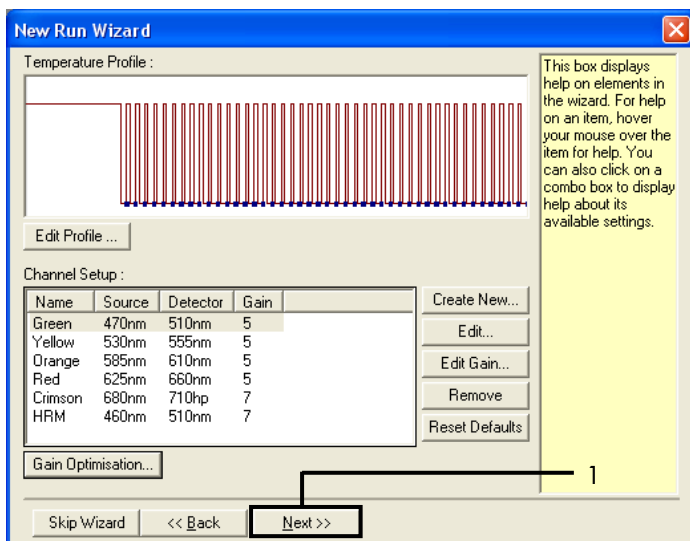
3. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden, bekräfta att reaktionsvolymen är inställd på 25 och att det i rutan "Sample Layout" [Provlayout] står "1, 2, 3...". Klicka på Next [Nästa] (Figur 34).



Figur 34. Alternativfönstret "New Run Wizard" [Guide för ny körning]. 1 = "Operator" [Användare], 2 = fältet "Notes" [Anteckningar], 3 = "Reaction Volume" [Reaktionsvolym], 4 = fältet "Sample Layout" [Provlayout], 5 = "Next" [Nästa].

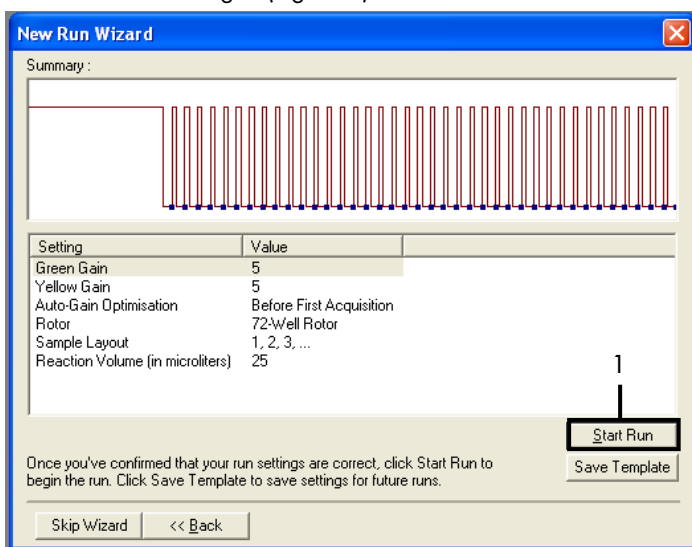
Obs! I nästa fönster kan du redigera temperaturprofilen. (Ingen redigering krävs eftersom temperaturprofilen har skapats enligt instruktionerna i Protokoll: Skapa en temperaturprofil)

4. Klicka på Next [Nästa] (Figur 35).



Figur 35. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och fönstret för temperaturregivering (1 = "Next" [Nästa]).

5. Verifiera sammanfattningen och klicka på "Start Run" [Starta körning] för att spara körningsfilen och starta körningen (Figur 36).



Figur 36. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och sammanfattningsfönstret (1 = "Start Run" [Starta körning]).

6. Utför ett av följande steg i det nya fönster som visas efter att körningen startar:

- Ange provnamnen.
- Klicka på Finish [slutför] och ange provnamnen senare. Gör det här genom att välja Sample [Prov] under körningen eller efter att körningen har slutförts.

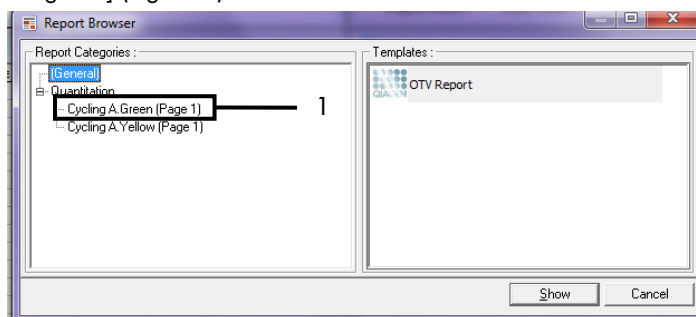
Viktigt: Om du klickar på Finish and Lock Samples [avsluta och lås prover], kan du inte längre redigera provnamnen. Iaktta särskild försiktighet när du anger provnamn för att säkerställa korrekt provtestning och analys.

Obs! Vid namngivning av prover ska du inte ange något namn i fälten för tomma rör i kolumnen "Name" [Namn].

7. När körningen är avslutad analyserar du data enligt avsnitten Analys av provbedömningsdata eller Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata enligt behov.

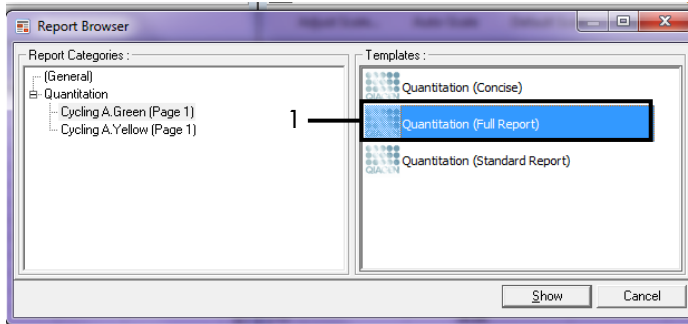
8. Om du behöver kvantifieringsrapporter klickar du på ikonen "Reports" [Rapporter] i verktygsfältet i Rotor-Gene Q-körningsfilen.

9. I rapportmenyn klickar du på Cycling A Green (page 1) (sida 1) under "Report Categories" [Rapportkategorier] (Figur 37).



Figur 37. Rapportmeny (1 = "Cycling A. Green (Page 1)" (sida 1)).

10. Välj "Quantitation" (Full Report) [Kvantifiering (fullständig rapport)] under "Templates" [Mallar] (Figur 38).



Figur 38. Kvantifieringsrapport (fullständig rapport) (1).

11. Generera rapporten genom att klicka på Show [Visa].
12. Klicka på Save As [Spara som] om du vill spara en elektronisk version.
13. Upprepa för Cycling A Yellow (Page 1) (sida 1).

Tolkning av resultat (manuellt)

Efter att *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit har körts (för bedömning av DNA-prover eller EGFR-mutationsanalys) analyserar du data enligt följande procedurer:

- Programinställningar för analys
- DNA-provbedömningsanalys (manuell)
Obs! I tabell 4 anges rörlayouten.
- EGFR-mutationsdetektionsanalys (manuell)
Obs! I tabell 7 anges rörlayouten.

Programinställningar för analys

1. Öppna aktuell körningsfil (*.rex) med programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare.
2. Om proverna inte har namngetts innan körningen ska utföras klickar du på Edit Samples [Redigera prover].
3. Skriv in namnen på proverna i kolumnen "Name" [Namn].
Obs! Ange inget namn för tomma rör.
4. Klicka på Analysis [analys]. På analysysidan klickar du på "Cycling A. Yellow" för att kontrollera Yellow (HEX) kanalen.
5. Klicka på Named On [namngiven].
Obs! Detta säkerställer att inga tomma rör ingår i analysen.
6. Välj Dynamic tube [Dynamiskt rör].
7. Välj Slope correct [Lutningskorrigering].
8. Välj Linear scale [linjär skala].

-
9. Välj Take Off Adj [Take off-just] och ange värdet 15.01 i den övre rutan ("If take off point was calculated before cycle" [om take off-punkten beräknades innan cykeln]) och 20.01 i den nedre rutan ("then use the following cycle and take off point" [använd då följande cykel och take off-punkt]).
 10. Ställ in tröskeln på 0.02 och kontrollera C_T -värdena för Yellow (HEX) kanal.
 11. På analysidan klickar du på "Cycling A. Green" för att kontrollera Green (FAM) kanalen.
 12. Välj "Named On" [Namngiven].
 13. Välj Dynamic tube [Dynamiskt rör].
 14. Välj Slope correct [Lutningskorrigering].
 15. Välj Linear scale [linjär skala].
 16. Välj Take Off Adj [Take off-just] och ange värdet 15.01 i den övre rutan ("If take off point was calculated before cycle" [om take off-punkten beräknades innan cykeln]) och 20.01 i den nedre rutan ("then use the following cycle and take off point" [använd då följande cykel och take off-punkt]).
 17. Ställ in tröskeln på 0.075 och kontrollera C_T -värdena för Green (FAM) kanal.

Analys av provbedömningsdata

Efter avslutad DNA-provbedömningskörning läser du avsnittet Programinställningar för analys och analyserar data på följande sätt. (Rörlayout visas i tabell 4, sida 25.)

Kör kontrollanalys

Negativ kontroll

För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får NTC inte generera ett C_T -värde under 40 i Green (FAM) kanalen.

För att garantera att körningen har konfigurerats korrekt måste NTC visa amplifiering i intervallet 29,85 till 35,84 i Yellow (HEX) kanalen. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.

Positiv kontroll

EGFR PC måste ge ett C_T -värde i Green (FAM) kanalen inom intervallet 28,13 till 34,59. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen. Körningen har misslyckats.

Obs! Om antingen den negativa eller den positiva kontrollen har misslyckats får provdata inte användas.

Provanalys

Om körningskontrollerna för DNA-provbedömning är giltiga får analysen fortsätta. Kontroll- C_T -värdet för ett prov måste vara inom intervallet 23,70 till 31,10 i Green (FAM) kanalen. Om provets C_T är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

- Provkontrollanalysens $C_T < 23,70$

Prover med ett kontroll- C_T på $< 23,70$ (hög DNA-koncentration) överbelastar mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom C_T -intervallet 23,70 till 31,10. Spädning av prov-DNA ökar C_T -värdet (en 1:1-spädning ökar C_T -värdet med ca 1,0). Späd proverna med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).

- C_T -värde för provets kontrollanalys $> 31,10$

Omextraktion av provet rekommenderas med ett kontroll- C_T -värde $> 31,10$ i Green (FAM) kanalen. Det finns inte tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla EGFR-mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

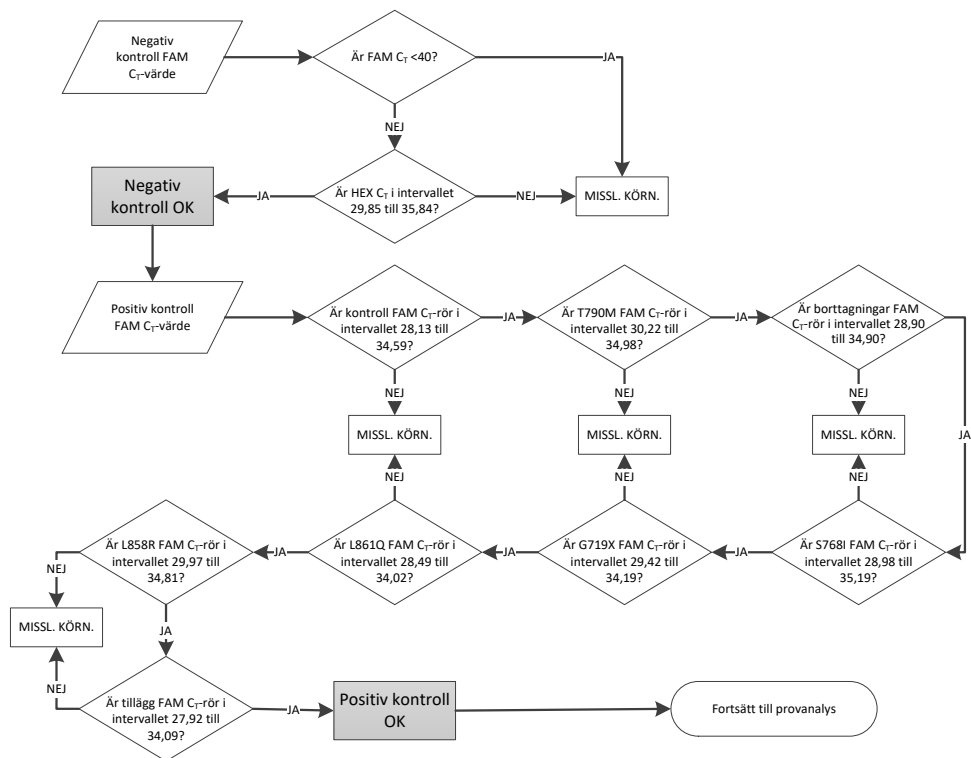
Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata

Ett prov måste klara DNA-provbedömningen innan det kan testas för att detektera EGFR-mutationer (se Analys av provbedömningsdata).

Efter avslutad EGFR-mutationsdetektionskörning läser du Programinställningar för analys och analyserar data på följande sätt. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

Kör kontrollanalys

Se flödesdiagrammet för körning av kontrollanalys i Figur 39.



Figur 39. Flödesdiagram för körning av kontrollanalys för EGFR-mutationsdetektion.

Negativ kontroll

För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får NTC för varje EGFR-mutationsanalys inte generera ett C_T -värde under 40 i Green (FAM) kanalen.

För att garantera att körningen har konfigurerats korrekt måste NTC visa amplifiering i intervallet 29,85 till 35,84 i Yellow (HEX) kanalen. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.

Positiv kontroll

För varje EGFR-mutationsanalys måste EGFR PC ge ett C_T -värde i Green (FAM) kanalen inom intervallet enligt tabell 16. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen. Körningen har misslyckats.

Obs! Provdata får inte användas om antingen den negativa eller den positiva körningskontrollen har misslyckats.

Tabell 16. Acceptabla C_T -intervall för positiva kontroller (EGFR-mutationsdetektionsanalys)

Reaktionsmix	Prov	Kanal	ΔC_T -cutoff-intervall
Kontroll	PC	Green	28,13 till 34,59
T790M	PC	Green	30,22 till 34,98
Borttagningar	PC	Green	28,90 till 34,90
L858R	PC	Green	29,97 till 34,81
L861Q	PC	Green	28,49 till 34,02
G719X	PC	Green	29,42 till 34,19
S768I	PC	Green	28,98 till 35,19
Tillägg	PC	Green	27,92 till 34,09

Provanalys – kontroll- C_T -värde för prov i Green (FAM) kanalen

Om de positiva och negativa kontrollerna för EGFR-mutationsdetekteringskörningen är giltiga får EGFR-mutationsdetektion i prover fortsätta.

Kontroll- C_T -värdet för ett prov i Green (FAM) kanalen måste vara inom intervallet 23,70 till 31,10. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

Om provets kontroll- C_T -värde är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

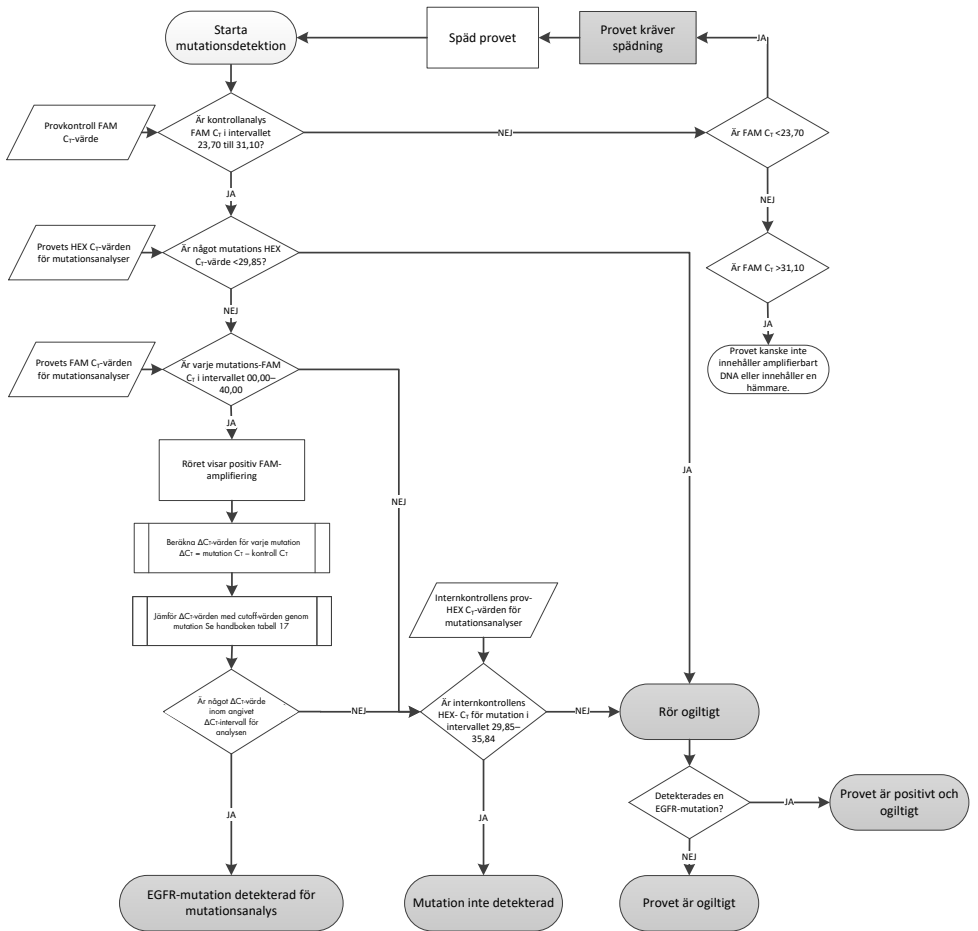
- Provkontrollanalysens $C_T < 23,70$

Prover med ett kontroll- C_T på $< 23,70$ (hög DNA-koncentration) överbelastar mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom C_T -intervallet 23,70 till 31,10. Spädning av prov-DNA ökar C_T -värdet (en 1:1-spädning ökar C_T -värdet med ca 1,0). Späd proverna med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).

- C_T -värde för provets kontrollanalys $> 31,10$

Omextraktion av provet rekommenderas med ett kontroll- C_T -värde $> 31,10$ i Green (FAM) kanalen. Det finns inte tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla EGFR-mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

Se Flödesdiagram för provanalys för EGFR-mutationsdetektion i Figur 40.



Figur 40. Flödesdiagram för provanalys för EGFR-mutationsdetektion.

Provanalys – C_T -värde för provets internkontroll i Yellow (HEX) kanalen

Obs! Se Flödesdiagram för provanalys för EGFR-mutationsdetektion i Figur 40.

Alla rör i varje prov måste analyseras. Kontrollera att varje rör genererar en HEX-signal inom intervallet 29,85 till 35,84 från den interna kontrollen i Yellow (HEX) kanalen. Det finns 3 möjliga slutresultat.

- Om den interna kontrollens C_T är under det angivna intervallet ($< 29,85$) för en mutationsanalys är resultatet ogiltigt för HEX-amplifiering (Yellow kanal). HEX-amplifieringen (Yellow kanal) är ogiltig för det aktuella röret.
- Om den interna kontrollens C_T hamnar inom det angivna intervallet (29,85 till 35,84) är resultatet positivt för HEX-amplifiering (Yellow kanal). HEX-amplifieringen (Yellow kanal) är giltig för det aktuella röret.
- Om den interna kontrollens C_T är ovanför det angivna intervallet ($> 35,84$) är resultatet negativt för HEX-amplifiering (Yellow kanal).

Om det finns amplifiering i Green (FAM) kanalen och ΔC_T -värdet för den reaktionen är mindre än eller lika med analysens cutoff-värde för det röret så är HEX-amplifieringen (Yellow kanal) giltig. Om det inte finns amplifiering i Green (FAM) kanalen för det röret eller ett ΔC_T -värde större än analysens cutoff-värde så är HEX-amplifieringen (Yellow kanal) ogiltig.

Internkontrollamplifieringen i den Yellow (HEX) kanalen kan misslyckas på grund av PCR-hämmare. Om provet späds kan effekten från hämmare minskas. Observera att den här åtgärden även leder till spädning av mål-DNA i provet. Späd proverna med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).

Provanalys – C_T -värde för provmutationsanalys i Green (FAM) kanalen

FAM-värdena (Green kanal) för alla sju EGFR-mutationsreaktionsmixarna ska kontrolleras mot värdena som visas i tabell 17. De angivna värdena är inom och inklusive de värden som visas. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

Tabell 17. Acceptabla provvärden för EGFR-mutationsreaktioner i Green kanalen (FAM) (EGFR-mutationsdetektionsanalys)

Analys	C _T -intervall	ΔC _T -cutoff-intervall
T790M	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤7,40
Borttagningar	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,00
L858R	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
L861Q	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
G719X	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
S768I	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
Tillägg	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,00

- Om Green kanalens (FAM) C_T för provet hamnar inom angivet intervall är FAM-amplifieringen positiv.
- Om Green kanalens (FAM) C_T för provet hamnar ovanför angivet intervall eller om amplifiering saknas är FAM-amplifieringen negativ.

Beräkna ΔC_T-värdet för varje EGFR-mutationsdetektor med positiv FAM-amplifiering enligt nedan, för att garantera att mutations- och kontroll-C_T-värdena kommer från samma prov. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

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

Jämför ΔC_T-värdet för provet med ΔC_T-cutoff-intervallet för den aktuella analysen (Tabell 17). Säkerställ att korrekt ΔC_T-cutoff-intervall tillämpas.

Den övre punkten för ΔC_T-cutoff-intervallet är den punkt ovanför vilken en positiv signal för en analys eventuellt kan bero på bakgrundssignal för ARMS-primern i vildtyps-DNA. Om provets ΔC_T-värde är högre än ΔC_T-cutoff-intervallet för en analys klassas provet som negativt eller som liggande utanför kitets detektionsgräns för den analysen. Om provvärdet ligger under den nedre gränsen för ΔC_T-cutoff-intervallet kan detta potentiellt bero på en fluorescensartefakt.

Varje mutationsreaktion för alla prover kommer att ha en av följande statusar:

- Mutation detekterad
- Mutation inte detekterad
- Ogiltig

Mutation detekterad

FAM-amplifieringen (Green kanal) är positiv och ΔC_T -värdet ligger inom ΔC_T -cutoff-intervallet. Om flera mutationer detekteras för ett prov kan alla rapporteras.

Mutation inte detekterad

FAM-amplifieringen (Green kanal) är positiv och ΔC_T -värdet ligger över ΔC_T -cutoff-intervallet.

FAM-amplifieringen (Green kanal) är negativ och HEX-amplifieringen (Yellow kanal, internkontroll) är positiv.

Ogiltig

HEX-amplifieringen (Yellow kanal, internkontroll) är ogiltig.

FAM-amplifieringen (Green kanal) är negativ och HEX-amplifieringen (Yellow kanal, internkontroll) är negativ.

Obs! Ett prov kan visa negativ HEX-amplifiering (Yellow kanal) i ett rör, och positiv FAM-amplifiering (Green kanal) i ett annat rör. I det fallet kan resultatet "mutation detected" [mutation detekterad] i det andra röret betraktas som giltigt, men den särskilda mutation som identifierats kanske inte är den enda möjliga mutationen i provet.

Det beräknade ΔC_T -värdet ligger under ΔC_T -cutoff-intervallet och HEX-amplifieringen (Yellow kanal, intern kontroll) ligger inom det förväntade intervallet.

Bilaga B: Installation av *therascreen* EGFR CE Assay Package

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är avsett för användning med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med en rotor med 72 brunnar. *therascreen* EGFR CE Assay Package finns tillgängligt för nedladdning på produktwebbsidan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit på www.qiagen.com. Navigera till Product Resources [Produktresurser] > Supplementary Protocols [Tilläggsprotokoll] om du vill ladda ner analyspaketet. I analyspaketet ingår "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" och "*therascreen* EGFR CE Locked Template".

Obs! *therascreen* EGFR CE Assay Package är endast kompatibelt med programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare. Se till att rätt version av programmet Rotor-Gene Q är installerat innan du fortsätter med installationen av *therascreen* EGFR CE Assay Package. Om ditt Rotor-Gene Q MDx-instrument levererades med en tidigare programversion kan du uppgradera genom att ladda ned version 2.3.5 eller senare av programmet Rotor-Gene Q från produktsidan för Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (i avsnittet "Product Resources" [Produktresurser] under "Operating Software" [Operativ programvara] på www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources).

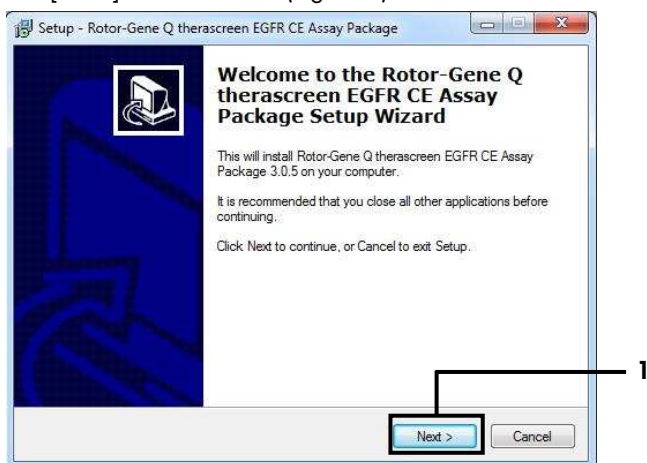
Procedur

1. Ladda ner *therascreen* EGFR CE Assay Package från www.qiagen.com och överför det till en virusfri USB-lagringsenhet.

Obs! Analyspaketet är tillgängligt på produktwebbsidan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Version 2. Gå till Product Resources [Produktresurser] > Supplementary Protocols [Tilläggsprotokoll] om du vill ladda ner analyspaketet.

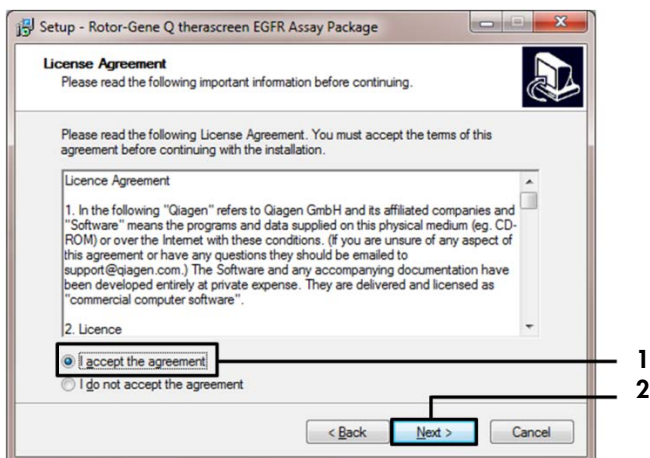
2. Sätt in USB-lagringsenheten i den dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
3. Lokalisera *therascreen* EGFR CE Assay Package-filen.

- Högerklicka på *therascreen* EGFR CE Assay Package, välj sedan Extract all [Extrahera alla] för att packa upp filen.
- Dubbelklicka på *therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.6.exe* för att starta installationen.
Du kan också leta upp och starta filen i filhanteraren på den anslutna datorn.
Installationsguiden till *therascreen* EGFR CE Assay Package öppnas.
- Klicka på Next [nästa] för att fortsätta (Figur 41).



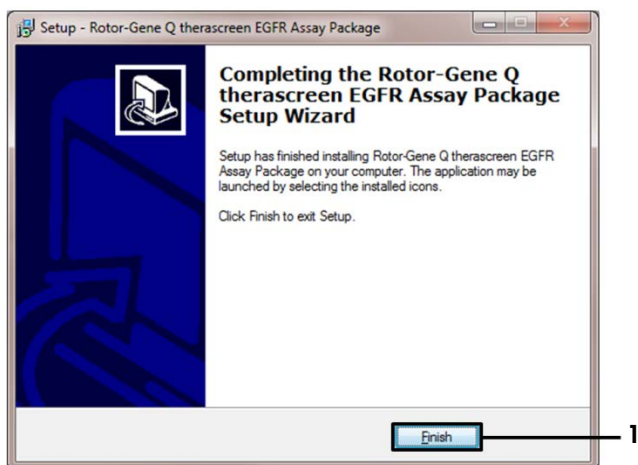
Figur 41. Dialogrutan "Setup Wizard" [Installationsguiden] (1 = "Next" [Nästa]).

- Läs licensavtalet i dialogrutan och godkänn avtalet genom att markera "I accept the agreement" [Jag godkänner avtalet]. Klicka på Next [Nästa] för att fortsätta (Figur 42).
Installationen startar automatiskt.



Figur 42. Dialogrutan "License Agreement" [Licensavtal]. 1 = "I accept the agreement" [Jag godkänner avtalet], 2 = "Next" [Nästa].

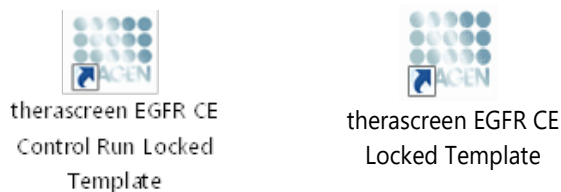
8. Efter att installationen slutförts klickar du på Finish [Avsluta] i den slutliga Setup [installationsguidens] dialogruta (Figur 43).



Figur 43. Slutföra installationsguiden (1 = "Finish" [Slutför]).

9. Starta om datorn.

Genvägar till både "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" [therascreen EGFR CE kontrollkörning låst mall] och "therascreen EGFR CE Locked Template" [therascreen EGFR CE låst mall] skapas automatiskt på skrivbordet (Figur 44).



Figur 44. Ikonerna EGFR CE Control Run Locked Template [EGFR CE kontrollkörning låst mall] och EGFR CE Locked Template [EGFR CE låst mall].

Kontaktinformation

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

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr,
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: Kontrollanalys, 7 mutationsanalyser, positiv kontroll, <i>Taq</i> DNA-polymeras, vatten för NTC och vatten för spädning av prov	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package	Programprotokollpaket för användning med <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit och QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	Nedladdning
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA förberedelser: QIAamp MinElute®-kolumner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 beredningar: 50 QIAamp MinElute-kolumner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM och tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykler och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033

Produkt	Innehåll	Kat. nr,
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykler och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, men installation och utbildning ingår inte	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanals-pipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska support eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

Datum	Ändringar
R5, januari 2019	Tillägg av auktoriserad representant (framsida). Uppdaterade avsnittet "Symboler".
R6, oktober 2019	Ändring av juridisk tillverkare (framsida) Anpassning av instrumentets namn från Rotor-Gene Q MDx till Rotor-Gene Q MDx Splex HRM för att stämma med instrumentetiketten Lade till förhållande för förvaring av reagens i avsnittet Förvaring och hantering av reagenser Uppdaterade tabell 1 och lade till en anteckning om borttagning av COSM6254 från COSMIC-databasen Uppdaterade avsnittet Begränsningar med information om exon 19-borttagningsanalysen och L858R-analysen Tog bort EC + REP-symbolen från omslagssidan och avsnittet Symboler
R7, juni 2020	Uppdaterade versionsnumret för EGFR Assay Package från 3.0.5 till 3.0.6 Uppdaterade referenserna till RGQ-programversion från 2.3 till 2.3.5 eller senare Uppdaterade tabell 9 och 17 för att implementera de nya cutoff-intervallen och justerade alla relevanta beskrivningar i handboken i enlighet med detta Uppdaterade alla Protokoll-kapitel för att inkludera information om vikten av blandning i avsnitten Viktigt att tänka på före start, markerade blandningsinformationen för alla blandningssteg, lade till blandningssteg där sådana krävdes Lade till flaggan MUTATION_EARLY_CT flagg in tabell 8 Tog bort alla referenser till CD och ersatte dessa med nedladdningsinformation

Avtal om begränsad licens för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

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

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN-gruppen); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GLOTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca-gruppen). Registrerade namn, varumärken med mera som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är en CE-märkt diagnosutrustning som uppfyller kraven i Europaparlamentets och Rådets direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik. Ej tillgängligt i alla länder.

1121935 06-2020 HB-1909-007 © 2020 QIAGEN, med ensamrätt.

