

Oktober 2019

Håndbog til *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR Kit



Version 2



Til in vitro-diagnostisk brug

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



874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, TYSKLAND



1119191DK

Indhold

Tilslgtet anvendelse	5
Oversigt og forklaring	6
Funktionsprincip	9
Medfølgende materialer	13
Kit-indhold	13
Nødvendige materialer, som ikke medfølger	14
Advarsler og forholdsregler	16
Generelle forholdsregler	16
Opbevaring og håndtering af reagenser	18
Forsendelsesbetingelser	18
Opbevaringsbetingelser	18
Håndtering og opbevaring af prøver	20
Procedure	21
DNA-ekstrahering og -forberedelse	21
Protokol: Prøvevurdering	22
Protokol: Påvisning af EGFR-mutation	33
Fortolkning af resultater (automatiseret)	46
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package-flag	48
Fejlfindingsvejledning	52
Kvalitetskontrol	53
Begrænsninger	53

Ydelseskarakteristik.....	55
Analytisk ydeevne	55
Tomgrænse (Limit of Blank, LOB), arbejdsområde og cutoff-værdier	55
Effekten af DNA-input på ΔC_T -værdier	56
Krydsreaktivitet.....	56
Nøjagtighed: Sammenligning med den analytiske referencemetode	57
Værdier for påvisningsgrænse (Limit of Detection, LOD)	58
Interferens.....	60
Reproducerbarhed	61
Klinisk ydeevne	65
Kliniske resultatdata: GIOTRIF®	65
Kliniske resultatdata: IRESSA®	67
Litteraturhenvisninger.....	69
Symboler	71
Bilag A: Vejledningsprotokol til <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit	72
Generelle oplysninger.....	72
Protokol: Oprettelse af en temperaturprofil	72
Procedure (manuel).....	83
Protokol: Prøvevurdering (manuel).....	83
Protokol: EGFR-mutationspåvisning (manuel)	83
Protokol: <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q-opsætning	84
Fortolkning af resultater (manuel)	89
Softwareanalyseindstillinger	89
Dataanalyse af prøvevurdering	91

Dataanalyse af EGFR-mutationspåvisning	92
Bilag B: Installation af <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package	100
Kontaktoplysninger	103
Bestillingsinformation	104
Revisionshistorik for dokumentet.....	106

Tilsigtet anvendelse

therascreen EGFR RGQ PCR Kit er en in vitro-diagnostisk test, som er beregnet til påvisning af 29 somatiske mutationer i EGFR-genet. Det giver en kvalitativ vurdering af mutationsstatussen i tumorprøver fra patienter med ikke-småcellet lungecancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Resultaterne er beregnet til at hjælpe klinikerne med at identificere patienter med NSCLC, som kan have gavn af behandling med EGFR-tyrosinkinasehæmmere.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit tester DNA-prøver, der er ekstraheret fra formalinfikseret, paraffinindstøbt (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) tumornæv fra NSCLC-patienter, og kørt på et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Det skal anvendes af uddannet laboratoriepersonale i et professionelt laboratiemiljø.

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

Oversigt og forklaring

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

therascreen EGFR RGQ PCR Kit er et brugsklart kit til påvisning af 29 mutationer i det cancerrelaterede EGFR-gen ved hjælp af polymerasekædereaktion (polymerase chain reaction, PCR) på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Ved hjælp af teknologierne Scorpions® (10) og ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (11) kan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit detektere 29 mutationer i exon 18, 19, 20 og 21 i EGFR-onkogenet på en baggrund af vildtype-genomisk DNA (tabel 1). Kort fortalt:

- 19 deletioner i exon 19 (påviser tilstedeværelsen af en af 19 deletioner, men skelner ikke mellem dem)
- Tre indsætninger i exon 20 (påviser tilstedeværelsen af en af tre indsætninger, men skelner ikke mellem dem)
- G719X (påviser tilstedeværelse af G719S, G719A eller G719C, men skelner ikke mellem dem)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

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

Tabel 1. Liste over mutationer og COSMIC-identiteter

Exon	Mutation	COSMIC*-id	Basisændring
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deletioner	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 over somatiske cancermutationer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Tabellen fortsættes på næste side

Tabellen er fortsat fra foregående side

Tablet 1: Liste over mutationer og COSMIC-identiteter

Exon	Mutation	COSMIC*-id	Basisændring
20	S768I	6241	2303G>T
	Indsætninger	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 over somatiske cancermutationer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

** Mutationerne COSM6254 (2239_2253del15) og COSM12369(2240_2254del15) resulterer i deletion af 15 basepar fra EGFR-sekvensen. Den samme endelige sekvens genereres af begge mutationer, hvilket gør det umuligt at skelne dem fra hinanden. Derfor fjernes mutationen COSM6254 (2239_2253del15) fra den nyeste version af COSMIC (v83), hvorefter begge mutationer repræsenteres af COSM12369 (2240_2254del15). Dette er i tråd med HGVs-retningslinjerne om at repræsentere flest 3'-deletioner. *therascreen* EGFR-testen skelner ikke mellem de 19 forskellige deletionsmutationer, og eventuelle positive deletioner kaldes blot "Deletions" (deletioner). Denne ændring påvirker kun dokumentationen, ikke kittet eller dets stabilitet med hensyn til at registrere individuelle mutationer.

Funktionsprincip

therascreen EGFR RGQ PCR Kit består af otte separate reaktionsblandinger til PCR-forstærkning: syv mutationsspecifikke reaktioner i exon 18, 19, 20 og 21 i EGFR-onkogenet og en vildtypekontrol i exon 2. Hovedkomponenterne i kittet er forklaret nedenfor.

ARMS

Allele- eller mutationsspecifik forstærkning opnås ved hjælp af ARMS. *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) er effektiv til at skelne mellem en match og en fejlmatch i 3'-enden af en PCR-primer. Specifikke muterede sekvenser forstærkes selektivt, selv i prøver hvor størsteparten af sekvenserne ikke bærer mutationen. Når primeren er fuldstændigt matchet, fortsætter forstærkningen med fuld effektivitet. Når 3'-basen ikke er matchet, forekommer der kun baggrundsforstærkning på lavt niveau.

Scorpions

Påvisning af forstærkning udføres med Scorpions. Scorpions er bifunktionelle molekyler, der indeholder en PCR-primer, som er kovalent kædet til en probe. Fluoroforen i proben reagerer med en quencher, der også er indeholdt i proben, hvilket reducerer fluorescensen. Når proben binder til ampliconet under PCR, adskilles fluoroforen og quencheren, hvilket fører til en påviselig stigning af fluorescens.

Kitformat

Der leveres otte analyser med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit:

- En kontrolanalyse (CTRL)
- Syv mutationsanalyser

Alle reaktionsblandinger indeholder reagenser til påvisning af mål, der er mærket med carboxyfluorescein (FAM™), og en intern kontrolanalyse, der er mærket med hexachlorofluorescein (HEX™). Den interne kontrolanalyse kan påvise tilstedeværelsen af hæmmere, der kan medføre falsk-negative resultater. FAM-forstærkning kan udkonkurrere den interne kontrolforstærkning, og formålet med den interne kontrol er ganske enkelt at vise, at hvor der ikke er nogen FAM-forstærkning, er dette et sandt negativt resultat og ikke en mislykket PCR-reaktion.

Analyser

therascreen EGFR RGQ PCR Kit indebærer en tottrinprocedure. I første trin udføres kontrolanalysen for at bedømme det samlede EGFR DNA, der kan forstærkes, i prøven. I andet trin udføres både mutations- og kontrolanalyser for at påvise eller afvise tilstedeværelsen af mutant-DNA.

Kontrolanalyse

Kontrolanalysen, der er mærket med FAM, anvendes til vurdering af det samlede EGFR DNA, der kan forstærkes, i prøven. Denne kontrolanalyse forstærker en region af exon 2 af EGFR-genet. Primere og Scorpions-proben er designet, så alle kendte EGFR-polymorfismer undgås.

Mutationsanalyser

Hver mutationsanalyse indeholder en FAM-mærket Scorpions-probe og en ARMS-primer for at skelne mellem vildtype-DNA og en bestemt mutant-DNA.

Kontroller

Bemærk: Alle prøvekørsler skal indeholde positive og negative kontroller.

Positiv kontrol

Hver kørsel skal indeholde en positiv kontrol i rør 1-8. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit indeholder positiv kontrol (Positive Control, PC) for EGFR, der skal bruges som skabelon i den positive kontrolreaktion. De positive kontrolresultater vil blive vurderet for at sikre, at kittet fungerer korrekt inden for de erklærede acceptkriterier.

Negativ kontrol

Hver kørsel skal indeholde en negativ kontrol ("kontrol uden skabelon": NTC) i rør 9-16. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit indeholder vand til NTC, der skal bruges som "skabelon" i kontrollen uden skabelon. Ikke-skabelon-kontrollen bruges til at bedømme eventuel potentiel kontaminering under kørselsopsætningen og til at vurdere den interne kontrolreaktions ydelse.

Bedømmelse af intern kontrolreaktion

Hver reaktionsblanding indeholder en intern kontrol (Internal Control, IC) ud over målreaktionen. En fejl angiver enten, at der er hæmmere til stede, som kan medføre unøjagtige resultater, eller at der er opstået en brugeropsætningsfejl for det pågældende rør. IC'en indeholder en oligonukleotid målsekvens, der ikke er EGFR-relateret, en umærket primer og en Scorpions-primer, der er mærket med HEX for at adskille det fra de FAM-mærkede Scorpions i kontrollen og mutationsreaktionsblandingerne. FAM-forstærkning kan udkonkurrere IC-forstærkningen, så den IC C_T (HEX)-værdi, der genereres, kan ligge uden for det specificerede område. FAM-resultaterne er alligevel gyldige for disse prøver.

Prøvevurdering

Det anbefales på det kraftigste at anvende den kontrolreaktionsblanding (rør-CTRL), der leveres med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, til vurdering af det samlede EGFR DNA, der kan forstærkes, i en prøve. Denne kontrolanalyse forstærker en region af exon 2 af EGFR-genet. Det anbefales at opsætte prøverne kun med kontrolanalysen med EGFR PC som en positiv kontrol og vand til "skabelonen" som kontrol uden skabelon.

Bemærk: DNA-vurderingen skal baseres på PCR og kan afvige fra kvantificering baseret på absorptionsmålinger. Der medfølger ekstra kontrolreaktionsblanding (rør med CTRL) for at give mulighed for vurdering af kvaliteten og kvantiteten i DNA i prøver før analyse med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Platform og software

therascreen EGFR RGQ PCR Kit er specifikt udviklet til at anvendes sammen med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet er programmeret til forskellige cyklusparametre, eller "kørsler", efter *therascreen* EGFR CE Assay Package.

therascreen EGFR CE Assay Package består af to skabeloner: "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (til DNA-prøvevurdering) og "therascreen EGFR CE Locked Template" (til påvisning af EGFR-mutationer). Disse skabeloner indeholder PCR-kørselsparametre og beregner resultaterne.

Det er også muligt at bruge *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit med Rotor-Gene Q-softwareversion 2.3 i åben tilstand (dvs. uden brug af Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Se flere detaljer i Bilag A: Vejledningsprotokol til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Medfølgende materialer

Kit-indhold

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Katalognr.				874111
Antal reaktioner				24
Farve	Identitet	Rør-id		Volumen
Rød	Control Reaction Mix (kontrolreaktionsblanding)	1	CTRL	2 x 600 µl
Lilla	T790M Reaction Mix (T790M-reaktionsblanding)	2	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (deletionsreaktionsblanding)	3	Del	600 µl
Lyserød	L858R Reaction Mix (L858R-reaktionsblanding)	4	L858R	600 µl
Grønt	L861Q Reaction Mix (L861Q-reaktionsblanding)	5	L861Q	600 µl
Gul	G719X Reaction Mix (G719X-reaktionsblanding)	6	G719X	600 µl
Grå	S768I Reaction Mix (S768I-reaktionsblanding)	7	S768I	600 µl
Blå	Insertions Reaction Mix (indsætningsreaktionsblanding)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (Positiv kontrol for EGFR)	9	PC	300 µl
Mintgrøn	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> -DNA-polymerase)	<i>Taq</i>	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Hvid	Nuclease-free water for No Template Control (Nukleasefrit vand til ikke-skabelon-kontrol)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Hvid	Nuclease-free water for Dilution (Nukleasefrit vand til fortynding)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
Håndbog til <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				1

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Reagenser

- DNA-ekstraheringskit (se DNA-ekstrahering og forberedelse)

Forbrugsvarer og generelt laboratoriestyr

- Dedikerede pipetter* (justerbare) til prøveforberedelse
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til forberedelse af PCR-masterblanding
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til dosering af DNA-skabelon
- DNase-, RNase- og DNA-fri pipettespidser med filtre (for at undgå krydskontamination anbefales pipettespidser med aerosolbarrierer)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, til brug med 72-Well Rotor (katalognr. 981103 eller 981106)
- DNase-, RNase- og DNA-fri mikrocentrifugeringsrør til forberedelse af masterblandinger
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette (katalognr. 9018901)
- Thermomixer*, opvarmet orbital inkubator*, varmeblok* eller vandbad*, der kan inkubere ved 90 °C
- Bordcentrifuge* med rotor til 2 ml-reagensglas
- Vortex-mixer*

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

Udstyr til PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med fluorescenskanaler til Cycling Green og Cycling Yellow (påvisning af hhv. FAM og HEX) * †
- Rotor-Gene Q-software, version 2.3
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package CD, version 3.0.5 (katalognr. 9023537)

Bemærk: Softwaren til Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package kræver Rotor-Gene Q-softwareversion 2.3.

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

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

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

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

Se sikkerhedsoplysningerne vedrørende Rotor-Gene Q-instrumentet i den brugervejledning, der følger med instrumentet.

Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsregler.

Generelle forholdsregler

Vær altid opmærksom på følgende:

- Denne test er beregnet til brug sammen med FFPE NSCLC-vævsprøver.
- Positive materialer (prøver og positive kontroller) skal opbevares og ekstraheres separat fra alle andre reagenser og tilsættes reaktionsblandingen på et separat sted.
- Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre forurening af PCR'er med syntetisk kontrolmateriale. Vi anbefaler at bruge separate, dedikerede pipetter til forberedelse af reaktionsblandinger og tilføjelse af DNA-skabelon. Forberedelse og dispensering af reaktionsblandinger skal udføres i et område, som er adskilt fra skabelontilføjelsen. Rotor-Gene Q-rørene må ikke åbnes, når PCR-kørslen er afsluttet. Dette er for at forhindre kontaminering af laboratoriet med produkter efter PCR.
- Alle kemikalier og alt biologisk materiale er potentielt farligt. Prøver er potentielt farlige og skal håndteres som biologisk farlige materialer.

- Reagenserne til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit er fortyndet optimalt. Fortynd ikke reagenserne yderligere, da dette kan resultere i tab af ydelse. Brug ikke reaktionsvolumener (reaktionsblanding plus prøve) på mindre end 25 µl, da det øger risikoen for falsk-negative resultater.
- Alle reagenser, der leveres med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Reagenserne i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit eller mellem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits må ikke udskiftes, da dette kan påvirke ydeevnen.
- Brug kun den *Taq* DNA-polymerase (rør med *Taq*), som leveres med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Den må ikke udskiftes med *Taq* DNA-polymerase fra andre kit af den samme eller en anden type eller med *Taq* DNA-polymerase fra en anden leverandør.
- Brug aldrig for gamle eller ukorrekt opbevarede komponenter.

Bemærk: Der skal udvises forsigtighed for at sikre korrekte test af prøver, hvad angår undgåelsen af forkert prøveangivelse, fejl ved isætning og pipetteringsfejl.

Bemærk: Reagenserne er godkendt til manuel opsætning. Hvis der bruges en automatiseret metode, kan det reducere antallet af mulige reaktioner, da reagenset skal udfylde "dødvolumener" på disse instrumenter.

Opbevaring og håndtering af reagenser

Forsendelsesbetingelser

therascreen EGFR RGQ PCR Kit sendes på tøris og skal være frosset ved modtagelse. Hvis *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ikke er frosset ved modtagelse, hvis den ydre emballage har været åbnet under transporten, eller hvis forsendelsen ikke indeholder en følgeseddel, denne håndbog eller reagenserne, skal der rettes henvendelse til QIAGENs tekniske serviceafdeling eller den lokale forhandler (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Opbevaringsbetingelser

therascreen EGFR RGQ PCR Kit skal straks efter modtagelse opbevares ved -30 til -15 °C i en fryser med konstant temperatur og beskyttes mod lys. Scorpions (som det er tilfældet med alle fluorescensmærkede molekyler) skal beskyttes mod lys for at undgå fotoblegning og tab af ydelse. Ved opbevaring i den oprindelige emballage under de anbefalede opbevaringsbetingelser er kittet stabilt indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten.

Når reagenser er åbnet, kan de opbevares i den originale emballage ved en temperatur fra -30 til -15 °C i 12 måneder eller indtil den angivne udløbsdato, alt efter hvad der indtræffer først. Undgå gentagen indfrysning og optøning. Et reagens må højst nedfryses og optøs otte gange.

Reagenserne skal optøs ved stuetemperatur (15-25 °C) i mindst 1 time og højst 4,5 timer. Når reagenserne er klar til brug, kan PCR-reaktionerne opsættes. Rotor-Gene Q-rør, der indeholder masterblandinger og DNA-prøve, skal sættes i et Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument med det samme. Når PCR-reaktionerne er klargjort, må den samlede tid fra opstarten til kørslen ikke overstige:

- 6 timer, hvis de opbevares ved stuetemperatur

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

- 18 timer, hvis de opbevares i køleskab (2-8 °C)

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

Bemærk: For at sikre optimal aktivitet og ydelse bør Scorpions (som det er tilfældet med alle fluorescensmærkede molekyler) beskyttes mod lys for at undgå fotoblekning.

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

Håndtering og opbevaring af prøver

Bemærk: Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Prøvemateriale skal være humant genomisk DNA, ekstraheret fra FFPE-væv. Prøverne skal transporteres i henhold til standardmetoder inden for patologien for at sikre prøvernes kvalitet.

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

Sådan forberedes vævsprøver til DNA-ekstrahering:

- Ved hjælp af standardmaterialer og -metoder fikseres vævsprøven i 10 % neutralt bufret formalin (NBF) og indstøbes i paraffin. Ved hjælp af en mikrotom skal man skære 5 µm serielle sektioner fra paraffinblokken og montere dem på objektglas.
- Brug en uddannet person (f.eks. en patolog) til at vurdere en hæmatoxylin- og eosin-farvet (H&E) sektion for at bekræfte, at der er en tumor til stede.
- De farvede sektioner må ikke bruges til DNA-ekstrahering.
- Opbevar alle FFPE-blokke og objektglas ved stuetemperatur (15-25 °C). Objektglas kan opbevares ved stuetemperatur i op til 1 måned før DNA-ekstrahering.

Procedure

DNA-ekstrahering og -forberedelse

Kittets ydelseskaraktistika er genereret ved hjælp af DNA, som er ekstraheret med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (katalognr. 60404). Dette kit skal anvendes til DNA-forberedelse, hvis det er tilgængeligt i dit land. Hvis det funktionelt tilsvarende QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (katalognr. 56404) anvendes, skal DNA-ekstraheringen udføres i henhold til instruktionerne i håndbogen med følgende bemærkninger:

- Brug ikke QIAGEN Deparaffinization Solution. Brug kun xylene-/ethanol-metoden til deparaffinering som beskrevet i *Håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Sørg for at bruge ethanol af molekylærbiologisk kvalitet* til alle nødvendige trin.
- Skrab hele vævsområdet bort fra to sektioner og ind i et mærket mikrocentrifugeringsrør med en ny skalpel for hver prøve.
- Proteinase K-fordøjelse (trin 11 i *Håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) skal udføres i 1 timer \pm 5 minutter i $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Proteinase K-fordøjelse (trin 12 i *Håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*) skal udføres i 1 timer \pm 5 minutter i $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Brug ikke RNase-trinnet, der er beskrevet i *Håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*.
- Prøverne skal elueres med 120 μl elutionsbuffer (ATE) fra QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (trin 20 i *Håndbog til QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*).
- Genomisk DNA kan opbevares ved $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1 uge efter ekstrahering derefter ved -30 til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i op til 8 uger før brug.

Bemærk: Alle analyser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit genererer korte PCR-produkter. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit fungerer imidlertid ikke med meget fragmenteret DNA.

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

Protokol: Prøvevurdering

Denne protokol bruges til at vurdere det samlede DNA, der kan forstærkes, i prøver ved hjælp af "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" i Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package til automatiseret prøvevurdering.

Bemærk: Se flere oplysninger om manuel DNA-prøvevurdering under Bilag A: Vejledningsprotokol til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Vigtige anvisninger før start

- Gennemlæs afsnittet Generelle forholdsregler, før proceduren påbegyndes.
- Brug tid på at sætte dig ind i brug af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, før du starter protokollen. Se brugsvejledningen til instrumentet.
- *Taq* eller blandinger, der indeholder *Taq*, må ikke vortexes, da dette kan inaktivere enzymet.
- Pipetter *Taq* ved at placere pipettens spids lige under væskens overflade, så spidsen ikke dækkes af overskydende enzym.
- Der kan bedømmes op til 24 prøver med kontrolreaktionsblandingen.

Ting, der skal gøres før start

- Kontrollér, at *therascreen* EGFR CE Assay Package-softwaren er installeret, før Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet anvendes første gang (se Bilag B: Installation af *therascreen* EGFR CE Assay Package).
- Før hver brug skal alle reagenser optøes helt i mindst 1 time og maksimalt 4,5 timer ved stuetemperatur (15-25 °C), blandes ved at vende dem 10 gange og centrifugeres kortvarigt for at samle alt indhold i bunden af røret.
- Bland alle prøver ved at vende dem 10 gange, og centrifuger kort for at indsamle indholdet i bunden af røret.
- Kontrollér, at *Taq* har stuetemperatur (15-25 °C) inden hver brug. Centrifuger røret kortvarigt for at samle enzymet i bunden af røret.

Procedure

1. Optø kontrolreaktionsblandingen (CTRL), nukleasefrit vand til ikke-skabelon-kontrollen (No Template Control, NTC) og positiv kontrol (Positive Control, PC) for EGFR ved stuetemperatur (15-25 °C) i mindst 1 time og højst 4,5 timer.

Tiderne for optøning af reagenser, PCR-opsætning og opbevaring før start af kørsel er angivet i tabel 2.

Tabel 2. Optøningstid, PCR-opsætningstider og opbevaringstemperaturer

Minimal optøningstid	Maksimal optøningstid	Opbevaringstemperatur efter PCR-opsætning	Maksimal tid for PCR-opsætning og -opbevaring
1 t	4,5 t	Stuetemperatur (15-25 °C)	6 t
1 t	4,5 t	2-8 °C	18 t

Bemærk: PCR-opsætning udføres ved stuetemperatur (15-25 °C). Begrebet "opbevaring" henviser til tiden mellem fuldførelsen af PCR-opsætningen og starten af PCR-kørslen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Bemærk: Bring *Taq* til stuetemperatur (15-25 °C) ved samme tid som de andre reagenser (se Opbevaring og håndtering af reagenser). Centrifuger røret kortvarigt for at samle enzymet i bunden af røret.

2. Når reagenserne er optøet, skal de blandes ved, at man vender hvert rør 10 gange, så lokale saltkoncentrationer undgås, og derefter centrifugeres kortvarigt for at samle alt indhold i bunden af røret.
3. Forbered tilstrækkelige mængder kontrolmasterblanding (kontrolreaktionsblanding [CTRL] samt *Taq*) til DNA-prøverne, en EGFR PC-reaktion og en NTC-reaktion i henhold til volumenerne i tabel 3. Inkluder reagenser til én ekstra prøve for at sikre tilstrækkelig ældning til PCR-opsætningen.

Bemærk: Masterblandingen indeholder alle de komponenter, der er nødvendige ved PCR, undtagen prøven.

Tabel 3. Forberedelse af masterblanding til kontrolanalyse

Komponent	Volumen
Kontrolreaktionsblanding (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
Taq-DNA-polymerase (Taq)	0,5 µl × (n + 1)
Samlet volumen	20 µl/reaktion

* n = antallet af reaktioner (prøver plus kontroller). Forbered tilstrækkelig masterblanding til 1 ekstra prøve (n + 1) for at sikre tilstrækkelig dækning til PCR-opsætningen. Værdien n må ikke overstige 26 (24 prøver plus 2 kontroller).

Bemærk: Når masterblandingen forberedes, tilsættes først den nødvendige volumen af kontrolreaktionsblandingen til det relevante rør, og Taq tilsættes til sidst.

4. Bland masterblandingen grundigt ved at pipettere forsigtigt op og ned 10 gange. Placer det passende antal båndrør i isætningsblokken i overensstemmelse med layoutet i tabel 4. Tilsæt straks 20 µl masterblanding til hvert PCR-båndrør.

Hætterne skal blive i plastikbeholderen, indtil de skal bruges. Til DNA-prøvevurdering skal analysemasterblandingen tilsættes til ét PC-rør, ét NTC-rør og ét rør for hver prøve.

Tabel 4. Layout for DNA-prøvevurderingsanalyser i isætningsblokken. Tallene angiver positioner i isætningsblokken og indikerer den endelige rotorposition.

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

5. Tilsæt straks 5 µl vand til NTC i røret i position 2, og sæt hætte på røret.
6. Tilsæt 5 µl af hver prøve til prøverørene (rørpositioner 3-26), og sæt hætter på rørene.
7. Tilsæt 5 µl EGFR PC til røret i position 1, og sæt hætte på røret.

Undgå fejl ved isætning og pipettering for at sikre korrekt tilsætning af NTC, prøver og PC i de relevante rør. Markér rørenes hætter for at vise, hvilken vej rørene skal vende, når de sættes i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

8. Når der er sat hætte på alle PCR-rørene, skal der foretages en visuel kontrol af prøverørenes opfyldningsniveauer for at sikre, at prøven er blevet tilsat alle rørene.
9. Vend alle PCR-rørene fire gange for at blande prøverne og reaktionsblandingerne.
10. Placer PCR-båndrørene i de korrekte positioner i 72-brøndsrotoren i overensstemmelse med visningen i tabel 4.

Hvis rotoren ikke er helt fyldt, skal alle tomme positioner på rotoren fyldes med tomme rør med hætte på.

11. Placer straks 72-brøndsrotoren i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Kontrollér, at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) er placeret oven på rotoren, for at sikre rørene under kørslen.

Bemærk: Hvis der anvendes manuel prøvевurdering, henvises der til Bilag A: Vejledningsprotokol *til* theascreen EGFR RGQ PCR Kit.

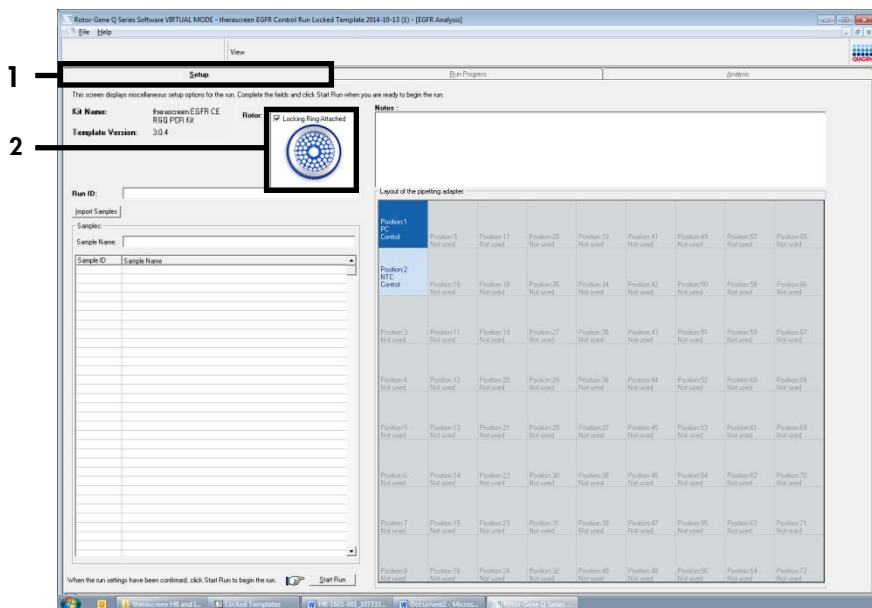
12. Start Rotor-Gene Q-softwaren ved at dobbeltklikke på ikonet "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (Låst skabelon til prøvekørsel af theascreen EGFR CE) på skrivebordet på den computer, der er sluttet til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet (figur 1).



therascreen EGFR CE
Control Run Locked
Template

Figur 1. Ikonet Låst skabelon til EGFR CE til kontrollørsel (prøvevurdering).

13. Fanen "Setup" (Opsætning) åbnes som standard (figur 2). Kontrollér, at låseringen er korrekt påsat, og markér derefter afkrydsningsfeltet Locking Ring Attached (Låsering påsat). Luk låget på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.



Figur 2. Fanen "Setup" (Opsætning) (1) og afkrydsningsfeltet "Locking Ring Attached" (Låsering påsat) (2).

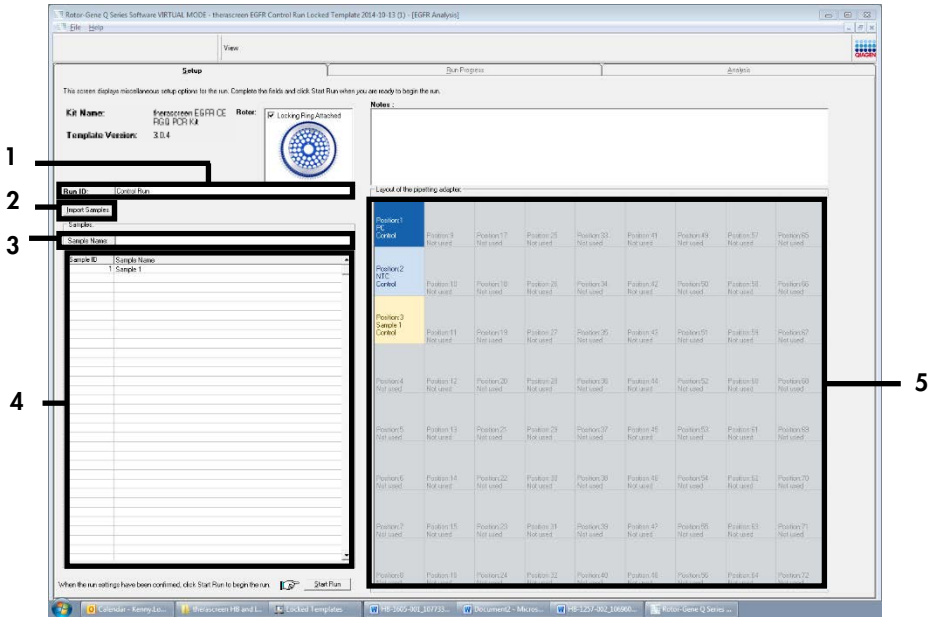
14. Angiv kørsels-id i dialogboksen Run ID (Kørsels-id) i overensstemmelse med den lokale navnekonvention. Angiv prøvenavnet i dialogboksen Sample Name (Prøvenavn) i overensstemmelse med den lokale navnekonvention, og tryk på "Return" (Retur).

Dette føjer prøvenavnet til listen over prøver nedenfor og giver prøven et "Sample ID" (Prøve-id) (1, 2, 3 osv.). Derudover opdateres panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter) i højre side til at omfatte prøvenavnet (figur 3).

Bemærk: Alternativt kan prøvenavne, som er gemt i formatet *.smp (Rotor-Gene Q-prøvefil) eller formatet *.csv (kommaseparerede værdier), importeres ved hjælp af funktionen Import Samples (Importér prøver). Prøvenavnene udfyldes automatisk ved hjælp af denne metode.

Bemærk: I panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter) skal man kontrollere, at tilsætningen af prøvenavnet er fremhævet med en ændring af farven, og at prøvenavnet er i prøvepositionen (figur 3).

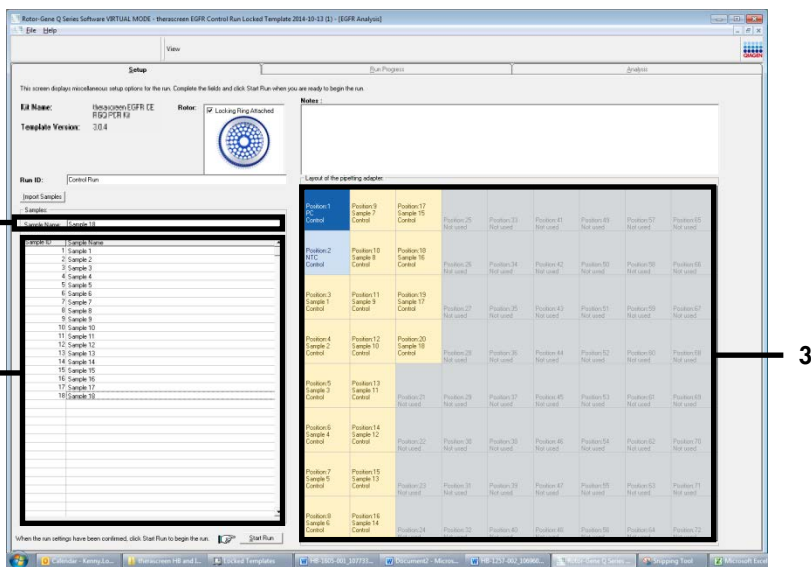
Bemærk: Prøvenavne med mere end 8 tegn vises muligvis ikke helt i panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter).



Figur 3. Angivelse af "Run ID" (Kørsels-id) og "Sample Name" (Prøvenavn). 1 = dialogfeltet "Run ID" (Kørsels-id), 2 = panelet "Import Samples" (Importér prøver), 3 = dialogfeltet "Sample Name" (Prøvenavn), 4 = "Sample List" (Prøveliste), 5 = panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter).

15. Gentag trin 14 for at angive navnene på yderligere prøver (figur 4).

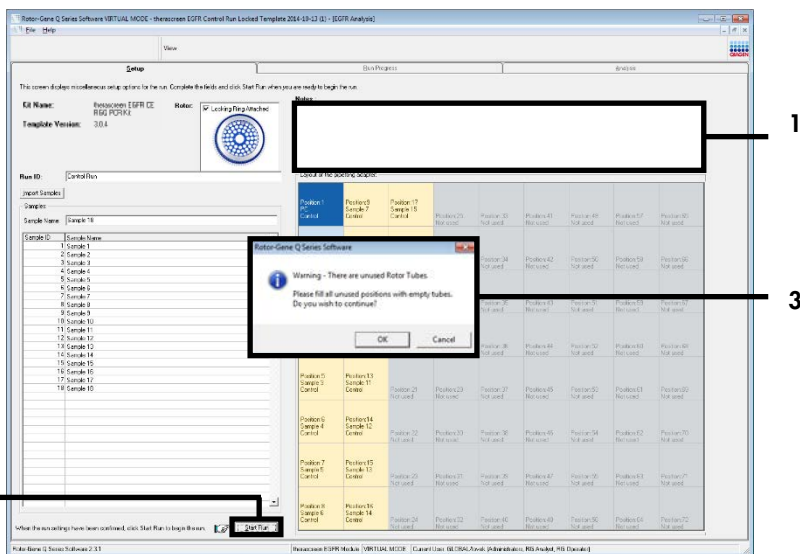
Bemærk: For at redigere et prøvenavn skal man klikke på Sample Name (Prøvenavn) på listen over prøver, og derefter vises den valgte prøve i dialogboksen Sample Name ovenfor. Rediger prøvenavnet efter de lokale navnekonventioner, og tryk på Return (Retur) for at opdatere navnet.



Figur 4. Angivelse af yderligere prøvenavne i dialogfeltet "Sample Name" (Prøvenavn). 1 = dialogfeltet "Sample Name" (Prøvenavn), 2 = "Sample List" (Prøveliste), 3 = panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter).

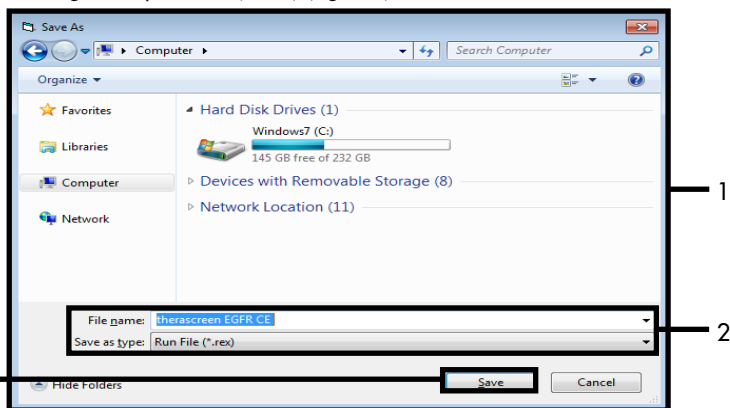
16. Når alle prøvenavne er angivet, skal man verificere, at de er korrekte. Tilføj eventuelle yderligere oplysninger i feltet Notes (Bemærkninger), om nødvendigt, og klik derefter på Start Run (Start kørsel) (figur 5).

Bemærk: Hvis nogle rotorpositioner er tomme, vises en "Warning" (Advarsel) (figur 5) for at minde brugeren om, at alle tomme positioner på rotoren skal udfyldes med et tomt rør med hætte. Kontrollér, at alle tomme rotorpositioner udfyldes med tomme rør med hætte, og klik på OK for at fortsætte. Vinduet "Save As" (Gem som) åbnes.



Figur 5. Dialogfeltet "Notes" (Bemærkninger) (1), knappen "Start Run" (Start kørsel) (2) og advarsel om tomme positioner (3).

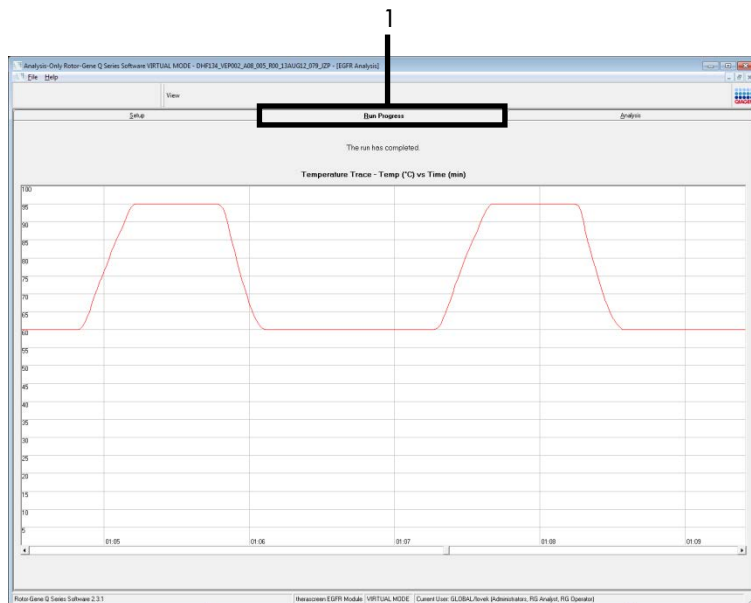
17. Vælg et passende filnavn, og gem PCR-kørslen som en *.rex-kørselsfil på den valgte placering. Klik på Save (Gem) (figur 6).



Figur 6. Vinduet "Save As" (Gem som) (1), 2 = feltene "File Name" (Filnavn) og "Save as type" (Gem som type); 3 = "Save" (Gem).

PCR-kørslen starter.

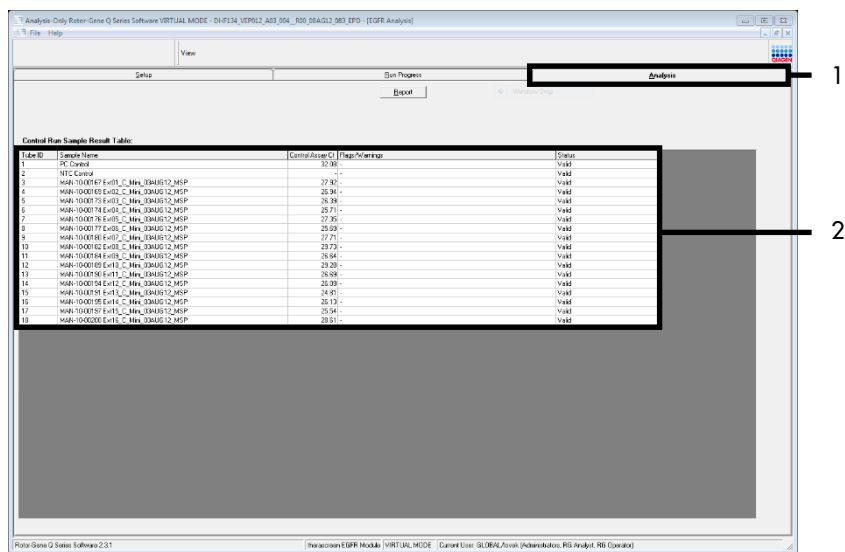
Bemærk: Når kørslen starter, åbnes fanen "Run Progress" (Kørselsstatus) automatisk for at vise temperatursporingen og den resterende kørselstid (figur 7).



Figur 7. Fanen "Run Progress" (Kørselsstatus) (1).

Bemærk: Når kørslen er afsluttet, åbnes fanen "Analysis" (Analyse). Hvis fanen Analysis (Analyse) ikke åbnes, skal klikke på fanen Analysis (Analyse) (figur 8).

Bemærk: Der vises en forklaring på beregningsmetoden i afsnittet "Fortolkning af resultater (automatiseret)".



Figur 8. Fanen "Analysis" (Analyse) (1) og rapportering af resultater (2 = "Control Run Sample Result Table" (Resultattabel for prøvekørsel).

Kontrolresultater rapporteres på følgende måde i "Control Run Sample Result Table" (Resultattabel for prøvekørsel) (figur 8).

Kørselskontroller (PC og NTC, henholdsvis rørpositioner 1 og 2). Hvis resultaterne er inden for de acceptable områder, vises hvert resultat som "Valid" (Gyldigt). Ellers vises teksten "Invalid" (Ugyldigt).

Prøvekontrolreaktionens $C_T > 31,10$ vises som "Invalid" (Ugyldigt). Kvantiteten af DNA er ikke tilstrækkelig til mutationsanalyse. Test prøven igen. Hvis kvantiteten af DNA'et stadig er utilstrækkelig, skal der ekstraheres mere væv, hvis det er tilgængeligt.

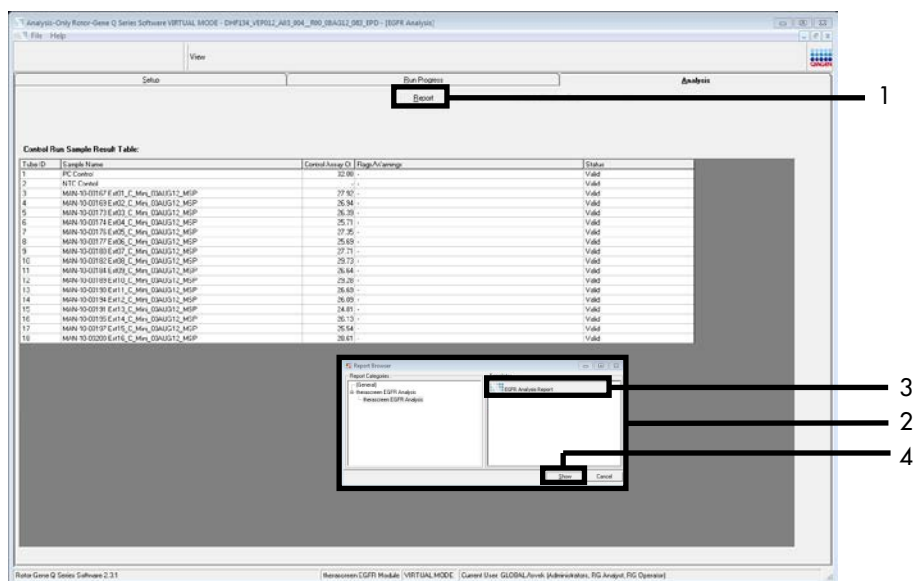
Prøvekontrolreaktionens $C_T < 23,70$ vises som "Invalid" (Ugyldigt). DNA-koncentrationen er for høj til mutationsanalyse. Fortynd med nukleasefrit vand til fortynding (Dil.), og test igen. Fortynd til en C_T på 23,70-31,10. En 1:1-fortynding øger C_T -værdien med ca. 1,0.

Prøvekontrolreaktionens C_T på 23,70 til 31,10 ($23,70 \leq \text{kontrol-}C_T \leq 31,10$) vises som "Valid" (Gyldigt). DNA-koncentrationen er egnet til mutationsanalyse.

Bemærk: Hvis det er nødvendigt at ekstrahere prøven igen eller fortynde den, skal kontrolreaktionen gentages for at bekræfte, at DNA-koncentrationen er passende til brug.

18. Klik på Report (Rapport) for at generere en rapportfil. Vinduet "Report Browser" (Rapportbrowser) åbnes. Vælg EGFR CE Analysis Report (EGFR CE-analyserapport) under Templates (Skabeloner), og klik derefter på Show (Vis) (figur 9).

Bemærk: Rapporter kan gemmes på et alternativt sted i Web Archives-format ved at klikke på knappen Save As (Gem som) i øverste venstre hjørne af hver rapport.



Figur 9. Valg af "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE-analyserapport). 1 = "Report" (Rapport), 2 = panelet "Report Browser" (Rapportbrowser), 3 = "EGFR Analysis Report" (EGFR-analyserapport), 4 = "Show" (Vis).

Protokol: Påvisning af EGFR-mutation

Denne protokol er til påvisning af EGFR-mutationer. Når en prøve har bestået DNA-prøvevurderingen, kan den testes ved hjælp af EGFR-mutationsanalyserne og den automatiserede software.

Bemærk: Se oplysninger om manuel mutationspåvisning i Bilag A: Vejledningsprotokol til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Vigtige anvisninger før start

- Gennemlæs afsnittet Generelle forholdsregler, før proceduren påbegyndes.
- Brug tid på at sætte dig ind i brug af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet, før du starter protokollen. Se brugsvejledningen til instrumentet.
- En prøve kan testes ved hjælp af EGFR-mutationsanalyserne, når den har bestået DNA-prøvevurderingen.
- For at udnytte *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit effektivt skal prøverne grupperes i batch af syv. Mindre batchstørrelser betyder, at der kan testes færre prøver med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- En prøve skal testes ved at bruge alle de reaktionsblandinger, der følger med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Taq eller blandinger, der indeholder Taq, må ikke vortexes, da dette kan inaktivere enzymet.
- Pipetter Taq ved forsigtigt at placere pipettens spids lige under væskens overflade, så spidsen ikke dækkes af overskydende enzym.

Ting, der skal gøres før start

- Kontrollér, at *therascreen* EGFR CE Assay Package-softwaren er installeret, før Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet anvendes første gang (se Bilag B: Installation af *therascreen* EGFR CE Assay Package).

- Før hver brug skal alle reagenser optøs helt i mindst 1 time og maksimalt 4,5 timer ved stuetemperatur (15-25 °C), blandes ved at vende dem 10 gange og centrifugeres kortvarigt for at samle alt indhold i bunden af røret.
- Bland alle prøver ved at vende dem 10 gange, og centrifuger kort for at indsamle indholdet i bunden af røret.
- Kontrollér, at *Taq* har stuetemperatur (15-25 °C) inden hver brug. Centrifuger røret kortvarigt for at samle enzymet i bunden af røret.

Procedure

1. Optø alle rør med reaktionsblandingen, vand til NTC og EGFR PC ved stuetemperatur (15-25 °C) i mindst 1 time og højst 4,5 timer.

Tiderne for optøning af reagenser, PCR-opsætning og opbevaring før start af kørsel er angivet i tabel 5.

Tabel 5. Optøningstid, PCR-opsætningstider og opbevaringstemperaturer

Minimal optøningstid	Maksimal optøningstid	Opbevaringstemperatur efter PCR-opsætning	Maksimal tid for PCR-opsætning og -opbevaring
1 t	4,5 t	Stuetemperatur (15-25 °C)	6 t
1 t	4,5 t	2-8 °C	18 t

Bemærk: PCR-opsætning udføres ved stuetemperatur (15-25 °C). Begrebet "opbevaring" henviser til tiden mellem fuldførelsen af PCR-opsætningen og starten af PCR-kørslen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Bemærk: Bring *Taq* (*Taq*-røret) til stuetemperatur (15-25 °C) ved samme tid som de andre reagenser (se Opbevaring og håndtering af reagenser). Centrifuger røret kortvarigt for at samle enzymet i bunden af røret.

2. Når reagenserne er optøet, skal de blandes ved, at man vender hvert rør 10 gange, så lokale saltkoncentrationer undgås, og derefter centrifugeres kortvarigt for at samle alt indhold i bunden af røret.

3. Forbered tilstrækkelige mængder analysemasterblandinger (analysereaktionsblandning samt Taq) til DNA-prøverne, en EGFR PC og en NTC-reaktion i henhold til volumenerne i tabel 6. Inkluder reagenser til én ekstra prøve for at sikre tilstrækkelig ældning til PCR-opsætningen.

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

Tabel 6. Forberedelse af analysemasterblandinger

Analyse	Reaktionsblandingsrør	Volumen af reaktionsblandning	Volumen af Taq DNA-polymerase (rør med Taq)
Kontrol	CTRL	19,5 µl × (n + 1)*	0,5 µl × (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Deletioner	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)
Indsætninger	Ins	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)

* n = antallet af reaktioner (prøver plus kontroller). Forbered nok masterblanding til én ekstra prøve (n + 1) for at sikre tilstrækkelig ældning til PCR-opsætningen. Værdien må ikke overstige syv (plus kontroller), da dette er det maksimale antal prøver, der er plads til i en kørsel.

4. Bland analysemasterblandingerne grundigt ved at pipettere forsigtigt op og ned 10 gange. Placer det passende antal båndrør i isætningsblokken i overensstemmelse med layoutet i tabel 7. Tilsæt straks 20 µl af den passende analysemasterblanding til hvert PCR-båndrør.

Hætterne skal blive i plastikbeholderen, indtil de skal bruges.

Tabel 7. Layout for kontrol- og mutationsanalyser i isætningsblokken. Tallene angiver positioner i isætningsblokken og indikerer den endelige rotorposition.

Analyse	Kontroller			Position						
	PC	NTC		1	2	3	4	5	6	7
Kontrol	1	9	17	25	33	41	49	57	65	
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66	
Deletioner	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	
Indsætninger	8	16	24	32	40	48	56	64	72	

5. Tilsæt straks 5 µl vand til NTC i rørene i positionerne 9-16, og sæt hætte på røret.
6. Tilsæt 5 µl af hver prøve til prøverørene (rørpositioner 17-24, 25-32, 33-40, 41-48, 49-56, 57-64 og 65-72), og sæt hætte på rørene.
7. Tilsæt 5 µl EGFR PC til rørene i position 1-8, og sæt hætte på rørene.
 Undgå fejl ved isætning og pipettering for at sikre korrekt tilsætning af NTC, prøver og EGFR PC i de relevante rør.
 Hvert rør skal indeholde en samlet reaktionsvolumen på 25 µl (20 µl analysemasterblandingen, der er forberedt i trin 3 (tabel 6) samt 5 µl NTC/prøve/PC). Tallene angiver positioner i isætningsblokken og indikerer den endelige rotorposition.
 Markér rørenes hætter for at vise, hvilken vej rørene skal vende, når de sættes i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
8. Når der er sat hætte på alle PCR-rørene, skal der foretages en visuel kontrol af prøverørenes opfyldningsniveauer for at sikre, at prøven er blevet tilsat alle rørene.
9. Vend alle PCR-rørene 4 gange for at blande prøverne og reaktionsblandingerne.

10. Placer PCR-båndrørene i de korrekte positioner i 72-brøndsrotoren i overensstemmelse med visningen i tabel 7.

Der kan højst medtages 7 prøver i hver PCR-kørsel. Hvis rotoren ikke er helt fyldt, skal alle tomme positioner på rotoren fyldes med tomme rør med hætte på.

11. Placer straks 72-brøndsrotoren i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Kontrollér, at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) er placeret oven på rotoren, for at sikre rørene under kørslen.

Bemærk: Hvis der anvendes manuel EGFR-mutationspåvisning, henvises der til bilag A: Vejledningsprotokol til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

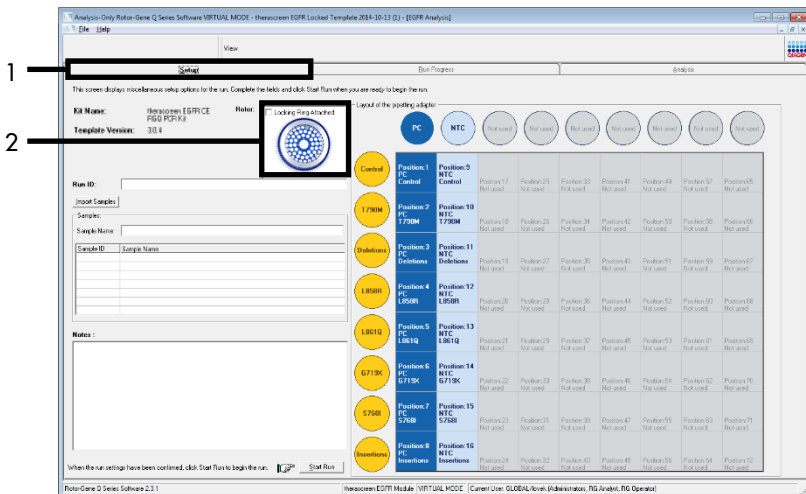
12. Dobbeltklik på ikonet "*therascreen* EGFR CE Locked Template" (Låst skabelon til *therascreen* EGFR CE) på skrivebordet på den bærbare computer, der er sluttet til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet (figur 10).



therascreen EGFR CE
Locked Template

Figur 10. Ikonet EGFR CE Locked Template (Låst skabelon til EGFR CE) (EGFR-mutationspåvisning).

13. Fanen "Setup" (Opsætning) åbnes som standard (figur 11). Kontrollér, at låseringen er korrekt påsat, og markér derefter afkrydsningsfeltet Locking Ring Attached (Låsering påsat). Luk låget på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.



Figur 11. Fanen "Setup" (Opsætning) (1) og afkrydsningsfeltet "Locking Ring Attached" (Låsering påsat) (2).

14. Angiv kørsels-id i dialogboksen Run ID (Kørsels-id) i overensstemmelse med den lokale navnekonvention. Angiv prøvenavnet i dialogboksen Sample Name (Prøvenavn) i overensstemmelse med den lokale navnekonvention, og tryk på Return (Retur).

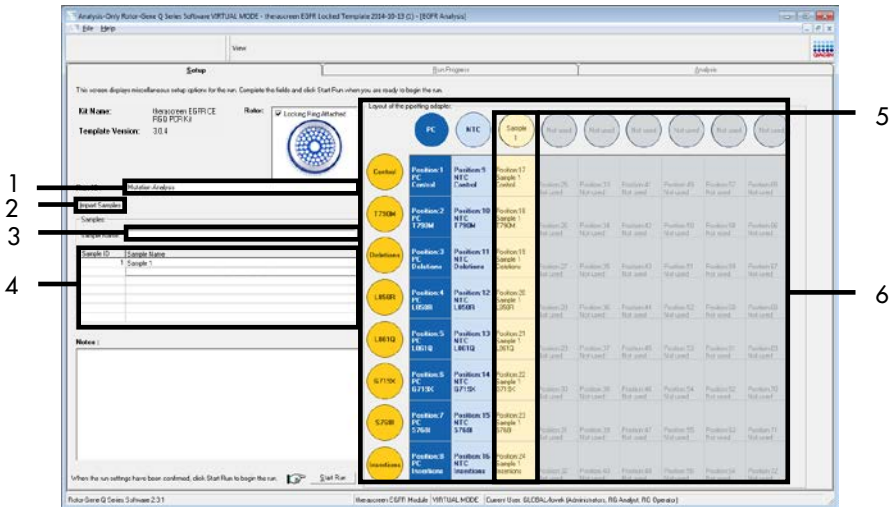
Dette føjer prøvenavnet til listen over prøver nedenfor og giver prøven et "Sample ID" (Prøve-id) (1, 2, 3 osv.). Derudover opdateres panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter) i højre side til at omfatte prøvenavnet (figur 12).

Bemærk: Alternativt kan prøvenavne, som er gemt i formatet *.smp (Rotor-Gene Q-prøvefil) eller formatet *.csv (kommaseparerede værdier), importeres ved hjælp af knappen Import Samples (Importér prøver). Prøvenavnene udfyldes automatisk ved hjælp af denne metode.

Bemærk: I panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter) skal man kontrollere, at tilsætningen af prøvenavnet er fremhævet med en ændring af farven, og at prøvenavnet er i prøvepositionen (figur 12).

Bemærk: Der kan højst tilføjes 7 prøver. Prøve-id'erne (i prøvecirklerne) tildeles automatisk fra 1 til 7.

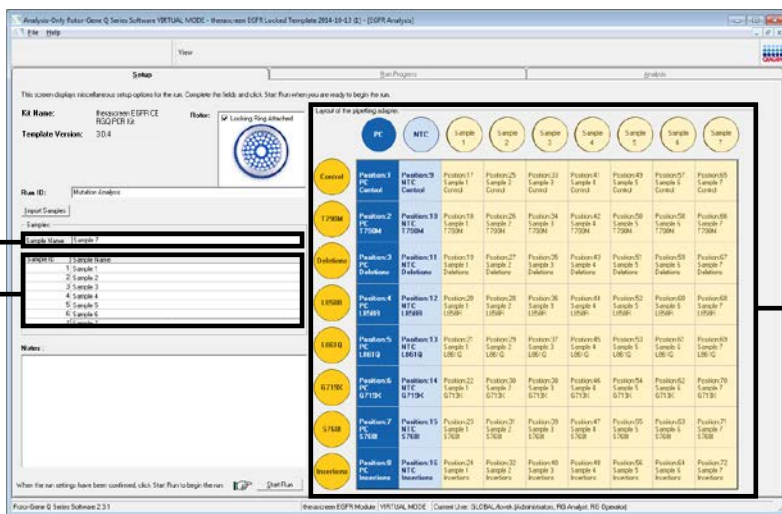
Bemærk: Prøvenavne med mere end 8 tegn vises muligvis ikke helt i panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter).



Figur 12. Angivelse af "Run ID" (Kørsels-id) og "Sample Name" (Prøvenavn). 1 = dialogfeltet "Run ID" (Kørsels-id), 2 = knappen "Import Samples" (Importér prøver), 3 = dialogfeltet "Sample Name" (Prøvenavn), 4 = "Sample List" (Prøveliste), 5 = panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter), 6 = fremhævet prævecirkel og kolonne med 8 analyser under panelet.

15. Gentag trin 14 for at angive navnene på yderligere prøver (figur 13).

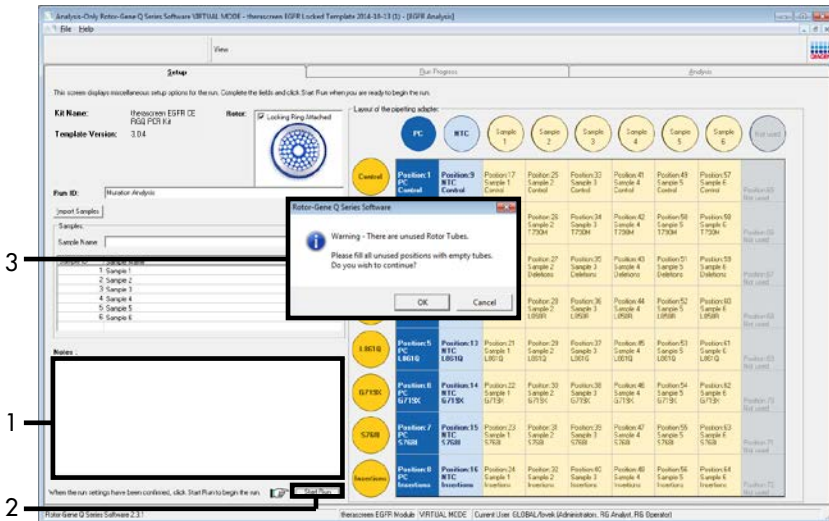
Bemærk: For at redigere et prøvenavn skal man klikke på Sample Name (Prøvenavn) på listen over prøver, og derefter vises den valgte prøve i dialogboksen Sample Name ovenfor. Rediger prøvenavnet efter de lokale navnekonventioner, og tryk på Return (Retur) for at opdatere navnet.



Figur 13. Angivelse af yderligere prøvenavne i dialogfeltet "Sample Name" (Prøvenavn). 1 = dialogfeltet "Sample Name" (Prøvenavn), 2 = "Sample List" (Prøveliste), 3 = panelet "Layout of the pipetting adapter" (Layout for den pipetterende adapter).

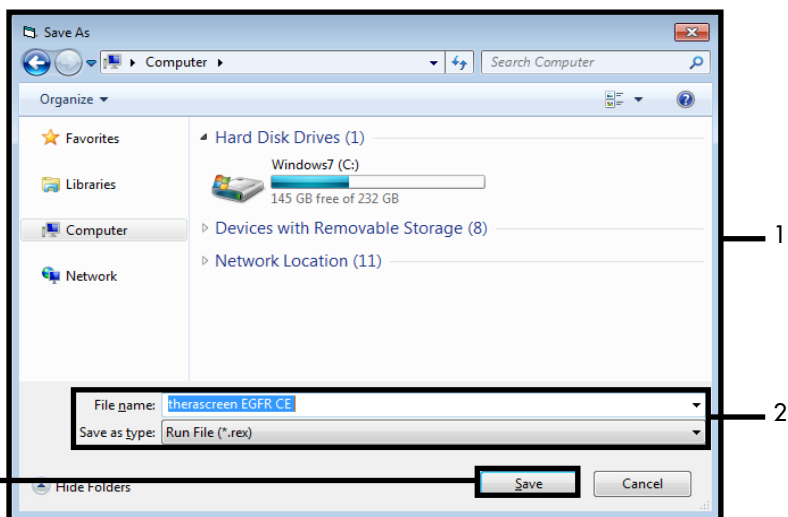
16. Når alle prøvenavne er angivet, skal man verificere, at de er korrekte. Tilføj eventuelle yderligere oplysninger i feltet Notes (Bemærkninger), om nødvendigt, og klik derefter på Start Run (Start kørsel) (figur 14).

Bemærk: Hvis nogle rotorpositioner er tomme, vises en "Warning" (Advarsel) (figur 14) for at minde brugeren om, at alle tomme positioner på rotoren skal udfyldes med et tomt rør med hætte. Kontrollér, at alle tomme rotorpositioner udfyldes med tomme rør med hætte, og klik på OK for at fortsætte.



Figur 14. Dialogfeltet "Notes" (Bemærkninger) (1), knappen "Start Run" (Start kørsel) (2) og "Warning" (Advarsel om tomme positioner) (3).

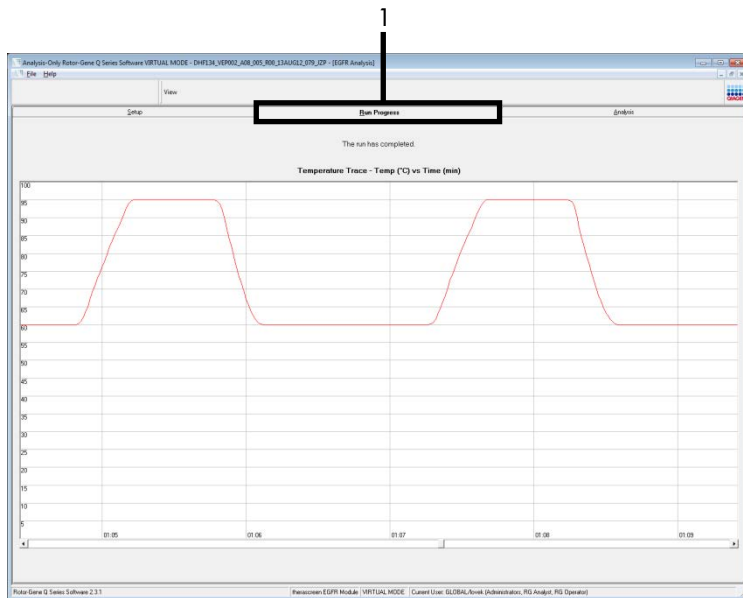
17. Vinduet "Save As" (Gem som) åbnes. Vælg et passende filnavn, og gem PCR-kørslen som en *.rex-kørselsfil på den valgte placering. Klik på Save (Gem) (figur 15).



Figur 15. Vinduet "Save As" (Gem som) (1). 2 = felterne "File Name" (Filnavn) og "Save as type" (Gem som type); 3 = "Save" (Gem).

PCR-kørslen starter.

Bemærk: Når kørslen starter, åbnes fanen "Run Progress" (Kørselsstatus) automatisk for at vise temperaturspringen og den resterende kørselstid (figur 16).

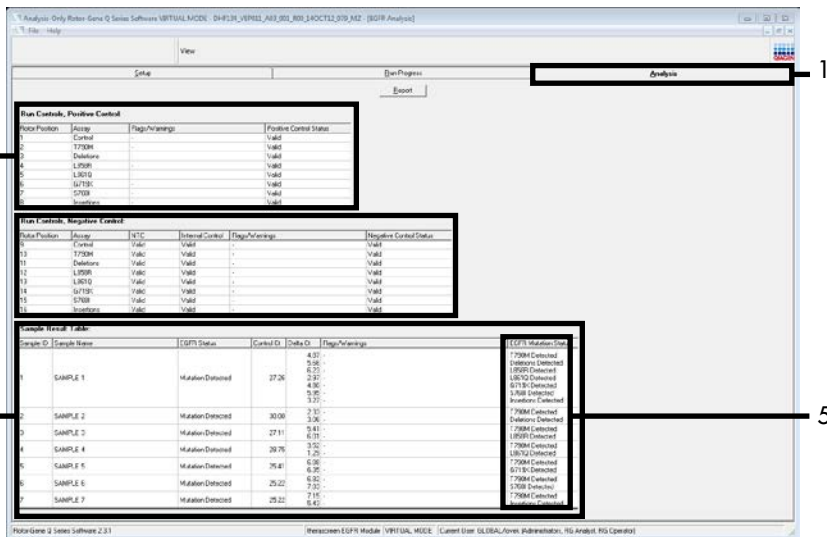


Figur 16. Fanen "Run Progress" (Kørselsstatus).

Når kørslen er afsluttet, åbnes fanen "Analysis" (Analyse).

Bemærk: Hvis fanen "Analysis" (Analyse) ikke åbnes, skal man klikke på fanen "Analysis" (Analyse) (figur 17).

Bemærk: Der vises en forklaring på beregningsmetoden i afsnittet "Fortolkning af resultater (automatiseret)".



Figur 17. Fanen "Analysis" (Analyse) (1) og rapportering af resultater. 2 = panelet "Run Controls, Positive Control" (Kørselskontroller, positiv kontrol), 3 = panelet "Run Controls, Negative Control" (Kørselskontroller, negativ kontrol), 4 = "Sample Result Table" (Tabel over prøveresultat), 5 = panelet "Mutation Status" (Mutationsstatus).

18. Analyseresultater rapporteres på følgende måde (figur 18).

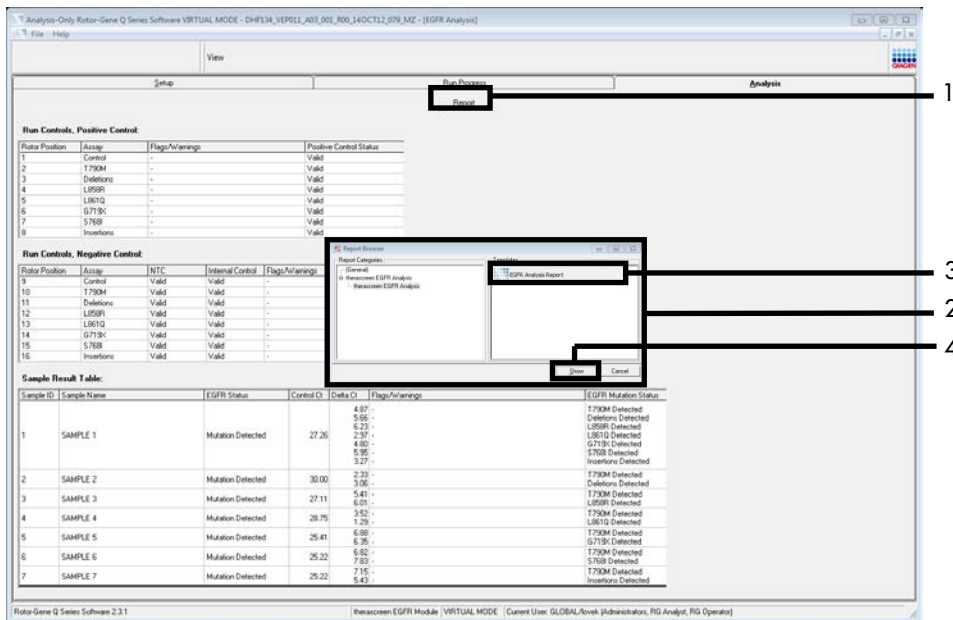
Run Controls, Positive Control (Kørselskontroller, Positiv kontrol): Hvis resultaterne er inden for et acceptabelt område, viser "Positive Control Status" (Positiv kontrolstatus) "Valid" (Gyldigt), ellers vises resultatet som "Invalid" (Ugyldigt).

Run Controls, Negative Control (Kørselskontroller, Negativ kontrol): Hvis resultaterne for både "NTC" og "Internal Control" (Intern kontrol) er inden for acceptable områder, viser "Negative Control Status" (Negativ kontrolstatus) "Valid" (Gyldigt), ellers vises resultatet som "Invalid" (Ugyldigt).

Sample Result Table (Tabel over prøveresultat): Der rapporteres specifikke mutationer for mutationspositive prøver under kolonnen "EGFR Mutation Status" (EGFR-mutationsstatus).

19. Klik på Report (Rapport) for at generere en rapportfil. Vinduet "Report Browser" (Rapportbrowser) åbnes. Vælg EGFR CE Analysis Report (EGFR CE-analyserapport) under Templates (Skabeloner), og klik derefter på Show (Vis) (figur 18).

Bemærk: En rapport kan gemmes på et alternativt sted i Web Archives-format ved at klikke på knappen Save As (Gem som) i øverste venstre hjørne af hver rapport.



Figur 18. Valg af "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE-analyserapport). 1 = "Report" (Rapport), 2 = panelet "Report Browser" (Rapportbrowser), 3 = "EGFR CE Analysis Report" (EGFR CE-analyserapport), 4 = "Show" (Vis).

Fortolkning af resultater (automatiseret)

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

Bemærk: Se oplysninger om manuel analyse af resultater i afsnittet Fortolkning af resultater (manuel).

PCR-cyklussen, hvor fluorescensen fra en bestemt reaktion overskrider den foruddefinerede tærskelværdi, defineres som C_T -værdien. C_T -værdier angiver kvantiteten af bestemt input-DNA. Lave C_T -værdier angiver højere input-DNA-niveauer, og høje C_T -værdier angiver lavere input-DNA-værdier. Reaktionen med en C_T -værdi klassificeres som positive forstærkninger.

Rotor-Gene Q-softwaren interpolerer fluorescenssignaler mellem to registrerede værdier. C_T -værdierne kan derfor være et reelt tal (ikke begrænset til heltal) inden for området 0 til 40. For *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit er tærskelværdien indstillet til 0,075 relative fluorescenseheder for Green (FAM)-kanalen og 0,02 for Yellow (HEX)-kanalen. Disse værdier konfigureres automatisk i *therascreen* EGFR Assay Package. Kørselskontrollerne (PC og NTC samt IC) vurderes for at sikre, at acceptable C_T -værdier opfyldes, og at reaktionerne fungerer korrekt.

Prøvens ΔC_T -værdier beregnes for hver mutationsanalyse ved hjælp af ligningen:

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

Prøverne klassificeres som mutationspositive, hvis de giver en ΔC_T -værdi, der er mindre end eller lig med cutoff- ΔC_T -værdien for den pågældende analyse. Over denne værdi indeholder prøven enten mindre end den mutationsprocentdel, der kan påvises af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (ud over analysens grænser), eller også er prøven mutationsnegativ og rapporteres som "No Mutation Detected" (Ingen mutation påvist).

Ingen forstærkning i mutationsreaktioner klassificeres som "No Mutation Detected" (Ingen mutation påvist). ΔC_T -værdier, der er beregnet fra baggrundsforstærkning, forventes at være højere end cutoff- ΔC_T -værdierne, og prøven klassificeres som "No Mutation Detected" (Ingen mutation påvist).

Analyseresultaterne vises som "Mutation Detected" (Mutation påvist), "No Mutation Detected" (Ingen mutation påvist), "Invalid" (Ugyldig), eller hvis en kørsel mislykkes "Run Control Failed" (Kørselskontrol mislykket). For de mutationspositive prøver rapporteres de specifikke mutationer. En tumor kan indeholde mere end én mutation. I sådanne tilfælde rapporteres der om mere end én mutation.

Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package-flag

Tabel 8 (næste side) viser de mulige flag, der kan genereres af Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package, deres betydning og de handlinger, der skal foretages.

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

For eksempel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = den positive kontrols (Positive Control, PC) kontrolanalyse (CTRL_ASSAY) mislykkedes (FAIL)
- NTC_INT_CTRL_FAIL = ikke-skabelon-kontrollens (No Template Control, NTC) interne kontrol (INT_CTRL) mislykkedes (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = prøvens (SAMPLE) kontrolanalyse (CTRL) har en høj koncentration (HIGH_CONC).

Tabel 8. Flag, betydninger og handlinger, der skal tages

Flag	Betydning	Handling
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-kørsel ugyldig – FAM-C _T uden for området for positiv kontrol i kontrolreaktion.	Gentag hele PCR-kørslen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR-kørsel ugyldig – FAM-C _T uden for området for én eller flere mutationskontrolreaktioner.	Gentag hele PCR-kørslen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR-kørsel ugyldig – fluorescensdata i positiv kontrol (kontrolreaktionsblanding) kan ikke fortolkes.	Gentag hele PCR-kørslen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR-kørsel ugyldig – fluorescensdata i positiv kontrol (mutationsreaktionsblanding) kan ikke fortolkes.	Gentag hele PCR-kørslen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR-kørsel ugyldig – intern kontrol over området for negativ kontrol.	Gentag hele PCR-kørslen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR-kørsel ugyldig – intern kontrol er under området for negativ kontrol.	Gentag hele PCR-kørslen.
NTC_INVALID_CT	PCR-kørsel ugyldig – FAM ugyldig (mindre end grænsen) for negativ kontrol.	Gentag hele PCR-kørslen.
NTC_INVALID_DATA	PCR-kørsel ugyldig – fluorescensdata i negativ kontrol kan ikke fortolkes.	Gentag hele PCR-kørslen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Prøve ugyldig – fluorescensdata i prøvekontrol kan ikke fortolkes.	Sæt ny PCR-kørsel op for at gentage de(n) relevante prøve(r).
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Prøve ugyldig – FAM-C _T for lav i prøvekontrol.	Fortynd prøven for at øge kontrollens C _T -værdi. Denne fortynding skal beregnes ud fra en forudsætning om, at en fortynding 1:1 med det vand, der leveres sammen med kittet, vil øge C _T -værdien med 1,0. Når prøven er fortyndet, skal en ny mutationsvurderingskørsel sættes op for at gentage prøven. Eller hvis prøven er blevet fortyndet efter DNA-prøvevurderingskørslen, skal du gå direkte til EGFR-mutationspåvisningskørslen med den fortyndede prøve.

Table 8. Flag, betydninger og handlinger, der skal tages (fortsat)

Flag	Betydning	Handling
SAMPLE_CTRL_FAIL	Prøve ugyldig – FAM-C _T for høj i prøvekontrolreaktion.	Sæt en ny PCR-kørsel op for at gentage prøven. Hvis prøven er ugyldig efter den gentagne PCR-kørsel, og hvis mængden af DNA stadig er utilstrækkelig, skal du udtrække yderligere 2 FFPE-vævssektioner, hvis de er tilgængelige. Sæt en ny PCR-kørsel op for at teste denne ekstrahering. Hvis prøven er ugyldig, gentages PCR-kørslen på den sekundære ekstrahering. Hvis prøven ikke giver et gyldigt resultat efter denne kørsel, får prøven en ubestemt mutationsstatus, og der skal ikke udføres yderligere test.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T for høj (eller ingen C _T) til intern kontrol (HEX), FAM-kanal er mutationsnegativ.	For prøver, som genererer flaget SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID med en mutation påvist (eller ikke påvist) i en klinisk relevant mutationsreaktionsblanding, skal resultaterne rapporteres, og der kræves ingen yderligere test. Fortynd prøven med det vand, der leveres sammen med kittet, under forudsætning af, at en fortynding 1:1 vil øge C _T -værdien for kontrolreaktionen med 1,0, så den endelige volumen er >40 µl (f.eks. 40 µl DNA og 40 µl vand fra rør med mærket DIL). Sæt en ny PCR-kørsel op for at gentage prøven. Hvis den er ugyldig ved den gentagne PCR-kørsel, skal prøven ekstraheres fra yderligere to FFPE-sektioner. Sæt en ny PCR-kørsel op for at teste denne ekstrahering. Hvis den sekundære ekstrahering er ugyldig, skal du fortynde prøven som beskrevet ovenfor. Hvis prøven ikke giver et gyldigt resultat efter denne kørsel, får prøven en ubestemt mutationsstatus, og der skal ikke udføres yderligere test.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutationsrør er ugyldigt – C _T HEX for lav til prøve (intern kontrol).	For prøver, som genererer flaget SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID med en mutation påvist (eller ikke påvist) i en klinisk relevant mutationsreaktionsblanding, skal resultaterne rapporteres, og der kræves ingen yderligere test. Sæt en ny PCR-kørsel op for at gentage prøven. Hvis den er ugyldig ved gentagne PCR-kørsel, skal der ekstraheres 2 ekstra FFPE-vævssektioner, hvis de er tilgængelige. Sæt en ny PCR-kørsel op for at teste denne ekstrahering. Hvis den er ugyldig, gentages PCR-kørslen på den sekundære ekstrahering. Hvis prøven ikke giver et gyldigt resultat efter denne kørsel, får prøven en ubestemt mutationsstatus, og der skal ikke udføres yderligere test.

Tabel 8. Flag, betydninger og handlinger, der skal tages (fortsat)

Flag	Betydning	Handling
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsrør er ugyldigt – fluorescensdata i intern kontrol kan ikke fortolkes.	<p>For prøver, som genererer flaget SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID med en mutation påvist (eller ikke påvist) i en klinisk relevant mutationsreaktionsblanding, skal resultaterne rapporteres, og der kræves ingen yderligere test.</p> <p>Sæt en ny PCR-kørsel op for at gentage prøven. Hvis den er ugyldig ved gentagen PCR-kørsel, skal der ekstraheres 2 ekstra FFPE-vævssektioner, hvis de er tilgængelige. Sæt en ny PCR-kørsel op for at teste denne ekstrahering. Hvis den er ugyldig, gentages PCR-kørslen på den sekundære ekstrahering. Hvis prøven ikke giver et gyldigt resultat efter denne kørsel, får prøven en ubestemt mutationsstatus, og der skal ikke udføres yderligere test.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Én eller flere mutationer til en prøve er positive, samtidig er én eller flere mutationer til den samme prøve ugyldige.	<p>For prøver, som genererer flaget SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID med en mutation påvist (eller ikke påvist) i en klinisk relevant mutationsreaktionsblanding, skal resultaterne rapporteres, og der kræves ingen yderligere test.</p> <p>For prøver, som genererer flaget SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID med resultatet INVALID (Ugyldig) opnået i en klinisk relevant mutationsreaktionsblanding, skal prøven testes igen med alle reaktionsblandingerne efter handlingen for det specifikke ugyldige flag.</p> <p>Hvis flaget SAMPLE_INT_CTRL_FAIL genereres i kombination med et andet flag for den påvirkede prøve, skal handlingen med fortynding af prøven fra flaget SAMPLE_INT_CTRL_FAIL følges. Sæt en ny PCR-kørsel op, og testprøven igen.</p> <p>For prøver, som genererer flaget SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID med resultatet INVALID (Ugyldig) opnået i en klinisk relevant mutationsreaktionsblanding ved den gentagne PCR-kørsel, skal prøven ekstraheres fra yderligere 2 FFPE-sektioner. Sæt en ny PCR-kørsel op med alle reaktionsblandinger for at teste denne ekstrahering.</p> <p>Hvis denne prøver genererer et ugyldigt resultat igen for en klinisk relevant mutationsreaktionsblanding, skal du gentage prøven med alle reaktionsblandinger efter det ugyldige flags specifikke handling. Hvis SAMPLE_INT_CTRL_FAIL genereres i kombination med et andet flag for den påvirkede prøve, så skal handlingen for fortynding af prøven fra flaget SAMPLE_INT_CTRL_FAIL følges. Sæt en ny PCR-kørsel op, og testprøven igen.</p> <p>Hvis flaget SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID observeres ved denne gentagelse, får prøven en ubestemt mutationsstatus.</p>

Fejlfindingsvejledning

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

Kommentarer og forslag

NTC-prøver viser positive resultater i Green FAM-kanalen

Der opstod kontaminering under forberedelsen af PCR'en	Gentag PCR'en med nye reagenser. Hvis det er muligt, skal PCR-rørene lukkes straks efter tilsætning af den prøve, der skal testes. Sørg for, at arbejdsbordene og apparaterne regelmæssigt dekontamineres.
--	--

Intet signal med den positive kontrol for EGFR

- | | |
|---|---|
| a) Den valgte fluorescenskanal til PCR-dataanalyse er ikke i overensstemmelse med protokollen. | I forbindelse med dataanalyse skal der vælges fluorescenskanalen Cycling Green for EGFR-analyse-PCR og fluorescenskanalen Cycling Yellow for den interne kontrol-PCR. |
| b) Temperaturprofilen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet er programmeret forkert. | Sammenlign temperaturprofilen med protokollen. Hvis den er korrekt, skal man gentage kørslen. |
| c) PCR er konfigureret forkert | Kontrollér arbejdsstrinnene ved hjælp af pipetteringsplanen, og gentag PCR efter behov. |
| d) Opbevaringsbetingelserne for en eller flere kitkomponenter var ikke i overensstemmelse med instruktionerne i afsnittet "Opbevaring og håndtering af reagenser" (side 18) | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagensene (se kittets etiket), og brug evt. et nyt kit. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit er for gammelt | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagensene (se kittets etiket), og brug evt. et nyt kit. |

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringsystem testes hvert lot af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Begrænsninger

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

Produktet må kun bruges af personale med særlig kompetence og uddannelse inden for in vitro-diagnostiske procedurer og Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter.

Produktet er udelukkende beregnet til brug med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cycler.

Håndbog til theascreen EGFR RGQ PCR Kit skal følges fuldstændigt for at opnå optimale resultater. Det anbefales ikke at fortynde reagenserne, undtagen som det er beskrevet i denne håndbog, da det vil medføre tab af ydelse.

Det er vigtigt, at mængden og kvaliteten af DNA'et i prøven vurderes, inden prøven analyseres ved hjælp af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Der medfølger ekstra kontrolblanding til at konstatere, om C_T -værdien kan accepteres for analysen. Brug ikke absorbansmålinger, da de ikke svarer til C_T -værdierne i fragmenterede DNA-prøver.

Primerne i EGFR Deletions Reaction Mix er målrettet flere exon 19-deletioner samtidig og omfatter nukleotiderne 55174772 til 55174795 (GRCh38 chr7), en række på 23 bp.

Analysen af exon 19-deletionerne er blevet valideret analytisk og påvist at registrere 14 specifikke deletioner i exon 19 (se tabel 1 i denne håndbog), men det er muligt, at flere mutationer (herunder, men ikke begrænset til, ekstra exon 19-deletioner, exon 19-insertioner og L747P-mutationer), som skal forstærkes ved hjælp af en Deletions Reaction Mix.

Hvis disse ekstra mutationer konstateres, resulterer det i "Deletions Detected" (Deletioner påvist) i den pågældende patientprøve.

Derudover er det muligt at påvise L858Q-mutationen ved hjælp af L858R-analysen. Hvis L858Q-mutationen konstateres i en patientprøve, kan det derfor resultere i "L858R Detected" (L858R påvist).

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

Ydelseskarakteristik

Analytisk ydeevne

De specifikke ydelseskarakteristika for *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit blev bestemt af undersøgelser med formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) vævsprøver, der er indsamlet fra patienter med NSCLC og paraffinindstøbte humane cellelinjer (FFPE-cellelinjer). FFPE-cellelinjerne blev genereret ved hjælp af en cellelinje med lungecarcinom (A549) til at producere cellelinjer, der indeholder de ønskede specifikke EGFR-mutationer. Hvis vævsprøven eller cellelinjerne ikke var tilgængelige, blev der brugt plasmid-DNA.

Tomgrænse (Limit of Blank, LOB), arbejdsområde og cutoff-værdier

I alt 417 FFPE-prøver blev testet i en undersøgelse, der fulgte vejledningen i NCCLS EP17-A (2004) (12) for at bestemme LOB og cutoff-værdier for hver mutationsanalyse. Derudover blev arbejdsområdet bestemt. Cutoff-værdierne blev fastlagt og er vist i tabel 9.

Tabel 9. Fastlagte cutoff-værdier for hver mutationsanalyse

Analyse	Cutoff (Δ CT)
T790M	$\leq 7,40$
Deletioner	$\leq 8,00$
L858R	$\leq 8,90$
L861Q	$\leq 8,90$
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Indsætninger	$\leq 8,00$

Kontrolreaktionens C_T -område blev fastlagt til 23,70 til 31,10 C_T .

Cutoff-værdierne og arbejdsområderne for analysen blev verificeret ved hjælp af standarder og yderligere FFPE-prøver. Under verificeringen blev cutoff-værdierne vurderet for evnen til at skelne mellem den korrekte mutation mod en baggrund af vildtype-genomisk DNA ved at vurdere hver analyse med højt genomisk input-DNA og høj input-mutation for DNA (se Krydsreaktivitet). Effekten af input-DNA ved mutationsbestemmelse blev også vurderet (se Effekten af DNA-input på ΔC_T -værdier).

For at vurdere ydelsen i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i mangel af en skabelon og for at sikre, at en tom prøve eller en prøve med vildtype-DNA ikke genererer et analytisk signal, der kan indikere lav koncentration af mutation, blev prøver uden skabelon og NSCLC EGFR-vildtype-DNA evalueret. Resultaterne viste ingen positive mutationsbestemmelser for NTC-prøver og for FFPE-vildtype-prøver.

Effekten af DNA-input på ΔC_T -værdier

DNA-inputniveaulet defineres som den samlede kvantitet af amplificerbart EGFR DNA i en prøve som bestemt af C_T -værdierne fra kontrolreaktionen. For at vise, at ydelsen i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit er konstant over kontrolreaktionens C_T -område (23,70-31,10), blev alle 7 EGFR-mutationsanalyser testet i forhold til en 6-punkts 1 i 3-fortyndingsserie (DNA ekstraheret fra FFPE-cellelinjer). Den tilsigtede C_T -værdi for fortynding 1 for hver mutation var ca. 24,70. Den endelige fortynding, som gav en C_T på ca. 32-33, var uden for kontrolreaktionens C_T -område. Overordnet set var de ΔC_T -værdier, der blev målt ved forskellige samlede DNA-inputniveauer, konstante over arbejdsområdet for *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Krydsreaktivitet

Vildtype-EGFR DNA ved højt DNA-input blev testet for at vurdere uspecifik forstærkning. Resultaterne viste, at de laveste ΔC_T -værdier oversteg de fastlagte cutoffs, og angav ingen uspecifik forstærkning.

FFPE-cellelinjer ved højt DNA-input blev testet i forhold til alle reaktionsblandinger for at vurdere potentiel krydsreaktivitet. Resultaterne viste ingen påvirkning fra krydsreaktivitet mellem mutantreaktioner. De mindste ΔC_T -værdier var alle højere end analysens respektive cutoff-værdier for alle ikke-tilsvarende reaktionsblandinger og DNA-prøver.

Nøjagtighed: Sammenligning med den analytiske referencemetode

En undersøgelse viste overensstemmelsen i mutationspåvisningen i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i forhold til bidirektional Sanger-sekventering. I denne undersøgelse blev 360 FFPE-prøver testet.

Prøver med gyldige resultater fra både Sanger- og *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit blev analyseret for at vurdere procentdelen af positiv overensstemmelse (Positive Percent Agreement, PPA), procentdelen af negativ overensstemmelse (Negative Percent Agreement, NPA) og procentdelen af overordnet overensstemmelse (Overall Percent Agreement, OPA). Disse procentdele sammen med de tilsvarende tosidede 95 % konfidensintervaller (Confidence Intervals, CI) er opsummeret i tabel 10.

Tabel 10. Analyse af overensstemmelse

Mål	Procentdel af overensstemmelse (N)	95 % CI
Positiv overensstemmelse i procent	99,4 % (157/158)	96,5-100,0 %
Negativ overensstemmelse i procent	86,6 % (175/202)	81,2-91,0 %
Overordnet overensstemmelse i procent	92,2 % (332/360)	89,0-94,8 %

De 28 afvigende resultater blandt procentdelen af den overordnede overensstemmelse viste følgende:

- 1 prøve (3,6 %) var vildtype (dvs. ingen mutation påvist) med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, men resultater med Sanger-sekventering påviste mutation.
- 127 prøver (96,4 %) blev mutation påvist med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, men Sanger-sekventering viste vildtype-resultater.

Værdier for påvisningsgrænse (Limit of Detection, LOD)

Der blev udført en undersøgelse for at bestemme LOD for hver af de 29 EGFR-mutationer. LOD blev defineret som den laveste mængde mutant-DNA på en baggrund af vildtype-DNA, hvor en mutationsprøve giver positive resultater i 95 % af testresultaterne (C₉₅).

For at bestemme LOD for hver mutation blev prøver med forskellige procentdele af mutation udarbejdet ved lave og høje input-DNA-koncentrationer og testet med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (tabel 11). LOD for hver analyse blev beregnet ved logistisk regression. For at verificere LOD blev mutationsprøver ved den bestemte LOD testet, og den positive testrate blev verificeret.

Tabel 11. LOD, der blev fastlagt ved hjælp af FFPE-kliniske prøver med lavt og højt DNA-input, FFPE-cellelinjer eller plasmider

Exon	Mutation	COSMIC*-id	Basisændring	LOD (% mutant)	
				Lav	Høj
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [†]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [†]	– [†]
19	Deletioner	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 [§]

Tabel 11. LOD, der blev fastlagt ved hjælp af FFPE-kliniske prøver med lavt og højt DNA-input, FFPE-cellelinjer eller plasmider (fortsat fra foregående side)

Exon	Mutation	COSMIC*-id	Basisændring	LOD (% mutant)	
				Lav	Høj
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Indsætninger	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 over somatiske cancermutationer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] LOD-værdier blev fastlagt ved hjælp af cellelinjer.

[†] LOD-værdier blev fastlagt ved hjælp af plasmider.

[‡] LOD-værdier blev fastlagt ved hjælp af kliniske prøver.

[†] Ikke vurderet

Interferens

Virningen af nekrotisk væv

NSCLC FFPE-kliniske prøver med indhold af nekrotisk væv på op til 50 % for både EGFR-mutant- og vildtype-prøver påvirkede ikke bestemmelsen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Eksogene stoffer

Potentielt interfererende stoffer, der var til stede i DNA-ekstraheringsprocessen, blev testet i mutant- og vildtype-prøver ved 10x koncentration: paraffinoks, xylene, ethanol og proteinase K. Resultaterne viste, at disse stoffer ikke påvirkede bestemmelsen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reproducerbarhed

Lot-til-lot-reproducerbarhed

Testsystemet for *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit anvender to separate kits: QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit eller QIAamp DNA FFPE Tissue Kit til isolering af DNA samt *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit til forstærkning af DNA og påvisning af EGFR-mutationsstatus. Lot-til-lot-reproducerbarhed og -udskiftelighed blev vist ved hjælp af 3 lot fra QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit og 3 lot fra *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Den overordnede procentdel af korrekte bestemmelser af lot for EGFR-mutationsanalyse var 97,8 % (317/324) og 100 % (379/379) for vildtypeprøver.

Prøvehåndtering

Reproducerbarheden i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit blev undersøgt ved hjælp af sektioner fra tre FFPE-prøveblokke, især exon 19-deletionsmutationen (2235-2249 del15), exon 21 L858R-mutation og én vildtype. For hver prøve blev der foretaget ekstraheringer i duplikater på 3 steder og testet på 3 ikke-fortløbende dage i en periode på 6 dage, hvilket gav i alt 18 datapunkter pr. prøve. På hvert sted udførte 2 brugere testen ved hjælp af 1 lot fra QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 lot pr. sted, 3 lot i alt) kombineret med det samme lot i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-reagenser på tværs af stederne. Alle mutant- og vildtypeprøveresultater var gyldige og viste den forventede bestemmelse (korrekt bestemmelse = 100 %, 18/18 for hver prøve) og understøttede reproducerbarheden og repeterbarheden for *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i det præanalytiske trin i DNA-isolering.

Præcision og reproducerbarhed

Præcisionen og reproducerbarheden i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit blev undersøgt ved at teste DNA, der blev ekstraheret fra NSCLC FFPE-kliniske prøver eller FFPE-cellelinjer, der repræsenterede alle syv mutationsanalyser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. NSCLC vildtype-FFPE-kliniske prøver blev også inkluderet i undersøgelsen (tabel 12).

Der blev implementeret et matrix-undersøgelsesdesign for at vurdere analysens reproducerbarhed ved at teste prøver i 3 laboratorier (steder) med 3 lot fra *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 lot på tværs af 3 steder), med 2 brugere pr. sted, på 2 instrumenter pr. sted, hvor hver prøve (forberedt ved et niveau tæt på LOD) blev testet i duplikater i en periode på i alt 16 dage. Reproducerbarheden for hver enkelt mutation blev undersøgt over ikke-fortløbende dage på hvert sted. Fordelingen af korrekte bestemmelser vises i tabel 12.

Table 12. Analysis reproducibility – distribution of correct determinations for the tested EGFR mutations

Exon	Mutation	COSMIC* -id	Bestemmelser		% korrekte	
			Korrekte/i alt	% korrekte	Nedre endet 95 % CI	
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06	
19	Deletioner	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	
		Indsætninger	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	
Vildtype	–	–	77/78	98,72	94,06	

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer (Katalog over somatiske cancermutationer): <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Der blev anvendt en varianskomponentanalyse til at vurdere standardafvigelsen og 95 % konfidensintervaller for variabiliteten inden for kørslen, mellem kørsler, mellem dage, mellem lot og mellem stederne. På tværs af alle varianskomponenter var den samlede variationskoefficient (Coefficient of Variation, CV) $\leq 14,11$ % for alle de testede EGFR-mutationer. Blandt alle mutantpanelsmedlemmer var den procentvise CV $\leq 8,33$ % mellem lot, mellem dage og mellem kørsler. Den procentvise CV for variabilitet inden for kørsler (repetierbarhed/præcision) var fra 5,99 % til 13,49 %.

Klinisk ydeevne

Kliniske resultatdata: GIOTRIF®

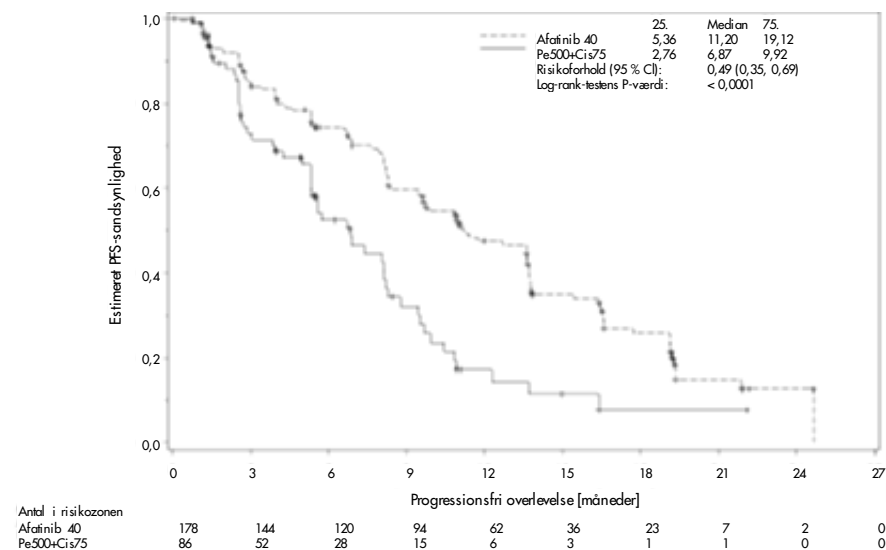
Det kliniske LUX-Lung 3-forsøg var et internationalt, multicenter-, open label-, randomiseret fase 3-forsøg med afatinib i forhold til kemoterapi som førstevalgsbehandling til patienter med stadie IIIB- eller IV-adenokarcinom i lungen med en EGFR-aktiverende mutation (ClinicalTrials.gov-nummer NCT00949650). Patientens egnethed til deltagelse i forsøget blev bestemt ved at teste patientens EGFR-mutationsstatus ved hjælp af en klinisk prøveanalyse (Clinical Trial Assay, CTA). Retrospektive test af vævsprøver blev udført ved hjælp af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Der blev udført en overgangsundersøgelse for at vurdere overensstemmelsen mellem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit og CTA.

På baggrund af CTA-testresultaterne var der 345 patienter i det randomiserede sæt (afatinib: 230 patienter; kemoterapi: 115 patienter). Det primære effektivitetsresultat var progressionsfri overlevelse (Progression-Free Survival, PFS), som blev vurderet ved hjælp af en uafhængig tilsynskomite (Independent Review Committee, IRC). Blandt de 345 randomiserede patienter blev tumorprøver fra 264 patienter (afatinib: 178 patienter; kemoterapi: 86 patienter) testet retrospektivt ved hjælp af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En statistisk væsentlig forbedring i PFS som bestemt af IRC blev påvist for patienter, der var randomiseret til afatinib, sammenlignet med de patienter, der var randomiseret til kemoterapi i den samlede CTA+population og *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ population. De samlede effektivitetsresultater er opsummeret i tabel 13 og figur 19.

Tabel 13. Den kliniske fordel for patienter, der blev testet med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i populationen med det kliniske LUX-Lung 3-forsøgspopulationen

Parameter	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/ CTA+ population n = 264		CTA+ population, n = 345	
	Kemoterapi n = 86	Afatinib n = 178	Kemoterapi n = 115	Afatinib n = 230
Progressionsfri overlevelse (Progression-Free Survival, PFS)				
Antal dødsfald eller progressioner, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
Median PFS (måneder)	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
Risikoforhold	0,49		0,58	
Risikoforhold 95 % CI	0,35, 0,69		0,43, 0,78	
P-værdi (stratificeret log-rank-test)*	< 0,0001		< 0,001	

* Stratificeret efter EGFR-mutationsstatus og race.



Figur 19. Kaplan-Meier-kurven for progressionsfri overlevelse (Progression-Free Survival, PFS) via uafhængig review efter behandlingsgruppe (*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+ /CTA+ population).

Analysen af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-undersæt (n = 264) viste, at de patienter, der blev behandlet med afatinib, havde en væsentlig stigning i PFS-tiden (median PFS 11,2 i forhold til 6,9 måneder) og havde mindre sandsynlighed for at udvikle progressiv sygdom eller dø af sygdommen (HR = 0,49, 95 % CI [0,35; 0,69], p < 0,0001) end patienter, der blev behandlet med kemoterapi. Den observerede kliniske fordel blandt undersættet af patienter, som blev testet med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, blev sammenlignet med den observerede kliniske fordel i hele forsøgspopulationen (n = 345).

Kliniske resultatdata: IRESSA®

IFUM-forsøget (IRESSA Follow-up Measure) var et enkeltarmet, open-label-forsøg i fase 4 (NCT01203917) til vurdering af effektiviteten og sikkerheden/tolerancen ved første linje-behandling med gefitinib blandt kaukasiske patienter med stadie IIIA/B/IV, EGFR-mutationspositiv lokalt fremskreden eller metastatisk NSCLC. IFUM-undersøgelsen blev udviklet til at evaluere den objektive responsrate ved hjælp af RECIST-kriterier blandt prospektivt udvalgte kaukasiske patienter med EGFR-mutant NSCLC.

Egnede patienter skulle have en deletion i en EGFR exon 19-, L858R-, L861Q- eller G719X-substitutionsmutation og ingen T790M- eller S768I-mutation eller exon 20-indsættelser i tumorprøver, som blev prospektivt bestemt ved hjælp af CTA'en. Retrospektive test af prøver fra patienter, som screenes til det kliniske IFUM-forsøg, blev udført ved hjælp af det medfølgende diagnostiske *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Der blev udført en overgangsundersøgelse for at vurdere overensstemmelsen mellem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit og den CTA, der blev anvendt til at udvælge patienter til det kliniske IFUM-forsøg. Den overordnede overensstemmelse mellem de to analyser til påvisning af EGFR exon 19 deletioner og 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 % og NPA på 99,8 % (n = 610/611; 95 % CI: 99,1 %, 100,0 %).

CTA-testresultaterne blev opnået for 859 screenede patienter, hvoraf 106 patienter var egnede til behandling med gefitinib. Ud af 859 prøver med et CTA-resultat blev 765 prøver tilgængelige for testning retrospektivt ved hjælp af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, herunder 87 prøver, som var EGFR-mutationspositive med både CTA og *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Det største effektivitetsresultat var en objektiv responsrate (Objective Response Rate, ORR) som vurderet ved hjælp af uafhængig central blindvurdering (Blinded Independent Central Review, BICR) og undersøgere. Den observerede kliniske fordel blandt undersøgt af patienter, som blev testet med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, blev sammenlignet med den observerede kliniske fordel i hele forsøgspopulationen.

De samlede effektivitetsresultater er opsummeret i tabel 14.

Tabel 14. Klinisk fordel for patienter, der blev testet med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, i populationen med det kliniske IFUM-forsøg

Parameter	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+ population, n = 87	CTA+ population, n = 106
Objektiv responsrate (Objective Response Rate, ORR) ved hjælp af BICR Antal responser (N)	42	53
ORR (95 % CI)	48,3 (38,1-58,6)	50,0 (40,6-59,4)
Median varighed for respons (måneder)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
Objektiv responsrate (Objective Response Rate, ORR) ved hjælp af undersøgere Antal responser (N)	62	74
ORR (95 % CI)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Median varighed for respons (måneder)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

BICR: Blinded independent central review (Uafhængig central blindvurdering); CI: Confidence interval (Konfidensinterval); CTA: Clinical trial assay (Klinisk forsøgsanalyse).

Bemærk: Kit+ er resultatpositive for exon 19-deletioner/L8585R/L861Q/G719X.

Da *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ikke blev brugt til at udvælge patienter til det kliniske IFUM-forsøg, blev der udført yderligere effektivitetsanalyser for at inkludere patienter, som ikke indgik i forsøget, fordi de blev testet negative med CTA men kunne være testet positive med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (dvs. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), samt patienter, som deltog i forsøget men ikke havde gyldige resultater fra *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit efter en ny test (dvs. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ukendt/CTA+). Resultaterne fra alle de hypotetiske analyser svarede generelt til resultaterne fra den primære effektivitetsanalyse.













Litteraturhenvisninger

1. Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J. Clin. Oncol.* 23, 2556.
2. Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 7525.
3. Inoue, A., 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

Følgende symboler kan evt. findes på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
 Σ <N>	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Holdbarhedsdato
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer
	Beskyt mod direkte lys
	Globalt handelsvarenummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen (håndbog), og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Læs brugsanvisningen
	Forsigtig

Bilag A: Vejledningsprotokol til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Dette afsnit indeholder instruktioner i brugen af *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit med Rotor-Gene Q-softwareversion 2.3 i åben tilstand (dvs. uden brug af Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Generelle oplysninger

- Se en liste over de nødvendige materialer i Nødvendige materialer, som ikke medfølger.
- Se instruktioner i prøveforberedelse og prøvelayout i Protokol: Prøvevurdering og Protokol: Påvisning af EGFR-mutation.
- Før hver kørsel startes, skal det sikres, at cyklusparametrene er korrekte.

Protokol: Oprettelse af en temperaturprofil

Før start skal der oprettes en temperaturprofil for *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-analysen. Cyklusparametrene er de samme for DNA-prøvevurderingen og EGFR-mutationspåvisningen.

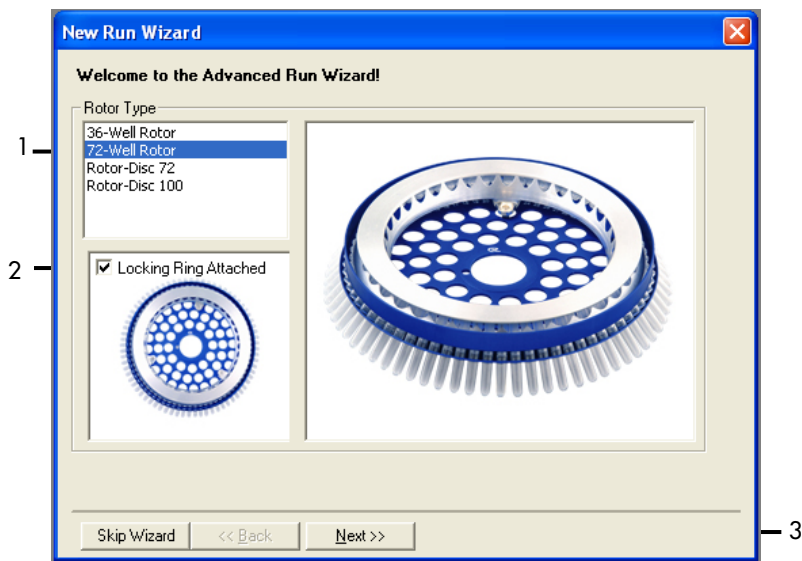
Procedure

Der vises en oversigt over cyklusparametrene i tabel 15.

Tabel 15. Temperaturprofil

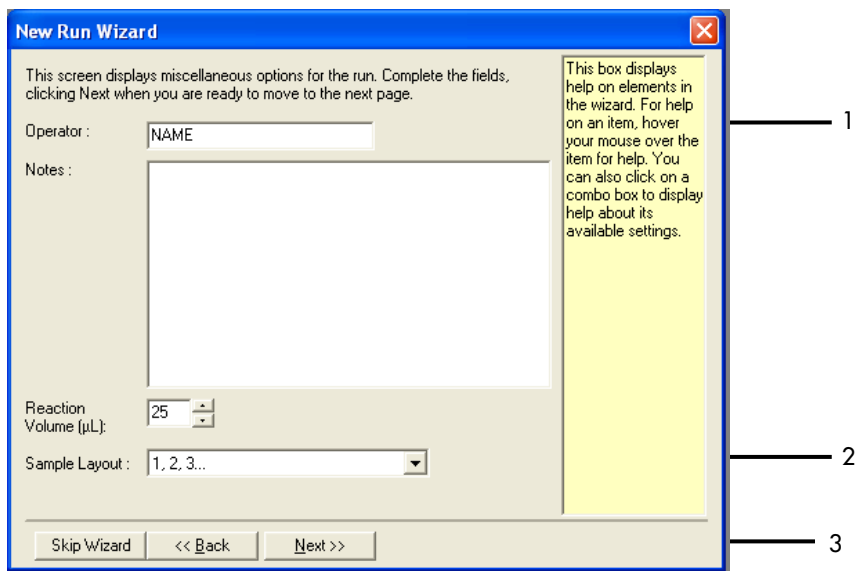
Cykklusser	Temperatur	Tid	Datahentning
1	95 °C	15 minutter	Ingen
40	95 °C	30 sekunder	Ingen
	60 °C	60 sekunder	Green og Yellow

1. Dobbeltklik på ikonet for Rotor-Gene Q-seriessoftwaren 2.3 på skrivebordet på den computer, der er tilsluttet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
2. Opret en ny skabelon ved at vælge Empty Run (Tom kørsel), og klik derefter på New (Ny) for at starte "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel).
3. Vælg 72-Well Rotor (72-brøndsrotor) som rotortype. Kontrollér, at låseringen er påsat, og markér afkrydsningsfeltet Locking Ring Attached (Låsering påsat). Klik på Next (Næste) (figur 20).



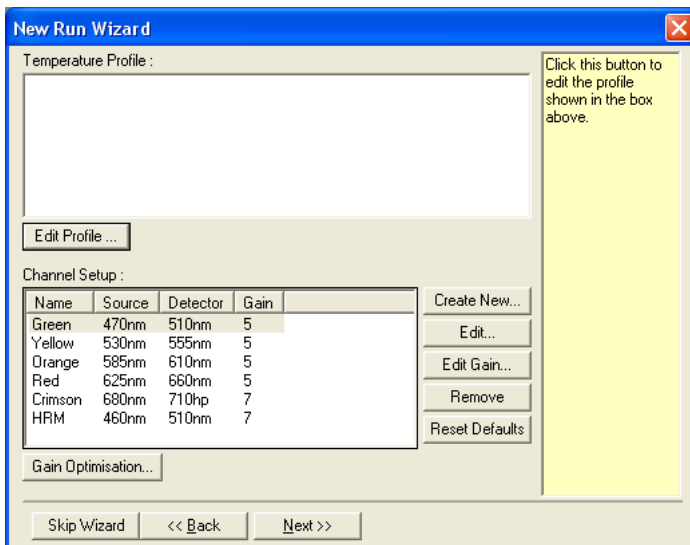
Figur 20. Dialogboksen "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel). 1 = "Rotor Type" (Rotortype), 2 = feltet "Locking Ring Attached" (Låsering påsat), 3 = "Next" (Næste).

4. Skriv navnet på brugeren. Tilføj eventuelle bemærkninger, og angiv reaktionsvolumen som 25. Sørg for, at 1, 2, 3... er angivet i feltet Sample Layout (Prøvelayout). Klik på Next (Næste) (figur 21).



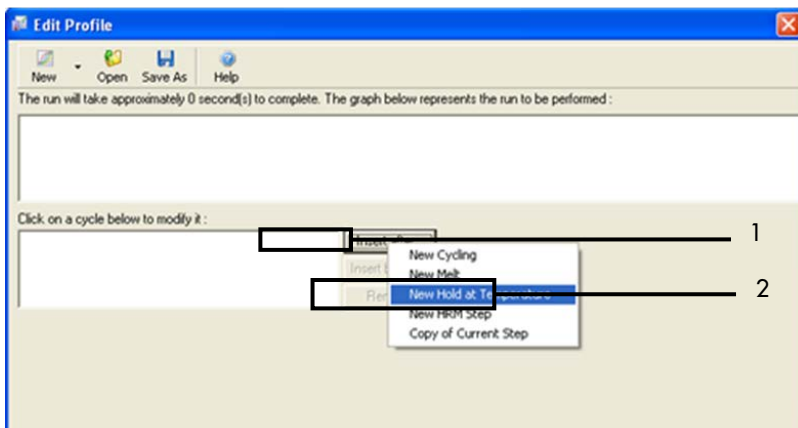
Figur 21. Angiv navnet på brugeren og reaktionsvolumener. 1 = dialogfelterne "Operator" (Bruger) og "Notes" (Bemærkninger), 2 = felterne "Reaction Volume" (Reaktionsvolumen) og "Sample Layout" (Prøvelayout), 3 = "Next" (Næste).

5. Klik på Edit Profile (Rediger profil) i dialogboksen i "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel) (figur 22), og kontrollér kørselsparametrene i henhold til de følgende trin.



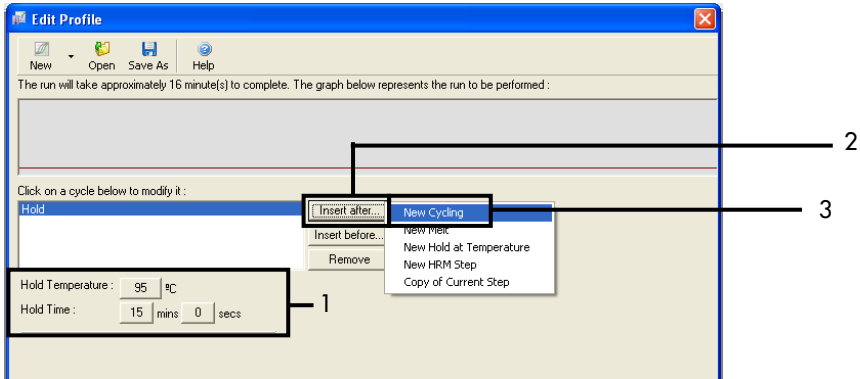
Figur 22. "Edit Profile" (Rediger profil) i "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel).

6. Klik på Indsæt efter (Indsæt efter), og vælg New Hold at Temperature (Ny holdetemperatur) (figur 23).



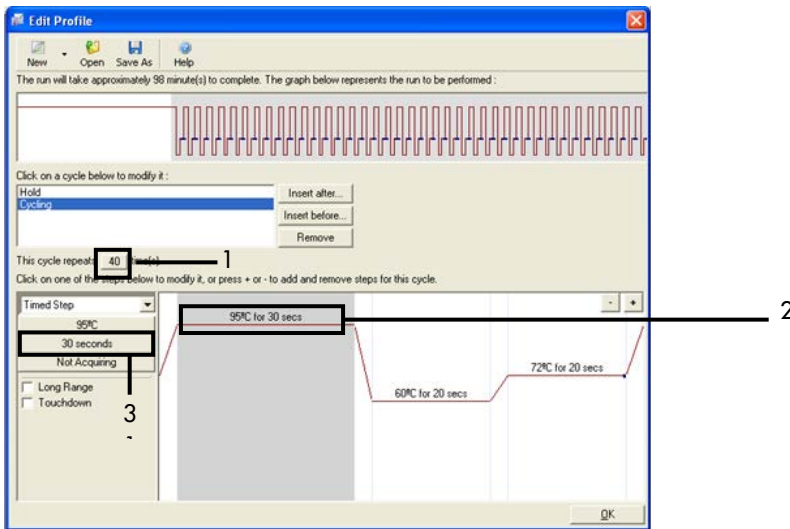
Figur 23. Indsættelse af første inkuberingsstrin. 1 = "Insert after" (Indsæt efter), 2 = "New Hold at Temperature" (Ny holdetemperatur).

7. Indstil værdien i feltet Hold Temperature (Holdtemperatur) til 95 °C og værdien i Hold Time (Holdetid) til 15 mins 0 secs (15 min. 0 sek). Klik på Indsæt After (Indsæt efter), og vælg New Cycling (Ny cyklus) (figur 24).



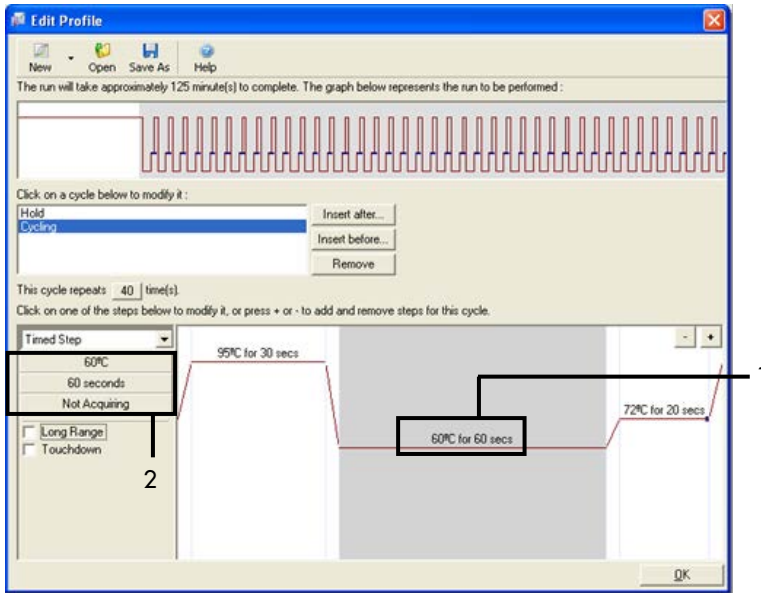
Figur 24. Første inkuberingstrin ved 95 °C. 1 = "Hold Temperature" (Holdtemperatur) og "Hold Time" (Holdetid), 2 = "Indsæt efter" (Indsættefter), 3 = "New Cycling" (Ny cyklus).

8. Indstil antallet af cyklusser til 40. Vælg det første trin, og indstil til 95 °C i 30 sekunder (figur 25).



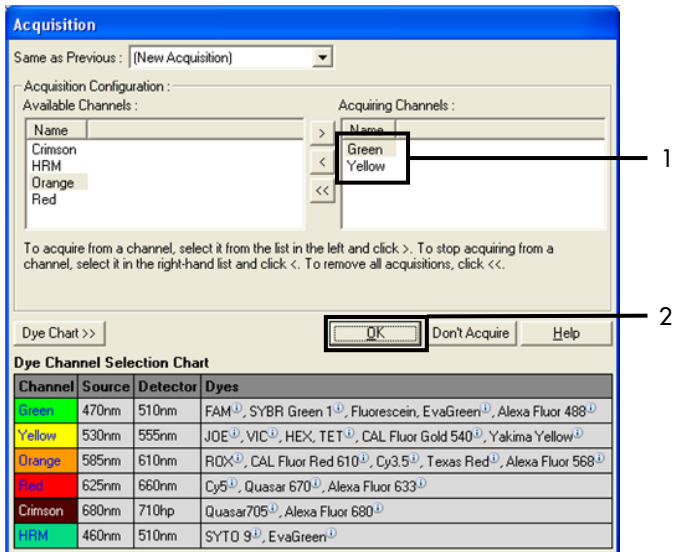
Figur 25. Cyklusstrin ved 95 °C. 1 = Feltet "Cycle repeats" (Cyklusgentagelse), 2 = temperaturindstilling af første trin, 3 = tidsindstilling af første trin.

9. Markér det andet trin, og indstil til 60 °C i 60 sekunder. Klik på Not Acquiring (Henter ikke) for at aktivere datahentning i dette trin figur 26).



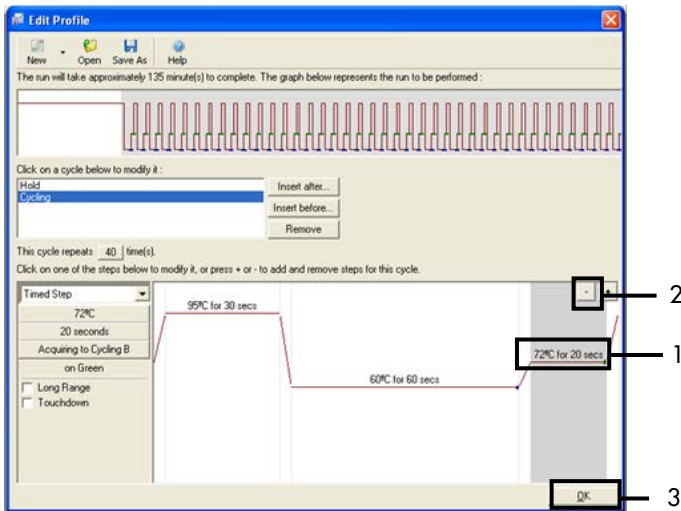
Figur 26. Cyklustrin ved 60 °C. 1 = Trin to: temperatur- og tidsindstilling, 2 = "Not Acquiring" (Henter ikke).

10. Vælg Green og Yellow som hentende kanaler. Klik på > for at overføre disse kanaler fra listen "Available Channels" (Tilgængelig kanaler) til sektionen Acquiring Channels (Hentende kanaler). Klik på OK (figur 27).



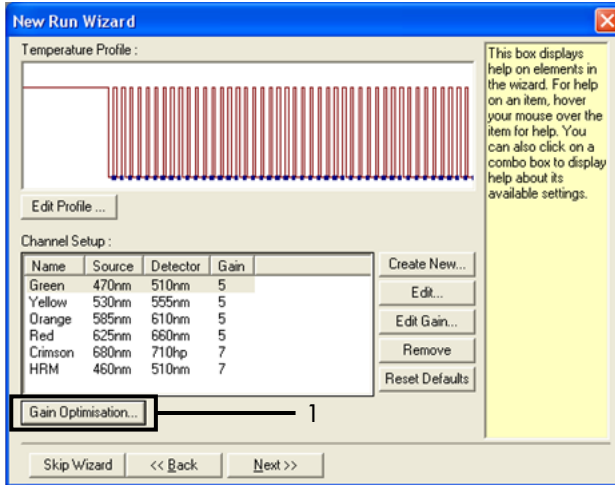
Figur 27. Hentning ved cyklustrin på 60 °C. 1 = valgte kanaler, 2 = "OK".

11. Markér det tredje trin, og klik på - for at slette det. Klik på OK (figur 28).



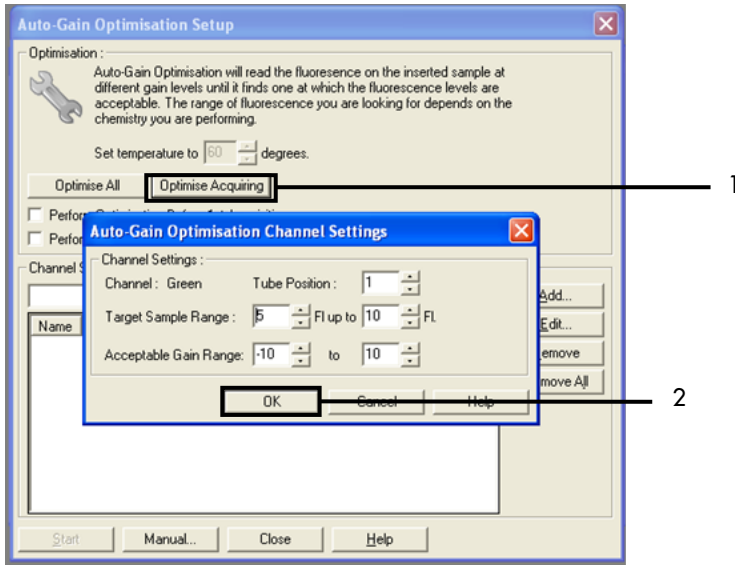
Figur 28. Fjernelse af udvidelsestrin. 1 = tredje trin, 2 = slet, 3 = "OK".

12. Klik på Gain Optimisation (Optimering af forstærkning) i den næste dialogboks (figur 29).



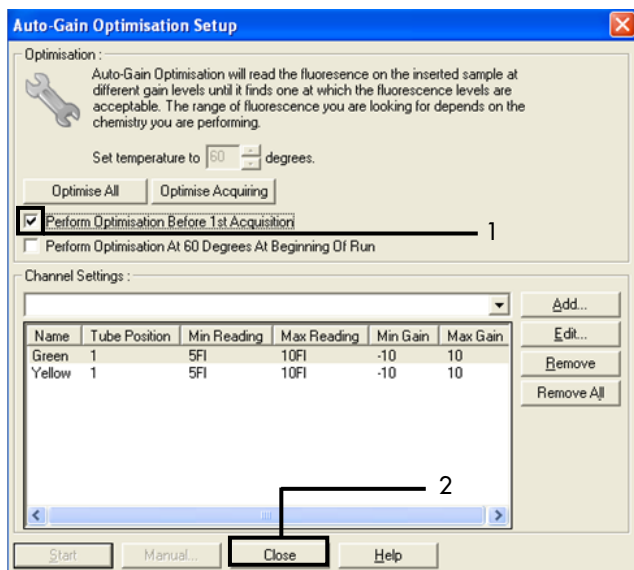
Figur 29. Gain Optimisation (Optimering af forstærkning) (1).

13. Klik på Optimise Acquiring (Optimer hentning). Kanalindstillingerne vises for hver enkelt kanal. Klik på OK for at acceptere standardværdierne for begge kanaler (figur 30).



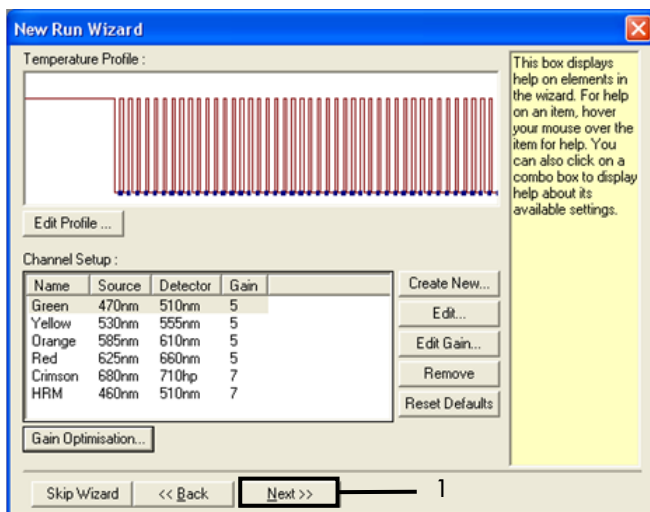
Figur 30. Optimering af automatisk forstærkning for Green-kanalen. 1 = "Optimise Acquiring" (Optimer hentning), 2 = "OK".

14. Afkryds feltet Perform Optimisation before 1st Acquisition (Udfør optimering inden første hentning), og klik på Close (Luk) for at gå tilbage til guiden (figur 31).



Figur 31. Valg af Green og Yellow-kanaler. 1 = afkrydsningsfeltet "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Udfør optimering inden første hentning), 2 = "Close" (Luk).

15. Klik på Next (Næste) (figur 32). Klik på Save Template (Gem skabelon) for at gemme skabelonen til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (*.ret) på et passende sted.



Figur 32. "Next" (Næste) (1).

Procedure (manuel)

Protokol: Prøvevurdering (manuel)

Denne protokol bruges til at vurdere det samlede DNA, der kan forstærkes, i prøver og skal udføres før EGFR-mutationsanalysen.

- Forbered prøverne som beskrevet i afsnittet Protokol: Prøvevurdering frem til trin 11.
- Konfigurer PCR-kørslen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet som beskrevet i afsnittet Protokol: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q-opsætning.
- Når kørslen er afsluttet, analyseres dataene i henhold til afsnittet Dataanalyse af prøvevurdering.

Protokol: EGFR-mutationspåvisning (manuel)

- Når en prøve har gennemført prøvevurderingen, kan den testes for at påvise EGFR-mutationerne.
- Forbered prøverne som beskrevet i afsnittet Protokol: EGFR-mutationspåvisningsanalyse, frem til trin 11.
- Konfigurer PCR-kørslen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet som beskrevet i afsnittet Protokol: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q-opsætning.
- Når kørslen er afsluttet, analyseres dataene i henhold til afsnittet Dataanalyse af EGFR-mutationspåvisning.

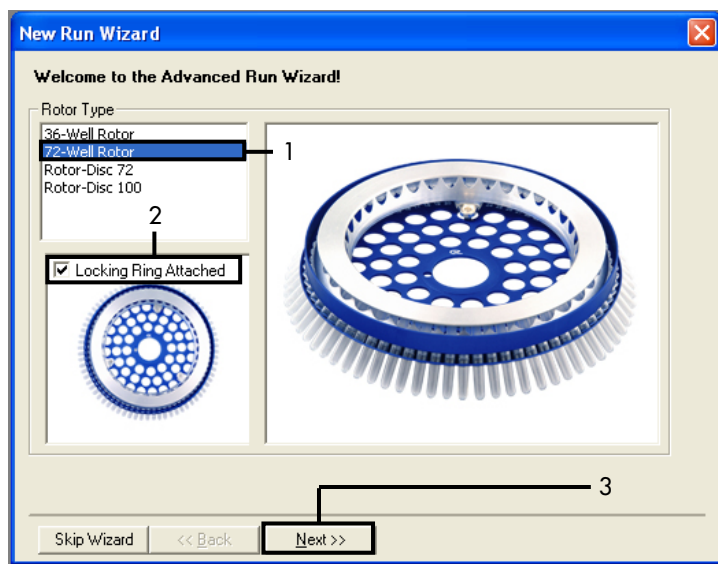
Protokol: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q-opsætning

Procedure

1. Åbn Rotor-Gene Q-seriesoftwaren version 2.3, og åbn den relevante temperaturprofil for *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (*.ret-fil).

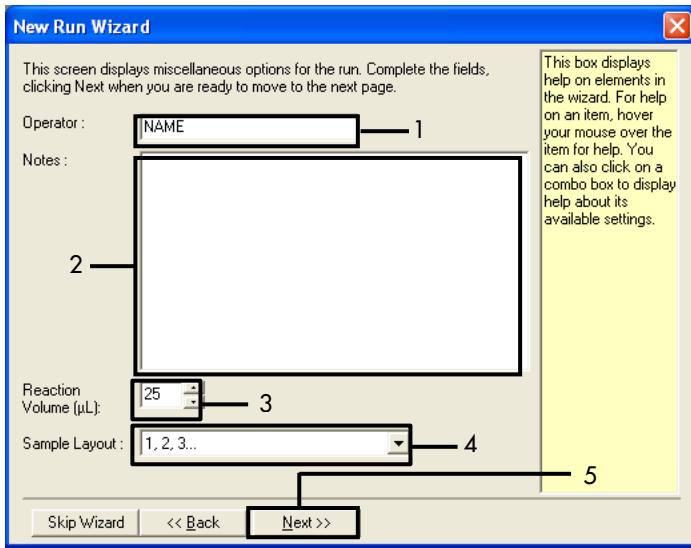
Se instruktioner i, hvordan man opretter temperaturprofilen og kontrollerer kørselsparametrene i afsnittet Protokol: Oprettelse af en temperaturprofil.

2. Sørg for, at låseringen er den rigtige, og markér afkrydsningsfeltet Locking Ring Attached (Låsering påsat). Klik på Next (Næste) (figur 33).



Figur 33. Dialogboksen "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel) og velkomstsærbilledet. 1 = "Rotor Type" (Rotortype), 2 = feltet "Locking Ring Attached" (Låsering påsat), 3 = "Next" (Næste).

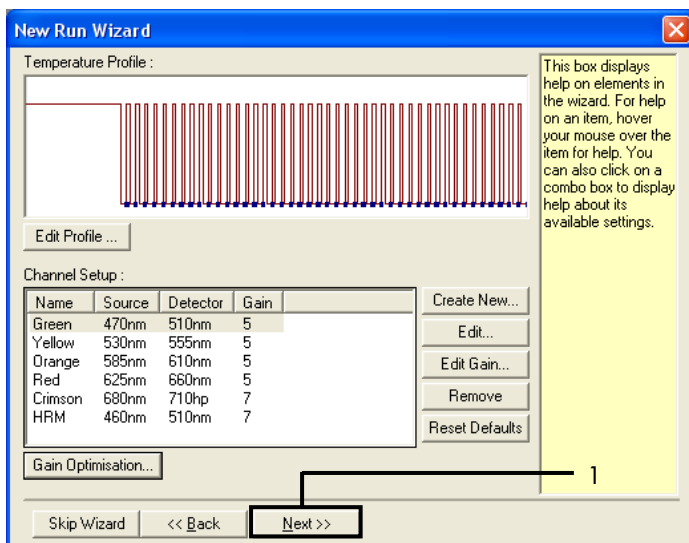
3. Skriv navnet på brugeren. Tilføj eventuelle bemærkninger, og kontrollér, at reaktionsvolumen er indstillet til 25, og at feltet Sample Layout (Prøvelayout) indeholder værdien 1, 2, 3.... Klik på Next (Næste) (figur 34).



Figur 34. Valgskærbilledet "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel). 1 = "Operator" (Bruger), 2 = feltet "Notes" (Bemærkninger), 3 = "Reaction Volume" (Reaktionsvolumen), 4 = feltet "Sample Layout" (Prøvelayout), 5 = "Next" (Næste).

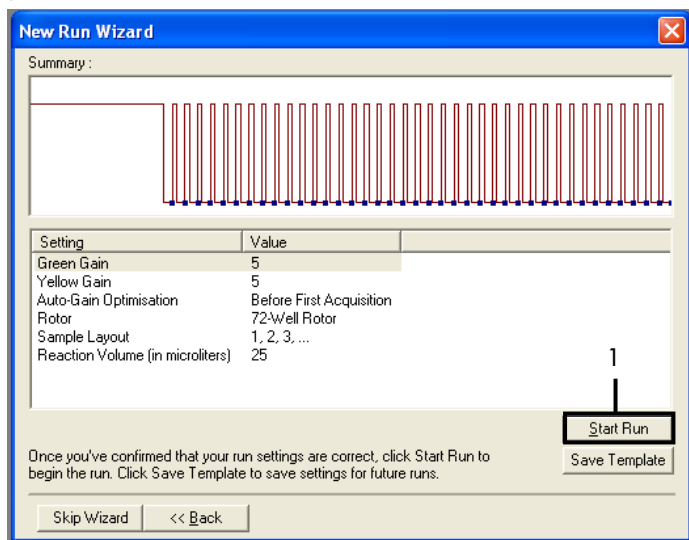
Bemærk: I det næste vindue kan man redigere temperaturprofilen. (Der er ikke behov for redigering, da temperaturprofilen allerede blev oprettet i henhold til instruktionerne i Protokol: Oprettelse af en temperaturprofil).

4. Klik på Next (Næste) (figur 35).



Figur 35. Dialogboksen "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel) og skærbilledet til redigering af temperaturen (1 = knappen "Next" (Næste)).

5. Gennemgå oversigten, og klik på Start Run (Start kørsel) for at gemme kørselsfilen og starte kørslen (figur 36).



Figur 36. Dialogboksen "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel) og oversigtsskærmen (1 = "Start Run" (Start kørsel)).

6. Udfør et af følgende trin i det nye vindue, der åbnes efter start af kørslen:

- Indtast prøvenavnene.
- Klik på Finish (Afslut), og indtast prøvenavnene senere. Dette gøres ved at vælge Sample (Prøve) under kørslen, eller når kørslen er afsluttet.

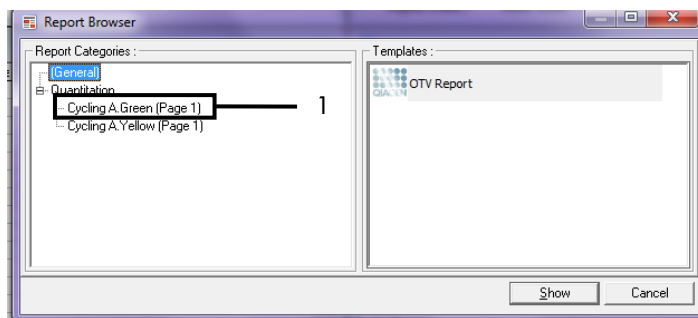
Vigtigt: Hvis du klikker på Finish and Lock Samples (Afslut og lås prøver), kan du ikke ændre prøvenavnene. Vær særlig påpasselig ved angivelse af prøvenavne for at sikre korrekte test og analyser af prøver.

Bemærk: Ved navngivning af prøver skal felterne for de tomme rør efterlades tomme i kolonnen "Name" (Navn).

7. Analysér dataene i henhold til afsnittene Dataanalyse af prøvevurdering eller Dataanalyse af EGFR-mutationspåvisning efter behov, når kørslen er afsluttet.

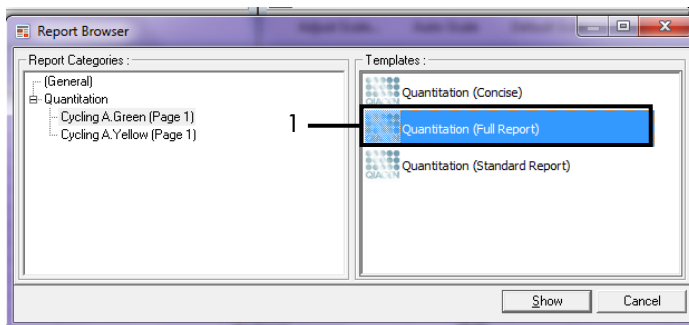
8. Hvis der kræves kvantiteringsrapporter, skal du klikke på ikonet Reports (Rapporter) på værktøjslinjen i Rotor-Gene Q-kørselsfilen.

9. I rapportbrowseren skal du klikke på Cycling A. Green (page 1)(Cycling A. Green (side 1)) under "Report Categories" (Rapportkategorier) (figur 37).



Figur 37. Rapportbrowser (1 = "Cycling A. Green [side 1]").

10. Vælg Quantitation (Full Report) (Kvantitering (fuld rapport)) under Templates (Skabeloner) (figur 38).



Figur 38. Kvantiteringsrapport (1).

11. Klik på Show (Vis) for at generere en ny rapport.
12. Klik på Save As (Gem som) for at gemme en elektronisk version.
13. Gentag for Cycling A Yellow (Page 1)(Cycling A Yellow (side 1)).

Fortolkning af resultater (manuel)

Når *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-kørslen (til DNA-prøvevurdering eller EGFR-mutationsanalysen) er færdig, skal dataene analyseres i overensstemmelse med følgende procedurer:

- Softwareindstillinger for analysen
- Analyse af DNA-prøvevurdering (manuel)
Bemærk: Se rørlayoutet i tabel 4.
- Analyse af EGFR-mutationspåvisning (manuel)
Bemærk: Se rørlayoutet i tabel 7.

Softwareanalyseindstillinger

1. Åbn den relevante kørselsfil (*.rex) ved hjælp af Rotor-Gene Q-seriesoftwarens version 2.3.
2. Hvis prøverne ikke allerede blev navngivet før udførelsen af kørslen, skal du klikke på Edit Samples (Rediger prøver).
3. Indsæt prøvenavnene i kolonnen "Name" (Navn).
Bemærk: Lad navnene på eventuelle tomme rør stå tomme.
4. Klik på Analysis (Analyse). Klik på Cycling A Yellow på analysesiden for at kontrollere Yellow (HEX)-kanalen.
5. Klik på Named On (Navngivet på).
Bemærk: Dette sikrer, at tomme rør ikke indgår i analysen.
6. Vælg Dynamic tube (Dynamisk rør).
7. Vælg Slope correct (Hældningskorrigerings).
8. Vælg Linear scale (Lineær skala).

-
9. Vælg Take Off Adj. (Justering af udgangspunkt), og angiv værdierne 15.01 i det øverste felt ("If take off point was calculated before cycle" (Hvis udgangspunktet blev beregnet før cyklus)) og 20.01 i det nederste felt ("then use the following cycle and take off point" (brug så følgende cyklus og udgangspunkt)).
 10. Indstil tærskelværdien til 0.02, og kontrollér Yellow (HEX)-kanalens C_T -værdier.
 11. Klik på Cycling A Green på analysesiden for at få vist Green (FAM)-kanalen.
 12. Vælg Named On (Navngivet på).
 13. Vælg Dynamic tube (Dynamisk rør).
 14. Vælg Slope correct (Hældningskorrigerung).
 15. Vælg Linear scale (Lineær skala).
 16. Vælg Take Off Adj. (Justering af udgangspunkt), og angiv værdierne 15.01 i det øverste felt ("If take off point was calculated before cycle" (Hvis udgangspunktet blev beregnet før cyklus)) og 20.01 i det nederste felt ("then use the following cycle and take off point" (brug så følgende cyklus og udgangspunkt)).
 17. Indstil tærskelværdien til 0.075, og kontrollér Green (FAM)-kanalens C_T -værdier.

Dataanalyse af prøvevurdering

Når DNA-prøvevurderingskørslen er færdig, skal du se afsnittet Softwareanalyseindstillinger og analysere dataene på følgende måde. (Se rørlayoutet i tabel 4, side 24).

Kørsel af kontrolanalyse

Negativ kontrol

For at sikre, at der ikke er nogen kontaminering i skabelonen, må NTC'en ikke generere en C_T -værdi under 40 i Green (FAM)-kanalen.

For at sikre at kørslen er opsat korrekt, skal NTC'en vise en forstærkning på mellem 29,85 og 35,84 i Yellow (HEX)-kanalen. De angivne værdier er inden for og inklusive disse værdier.

Positiv kontrol

EGFR PC skal give en C_T -værdi i Green (FAM)-kanalen på mellem 28,13 og 34,59. En værdi uden for dette område angiver, at der er et problem med analyseopsætningen. Kørslen mislykkedes.

Bemærk: Prøvedata må ikke anvendes, hvis den negative eller den positive kontrol mislykkedes.

Prøveanalyse

Hvis DNA-prøvevurderingskørselens kontroller er gyldige, kan analysen fortsættes. Kontrollens C_T -værdi for en prøve skal være mellem 23,70 og 31,10 i Green (FAM)-kanalen. Hvis prøve- C_T ligger uden for området, gives følgende vejledning.

- Prøvekontrolanalyse $C_T < 23,70$

Prøver med en kontrol- C_T på $< 23,70$ (høj DNA-koncentration) overbelaster mutationsanalyserne og skal fortyndes. For at påvise hver mutation på et lavt niveau skal de overkoncentrerede prøver fortyndes, så de ligger inden for et C_T -område på $23,70$ til $31,10$. Fortynding af prøve-DNA øger C_T (1:1-fortyndingen øger C_T -værdien med ca. 1,0). Fortynd prøverne med det vand, der medfølger i kittet (vand til fortynding [Dil.]).

- Prøvekontrolanalyse $C_T > 31,10$

Det anbefales at ekstrahere prøver med en kontrol- C_T på $> 31,10$ igen i Green (FAM)-kanalen. En utilstrækkelig DNA-startskabelon er til stede for at påvise alle EGFR-mutationer ved de fastsatte cutoff-værdier for analysen.

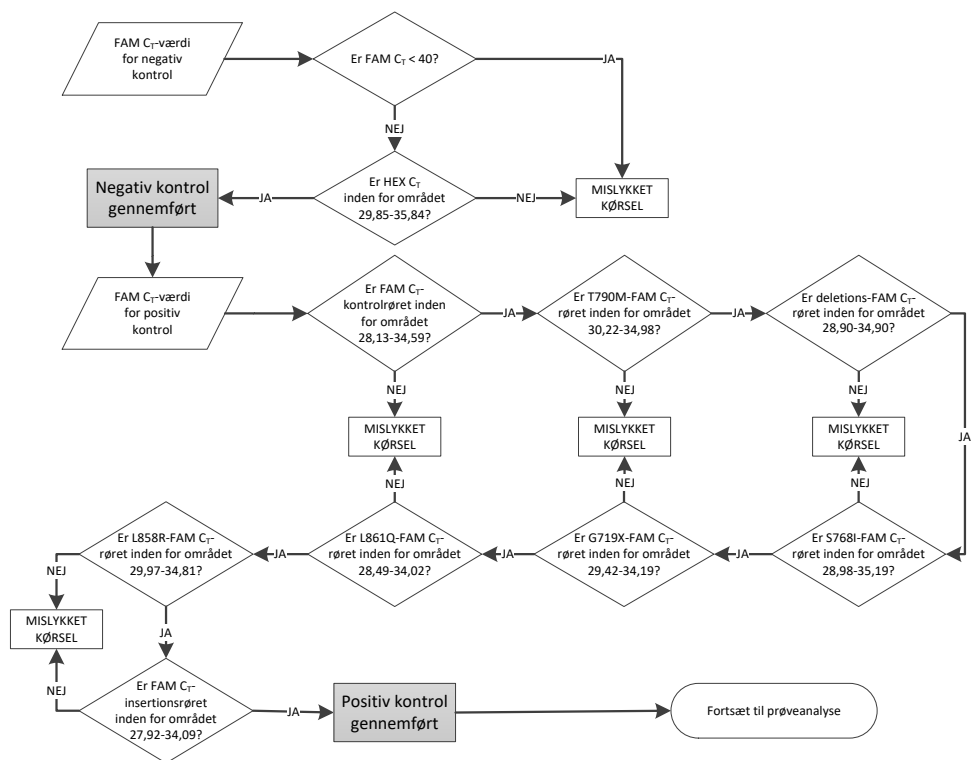
Dataanalyse af EGFR-mutationspåvisning

En prøve skal bestå DNA-prøvevurderingen, før den kan testes for at påvise EGFR-mutationer (se Dataanalyse af prøvevurdering).

Når EGFR-mutationspåvisningen er færdig, skal du se Softwareanalyseindstillinger og analysere dataene på følgende måde. (Se rørlayoutet i tabel 7).

Kørsel af kontrolanalyse

Se organisationsdiagrammet for kørselskontrolanalysen i figur 39.



Figur 39. Organisationsdiagram for kørselskontrolanalyse af EGFR-mutationspåvisning.

Negativ kontrol

For at sikre at der ikke er nogen kontaminering i skabelonen, må NTC'en for hver EGFR-mutationsanalyse ikke generere en C_T -værdi under 40 i Green (FAM)-kanalen.

For at sikre at kørslen er opsat korrekt, skal NTC'en vise en forstærkning på mellem 29,85 og 35,84 i Yellow (HEX)-kanalen. De angivne værdier er inden for og inklusive disse værdier.

Positiv kontrol

For hver EGFR-mutationsanalyse skal EGFR PC give en C_T -værdi i Green (FAM)-kanalen inden for det område, der fremgår af tabel 16. En værdi uden for dette område angiver, at der er et problem med analyseopsætningen. Kørslen mislykkedes.

Bemærk: Prøvedata må ikke anvendes, hvis den negative eller den positive kørselskontrol mislykkedes.

Tabel 16. Acceptable C_T -områder for reaktionspositive kontroller (EGFR-mutationspåvisningsanalyse)

Reaktionsblanding	Prøve	Kanal	C_T -område
Kontrol	PC	Grønt	28,13 til 34,59
T790M	PC	Grønt	30,22 til 34,98
Deletioner	PC	Grønt	28,90 til 34,90
L858R	PC	Grønt	29,97 til 34,81
L861Q	PC	Grønt	28,49 til 34,02
G719X	PC	Grønt	29,42 til 34,19
S768I	PC	Grønt	28,98 til 35,19
Indsætninger	PC	Grønt	27,92 til 34,09

Prøveanalyse – prøvekontrollens C_T -værdi i Green (FAM)-kanalen

Hvis de positive og negative kontroller for EGFR-mutationspåvisningen er gyldige, kan EGFR-mutationspåvisningen i prøverne fortsætte.

Kontrollens C_T -værdi for en prøve i Green (FAM)-kanalen skal være mellem 23,70 og 31,10. (Se rørlayoutet i tabel 7).

Hvis prøvekontrollens C_T ligger uden for området, gives følgende vejledning.

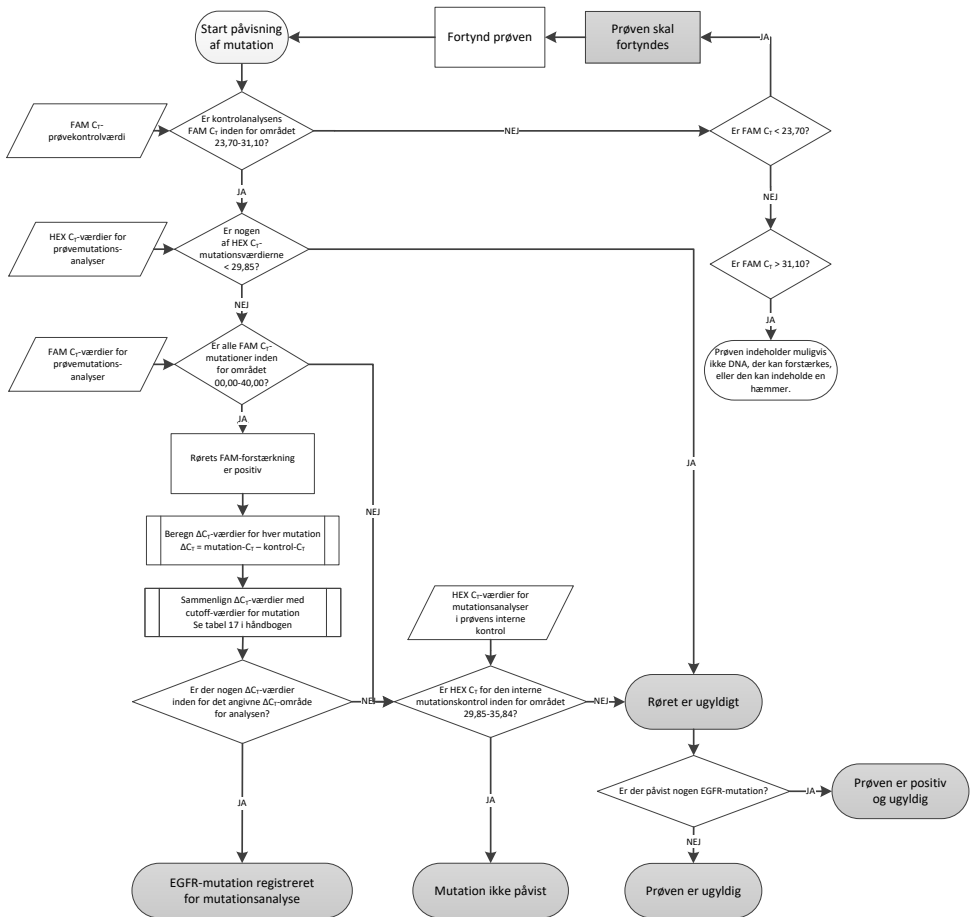
- Prøvekontrolanalyse $C_T < 23,70$

Prøver med en kontrol- C_T på $< 23,70$ (høj DNA-koncentration) overbelaster mutationsanalyserne og skal fortyndes. For at påvise hver mutation på et lavt niveau skal de overkoncentrerede prøver fortyndes, så de ligger inden for et C_T -område på 23,70 til 31,10. Fortynding af prøve-DNA øger C_T (1:1-fortyndingen øger C_T -værdien med ca. 1,0). Fortynd prøverne med det vand, der medfølger i kittet (vand til fortynding [Dil.]).

- Prøvekontrolanalyse $C_T > 31,10$

Det anbefales at ekstrahere prøver med en kontrol- C_T på $> 31,10$ igen i Green (FAM)-kanalen. En utilstrækkelig DNA-startskabelon er til stede for at påvise alle EGFR-mutationer ved de fastsatte cutoff-værdier for analysen.

Se prøveanalysens organisationsdiagram for EGFR-mutationspåvisning i figur 40.



Figur 40. Prøveanalysens organisationsdiagram for EGFR-mutationspåvisning.

Prøveanalyse – den interne prøvekontrols C_T -værdi i Yellow (HEX)-kanalen

Bemærk: Se prøveanalysens organisationsdiagram for EGFR-mutationspåvisning i figur 40.

Alle rør for hver prøve skal analyseres. Kontrollér, at hvert rør genererer et HEX-signal i området 29,85 til 35,84 fra den interne kontrol i Yellow (HEX)-kanalen. Der er 3 mulige resultater.

- Hvis den interne kontrols C_T ligger under det specificerede område ($< 29,85$) for en hvilken som helst mutationsanalyse, er resultatet negativt for forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen. Forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen for det pågældende rør er ugyldig.
- Hvis den interne kontrols C_T ligger inden for det specificerede område (29,85 til 35,84), er resultatet positivt for forstærkning i Yellow (HEX)-kanalen. Forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen for røret er gyldig.
- Hvis den interne kontrols C_T ligger over det specificerede område ($> 35,84$), er resultatet negativt for forstærkning i Yellow (HEX)-kanalen.

Hvis der er forstærkning i Green (FAM)-kanalen, og ΔC_T for den pågældende reaktion er lavere end eller lig med analysens cutoff-værdier for det pågældende rør, er forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen gyldig. Hvis der ikke er forstærkning i Green (FAM)-kanalen til røret eller en ΔC_T -værdi højere end analysens cutoff-værdi, er forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen ugyldig.

Den interne kontrols forstærkning i Yellow (HEX)-kanalen kan mislykkes på grund af PCR-hæmmere. Fortynding af prøven kan reducere effekten fra hæmmere. Bemærk, at denne handling også fortynder DNA-målet i prøven. Fortynd prøverne med det vand, der medfølger i kittet (vand til fortynding [Dil.]).

Prøveanalyse – prøvemutationsanalysens C_T -værdi i Green (FAM)-kanalen

Green (FAM)-kanalens værdier i alle syv EGFR-mutationsreaktionsblandinger skal kontrolleres i forhold til værdierne i tabel 17. De angivne værdier er inden for og inklusive de viste værdier. (Se rørlayoutet i tabel 7).

Tabel 17. Acceptable værdier for prøvens EGFR-mutationsreaktioner i Green (FAM)-kanalen (EGFR-mutationspåvisningsanalyse)

Analyse	C _T -område	Cutoff (ΔC_T)
T790M	0,00 til 40,00	$\leq 7,40$
Deletioner	0,00 til 40,00	$\leq 8,00$
L858R	0,00 til 40,00	$\leq 8,90$
L861Q	0,00 til 40,00	$\leq 8,90$
G719X	0,00 til 40,00	$\leq 8,90$
S768I	0,00 til 40,00	$\leq 8,90$
Indsætninger	0,00 til 40,00	$\leq 8,00$

- Hvis Green (FAM)-kanalens C_T for prøven ligger inden for det specificerede område, har den positiv FAM-forstærkning.
- Hvis Green (FAM)-kanalens C_T for prøven ligger over det specificerede område, eller hvis der ikke er nogen forstærkning, har den negativ FAM-forstærkning.

ΔC_T -værdien beregnes for alle EGFR-mutationsrør, der viser positiv FAM-forstærkning, idet det skal sikres, at mutation og kontrol for C_T-værdierne er fra den samme prøve. (Se rørlayoutet i tabel 7).

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

Sammenlign ΔC_T -værdien for prøven med cutoff-punktet for den pågældende analyse (tabel 17). Sørg for at anvende det korrekte cutoff-punkt.

Cutoff-punktet er det punkt, over hvilket et positivt signal for en analyse potentielt kunne skyldes et baggrundssignal i ARMS-primeren på vildtype-DNA. Hvis prøvens ΔC_T -værdi er højere end cutoff-punktet for en analyse, klassificeres prøven som negativ eller uden for det pågældende analysekits påvisningsgrænser.

Status for hver mutationsreaktion for hver prøve kan være én af følgende:

- Mutation påvist
- Mutation ikke påvist
- Ugyldig

Mutation påvist

Forstærkningen i Green (FAM)-kanalen er positiv, og ΔC_T -værdien er på eller under cutoff-værdien. Hvis der påvises flere mutationer for en prøve, kan de alle rapporteres.

Mutation ikke påvist

Forstærkningen i Green (FAM)-kanalen er positiv, og ΔC_T -værdien er over cutoff-værdien.

Forstærkningen i Green (FAM)-kanalen er negativ, og forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen (intern kontrol) er positiv.

Ugyldig

Forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen (intern kontrol) er ugyldig.

Forstærkningen i Green (FAM)-kanalen er negativ, og forstærkningen i Yellow (HEX)-kanalen (intern kontrol) er negativ.

Bemærk: En prøve kan have negativ forstærkning i ét rør i Yellow (HEX)-kanalen men positiv forstærkning i et andet rør i Green (FAM)-kanalen. I et sådant tilfælde kan resultatet "mutation detected" (Mutation påvist) i det andet rør anses for at være gyldigt, men den bestemte mutation, der blev identificeret, er muligvis ikke den eneste mulige mutation i den pågældende prøve.

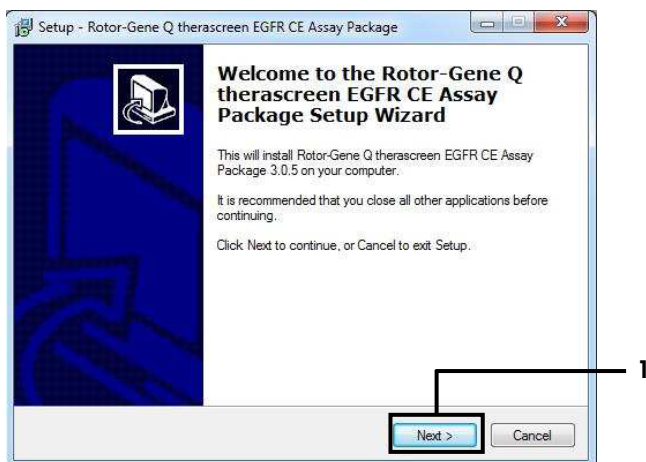
Bilag B: Installation af *therascreen* EGFR CE Assay Package

therascreen EGFR RGQ PCR Kit er udviklet til brug sammen med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med en 72-brøndsrotor. *therascreen* EGFR CE Assay Package fås separat på cd (katalognr. 9023537). Analysepakken indeholder "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" og "*therascreen* EGFR CE Locked Template".

Bemærk: The *therascreen* EGFR CE Assay Package er kun kompatibel med Rotor-Gene Q-softwareversion 2.3. Kontrollér, at den korrekte version af Rotor-Gene Q-softwaren er installeret, før installationen af *therascreen* EGFR CE Assay Package fortsættes. Hvis dit Rotor-Gene Q MDx-instrument blev leveret med en tidligere softwareversion, skal man opgradere ved at hente Rotor-Gene Q-softwareversion 2.3 fra Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-produktsiden i afsnittet "Product Resources" (Produktressourcer) under "Operating Software" (Operativsystem) på www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

Procedure

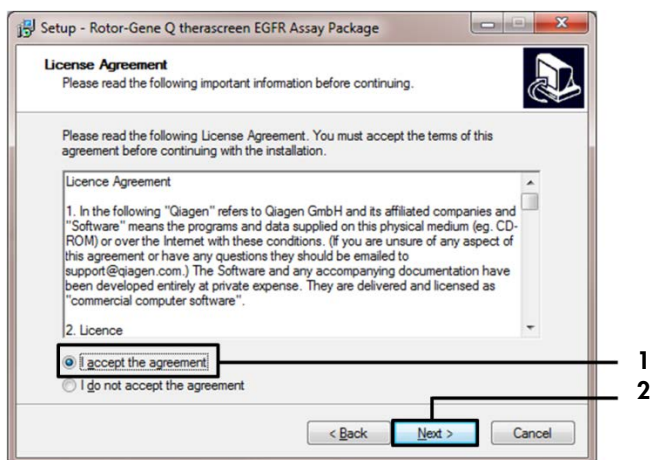
1. Bestil *therascreen* EGFR CE Assay Package CD (katalognr. 9023537).
2. Sæt cd'en i cd-drevet på den computer, som er tilsluttet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
3. Hvis cd'en indlæses automatisk, skal du dobbeltklikke på `therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe` for at starte installationen.
Ellers skal man finde og starte denne eksekverbare fil ved hjælp af filbrowseren på den tilsluttede computer.
therascreen EGFR CE Assay Package-installationsguiden åbnes.
4. Klik på Next (Næste) for at fortsætte (figur 41).



Figur 41. Dialogboksen "Setup Wizard" (Installationsguiden) (1 = "Next" (Næste)).

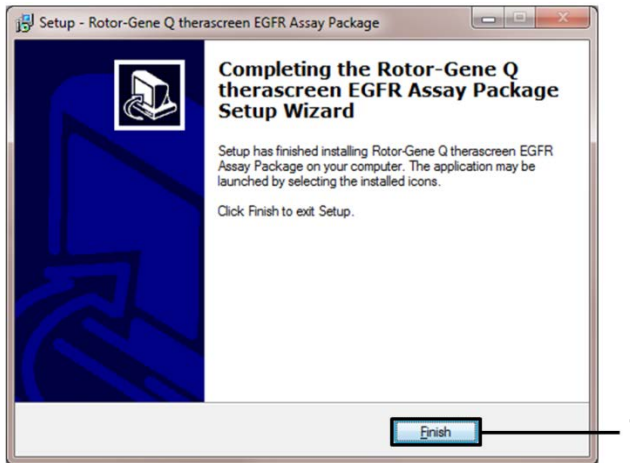
5. Læs licensaftalen i dialogboksen, og markér I accept the agreement (Jeg accepterer aftalen). Klik på Next (Næste) for at fortsætte (figur 42).

Installationen starter automatisk.



Figur 42. Dialogboksen "License Agreement" (Licensaftale). 1 = "I accept the agreement" (Jeg accepterer aftalen), 2 = "Next" (Næste).

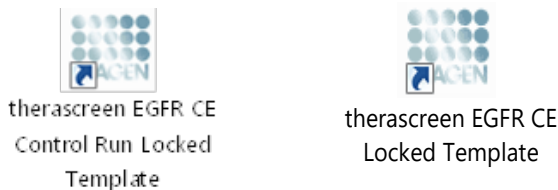
6. Når installationen er udført, skal du klikke på Finish (Afslut) i den sidste dialogboks, Setup Wizard (Installationsguide) (figur 43).



Figur 43. Afslutning af installationsguiden (1 = "Finish" (Udfør)).

7. Genstart computeren.

Der oprettes automatisk genveje til både "*thetascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" (Låst skabelon til prøvekørsel af *thetascreen* EGFR CE) og "*thetascreen* EGFR CE Locked Template" (Låst skabelon til *thetascreen* EGFR CE), som vises på skrivebordet (figur 44).



Figur 44. Ikonerne "EGFR CE Control Run Locked Template" (Låst skabelon til prøvekørsel af *thetascreen* EGFR CE) og "EGFR CE Locked Template" (Låst skabelon til *thetascreen* EGFR CE).

Kontaktoplysninger

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

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.nr.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaktioner: Kontrolanalyse, 7 mutationsanalyser, positiv kontrol, <i>Taq</i> DNA-polymerase, vand til NTC og vand til fortynding af prøven	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	Softwareprotokolpakke til brug sammen med <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit og QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargøringer: QIAamp MinElute®-kolonner, proteinase K, buffere og Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 klargøringer: 50 QIAamp MinElute-kolonner, proteinase K, buffere og Collection Tubes (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtime PCR-cykusanordning og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, lilla) samt HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti mod håndværksmæssige og materielle defekter, installation og uddannelse	9002033

Produkt	Indhold	Kat.nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler og højopløselig smelteanalysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør: inkluderer 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse ikke inkluderet	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller -brugermanual. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGENS tekniske service eller den lokale distributør.

Revisionshistorik for dokumentet

Dato	Ændringer
R4, marts 2018	Ændring af opbevaringstider for opsætning for at tydeliggøre optøningstiden og den samlede tid i "Opbevaringsforhold" samt tabel 2 og 5. Opdatering til figur 40. Prøveanalysens organisationsdiagram for EGFR-mutationspåvisning. Tilføjelse af bestillingsoplysninger til QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (katalognr. 60404)
R5, januar 2019	Tilføjelse af autoriseret repræsentant (forside). Afsnittet "Symboler" er opdateret.
R6, oktober 2019	Ændring af producent (forside) Ændring af instrumentets navn fra Rotor-Gene Q MDx til Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM i henhold til navnet på instrumentets etiket Tilføjelse af betingelser for opbevaring af reagenser i afsnittet Opbevaring og håndtering af reagenser Opdatering af tabel 1 med bemærkning om fjernelse af COSM6 254 fra COSMIC-databasen Opdatering af afsnittet Begrænsninger med oplysninger om analysen af exon 19 deletioner og L858R-analysen Fjernelse af EC + REP-symbolet på forsiden og i afsnittet Symboler

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

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

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

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

Varemærker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], MinElute[®], RotorGene[®], Scorpions[®], *therascreen*[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); GIOTRIE[®] (Boehringer Ingelheim), IRESSA[®] (AstraZeneca Group). Registrerede navne, varemærker osv., der bruges i dette dokument, er beskyttet af den relevante lovgivning, også når de ikke er specifikt markeret som sådan.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit er et CE-mærket diagnostisk kit i overensstemmelse med Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik. Ikke tilgængeligt i alle lande.

1119191 10/2019 HB-1909-006 © 2019 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

