



Juni 2022

Bruksanvisning for *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Versjon 1

IVD

Til in vitro-diagnostikk

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

CE

REF

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R6 **MAT**

1127512NB

Innhold

| | |
|---|----|
| Tiltent bruk | 5 |
| Sammendrag og forklaring | 6 |
| Prinsippene for prosedyren | 7 |
| Settformat | 7 |
| Analyser | 8 |
| Kontroller | 9 |
| Materialer som medfølger | 10 |
| Settets innhold | 10 |
| Materialer som er nødvendige, men ikke følger med | 11 |
| Advarsler og forholdsregler | 12 |
| Sikkerhetsinformasjon | 12 |
| Generelle forholdsregler | 12 |
| Oppbevaring og håndtering av reagenser | 14 |
| Oppbevaring og håndtering av prøver | 16 |
| Prosedyre | 17 |
| Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner | 18 |
| Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett | 22 |
| Dataanalyse av mutasjonsvurdering | 29 |
| Feilsøkingsveiledning | 36 |
| Kvalitetskontroll | 38 |
| Begrensninger | 38 |
| Ytelsesegenskaper | 40 |

| | |
|--|----|
| Analytisk sensitivitet – grense for blank prøve (Limit of Blank, LOB) | 40 |
| Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD) | 40 |
| Analytisk sensitivitet – ΔC_T -cutoff og ΔC_T -cutoff-område | 42 |
| Repeterbarhet og reproduserbarhet | 42 |
| Effekt av DNA-input på C_T -verdier | 42 |
| Interfererende stoffer | 43 |
| Klinisk ytelse | 47 |
| Referanser | 48 |
| Kontaktinformasjon | 49 |
| Symboler | 50 |
| Vedlegg A: Mutasjonsdetaljer | 52 |
| Bestillingsinformasjon | 53 |
| Endringshistorikk for dokument | 55 |

Tiltenkt bruk

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er en in vitro-diagnostisk test for påvisning av exon 19-slettinger, exon 20- og 21-substitusjoner (henholdsvis T790M og L858R) genet for overhudsvekstfaktorreseptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), og gir en kvalitativ evaluering av mutasjonsstatusen. Resultater er beregnet på å bistå klinikerer i å identifisere pasienter med NSCLC som kan ha nytte av behandling med IRESSA® (gefitinib) når en vevsprøve ikke kan evalueres.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit skal brukes av øvet personale i et profesjonelt laboratoriemiljø med DNA-prøver ekstrahert fra blodplasma fra pasienter med ikke-småcellet lungekreft (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er beregnet på bruk i in vitro-diagnostikk.

Sammendrag og forklaring

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er et kit som er klart til bruk for påvisning av mutasjoner i det kreftrelaterte EGFR-genet ved bruk av polymerasekjedereaksjon (Polymerase Chain Reaction, PCR) på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter.

Ved hjelp av Scorpions®- og ARMS-teknologier gjør *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit det mulig å detektere følgende mutasjoner i EGFR-genet mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA.

- Delesjoner i ekson 19
- T790M
- L858R

Metodene i dette settet er svært selektive, og avhengig av total mengde DNA som er til stede, kan en lav mutasjonsprosent detekteres mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA. Selektivitets- og deteksjonsgrensene er bedre enn teknologier som f.eks. fluoroforterminatorsekvensering.

Prinsippene for prosedyren

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit benytter to teknologier – ARMS og Scorpions – for påvisning av mutasjoner under real-time PCR.

ARMS

Allel- eller mutasjonsspesifikk amplifikasjon oppnås ved bruk av ARMS (Amplification Refractory Mutation System). Taq DNA-polymerase (Taq) er effektiv til å skille mellom en match og en mismatch ved 3'-enden av en PCR-primer. Spesifikt muterte sekvenser kan også amplifiseres selektivt, også i prøver der hoveddelen av sekvensene ikke bærer mutasjonen. Når primeren har full match, utføres amplifikasjonen med full effektivitet. Når 3'-basen ikke matcher, oppstår kun et lavt nivå bakgrunnsamplifikasjon.

Scorpions

Deteksjon av amplifikasjon utføres med Scorpions. Scorpions er bifunksjonelle molekyler som inneholder en PCR-primer kovalent bundet til en probe. Fluoroforen i denne proben interagerer med en slukker som også er innlemmet i proben, og som reduserer fluorescens. Under polymerasekjedereaksjonen separeres fluoroforen og slukkeren når proben bindes til ampikonet. Dette fører til en økning i fluorescens fra reaksjonsrøret.

Settformat

Fire analyser leveres i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit:

- Én kontrollanalyse (Ctrl)
- Tre mutasjonsanalyser

Alle reaksjonsblandinger inneholder reagenser for å påvise mål som er merket med FAM™, og en internkontrollanalyse som er merket med HEX™. Den interne kontrollanalysen kan påvise forekomsten av hemmere som kan føre til falskt negative resultater. FAM-amplifisering kan utkonkurrere den interne kontrollamplifiseringen, og formålet med internkontroll er helt enkelt å vise at i tilfeller der det ikke forekommer FAM-amplifisering er dette et sant negativt resultat og ikke en mislykket PCR-reaksjon.

Analyser

Kontrollanalyse

Kontrollanalysen merket med FAM brukes til å bestemme den totale mengden DNA i en prøve. Denne analysen amplifiserer et område av ekson 2 på EGFR-genet. Primeren og proben er utformet for å unngå kjente EGFR-polymorfismer.

Mutasjonsanalyser

Hver mutasjonsanalyse inneholder en FAM-merket Scorpion-probe og en ARMS-primer for å skille mellom villtype-DNA og spesifikt mutant DNA.

Kontroller

Alle forsøksanalyseringer må inneholde følgende kontroller:

Positiv kontroll

Hver analysering må inneholde en positiv kontroll i rør 1–4. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit inneholder EGFR positiv kontroll (Positive Control, PC) som skal brukes som templat i reaksjonen for positiv kontroll. Resultatene for positiv kontroll vil bli vurdert for å sikre at settet fungerer i henhold til angitte akseptkriterier.

Negativ kontroll

Hver kjøring må inneholde en negativ kontroll (ingen-malkontroll; NTC) i rør 9-12. NTC består av nukleasefritt vann (H₂O) som skal brukes som «mal» for ikke-malkontroll. Ikke-malkontrollen brukes for å vurdere potensiell kontaminering under oppsett av kjøringen, og for å vurdere ytelsen til internkontrollreaksjonen.

Vurdering av internkontrollreaksjon

Hver reaksjonsblanding inneholder en intern kontroll i tillegg til målreaksjonen. Hvis det oppstår feil, kan dette innebære at det enten finnes hemmere som kan føre til falske negative resultater, eller at det har oppstått en operatørfeil i oppsettet for det aktuelle røret.

Hvis det oppstår feil ved bruk av intern kontroll pga. PCR-hemming, kan en fortykning av prøven redusere effekten av hemmerne, men det er viktig å merke seg at dette også vil fortynne mål-DNA-et. FAM-amplifisering kan utkonkurrere internkontrollamplifisering, slik at IC CT (HEX)-verdien som genereres, kan falle utenfor det spesifiserte området. FAM-resultatene er fremdeles gyldige for disse prøvene.

Materialer som medfølger

Settets innhold

***therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit**
Katalognr.
Antall reaksjoner

(24)
870311
24

| | | | |
|--|---|------------|------------|
| Rød | Control Reaction Mix (Kontrollreaksjonsblanding) | Ctrl | 2 × 600 µl |
| Lilla | T790M Reaction Mix (T790M reaksjonsblanding) | T790M | 600 µl |
| Oransje | Deletions Reaction Mix (Delesjonreaksjonsblanding) | Del | 600 µl |
| Rosa | L858R Reaction Mix (L858R reaksjonsblanding) | L858R | 600 µl |
| Beige | EGFR Positive Control (EGFR positiv kontroll) | PC | 300 µl |
| Mint | <i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA-polymerase) | <i>Taq</i> | 2 × 80 µl |
| Hvit | Nuclease-Free Water for No Template Control (Nukleasefritt vann for ikke-templatkontroll) | NTC | 1 × 1,9 ml |
| Hvit | Nuclease-Free Water for Dilution (Nukleasefritt vann til fortynning) | Dil | 1 × 1,9 ml |
| Bruksanvisning (håndbok) for <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit | | | 1 |

Materialer som er nødvendige, men ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheet, SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

- DNA-ekstraksjonssett (se «Prosedyre», side 17)
- Dedikerte pipetter* (justerbare) for prøveklargjøring
- Dedikerte pipetter* (justerbare) til klargjøring av PCR-masterblanding
- Dedikerte pipetter* (justerbare) til pipettering av templat-DNA
- DNase-, RNase- og DNA-frie pipettespisser med filter (for å unngå krysskontaminasjon, vi anbefaler pipettespisser med aerosolbarrierer)
- Vannbad eller lignende enhet med plass til 50 ml-sentrifugerør ved 60 °C.
- Varmeblokk eller lignende enhet som kan inkubere ved 56 °C†
- Knust is
- Arbeidsbenksentrifuge* med rotor til 2 ml-reaksjonsrør
- Vorteksmikser
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument* † med fluorescenskanaler for Cycling Green og Cycling Yellow (påvisning av henholdsvis FAM og HEX)
- Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3.5 eller nyere
- Remser med mikrorør og korker, 0,1 ml, til bruk med 72-brønners rotor (kat.nr. 981103 eller 981106)
- DNase-, RNase- og DNA-frie mikrosentrifugerør til fremstilling av masterblanding
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med en pipette med enkeltkanal (QIAGEN, kat. nr. 9018901)

* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

† I enkelte land er det eventuelt mulig å bruke Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumentet som er produsert i mai 2011 eller senere. Serienummeret på baksiden av instrumentet inneholder produksjonsdatoen. Serienummeret er i formatet «mmåånn» der «mm» angir produksjonsmånedene i tall, «åå» angir de siste to tallene i produksjonsåret og «nnn» angir den unike instrument-ID-en.

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostikk

Til profesjonell bruk

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon i gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS). Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Generelle forholdsregler

Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Bruk DNase-, RNase- og DNA-frie pipettespisser med filter, og pass på at pipettene er kalibrert i henhold til produsentens anvisninger.
- Positivt materiell (prøver og positive kontroller) skal oppbevares og ekstraheres atskilt fra alle andre reagenser og tilsettes i reaksjonsblandingen i et eget avgrenset område.
- Tin alle komponentene grundig ved romtemperatur (15–25 °C) før igangsetting av en analyse.
- Når komponentene er tint, kan de blandes ved å snu hvert rør 10 ganger og sentrifugere det en kort stund.

Merk: Vær svært forsiktig med tanke på å forhindre kontaminering av polymerasekjedereaksjoner (Polymerase Chain Reaction, PCR) med syntetisk kontrollmateriale. Vi anbefaler at du bruker egne, tilpassede pipetter til å klargjøre reaksjonsblandinger og tilsette DNA-templat. Klargjøringen og pipetteringen av reaksjonsblandinger må utføres i et annet område enn området som brukes til

tilsetting av templat. Rotor-Gene Q-rør må ikke åpnes etter at PCR-analyseringen er fullført. Dette for å forhindre laboratoriekontaminering med materiale etter PCR-analysen.

Merk: Reagensene valideres for manuelt oppsett. Dersom en automatisert metode brukes, kan det redusere antallet mulige reaksjoner grunnet reagenser som er påkrevd for å fylle «dødvolum» på disse instrumentene.

Merk: Alle reagenser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit settes sammen spesifikt til bruk sammen med de bestemte testene. Alle reagenser som følger med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, skal bare brukes med de andre reagensene i det samme *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Reagensene i settet må ikke erstattes med andre produkter dersom optimal ytelse skal opprettholdes.

Merk: Kun *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) vedlagt i settet skal benyttes. Bytt ikke ut med *Taq* DNA-polymerase fra andre sett av samme eller en annen type, eller med *Taq* DNA-polymerase fra en annen leverandør.

Merk: Reagenser for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er optimalt fortynnet. Videre fortyninger av reagenser anbefales ikke, da dette vil påvirke ytelsen negativt. Det er ikke anbefalt å bruke mindre enn 25 µl reaksjonsvolum, da dette vil øke risikoen for falske negative resultater.

Oppbevaring og håndtering av reagenser

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit sendes på tørris. Hvis en komponent i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ikke er frosset ved ankomst, hvis ytteremballasjen har blitt åpnet under frakt, eller hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkeseddel, bruksanvisning eller reagenser, må du kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren (se www.qiagen.com).

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit må oppbevares umiddelbart etter mottak ved -30 til -15 °C i en mørk fryser med konstant temperatur. Når *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit oppbevares under de spesifiserte oppbevaringsforholdene, er settet stabilt frem til angitt utløpsdato.

Når reagenser først er åpnet, kan de oppbevares i originalemballasjen ved -30 til -15 °C i 12 måneder eller frem til utløpsdatoen som oppgis på emballasjen, det som kommer først. Gjentatt tining og frysing bør unngås. Maks. åtte fryse-tine-sykluser kan benyttes.

Reagensene må tines ved omgivelsestemperatur i minst 1 time og maks 4,5 timer. Når reagensene er klare til bruk, kan PCR-reaksjonene settes opp, og Rotor-Gene Q-rørene, som inneholder masterblandingene og DNA-prøven, kan lastes over på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet umiddelbart. Den totale tiden fra start av PCR-oppsett til start av kjøringen bør ikke overskride:

- 6 timer hvis oppbevart ved romtemperatur
Merk: Denne tiden inkluderer både PCR-oppsett og -oppbevaring.
- 18 timer hvis oppbevart i kjøleskap ($2-8$ °C)
Merk: Denne tiden inkluderer både PCR-oppsett og -oppbevaring.

Merk: Scorpions (i likhet med alle fluorescensmerkede molekyler) i reaksjonsblandingsreagensene er lyssensitive. Beskytt kontroll- og reaksjonsblandingsreagenser mot lys for å unngå fotobleking.

Reagensene i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er optimalt fortynnet og trenger ingen videre rensing eller behandling før de brukes i analysen i henhold til bruksanvisningen (håndbok) for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller er oppbevart feil.

Oppbevaring og håndtering av prøver

Merk: Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

Prøvematerialet må være humant genomisk DNA, ekstrahert fra plasma. Prøvene må transporteres i henhold til standard patologimetodologi for å sikre prøve kvalitet.

Prosedyre

DNA-ekstraksjon

Ytelseskarakteristikkene for dette settet er opprettet ved å bruke DNA ekstrahert med QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (kat.nr. 55114). Når QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit brukes, må DNA-ekstraksjonen skje i henhold til instruksjonene i håndboken med spesielt fokus på følgende:

- Startvolumet for plasma er 2 ml.
- Før DNA-ekstraksjon skal 2 ml plasma sentrifugeres ved 3000 o/min i 2 minutter og supernatanten overføres til et rent rør.
- Proteinase K-volumet bør være på 250 µl.
- Proteinase K-nedbrytning bør pågå i 1 time ved 60 °C.
- Renset genomisk DNA skal elueres i 55 µl Buffer AVE (følger med i QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Renset genomisk DNA skal oppbevares ved –30 til –15 °C.

Merk: Alle analyser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit genererer korte PCR-produkter. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit vil imidlertid ikke virke på kraftig fragmentert DNA.

Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner

Viktige punkter før du starter

- For å oppnå korrekte resultater må du sørge for at den beskrevne blandingsprosedyren utføres ved hvert blandetrinn i analyseoppsettprosessen.
- Opptil 16 prøver kan vurderes på hver kjøring.
- Les «Generelle forholdsregler» på side 12 før du starter prosedyren.
- Bruk tid på å bli kjent med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM før du starter protokollen. Se instrumentets bruksanvisning.
- Bruk ikke vorteksmikser på *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) eller enhver blanding som inneholder *Taq* DNA-polymerase, siden dette kan forårsake inaktivering av enzymet.
- Pipetter *Taq* ved å plassere pipettespissen rett under væskeoverflaten for å unngå at spissen dekkes av overskytende enzym.
- For hver DNA-prøve må kontroll og mutasjonsanalyser analyseres i samme PCR-serie for å unngå variasjoner mellom kjøringene i de ulike analyseseriene.
- For å sikre effektiv bruk av reagensene i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit må DNA-prøver samles i den grad det er mulig for å opprette fulle kjøringene. Testing av prøver enkeltvis eller i små antall bruker opp mer reagens, og reduserer det totale antallet prøver som kan testes med et enkelt *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Ting du må gjøre før du starter

- Før bruk må alle reagenser tines helt i minst 1 time og maks 4,5 timer ved romtemperatur (15–25 °C), blandes ved å vende rørene 10 ganger, og sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet i bunnen av røret.
- Se til at *Taq* holder romtemperatur (15–25 °C) før hver bruk. Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet i bunnen av røret.
- Bland alle prøver ved å snu dem 10 ganger, og sentrifuger dem en kort stund for å samle innholdet i bunnen av røret.

Prosedyre

1. Tin helt alle reaksjonsblandinger, nukleasefritt vann for ikke-templatkontroll (No Template Control, NTC) og EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) skal tines helt ved romtemperatur (15–25 °C) i minst 1 time (Tabell 1). Når reagensene er tint, skal de blandes ved å vende hvert rør 10 ganger for å unngå lokale konsentrasjoner av salter. Sentrifuger deretter rørene en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.

Tabell 1. Tinetider, PCR-oppsettider og oppbevaringstemperaturer

| Min. opptiningstid | Maks. opptiningstid | Oppbevaringstemperatur etter PCR-oppsett | Maks. tid for PCR-oppsett og oppbevaring |
|--------------------|---------------------|--|--|
| 1 time | 4,5 timer | Romtemperatur (15–25 °C) | 6 timer |
| 1 time | 4,5 timer | 2–8 °C | 18 timer |

Merk: PCR-oppsett skal utføres ved omgivelsestemperatur. Oppbevaring viser til tiden mellom fullføringen av PCR-oppsett og starten av PCR-kjøringen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Merk: Få *Taq* DNA-polymerase (*Taq* i rør) til å oppnå romtemperatur (15–25 °C) samtidig med de andre reagensene (se «Oppbevaring og håndtering av reagenser» på side 14). Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet i bunnen av røret.

2. Utfør følgende trinn:

- 2a. Merk fire mikrosentrifugerør (medfølger ikke) i henhold til hver tilhørende reaksjonsblanding vist i Tabell 2.
- 2b. Klargjør tilstrekkelige masterblandinger (kontroll eller mutasjonsreaksjonsblanding [rør CTRL, T790M, Slettinger, L858R] pluss *Taq* DNA-polymerase [*Taq*]) for DNA-prøvene, én EGFR-positiv kontrollreaksjon (rør-PC) og én nuklease-fritt vann for ikke-templatkontroll (rør NTC)-reaksjon i henhold til volumet i Tabell 2.

Merk: Inkluder reagenser for 1 prøve, slik at det vil være nok til PCR-oppsettet. Masterblandingene inneholder alle komponentene som er nødvendige for PCR, unntatt prøven.

Tabell 2. Klargjøring av masterblandinger*

| Analyse | Reaksjonsblandingsrør | Reaksjonsblandingsvolum | Mengde Taq DNA-polymerase (Taq i rør) |
|------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Kontroll | CTRL | 19,50 µl × (n+1) | 0,50 µl × (n+1) |
| T790M | T790M | 19,50 µl × (n+1) | 0,50 µl × (n+1) |
| Delesjoner | Del | 19,50 µl × (n+1) | 0,50 µl × (n+1) |
| L858R | L858R | 19,50 µl × (n+1) | 0,50 µl × (n+1) |

* Når masterblandingen skal klargjøres, må du klargjøre nok til én ekstra prøve for å ha nok til PCR-oppsettet.

Merk: Ved klargjøring av masterblanding tilsettes den påkrevde mengden kontroll- eller mutasjonsreaksjonsblanding først og Taq DNA-polymerasen til slutt.

3. Plasser riktig antall PCR 4-rør (hver remse inneholder fire rør) i lasteblokken i henhold til oppsettet i Tabell 3. Ikke sett på lokkene.

Merk: La hettene ligge i plastbeholderen til de skal brukes.

4. Sett korken på røret for masterblanding, og vend røret 10 ganger for å blande Master Mix. Sentrifuger kort etterpå for å sikre at blandingen faller til bunnen av røret. Tilsett 20 µl masterblanding i hvert relevant PCR-rør umiddelbart.

5. Tilsett 5 µl nukleasefritt vann (H₂O) umiddelbart til ikke-templatkontrollens PCR-rør (PCR-rør nr. 9 – 12), og sett lokk på rørene.

6. Tilsett 5 µl av hver prøve til prøverørene (PCR-rør nr. 5–8, 13–16 og 17–72), og sett lokk på rørene.

7. Tilsett 5 µl EGFR positiv kontroll (PC) til de positive kontrollrørene (PCR-rør nr. 1–4). Hver DNA-prøve må kontrolleres med både kontrollen og alle mutasjonsanalysene. Oppsettet vises i Tabell 3.

Tabell 3. Oppsett for kontroll- og mutasjonsanalyser

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

8. Bruk en permanent tusj, og merk lokkene på de første rørene i den laveste tallposisjonen i hvert PCR 4-rør (f.eks. posisjon 1, 5 og 9, osv.) for å vise hvilken retning rørene skal lastes inn i 72-brønnersrotoren i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
9. Vend rør med påsatt lokk 4 ganger for å blande prøven og reaksjonsblandingen.
10. Plasser alle PCR 4-rør i riktige posisjoner i 72-brønners rotoren, og kontroller visuelt at alle rørene inneholder likt volum.
Merk: Forsikre deg om at rørremmene ikke har omvendt rekkefølge når du overfører dem til rotoren.
11. Dersom rotoren ikke er full, fyll gjenværende ledige plasser med tomme rør med påsatt lokk.
12. Sett umiddelbart rotoren inn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Se til at låseringen (Rotor-Gene Q MDx-tilbehør) er plassert øverst på rotoren for å sikre rørene under kjøringen.
13. Se instrumentoppsettet for Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (se «Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett» på side 22) for å opprette en temperaturprofil og starte kjøringen.

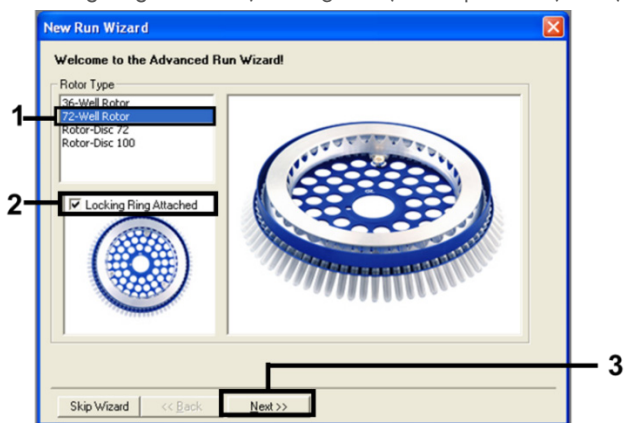
Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett

Detaljene vises i tabell 4.

Tabell 4. Syklusparametere

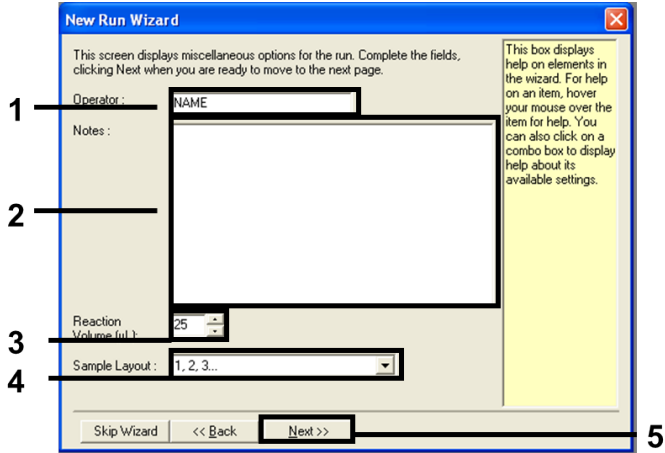
| Sykluser | Temperatur | Tid | Datainnsamling |
|----------|------------|-------------|------------------|
| 1 | 95 °C | 15 minutter | Ingen |
| 40 | 95 °C | 30 sekunder | Ingen |
| | 60 °C | 60 sekunder | Green and Yellow |

1. Dobbeltklikk på programvareikonet til Rotor-Gene Q programvareversjon 2.3 på datamaskinens skrivebord som er tilkoblet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Velg fanen «Advanced» (Avansert) i dialogboksen «New Run» (Ny analyse) som vises.
2. Opprett et nytt templat ved å velge Empty Run (Nullstill analyse), og klikk deretter på New (Ny).
Vinduet «New Run Wizard» (Veiviser for ny kjøring) vises.
3. Velg 72-Well Rotor (72 brønners rotor) som rotortype. Kontroller at låseringen er festet, og merk av i boksen Locking Ring Attached (Låsering festet). Klikk på Next (Neste) (figur 1).



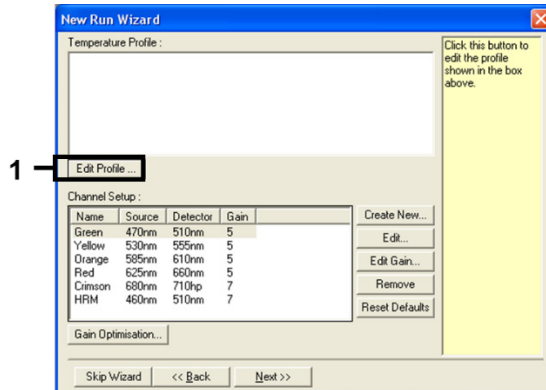
Figur 1. Dialogboksen «New Run Wizard» (Veiviser for ny kjøring).

4. Skriv inn navnet på operatøren i feltet Operatør (Operatør). Legg inn eventuelle kommentarer, og angi verdien i feltet Reaction Volume (Reaksjonsvolum) til 25. Påse at verdiene i feltet Sample Layout (Prøveoppsett) er 1, 2, 3 Klikk på Next (Neste) (figur 2).



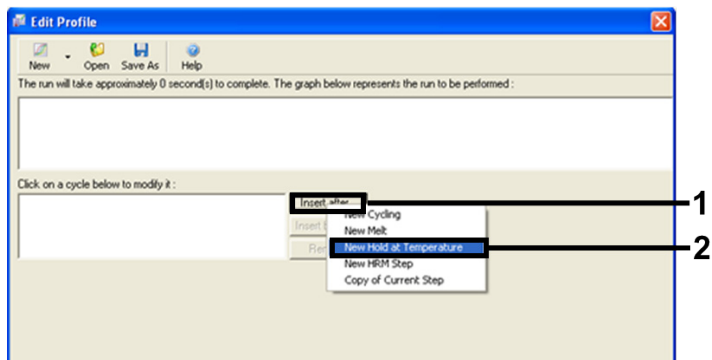
Figur 2. Innlegging av operatørnavn og reaksjonsmengder.

5. Klikk på Edit Profile (Rediger profil) i dialogboksen «New Run Wizard» (Veiviser for ny kjøring) (Figur 3) og still inn parameterne for kjøring i henhold til følgende prosedyre.



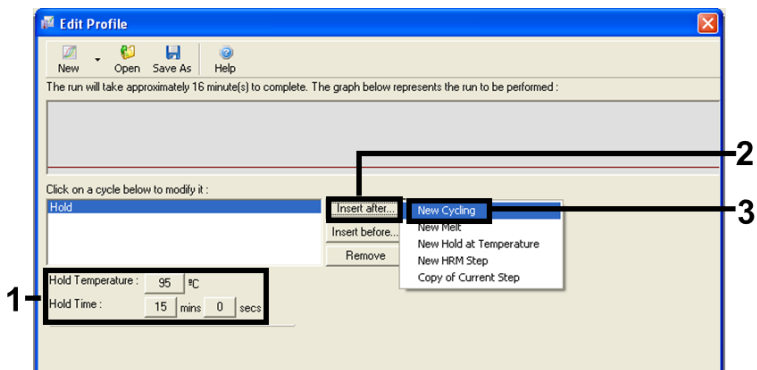
Figur 3. Redigering av profilen.

6. Klikk på **Insert after** (Sett inn etter), og velg **New Hold at Temperature** (Nytt hold ved temperatur) (figur 4).



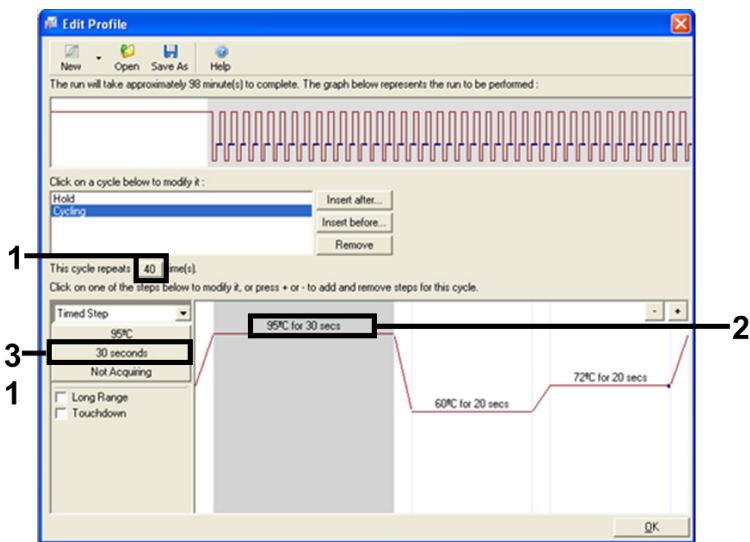
Figur 4. Innsetting av et innledende inkubasjonstrinn.

7. Endre verdien i feltet **Hold Temperature** (Pausetemperatur) til **95 °C** og verdien i **Hold Time** (Pausetid) til **15 mins 0 secs** (15 min. 0 sek). Klikk på **Insert After** (Sett inn etter), og velg deretter **New Cycling** (Ny syklus) (figur 5).



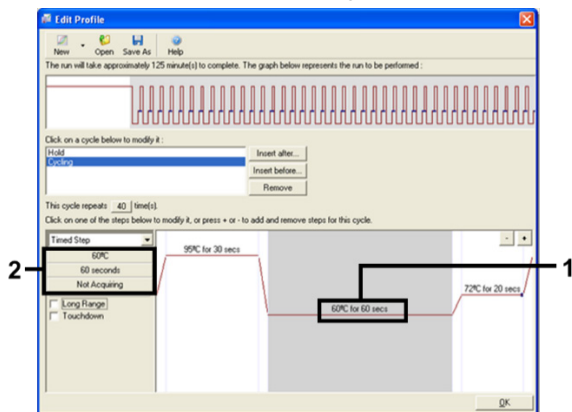
Figur 5. Innledende inkubasjonstrinn ved 95 °C.

8. Still inn antall syklusrepetisjoner til 40. Velg første trinn, og still inn 95 °C i 30 sekunder (figur 6).



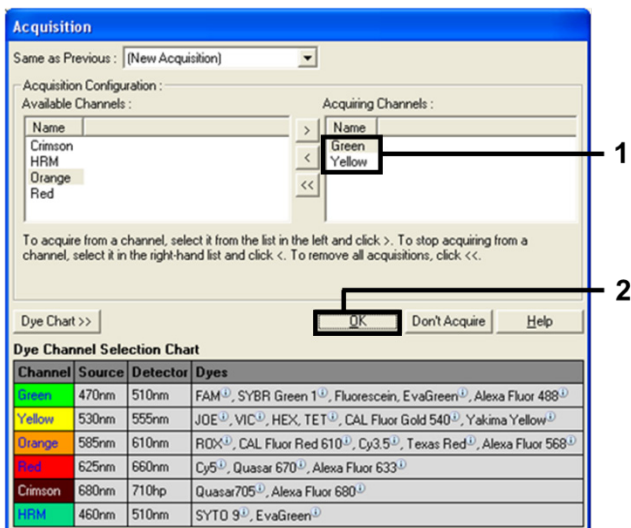
Figur 6. Sykluslitrinn ved 95 °C.

9. Marker det andre trinnet, og angi 60 °C i 60 sekunder. Klikk på Not Acquiring (Leser ikke av data) for å aktivere datainnsamling under dette trinnet. (Figur 7).



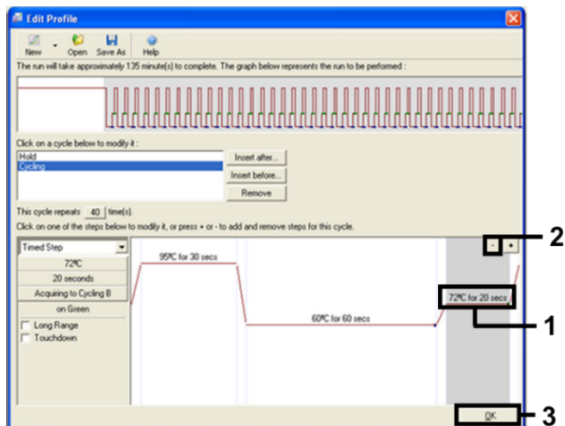
Figur 7. Sykluslitrinn ved 60 °C.

10. Velg Green og Yellow fra listen Available Channels (Tilgjengelige kanaler), og klikk deretter på > for å overføre dem til listen Acquiring Channels (Kanaler som skal avleses). Klikk på OK (Figur 8).



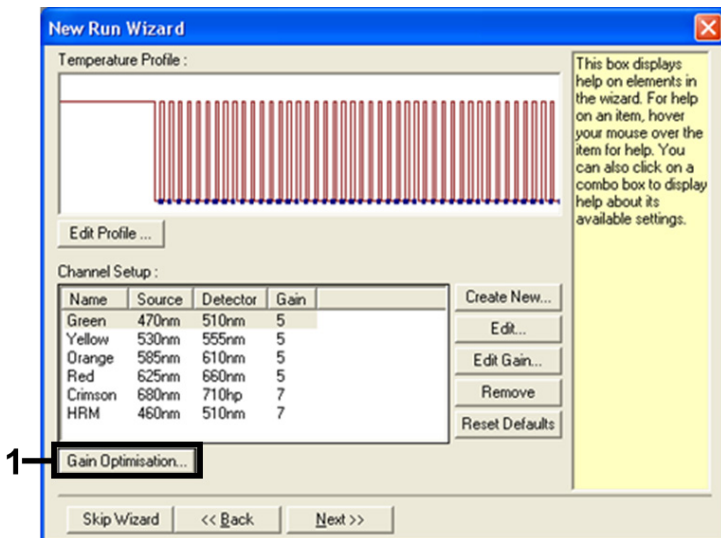
Figur 8. Avlesning ved syklustrinn på 60 °C.

11. Marker det tredje trinnet, og klikk på knappen - for å slette. Klikk på OK (Figur 9).



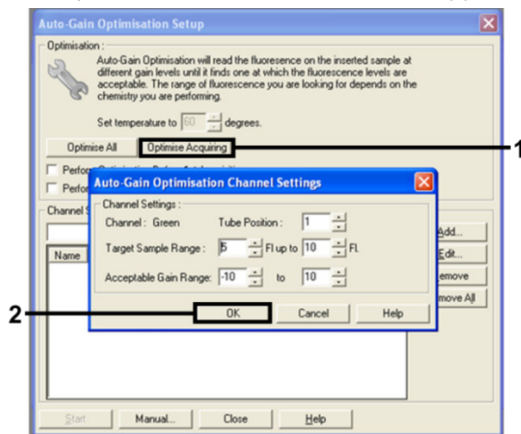
Figur 9. Fjerning av forlengelsestrinn.

12. I neste dialogboks klikker du på Gain Optimisation (Optimal forsterkning) (Figur 10).



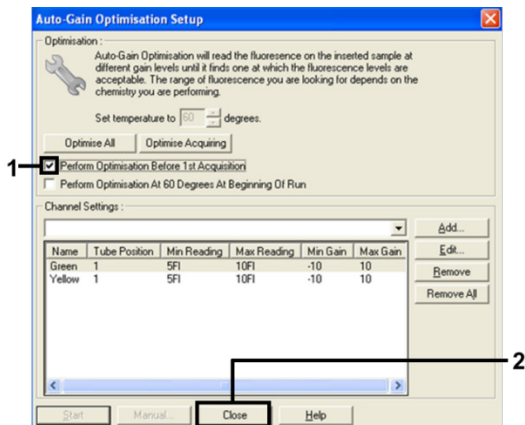
Figur 10. Optimal forsterkning.

13. Klikk på Optimise Acquiring (Optimaliser avlesning). Kanalinnstillinger vises for hver kanal. Klikk OK for å akseptere disse standardverdiene for begge kanaler. (Figur 11).



Figur 11. Automatisk optimal forsterkning for kanalen Green.

14. Kryss av i boksen Perform Optimisation before 1st Acquisition (Utfør optimalisering før 1. avlesning), og klikk deretter på Close (Lukk) for å gå tilbake til veiviseren (Figur 12).



Figur 12. Valg av grønne og gule kanaler.

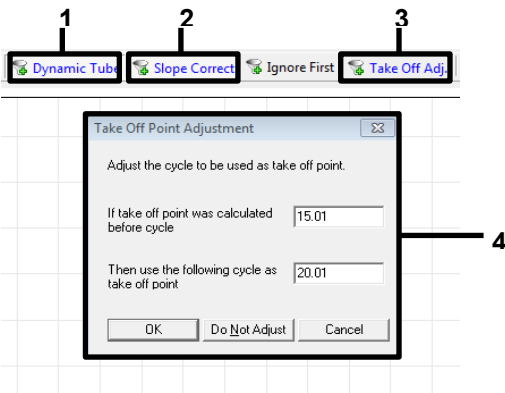
15. Klikk på Next (Neste) for å lagre templatet på riktig sted ved å velge «Save Template» (Lagre templat).

Dataanalyse av mutasjonsvurdering

Når analyseserien er fullført, må dataene analyseres med følgende prosedyre.

Sette opp programvareanalysen

1. Åpne den aktuelle filen ved hjelp av Rotor-Gene Q-programvare 2.3.5 eller nyere.
2. Klikk på Edit Samples (Rediger prøver) hvis prøvene ikke allerede har fått navn før kjøringen har startet.
3. Angi prøvenavnene i kolonnen Name (Navn).
Merk: La navnefeltene stå tomme for de tomme brønnene.
4. Klikk på Analysis (Analyse). Klikk på Cycling A Yellow på analysesiden for å merke av HEX-kanalen.
5. Kontroller at alternativet Dynamic Tube (Dynamisk rør) er merket. Klikk på Slope Correct (Riktig helling) og Linear scale (Lineær skala).
6. Klikk på Take Off Adj (Utgangspunktjust.), og legg inn verdiene 15.01 og 20.01 som vist i figur 13.



Figur 13. Normaliseringsinnstillinger for EGFR-analyse. 1 = «Dynamic Tube», (Dynamisk rør) 2 = «Slope Correct» (Riktig helling) 3 = «Take Off Adj» (Utgangspunktjust.) 4 = dialogvinduet «Take Off Adj» (Utgangspunktjust.) med parameterverdier.

7. Angi terskelen til 0.02 og kontroller HEX C_T -verdiene.
8. Klikk på Cycling A, Green på analysesiden for å vise FAM-kanalen. Angi parametere som i Figur 13 over.
Det dynamiske røret merkes.
9. Klikk på Slope Correct (Riktig helning) og Linear scale (Lineær skala).
10. Angi terskelen til 0.075 og kontroller FAM C_T -verdiene.

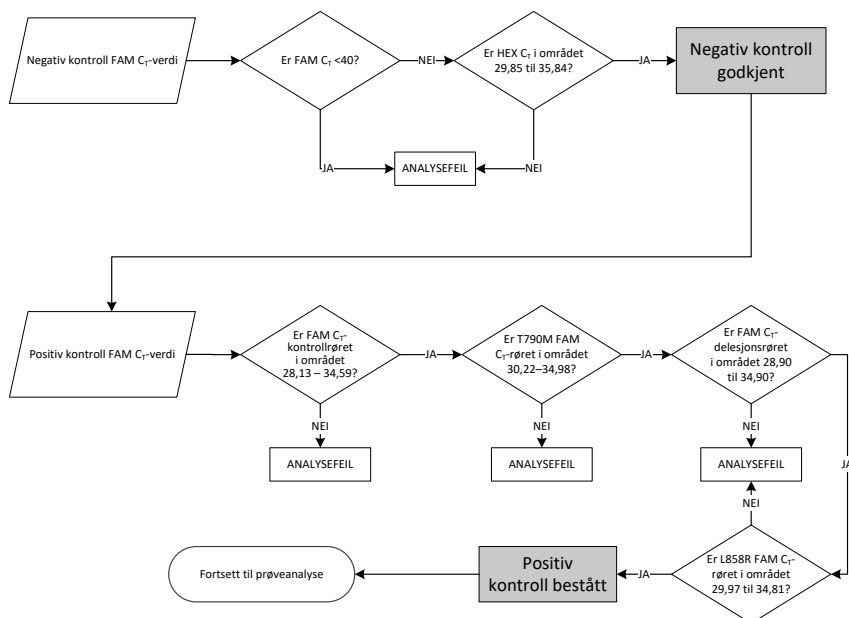
Seriekontrollanalyse

Når analyseringen er ferdig, kan dataene analyseres på følgende måte.

- **Negativ kontroll:** Hvis du vil sikre at det ikke er noen templatkontaminering, kan ikke NTC generere en C_T -verdi på under 40 i den grønne kanalen (FAM). NTC må vise amplifikasjon på 29,85 – 35,84 i den gule (HEX)-kanalen (internkontroll) for å sikre at analyseserien er satt opp korrekt.
Hvis det er positiv amplifikasjon i den grønne kanalen og/eller amplifikasjon utenfor området 29,85 – 35,84 i den gule kanalen, er analysen ugyldig.
- **Positiv kontroll:** EGFR positiv kontroll (PC) må gi en C_T for hver reaksjonsblanding som er innenfor, og som inkluderer angitt område i Tabell 5. En analyseserie med positiv kontrollverdi utenfor dette området indikerer et analyseoppsettproblem, og analyseserien bør betegnes som mislykket. Fortsett med analyseringen hvis den positive kontrollen gir en C_T innenfor området (FAM), men den interne kontrollen C_T (HEX) er utenfor området på 29,85 til 35,84.
Merk: Prøvedata må ikke brukes hvis den negative eller positive kontrollen mislykkes.

Tabell 5. Godkjent C_T-område for analysekontroller

| Reaksjonskontroll | Analyse | Kanal | C _T -område |
|----------------------|-------------------------------|--------------|------------------------|
| Positiv kontroll | Kontroll | Green (FAM) | 28,13-34,59 |
| | T790M | Green (FAM) | 30,22-34,98 |
| | Delesjoner | Green (FAM) | 28,90-34,90 |
| | L858R | Green (FAM) | 29,97-34,81 |
| Ikke-templatkontroll | Alle fire reaksjonsblandinger | Green (FAM) | ≥40,00 |
| | Alle fire reaksjonsblandinger | Yellow (HEX) | 29,85-35,84 |



Figur 14. Arbeidsflyt for seriekontrollanalyse.

Fortsatt at begge analysekontrollene er gyldige, må hver prøvekontrollanalyses CT-verdi ligge innenfor et område på 23,70 til 31,10 i den grønne (FAM) kanalen (tabell 6).

Tabell 6. Godkjent FAM C_T-område for prøvekontrollreaksjon

| Reaksjonsblanding | Kanal | Godkjent C _T -område |
|-------------------|-------------|---------------------------------|
| Kontroll | Green (FAM) | 23,70–31,10 |

Hvis prøven ligger utenfor dette området, gis følgende råd.

- Prøvekontrollanalyse-C_T på <23,70: Prøver med en kontroll-C_T på <23,70 vil overbelaste mutasjonsanalysene og må fortynnes. For å kunne se hver mutasjon på et lavt nivå, må de overkonsentrerte prøvene fortynnes slik at de faller innenfor området ovenfor med utgangspunkt i at en halv fortynning vil øke C_T med 1.
- Prøvekontrollanalyse C_T >31,10: Prøven inneholder ikke tilstrekkelig DNA for at analysen skal kunne utføres.

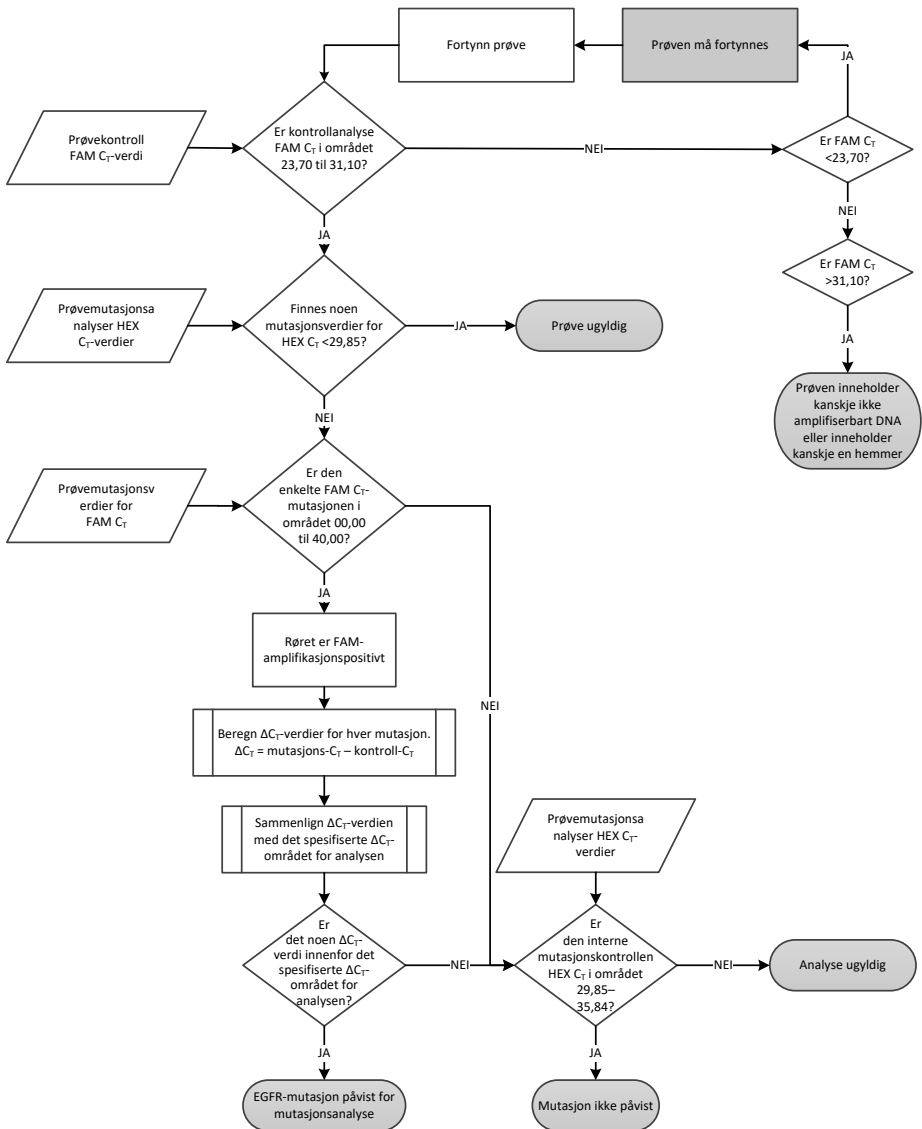
Fortsatt at begge analysekontrollene er gyldige og kontrollanalysen er innenfor området angitt i tabell 6, må hver prøvemutasjons-C_T-verdi ligge innenfor området angitt i tabell 7 i den grønne (FAM) kanalen. Hvis prøven ligger utenfor dette området, gis følgende råd.

Tabell 7. Godkjente reaksjonsverdier for prøvemutasjon

| Reaksjon | Reaksjonsblanding | Kanal | C _T -område |
|-------------------|---------------------|--------------|------------------------|
| Mutasjonsreaksjon | T790M | Green (FAM) | 0,00-40,00 |
| | Delesjoner | Green (FAM) | 0,00-40,00 |
| | L858R | Green (FAM) | 0,00-40,00 |
| | Alle tre mutasjoner | Yellow (HEX) | 29,85-35,84 |

Merk: Dersom en prøve ikke genererer en C_T (f.eks. C_T >40), kan grunnen være tilstedeværelsen av en hemmer, en feil i analyseoppsettet eller at det ikke fins noe amplifiserbart EGFR DNA.

- Intern kontroll C_T-verdi er innenfor 29,85 – 35,84: Det fins ikke noe amplifiserbart EGFR DNA.
- Internkontroll-C_T-verdien er ikke innenfor området 29,85–35,84: Dette kan indikere en feil i analyseoppsettet eller tilstedeværelsen av en hemmer. Det er mulig å redusere effekten av en hemmer ved å fortynne prøven, selv om dette også vil fortynne DNA-et.



Figur 15. Flytskjema for mutasjonsanalyse.

Prøvemutasjonsanalyser – FAM C_T-verdi

FAM-verdier for alle tre mutasjonsblandinger må kontrolleres opp mot verdiene angitt i Tabell 8.

Beregn ΔC_T -cutoff-verdien for hver mutasjonsprøve med positiv amplifikasjon vist på følgende måte, og kontroller at mutasjon- og kontroll-C_T er fra samme prøve.

$$\Delta C_T = \text{mutasjon } C_T - \text{kontroll } C_T$$

Sammenlign ΔC_T -verdien for prøven med ΔC_T -cutoff-området for den aktuelle analysen (tabell 8), og pass på at riktig cutoff-punkt brukes til hver analyse.

Tabell 8. Mutasjonsanalysens ΔC_T -cutoff-område

| Mutasjonsanalyse | ΔC_T -cutoff-område |
|------------------|-------------------------------|
| T790M | -10,00 \geq til \leq 7,40 |
| Delesjoner | -10,00 \geq til \leq 8,00 |
| L858R | -10,00 \geq til \leq 8,90 |

Den øvre grensen i ΔC_T -cutoff-området er punktet over der et positivt signal kan forekomme, på grunn av bakgrunns-signalet til ARMS-primeren på villtype-DNA. Hvis prøve ΔC_T -verdien er høyere enn det øvre punktet på ΔC_T -cutoff-området, er den klassifisert som «Mutation not detected» (Mutasjon ikke påvist) eller utenfor settets deteksjonsgrense. Hvis prøveverdien er innenfor ΔC_T -cutoff-punktet, anses prøven som positiv for en mutasjon detektert av den analysen. Hvis prøveverdien er under den nedre grensen for ΔC_T -cutoff-området, kan dette potensielt skyldes en fluorescensartefakt.

Merk: For prøver som ikke viser noen FAM-mutasjons-C_T, er det påkrevd med en evaluering av den interne kontroll-(HEX)-C_T-verdien for å avgjøre om det ikke er påvist mutasjon eller om analysen er ugyldig. Hvis HEX C_T-verdien er mellom 29,85 og 35,84, er det ikke påvist mutasjon. Hvis HEX ΔC_T -cutoff-verdien er utenfor dette området, er prøven ugyldig.

Som en helhet gjelder det for hver prøve at hver mutasjonsreaksjon få statusen mutasjon påvist, mutasjon ikke påvist eller ugyldig i henhold til følgende kriterier.

- Mutasjon påvist: FAM-amplifikasjon er positiv, og ΔC_T er innenfor ΔC_T -cutoff-området. Dersom flere mutasjoner påvises, kan alle rapporteres.
- Mutasjon ikke påvist:
 - FAM-amplifikasjon er positiv, og ΔC_T -verdien er over ΔC_T -cutoff-området, og HEX (internkontroll) er innenfor 29,85–35,84.
 - FAM-amplifikasjon er negativ, og HEX (internkontroll) er innenfor 29,85 – 35,84.
- Ugyldig: FAM-amplifikasjon er negativ, og HEX-amplifikasjon er utenfor det angitte området.
 - Beregnet ΔC_T er under ΔC_T -cutoff-området, og HEX (internkontroll) er innenfor det forventede området. En ΔC_T -verdi som er lavere enn $-10,00$, kan tyde på at det har oppstått en fluorescensartefakt.

Feilsøkingeveiledning

Denne feilsøkingeveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportsenters: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Ingen signal med EGFR positiv kontroll (Positive Control, PC) i fluorescenskanal for «Cycling Green»

- | | |
|--|--|
| a) Den valgte fluorescenskanalen for PCR-dataanalyse oppfyller ikke kravene i protokollen. | Ved dataanalyse må du velge fluorescenskanalen Cycling Green for analytisk EGFR PCR og fluorescenskanalen Cycling Yellow for internkontroll-PCR. |
| b) Feil programmering av temperaturprofil for Rotor Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet | Sammenlign temperaturprofilen med protokollen, og gjenta analyseringen hvis dette ikke er riktig. |
| c) Feil konfigurering av PCR | Kontroller arbeidstrinn ved hjelp av pipetteringsskjema, og gjenta PCR om nødvendig. |
| d) Oppbevaringsforholdene for én eller flere settkomponenter overholdt ikke anvisningene som ble gitt i «Oppbevaring og håndtering av reagenser» (side 14) | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se settetiketten) på reagensene, og bruk et nytt sett ved behov. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit er utløpt | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se settetiketten) på reagensene, og bruk et nytt sett ved behov. |

Kommentarer og forslag

Signaler med de negative kontrollene i fluorescenskanalen Cycling Green for analytisk PCR

- | | |
|--|--|
| a) Kontamineringen skjedde ved klargjøring for PCR | Gjenta PCR med nye reagenser i replikater. Lukk om mulig PCR-rørene rett etter tilsetting av prøven som skal testes. Sørg for at arbeidsområde og instrumenter dekontamineres regelmessig. |
|--|--|
-

Kryssing av flere terskler eller ΔC_T -verdi under cutoff-område

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a) Feil blanding under analyseoppsett | Gjenta PCR hvis dette berører en kontroll eller ny testing av en underkjent prøve. Følg bruksanvisningen, og vær spesielt nøye under blandingstrinnene. |
|---------------------------------------|--|

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Resultatene fra dette produktet må tolkes i sammenheng med alle relevante kliniske og laboratoriemessige funn og ikke brukes som eneste grunnlag for diagnose.

Produktet skal bare brukes av personell som har mottatt spesialopplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer og Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Analytiske valideringsstudier inkludert humant DNA ekstrahert fra plasmaprøver.

Produktet skal bare brukes sammen med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-real-time PCR-tyklere.

Streng overholdelse av *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit håndbok* er påkrevd for optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Ikke bruk komponenter som er gått ut på dato eller er oppbevart feil.

Primerne i EGFR-blandingen for slettingsreaksjon er designet for å rettes mot flere Exon 19-slettinger, og spanner nukleotider 55174772 til 55174795 (GRCh38 chr7), et område på 23 bp.

Mens Exon 19 slettingsanalysen er validert analytisk og er påvist å detektere spesifiserte slettinger i Exon 19 (se Tabell 13 i denne håndboken), er det imidlertid mulig å amplifisere flere mutasjoner (inkludert, men ikke begrenset til Exon 19-slettinger, Exon 19-innsettinger og L747P-mutasjonen) av blandingen for slettingsreaksjon.

Hvis det foreligger, gir slike tilleggsmutasjoner anledning til resultatet «Deletions Detected» (Slettinger detektert) for en gitt pasientprøve.

Det er også mulig å detektere L858Q-mutasjonen med reaksjonsblandingen L858R. Hvis L858Q-mutasjonen finnes i en pasientprøve, kan den derfor foranledige resultatet «L858R Mutation Detected» (L858R-mutasjon detektert).

Ytelsesegenskaper

Analytisk sensitivitet – grense for blank prøve (Limit of Blank, LOB)

For å vurdere ytelsen til *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit i fravær av malen, og for å sikre at en blank prøve eller en prøve med villtype-DNA ikke genererer et analytisk signal som kan indikere en lav mutasjonskonsentrasjon, ble NSCLC plasma EGFR villtype-DNA vurdert basert på 59 ulike prøver. Akseptkriteriene for studien (minst 95 % av villtypeprøver må ha en ΔC_T -verdi over den respektive cutoff-verdien) ble oppfylt.

Deteksjonsgrense (Limit of Detection, LOD)

LOD er minste prosentandel mutant DNA som kan detekteres i en bakgrunn av villtype-DNA når totalt amplifiserbart DNA (innenfor input-området) ga korrekte mutasjonsfunn ved 95 % for hver mutasjonspositive prøve (C95). Arbeidsområdet for DNA-input for analysen er definert av kontroll C_T ved det forhåndsspesifiserte området på 23,70 til 31,10.

LOD ble bestemt ved lave nivåer med DNA-input (kontroll- C_T ca. 30,10) ved hjelp av DNA fra FFPE-vev (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) fra *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD ble bestemt ved å bruke både kliniske FFPE-prøver og FFPE-cellelinjer ved lave nivåer av DNA-input for disse EGFR-mutasjonene.

LOD-verdier som ble etablert ved hjelp av FFPE-vev, ble testet for *therascreen* EGFR plasma RGQ PCR-settet med DNA fra konstruerte mutasjonspositive plasmaprøver.

De endelige fastsatte verdiene for LOD angitt i Tabell 9 på neste side, indikerer mutasjonsprosenten som ga en predikert sannsynlighet for korrekte andeler på 95 % for hver av mutasjonene.

Tabell 9. LOD-verdiene for hver av EGFR-mutasjonsanalysene

| Ekson | Mutasjon | COSMIC ID* | Fastsatte verdier for % LOD |
|-------|------------|------------|-----------------------------|
| 20 | T790M | 6240 | 17,5* |
| | | 6223 | 6,4* |
| | | 13551 | 4,24* |
| | | 12728 | 2,43† |
| | | 12419 | 16,87† |
| | | 12422 | 3,24† |
| | | 6218 | 9,83† |
| | | 6210 | 7,44† |
| | | 6254 | 10,2* |
| | | 12370 | 8,1* |
| 19 | Delesjoner | 12678 | 10,40† |
| | | 12367 | 4,39† |
| | | 12384 | 7,54† |
| | | 6225 | 6,5* |
| | | 6220 | 2,7* |
| | | 6255 | 0,81* |
| | | 12382 | 1,45* |
| | | 12383 | 4,58* |
| 21 | L858R | 6224 | 5,94* |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

* Fastsatte verdier for LOD bekreftet i plasma som en del av *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits LOD-bekreftelsesstudie.

† Disse mutasjonene ble ikke bekreftet i plasma.

Analytisk sensitivitet – ΔC_T -cutoff og ΔC_T -cutoff-område

En risikobasert tilnærming ble tatt med hensyn til falskt positive verdier ved angivelse av cutoff-verdiene for analyser, og estimerte LOB-verdier ble brukt som en komponent i utviklingen av cutoff-verdier.

De respektive ΔC_T -cutoff-verdiene som er etablert for hver mutasjonsanalyse i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, er angitt i tabell 10.

Tabell 10. *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ΔC_T -cutoff-områder

| Mutasjonsanalyse | ΔC_T -cutoff-område |
|------------------|------------------------------------|
| T790M | $-10,00 \geq \text{til} \leq 7,40$ |
| Delesjon | $-10,00 \geq \text{til} \leq 8,00$ |
| L858R | $-10,00 \geq \text{til} \leq 8,90$ |

Repeterbarhet og reproduserbarhet

Repeterbarhet og reproduserbarhet ble vurdert ved å teste prøver med mutasjonsnivå på 3 x LOD mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA ved tre teststeder, ved bruk av flere settbatcher, operatører og kjøringene over ulike dager, med to replikater av hver prøve. Testresultatene for 100 % av de mutante DNA-prøvene var mutasjonspositive for alle tre mutasjonsanalysene. Testresultatene for villtypeprøver var mutasjonsnegative for alle analysene på alle teststedene.

Effekt av DNA-input på C_T -verdier

DNA-inputnivået er angitt som den totale mengden amplifiserbart EGFR DNA i en prøve, som fastsatt av C_T -verdier fra kontrollreaksjonen. For å vise at ytelsen til *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er konsekvent på tvers av området for kontrollreaksjon C_T (23,70 – 31,10), ble alle tre EGFR-mutasjonsanalyser testet mot en seks-punkts, 1-i-3-fortynningsserie (DNA ekstrahert fra FPPE-cellelinjer). Mål- C_T for fortynning én for hver mutasjon, var på ca. 24,70.

Den endelige fortyning, som ga en C_T på ca. 32–33, lå utenfor området for kontrollreaksjon C_T . Generelt sett var ΔC_T -cutoff-verdiene som ble målt med forskjellige nivåer av totalt DNA-input, konsekvente på tvers av arbeidsområdet for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Interfererende stoffer

Endogene interfererende stoffer

De potensielt interfererende stoffene ble tilsatt i 3 x LOD konstruerte mutasjonpositive plasmaprøver. Prøver ble deretter testet med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Prøver med de potensielle interfererende stoffene ble sammenlignet med 3 x LOD konstruerte mutasjonpositive plasmaprøver som ikke inneholdt tilsatt interfererende stoff. Hvert interfererende stoff ble testet med 4 replikater.

En forskjell i >2 x standardavvik (Standard Deviation, SD) (tatt fra presisjonsstudien) mellom «testens» og «kontrollens» ΔC_T (f.eks. interfererende stoff) ble ansett som en indikasjon på potensiell interferens. I disse tilfellene er den observerte forskjellen i ΔC_T oppgitt.

Testkonsentrasjonene i Tabell 11 ble valgt basert på veiledningen angitt i CLSI-retningslinjen EP07-A2 og er representativ for maksimumskonsentrasjonene som er forventet å bli observert i en klinisk prøve.

Merk: Disse endogene forbindelsene ble tilsatt i konstruerte mutasjonpositive plasmaprøver som omfattet plasma fra friske donorer. Derfor ville disse endogene forbindelsene ha vært naturlig til stede i prøvene ved ukjente konsentrasjoner før tilsetting. Den endelige konsentrasjonen av hvert potensielle interfererende endogent stoff som ble testet, ville sannsynligvis ha vært større enn testkonsentrasjonen.

Tabell 11. Potensielt interfererende endogene stoffer

| Potensielt interfererende stoffer (Interfering Substance, IS) | Testkonsentrasjon |
|---|-------------------|
| Ukonjugert bilirubin | 15 mg/dl |
| Hemoglobin (humant) | 0,2 g/dl |
| Triglyserider | 3 g/dl |

T790M-analyse

Følgende endogene forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 11, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) på ytelsen til T790M-analysen:

- Triglyserider, differanse på $1,37 \Delta C_T$

Slettingsanalyse

Følgende endogene forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 11, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) på ytelsen til slettingsanalysen:

- Hemoglobin, differanse på $0,80 \Delta C_T$

L858R-analyse

Følgende endogene forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 11, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) på ytelsen til L858R-analysen:

- Bilirubin, differanse på $1,13 \Delta C_T$
- Triglyserider, differanse på $1,53 \Delta C_T$

Eksogene interfererende stoffer

De potensielt interfererende stoffene ble tilsatt i 3 x LOD konstruerte mutasjonsp positive plasmaprøver. Prøver ble deretter testet med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Prøver med de potensielle interfererende stoffene ble sammenlignet med 3 x LOD konstruerte mutasjonsp positive plasmaprøver som ikke inneholdt tilsatt interfererende stoff. Hvert interfererende stoff ble testet med 4 replikater.

En forskjell i >2 x standardavvik (Standard Deviation, SD) (tatt fra presisjonsstudien) mellom «testens» og «kontrollens» ΔC_T og «kontroll» ΔC_T (f.eks. interfererende stoff) ble ansett som en indikasjon på potensiell interferens. I disse tilfellene er den observerte forskjellen i ΔC_T oppgitt.

Testkonsentrasjonene i Tabell 12 ble valgt basert på veiledningen angitt i CLSI-retningslinjen EP07-A2, og har overskudd av den terapeutiske konsentrasjonen i alle tilfeller.

Tabell 12. Potensielt interfererende endogene stoffer

| Potensielt interfererende stoff (Interfering Substance, IS) | Testkonsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|--|
| Citalopramhydrobromid | 0,75 |
| Paroksetinhydrokloridhemihydrat | 1,14 |
| Sertralinhydroklorid | 0,67 |
| Fluoksetinhydroklorid | 3,87 |
| Paracetamol | 200,7 |
| K ₂ EDTA | 3600 |

T790M-analyse

Følgende eksogent forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 12, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) på ytelsen til T790M-analysen:

- Citalopram-hydrobromid, differanse på $0,52 \Delta C_T$
- Sertralin-hydroklorid, differanse på $0,47 \Delta C_T$
- Fluoksetin-hydroklorid, differanse på $0,48 \Delta C_T$

Slettingsanalyse

Følgende eksogent forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 12, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) på ytelsen til slettingsanalysen:

- Fluoksetin, differanse på $0,73 \Delta C_T$

L858R-analyse

Følgende eksogent forbindelser ved konsentrasjonene som ble angitt i Tabell 12, viste seg å ha en effekt $>2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) på ytelsen til L858R-analysen:

- Citalopram-hydrobromid, differanse på $0,72 \Delta C_T$
- Paroksetinhydrokloridhemihydrat, differanse på $0,92 \Delta C_T$
- Sertralin-hydroklorid, differanse på $0,82 \Delta C_T$
- Fluoksetin-hydroklorid, differanse på $0,98 \Delta C_T$
- Paracetamol, differanse på $0,81 \Delta C_T$
- K_2 EDTA, differanse på $0,57 \Delta C_T$

Klinisk ytelse

Den kliniske NCT01203917-studien var en fase IV, åpen, enkeltarmet studie som ble utført for å vurdere effekten og sikkerheten/toleransen for gefitinib i førstelinje hos kaukasiske pasienter med EGFR-mutasjonspositiv NSCLC i stadium IIIA/B/IV.

Hvorvidt pasienter var kvalifisert for innmelding i den kliniske studien NCT01203917, ble bestemt av tilstedeværelsen av EGFR-sensibiliserende mutasjoner. EGFR-mutasjonsstatus for NSCLC-pasienter ble vurdert ved hjelp av klinisk studietest analyse (Clinical Trial Assay, CTA) med DNA fra matchede vevs- og plasmaprøver. Studien omfattet et forhåndsplanlagt biomarkørutforskende mål om å fastslå om plasmaprøver kan vurderes for mutasjonsanalyse dersom vevsprøver ikke er tilgjengelig. Resultatene viste høyt samsvar mellom samme vev- og plasmaprøver ved 94,3 %, med analysespesifisitet på 99,8 % og sensitivitet på 65,7 %.

Retrospektiv testing av plasmaprøver fra pasienter screenet for den kliniske NCT01203917-studien ble utført med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Det ble utført en tilleggsstudie for å vurdere overensstemmelse mellom *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit og CTA-testen som ble brukt til å velge ut pasienter til den kliniske NCT01203917-studien. Ekvivalens mellom CTA og *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ble vist.

Referanser













1. Douillard, J.Y., et al. (2014). First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 110(1), 55.
2. Walsh, K., et. al. (2014) A cautionary lesson on the use of targeted methods for EGFR mutation analysis; a case report. *J. Clin. Pathol.* 67, 734
3. Huang, J., Wang, Y., Zhai, Y., and Wang, J. (2018) Non-small cell lung cancer harboring a rare EGFR L747P mutation showing intrinsic resistance to both gefinitib and osimertinib (AZD9291): A case report. *Thorac. Cancer.* 9, 745

Kontaktinformasjon

Hvis du trenger teknisk hjelp eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringe 00800-22-44-6000 eller kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå til www.qiagen.com).

Symboler

Følgende symboler kan vises i bruksanvisningen eller på emballasjen og merkingen:

| Symbol | Symbolforklaring |
|--|--|
|  Σ <N> | Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner |
|  | Siste forbruksdato |
|  | In vitro-diagnostisk medisinsk enhet |
|  | Katalognummer |
|  | Lotnummer |
|  | Materialnummer (dvs. komponentmerking) |
|  | Komponenter |
|  | Innhold |
|  | Nummer |
|  | Globalt artikkelnummer |
| Rn | R står for revisjon av bruksanvisningen, og n er revisjonsnummeret |
|  | Temperaturbegrensning |
|  | Produsent |

Symbol

Symbolforklaring



Se bruksanvisningen



Advarsel/forsiktig

Vedlegg A: Mutasjonsdetaljer

Tabell 13 viser COSMIC ID-ene som er hentet fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabell 13. Liste med mutasjoner og COSMIC ID-er

| Mutasjon | Ekson | Base-ending | COSMIC-ID |
|------------|-------|----------------------------------|-----------|
| T790M | 20 | 2369C>T | 6240 |
| L858R | 21 | 2573T>G | 6224 |
| | | 2235_2249del15 | 6223 |
| | | 2235_2252>AAT (kompleks) | 13551 |
| | | 2236_2253del18 | 12728 |
| | | 2237_2251del15 | 12678 |
| | | 2237_2254del18 | 12367 |
| | | 2237_2255>T (kompleks) | 12384 |
| | | 2236_2250del15 | 6225 |
| | | 2238_2255del18 | 6220 |
| | | 2238_2248>GC (kompleks) | 12422 |
| Delesjoner | 19 | 2238_2252>GCA (kompleks) | 12419 |
| | | 2239_2247del9 | 6218 |
| | | 2239_2253del15 | 6254 |
| | | 2239_2256del18 | 6255 |
| | | 2239_2248TTAAGAGAAG>C (kompleks) | 12382 |
| | | 2239_2258>CA (kompleks) | 12387 |
| | | 2240_2251del12 | 6210 |
| | | 2240_2257del18 | 12370 |
| | | 2240_2254del15 | 12369 |
| | | 2239_2251>C (kompleks) | 12383 |

Bestillingsinformasjon

| Produkt | Innhold | Kat.nr. |
|---|---|---------|
| <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – for deteksjon av mutasjoner i EGFR-genet | | |
| <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24) | Til 24 reaksjoner: 1 kontrollanalyse, 7 mutasjonsanalyser, positiv kontroll, Taq DNA-polymerase | 870311 |
| Rotor-Gene Q MDx og tilbehør | | |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System | Real-time PCR-sykluser og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring ikke inkludert | 9002033 |
| Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform | Real-time PCR-sentrifuge og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, dyp rød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, 1-års garanti på deler og utførelse, installasjon og opplæring | 9002032 |
| Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes | Aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med enkeltkanal-pipette i 72 x 0,1 ml-rør | 9018901 |
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250) | 250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner | 981103 |

| Produkt | Innhold | Kat.nr. |
|-------------------------------------|--|---------|
| Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500) | 10 x 250 rømsler med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner | 981106 |
| Relaterte produkter | | |
| QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit | Til 50 klargjøringer: QIAamp Mini-kolonner, rørforlengere (20 ml), QIAGEN Proteinase K, Carrier RNA, buffere, VacConnectors og Collection Tubes (1,5 ml og 2 ml) | 55114 |

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, kan du se i håndboken eller bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan fås på forespørsel fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

Endringshistorikk for dokument

Revisjon

Beskrivelse

R4, oktober 2019

Endret registrert produsent (**forsiden**)
Tilpasning av instrumentnavn fra Rotor-Gene Q MDx til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM for å tilpasses med navnet på instrumentetiketten
Korrigerende instruksjoner for oppbevaring av reagenser fra 90 dager til 12 måneder eller til utløpsdatoen
Oppdaterte avsnittet Begrensninger med informasjon vedrørende exon 19-slettingsanalysen og L858R-analysen
Revidert **tabell 9** for å erstatte den dupliserte exon 21 L858R med exon 19-slettinger
EC + REP-symbolet fjernet fra forsiden og avsnittet om symboler

R5, juni 2020

Oppdaterte referanser til RGQ-programvareversjon fra 2.3 til 2.3.5 eller nyere
Oppdaterte tabell 8 og 10 for å implementere det nye ΔC_T -cutoff-området og justerte ellers alle relevante beskrivelser i hele håndboken
Oppdaterte alle kapitler relatert til protokoller for å inkludere viktig informasjon om blanding, angitt under viktige punkter før de ulike avsnittene starter, og markerte alle blandingsdetaljer ved alle blandingstrinn
Lagt til et blandingstrinn i delen «Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner»
Oppdaterte delen «Feilsøking» for å legge til løsning for kryssing av flere terskler

R6, juni 2022

Oppdaterte tabell i avsnittet Interfererende stoffer for å revidere testkonsentrasjonen for bilirubin (ukonjugert) fra 150 til 15 mg/dl

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

Denne siden skal være tom

Begrenset lisensavtale for *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i panelet. QIAGEN gir ingen lisens for noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette panelet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette panelet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse andre protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette panelet og/eller dets bruk ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette panelet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av panelet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med panelet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Varemerker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], *therascreen*[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA[®] (AstraZeneca Group). Registrerte navn, varemerker, osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke anses som ubeskyttet ved lov, selv når de ikke er spesielt merket som sådan.

Juni-2022 HB-1898-007 1127512NB © 2022 QIAGEN. Med enerett.

