



Juni 2022

Brugsanvisning til *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit



Version 1

IVD

Til in vitro-diagnostisk brug

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

CE

REF

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R6 **MAT**

1127512DA

Indhold

Tilsigtet anvendelse	5
Oversigt og forklaring	6
Funktionsprincip	7
Kitformat	7
Analyser.....	8
Kontroller	9
Medfølgende materialer	10
Kit-indhold	10
Nødvendige materialer, som ikke medfølger.....	11
Advarsler og forholdsregler.....	12
Sikkerhedsinformation	12
Generelle forholdsregler.....	12
Opbevaring og håndtering af reagenser	14
Prøveopbevaring og -håndtering.....	16
Procedure	17
Protokol: Påvisning af EGFR-mutationer.....	18
Protokol: Rotor-Gene Q EGFR-opsætning	22
Dataanalyse af mutationsvurdering	29
Fejlsøgningsvejledning	36
Kvalitetskontrol	38
Begrænsninger	38
Ydelseskarakteristika	40

Analysesensitivitet – tomgrænse (Limit of Blank, LOB)	40
Påvisningsgrænse (Limit of Detection, LOD).....	40
Analysesensitivitet – ΔC_T -cutoffs og ΔC_T -cutoff-område.....	42
Repeterbarhed og reproducerbarhed.....	42
Effekten af DNA-input på C_T -værdier	43
Interfererende stoffer	43
Klinisk ydeevne	47
Litteraturhenvisninger.....	48
Kontaktoplysninger	49
Symboler	50
Bilag A: Oplysninger om mutationer	52
Bestillingsinformation.....	53
Revisionshistorik for dokumentet	55

Tilsigtet anvendelse

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er en diagnostisk in vitro-test til påvisning af exon 19-deletioner samt exon 20- og exon 21-substitutioner (henholdsvis T790M og L858R) i epidermal vækstfaktorreceptorgen (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) og giver en kvalitativ vurdering af mutationsstatusen. Resultaterne er beregnet til at hjælpe klinikerne med at identificere patienter med NSCLC, som kan have gavn af behandling med IRESSA® (gefitinib), når en vævsprøve ikke kan evalueres.

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit skal anvendes af uddannet laboratoriepersonale i et professionelt laboratoriemiljø med DNA-prøver, der er ekstraheret fra plasma fra patientblod med ikke-småcellet lungecancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

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

Oversigt og forklaring

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit er et brugsklart kit til påvisning af mutationer i det cancerrelaterede EGFR-gen ved hjælp af polymerasekædereaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumenter.

Ved hjælp af Scorpions®- og ARMS-teknologier muliggør *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit påvisning af nedenstående EGFR-genmutationer mod en baggrund af vildtype-genomisk DNA.

- Deletioner i exon 19
- T790M
- L858R

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

Funktionsprincip

I *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit bruges der to teknologier – ARMS og Scorpions – til at påvise mutationer i en real-time PCR-analyse.

ARMS

Allele- eller mutationsspecifik amplifikation opnås ved hjælp af ARMS (Amplification Refractory Mutation System). 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 amplifikationen med fuld effektivitet. Når 3'-basen ikke er matchet, forekommer der kun baggrundsamplifikationen på et lavt niveau.

Scorpions

Påvisning af amplifikation 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 sig til ampikonet under PCR, bliver fluoroforen og quencheren adskilt. Dette medfører en forøget fluorescens i reaktionsrøret.

Kitformat

Der leveres fire analyser med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit:

- En kontrolanalyse (Ctrl)
- Tre mutationsanalyser

Alle reaktionsblandinger indeholder reagenser til påvisning af mål, der er mærket med FAM™, og en intern kontrolanalyse, der er mærket med HEX™. Den interne kontrolanalyse kan påvise tilstedeværelsen af hæmmere, der kan medføre falsk-negative resultater. FAM-amplifikation kan udkonkurrere den interne kontrolamplifikation, 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

Kontrolanalyse

Kontrolanalysen, der er mærket med FAM, anvendes til vurdering af det samlede DNA i prøven. Denne analyse forstærker exon 2-regionen i EGFR-genet. Primeren og 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

Alle prøvekørsler skal indeholde følgende kontroller:

Positiv kontrol

Hver kørsel skal indeholde en positiv kontrol i rør 1-4. *therascreen* EGFR Plasma 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 godkendelseskriterier.

Negativ kontrol

Hver kørsel skal indeholde en negativ kontrol (kontrol uden skabelon (No-Template Control, NTC)) i rør 9-12. NTC'en består af nukleasefrit vand (H₂O), der skal bruges som "skabelon" i kontrol uden skabelon. Kontrol uden skabelon bruges til at bedømme eventuel potentiel kontamination under kørselsopsætningen og til at vurdere den interne kontrolreaktions ydelse.

Bedømmelse af intern kontrolreaktion

Hver reaktionsblanding indeholder en intern kontrol ud over målreaktionen. En fejl angiver enten, at der er hæmmere til stede, som kan medføre falsk-negative resultater, eller at der er opstået en operatørsætningsfejl for det pågældende rør.

Hvis den mislykkede interne kontrol skyldes PCR-hæmning, kan fortynding af prøven reducere hæmmernes effekt, men man skal være opmærksom på, at dette også vil fortynde DNA-målet. FAM-amplifikation kan udkonkurrere den interne kontrolamplifikation, så den IC CT (HEX)-værdi, der genereres, kan ligge uden for det specificerede område. FAM-resultaterne er alligevel gyldige for disse prøver.

Medfølgende materialer

Kit-indhold

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit			(24)
Katalognr.			870311
Antal reaktioner			24
Rød	Control Reaction Mix (Kontrolreaktionsblanding)	Ctrl	2 x 600 µl
Lilla	T790M Reaction Mix (T790M-reaktionsblanding)	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (deletionsreaktionsblanding)	Del	600 µl
Lyserød	L858R Reaction Mix (T790M-reaktionsblanding)	L858R	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (Positiv kontrol for EGFR)	PC	300 µl
Mintgrøn	<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> -DNA-polymerase)	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Hvid	Nukleasefrit vand til ikke-skabelon-kontrol	NTC	1 x 1,9 ml
Hvid	Nukleasefrit vand til fortynding	Dil	1 x 1,9 ml
Brugsanvisning (håndbog) til <i>therascreen</i> EGFR Plasma 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.

- DNA-ekstraheringskit (se "Procedure", side 17)
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til klargøring af prøve
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til forberedelse af PCR-masterblanding
- Dedikerede pipetter* (justerbare) til dosering af skabelon-DNA
- DNase-, RNase- og DNA-fri pipettespidser med filter (for at undgå krydskontaminering anbefaler vi pipettespidser med aerosolbarriere)
- Vandbad eller lignende, som kan indeholde centrifugeringsrør på 50 ml ved 60 °C.
- Varmeblok eller lignende, som kan inkuberes ved 56 °C‡
- Knust is
- Bordcentrifuge* med rotor til 2 ml reaktionsrør
- Vortex
- 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 2.3.5 eller nyere
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, til brug med 72-Well Rotor (kat.-nr. 981103 eller 981106)
- DNase-, RNase- og DNA-fri mikrocentrifugeringsrør til klargøring af masterblandinger
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (isætningsblok 72 x 0,1 ml rør), aluminiumsblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette (QIAGEN katalognr. 9018901)

* Kontrollér, at instrumenterne 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 "mmåånn", hvor "mm" står for produktionsmåneden i tal, "åå" står for de sidste to tal i produktionsåret, og "nnn" står for den endtydige instrumentidentifikator.

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

Til professionelt brug

Sikkerhedsinformation

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

Generelle forholdsregler

Følgende anvisninger skal altid overholdes af brugeren:

- Brug DNase-, RNase- og DNA-fri pipettespidser med filtre, og kontrollér, at pipetterne er kalibreret i henhold til producentens instruktioner.
- Positive materialer (prøver og positive kontroller) skal opbevares og ekstraheres separat fra alle andre reagenser og tilsættes reaktionsblandingen på et separat sted.
- Alle komponenter skal omhyggeligt optøes til stuetemperatur (15–25 °C), inden analysen startes.
- Efter optøning skal komponenterne blandes (ved at vende hvert rør 10 gange) og centrifugeres kortvarigt.

Bemærk: Udvis ekstrem forsigtighed for at forhindre kontamination af PCR'er med syntetisk kontrolmateriale. Vi anbefaler at bruge separate, dedikerede pipetter til forberedelse af reaktionsblandinger og tilføjelse af DNA-skabelon. Klargøring 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 post-PCR-produkter.

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

Bemærk: Alle reagenser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er formuleret specifikt til brug sammen med de angivne test. Alle reagenser, der leveres med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, er udelukkende beregnet til brug sammen med de øvrige reagenser i det samme *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Hvis der skal opnås optimal ydelse, må reagenserne i kittet ikke udskiftes.

Bemærk: Brug kun den *Taq*-DNA-polymerase (*Taq*), der findes i kittet. 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.

Bemærk: Reagenserne til *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er fortyndet optimalt. Vi anbefaler ikke at fortynde reagenserne yderligere, da det kan resultere i tab af ydelse. Vi anbefaler ikke, at der bruges reaktionsvolumener på mindre end 25 µl, da det øger risikoen for falsk-negative resultater.

Opbevaring og håndtering af reagenser

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

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit skal straks efter modtagelse opbevares ved -30 til -15 °C i en fryser med konstant temperatur og beskyttes mod lys. Når det opbevares under de specifikke opbevaringsbetingelser, er *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit stabilt, indtil den anførte udløbsdato.

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 optøning og indfrysning. Et reagens må højst indfryses og optøs otte gange.

Reagenserne skal optøs ved stuetemperatur 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 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 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: Scorpions (som det er tilfældet med alle fluorescensmærkede molekyler) i reaktionsblandings reagenser er lysfølsomme. Beskyt kontrol- og reaktionsblandingsreagenser mod lys for at undgå fotoblekning.

Reagenser i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit fortyndes optimalt, og der kræves ikke yderligere oprensning eller behandling før brug til analyse, som anvist i brugsanvisningen til *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit (håndbog).

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

Prøveopbevaring og -håndtering

Bemærk: Alle prøver skal behandles som potentielt infektiøst materiale.

Prøvemateriale skal være humant genomisk DNA, der er ekstraheret fra plasma. Prøverne skal transporteres i henhold til standardmetoder inden for patologien for at sikre prøvernes kvalitet.

Procedure

DNA-ekstraktion

Kittets ydelseskaraktistika er genereret ved hjælp af DNA, som er ekstraheret med QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (katalognr. 55114). Ved anvendelse af QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit skal DNA-ekstraheringen udføres i henhold til instruktionerne i håndbogen med følgende bemærkninger:

- Startvolumen af plasmaet er 2 ml.
- Før DNA-ekstrahering skal der centrifugeres 2 ml plasma ved 3000 o/min. i 2 minutter, og supernatanten skal overføres til et rent rør.
- Proteinase K-volumenen skal være 250 µl.
- Proteinase K-fordøjelse skal udføres i 1 time ved 60 °C.
- Det oprensede genomiske DNA skal elueres i 55 µl Buffer AVE (findes i QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit).
- Opbevar det oprensede genomiske DNA ved -30 til -15 °C.

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

Protokol: Påvisning af EGFR-mutationer

Vigtige anvisninger før start

- For at opnå korrekte resultater skal du sikre, at den anviste blandingsprocedure udføres på hvert trin af analyseopsætningen.
- Der kan vurderes op til 16 prøver på én kørsel.
- Før proceduren påbegyndes, bør "Generelle forholdsregler" på side 12 gennemlæses.
- Sørg for at være fortrolig med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, før protokollen påbegyndes. Se brugsvejledningen til instrumentet.
- *Taq*-DNA-polymerasen (*Taq*) eller blandinger, der indeholder *Taq*-DNA-polymerase, 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.
- For hver DNA-prøve skal kontrol- og mutationsanalyserne analyseres i samme PCR-kørsel for at undgå variationer mellem kørslerne.
- For effektiv brug af reagenserne i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit skal DNA-prøverne så vidt muligt samles for at oprette fulde kørsler. Hvis prøverne testes individuelt eller i mindre antal, opbruges flere reagenser, og det samlede antal prøver, der kan testes med et enkelt *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, reduceres.

Ting, der skal gøres før start

- 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.
- Kontrollér, at *Taq* har stuetemperatur (15-25 °C) inden hver brug. Centrifuger røret kortvarigt for at samle enzymet i bunden af røret.
- Bland alle prøver ved at vende dem 10 gange, og centrifuger kort for at indsamle indholdet i bunden af røret.

Procedure

1. Optø alle rør med reaktionsblandingen, nukleasefrit vand til ikke-skabelon-kontrol (No Template Control, NTC) og positiv kontrol for EGFR (Positive Control, PC) helt ved stuetemperatur (15-25 °C) i mindst 1 time (tabel 1). 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.

Tabel 1. Tider for optøning og PCR-opsætning samt opbevaringstemperaturer

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

Bemærk: PCR-opsætning skal udføres ved stuetemperatur. Begrebet "Opbevaring" henviser til tiden mellem fuldførelsen af PCR-opsætningen og starten af PCR-kørslen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Bemærk: Bring *Taq*-DNA-polymerase (*Taq*-røret) til stuetemperatur (15-25 °C) ved samme tid som de andre reagenser (se "Opbevaring og håndtering af reagenser", side 14). Centrifuger røret kortvarigt for at samle enzymet i bunden af røret.

2. Udfør følgende trin:

- 2a. Mærk fire mikrocentrifugeringsrør (medfølger ikke) i overensstemmelse med hver tilsvarende reaktionsblanding, som er vist i tabel 2.
- 2b. Forbered tilstrækkelige masterblandinger (kontrol- eller mutationsreaktionsblanding [rør med CTRL, T790M, deletioner, L858R] samt *Taq*-DNA-polymerase [*Taq*]) til DNA-prøverne, én positiv kontrol-reaktion for EGFR (rør med PC) og nukleasefrit vand til ikke-skabelon-kontrolreaktion (rør med NTC) i henhold til de volumener, der er angivet i tabel 2.

Bemærk: 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.

Table 2. Forberedelse af masterblandinger*

Analyse	Reaktionsblandingsrør	Volumen af reaktionsblanding	Volumen af Taq DNA-polymerase (rør med Taq)
Kontrol	CTRL	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)
T790M	T790M	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)
Deletioner	Del	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)
L858R	L858R	19,50 µl x (n + 1)	0,50 µl x (n + 1)

* Når masterblandingen forberedes, skal der forberedes nok til én ekstra prøve for at sikre tilstrækkelig ældning til PCR-opsætningen.

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

- Placer det passende antal PCR 4-båndrør (hvert bånd har 4 rør) i isætningsblokken i overensstemmelse med visningen i tabel 3. Sæt ikke hætte på rørene.

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

- Sæt hætte på røret til masterblandingen, og vend det 10 gange for at blande masterblandingen efterfulgt af en kort centrifugering for at sikre, at blandingen samles i bunden af røret. Tilsæt straks 20 µl masterblanding til hvert PCR-båndrør.
- Tilsæt straks 5 µl nukleasefrit vand (H₂O) til ikke-skabelon-kontrol-PCR-båndrørene (PCR-rør 9-12), og sæt hætte på rørene.
- Tilsæt 5 µl af hver prøve til prøverørene (PCR-rør 5-8, 13-16 og 17-72), og sæt hætte på rørene.
- Tilsæt 5 µl positiv kontrol (Positive Control, PC) for EGFR til rørene med positiv kontrol (PCR-rør 1-4). Hver DNA-prøve skal testes med kontrolanalysen og alle mutationsanalyser. Layoutet for dette er vist i tabel 3.

Tabel 3. Layout af kontrol- og mutationsanalyser

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

8. Brug en sprittusch til at mærke lågene på de første rør i den laveste numeriske position i hvert PCR 4-båndrør (f.eks. positionerne 1, 5, 9 osv.) for at angive, i hvilken retning rørene skal sættes i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentets 72-brønds rotor.
9. Vend rørene med hætter på 4 gange for at blande prøven og reaktionsblandingen.
10. Placer alle PCR 4-båndrør på de korrekte positioner i 72-brønds rotor, og kontrollér visuelt, at samtlige rør indeholder den samme volumen.
Bemærk: Sørg for, at båndene på rørene ikke vendes om, når de overføres til rotoren.
11. Hvis rotoren ikke er fuld, skal du fylde de tilbageværende pladser med tomme rør med hætter på.
12. Placer straks rotoren i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Kontrollér, at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet) er placeret oven på rotoren, for at sikre rørene under kørslen.
13. Der henvises til opsætningen af Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (se "Protokol: Rotor-Gene Q EGFR-opsætning", side 22) for at oprette temperaturprofilen, og start kørslen.

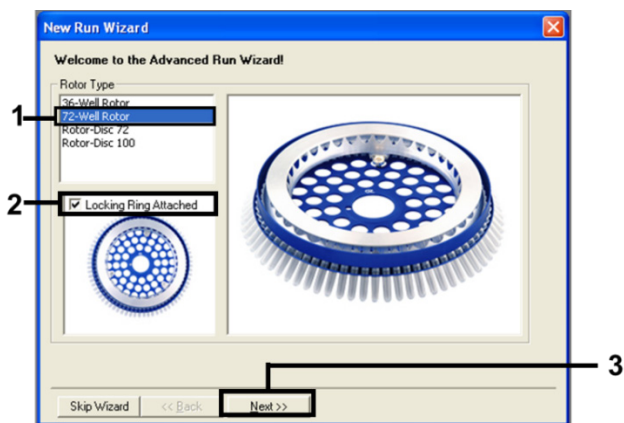
Protokol: Rotor-Gene Q EGFR-opsætning

Cyklusparametrene er vist i tabel 4.

Tabel 4. Cyklusparametre

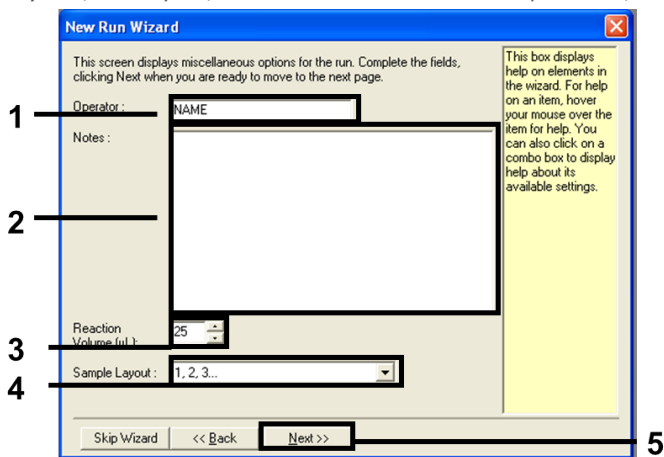
Cykusser	Temperatur	Tid	Datahentning
1	95 °C	15 minutter	Ingen
40	95 °C	30 sekunder	Ingen
	60 °C	60 sekunder	Green og Yellow

1. Dobbeltklik på ikonet for Rotor-Gene Q-seriesoftware 2.3 på skrivebordet på den bærbare computer, der er tilsluttet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Vælg fanen "Advanced" (Avanceret) i dialogboksen "New Run" (Ny kørsel), der åbnes.
2. Vælg Empty Run (Tom kørsel), og klik på New (Ny).
Dialogboksen "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel) vises.
3. Vælg 72-Well Rotor (72-brønds rotor) som rotortype. Sørg for, at låseringen er påsat, og markér afkrydsningsfeltet Locking Ring Attached (Låsering påsat). Klik på Next (Næste) (figur 1).



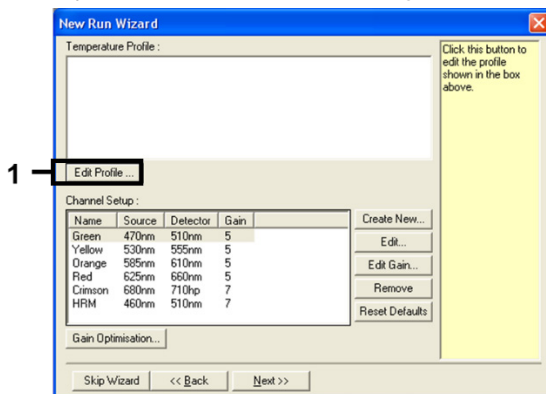
Figur 1. Dialogboksen "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel).

4. Skriv navnet på brugeren i feltet Operator (Bruger). Tilføj eventuelle bemærkninger, og indstil værdien i feltet Reaction Volume (Reaktionsvolumen) til 25. Sørg for, at værdierne i feltet Sample Layout (Prøvelayout) er indstillet til 1, 2, 3 osv. Klik på Next (Næste) (figur 2).



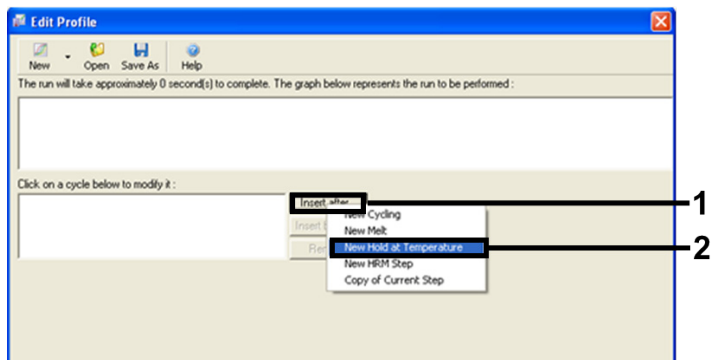
Figur 2. Angiv navnet på brugeren og reaktionsvolumener.

5. Klik på Edit Profile (Rediger profil) i dialogboksen "New Run Wizard" (Guiden Ny kørsel) (figur 3), og angiv kørselsparametrene i henhold til de følgende trin.



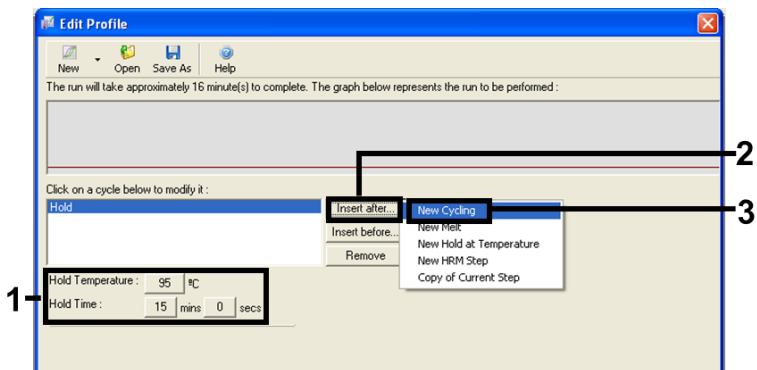
Figur 3. Redigering af profilen.

6. Klik på Insert after (Indsæt efter), og vælg New Hold at Temperature (Nyt hold ved temperatur) (figur 4).



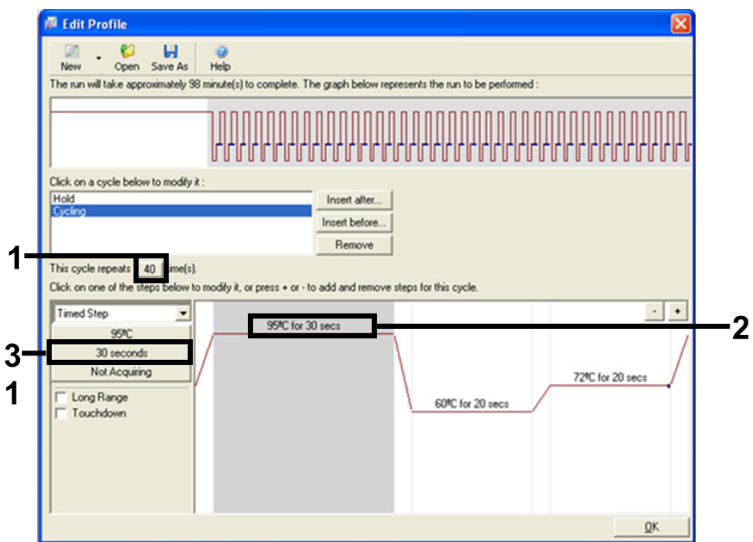
Figur 4. Indsættelse af første inkuberingsstrin.

7. Indstil værdien i feltet Hold Temperature (Holdtemperatur) til 95 °C og værdien i Hold Time (Holdetid) til 15 mins 0 secs (15 min. og 0 sek.). Klik på Insert After (Indsæt efter), og vælg New Cycling (Ny cyklus) (figur 5).



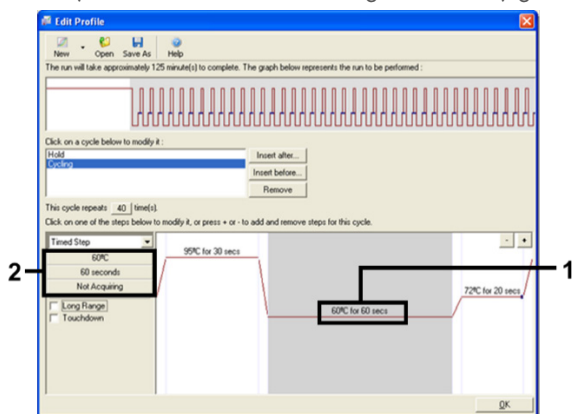
Figur 5. Første inkuberingsstrin ved 95 °C.

8. Indstil antallet af cyklusser til 40. Vælg det første trin, og indstil til 95 °C i 30 sekunder (figur 6).



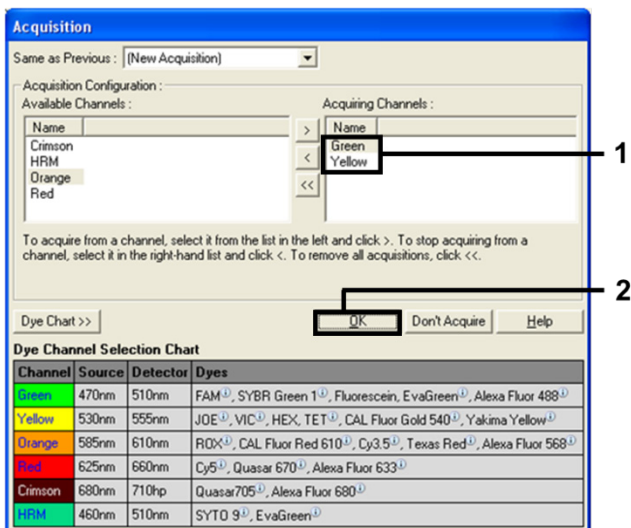
Figur 6. Cyklustrin ved 95 °C.

9. Markér det andet trin, og indstil til "60°C for 60 secs" (60 °C i 60 sekunder). Klik på Not Acquiring (Henter ikke) for at aktivere datahentning i dette trin (figur 7).



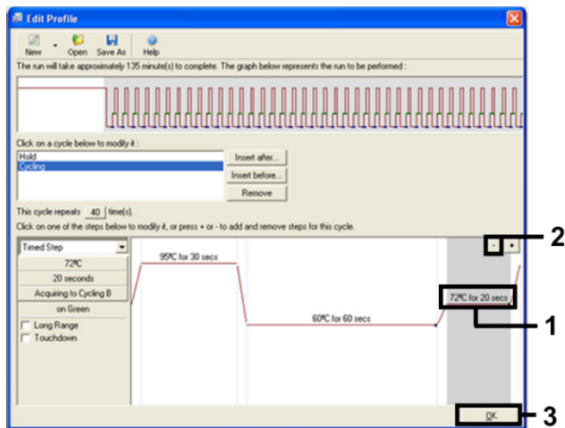
Figur 7. Cyklustrin ved 60 °C.

10. Vælg Green og Yellow på listen Available Channels (Tilgængelige kanaler), og klik derefter på > for at overføre dem til listen Acquiring Channels (Hentningskanaler). Klik på OK (figur 8).



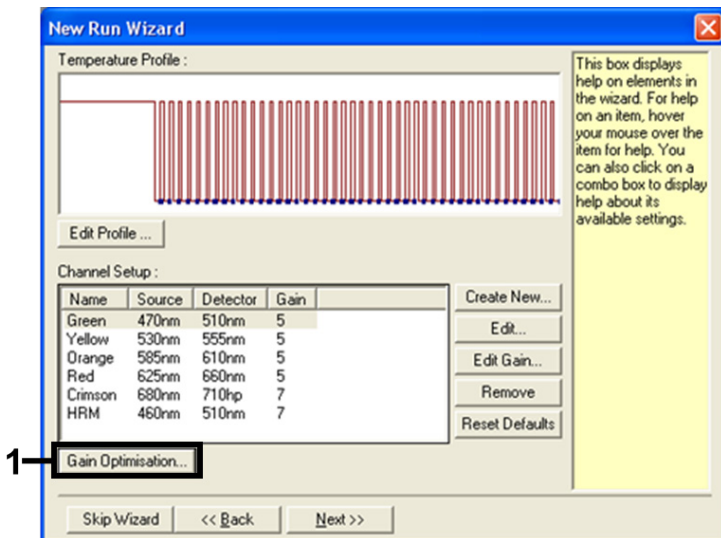
Figur 8. Hentning ved cyklustrin på 60 °C.

11. Markér det tredje trin, og klik på knappen - for at slette det. Klik på OK (figur 9).



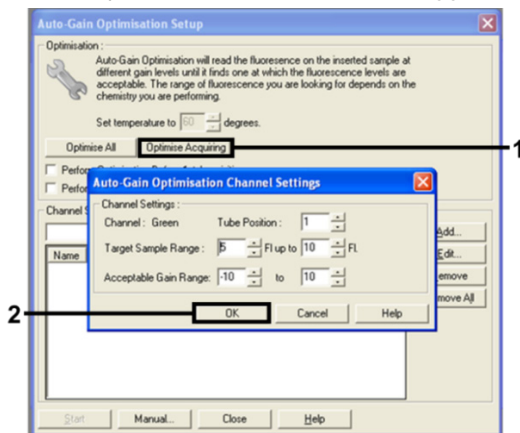
Figur 9. Fjernelse af udvidelsestrin.

12. Klik på Gain Optimisation (Optimering af forstærkning) i den næste dialogboks (figur 10).



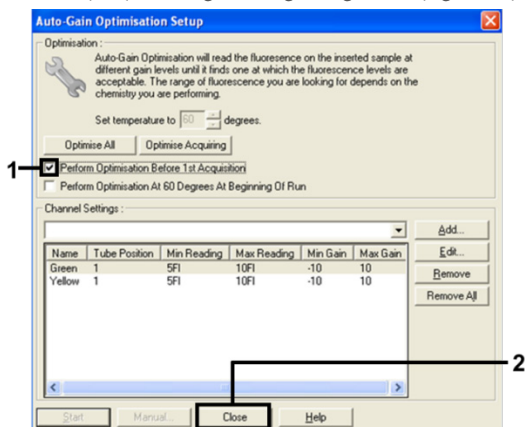
Figur 10. Optimering af forstærkning.

13. Klik på Optimise Acquiring (Optimer hentning). Kanalindstillingerne vises for hver enkelt kanal. Klik på OK for at acceptere standardværdierne for begge kanaler (figur 11).



Figur 11. Optimering af automatisk forstærkning for Green-kanalen.

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 12).



Figur 12. Valg af grønne og gule kanaler.

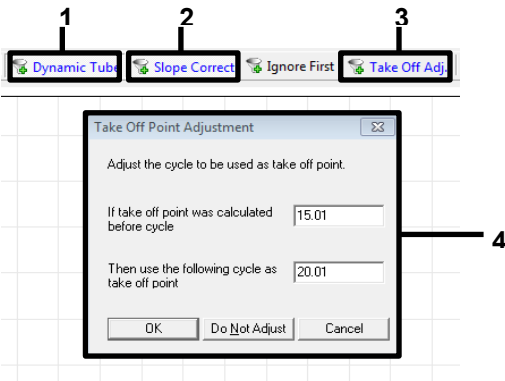
15. Klik på Next (Næste) for at gemme skabelonen på et passende sted ved at vælge "Save Template" (Gem skabelon).

Dataanalyse af mutationsvurdering

Analysér dataene ved hjælp af følgende procedure, når kørslen er afsluttet.

Konfiguration af softwareanalysen

1. Åbn den relevante fil med Rotor-Gene Q-seriesoftwaren (version 2.3.5 eller senere).
2. Hvis prøverne ikke allerede er navngivet før udførelsen af kørslen, skal du klikke på Edit Samples (Rediger prøver).
3. Skriv prøvenavnene i kolonnen Name (Navn).
Bemærk: Lad navnene på eventuelle tomme brønde stå tomme.
4. Klik på Analysis (Analyse). Klik på Cycling A Yellow på analysesiden for at kontrollere HEX-kanalen.
5. Kontrollér, at Dynamic Tube (Dynamisk rør) er fremhævet. Klik på Slope Correct (Hældningskorrigering) og Linear Scale (Lineær skala).
6. Klik på Take Off Adj (Justering af afsætningspunkt), og indtast 15.01 (15,01) og 20.01 (20,01) som vist i figur 13.



Figur 13. Normaliseringsindstillinger for EGFR-analysen. 1 = "Dynamic Tube" (Dynamisk rør), 2 = "Slope Correct" (Hældningskorrigering), 3 = "Take Off Adj;" (Justering af afsætningspunkt), 4 = dialogvinduet "Take Off Point Adjustment" (Justering af afsætningspunkt) med parameterværdier.

7. Indstil tærskelværdien til 0.02 (0,02), og kontrollér HEX C_T-værdierne.

8. Klik på Cycling A Green på analysesiden for at få vist FAM-kanalen. Angiv parametrene som vist på figur 13 ovenfor.
Det dynamiske rør fremhæves.
9. Klik på Slope Correct (Hældningskorrigerig) og Linear Scale (Lineær skala).
10. Indstil tærskelværdien til 0.075 (0,075), og kontrollér FAM C_T -værdierne.

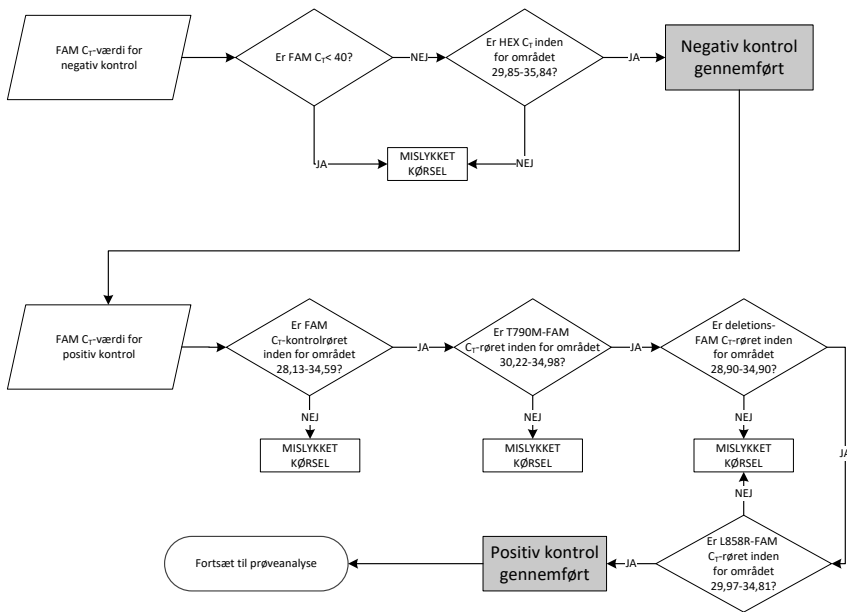
Kørsel af kontrolanalyse

Analysér dataene som følger, når kørslen er afsluttet.

- **Negativ kontrol:** For at sikre at der ikke er nogen skabelonkontaminering, må NTC'en ikke generere en C_T -værdi i den grønne (FAM) kanal under 40. For at sikre at kørslen er opsat korrekt, skal NTC'en vise amplifikation af 29,85-35,84 i den gule (HEX) kanal (intern kontrol). Hvis der er positiv amplifikation i den grønne kanal og/eller forstærkning uden for området 29,85 til 35,84 i det gule signal, er kørslen ugyldig.
- **Positiv kontrol:** Positiv kontrol (Positive Control, PC) for EGFR skal give en C_T for hver reaktionsblanding inden for og inklusive det angivne område i tabel 5. En kørsel med en positiv kontrolværdi uden for dette område tyder på, at der er et problem med analyseopsætningen, og kørslen skal betegnes som mislykket. Hvis den positive kontrolanalyses C_T er inden for området (FAM), men en intern controls C_T (HEX) er uden for området 29,85 til 35,84, skal du fortsætte med analysen.
Bemærk: Prøvedata må ikke anvendes, hvis den negative eller den positive kontrol mislykkes.

Tabel 5. Acceptabelt C_T -område for kørselskontroller

Reaktionskontrol	Analyse	Kanal	C_T -område
Positiv kontrol	Kontrol	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Deletioner	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Kontrol uden skabelon	Alle fire reaktionsblandinger	Green (FAM)	$\geq 40,00$
	Alle fire reaktionsblandinger	Yellow (HEX)	29,85-35,84



Figur 14. Procedure for kørselskontrolanalyse.

Forudsat at begge kørselskontroller er gyldige, skal hver prøvekontrolanalyses CT-værdi ligge inden for området 23,70 til 31,10 i den grønne (FAM) kanal (tabel 6).

Tabel 6. Acceptabelt FAM C_T-område for prøvekontrolreaktion

Reaktionsblanding	Kanal	Acceptabelt C _T -område
Kontrol	Green (FAM)	23,70-31,10

Hvis prøven ligger uden for området, gives følgende vejledning.

- Prøvekontrolanalyse med C_T på < 23,70: Prøver med en kontrol-C_T på < 23,70 overbelaster mutationsanalyserne og skal fortyndes. For at påvise hver enkelt mutation på lavt niveau skal de overkoncentrerede prøver fortyndes, så de er i ovenstående område med den basis, at C_T stiger med 1.

- Prøvekontrolanalyse $C_T > 31,10$: Prøven indeholder ikke tilstrækkeligt DNA til at muliggøre analyse.

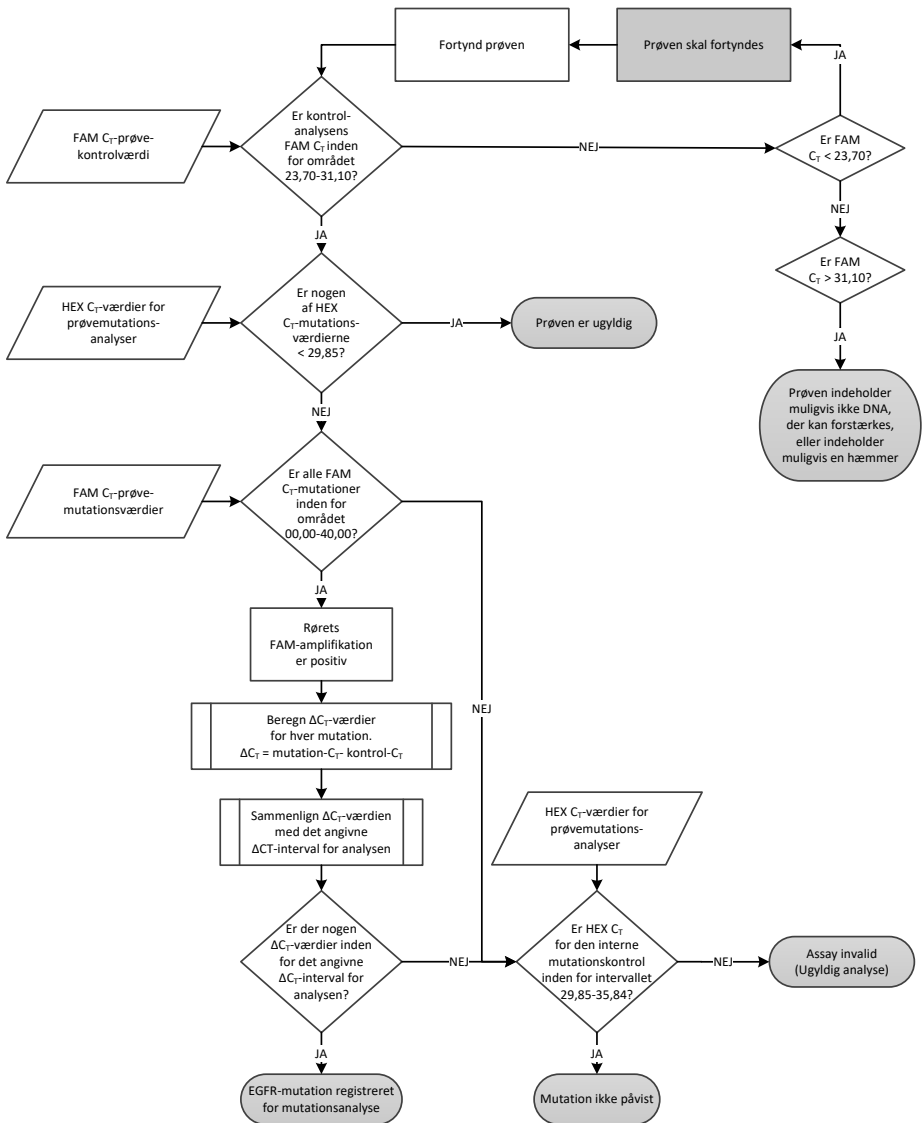
Forudsat at begge kørselskontroller er gyldige, og kontrolanalysen ligger inden for det område, der er angivet i tabel 6, skal hver værdi for prøvemutations- C_T ligge inden for det område, der er beskrevet i tabel 7 i den grønne (FAM) kanal. Hvis prøven ligger uden for området, gives følgende vejledning.

Tabel 7. Acceptable værdier for prøvemutationsreaktion

Reaktion	Reaktionsblanding	Kanal	C_T -område
Mutationsreaktion	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Deletioner	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Alle tre mutationer	Yellow (HEX)	29,85-35,84

Bemærk: Hvis en prøve ikke genererer en C_T (dvs. $C_T > 40$), kan det skyldes tilstedeværelsen af en hæmmer, en fejl i analyseopsætningen, eller at der ikke er noget EGFR DNA, der kan forstærkes.

- C_T -værdi for intern kontrol ligger inden for området 29,85-35,84: Der er ikke noget EGFR DNA, der kan forstærkes.
- Intern kontrol- C_T -værdi ligger ikke inden for området 29,85-35,84: Dette kan tyde på, at der er en fejl i analyseopsætningen, eller det kan tyde på tilstedeværelsen af en hæmmer. Det er muligt at reducere hæmmerens effekt ved at fortynde prøven, selvom dette også fortynder DNA'et.



Figur 15. Organisationsdiagram over mutationsanalyse.

FAM C_T-værdi for prøvemutationsanalyser

FAM-værdierne for alle tre mutationsreaktionsblandinger skal kontrolleres i forhold til værdierne i tabel 8.

ΔC_T -cutoff-værdien beregnes som følger for alle mutationsprøver, der viser positiv amplifikation, idet det skal sikres, at C_T-værdierne for mutation og kontrol er fra den samme prøve.

$$\Delta C_T = \text{mutation } C_T - \text{kontrol } C_T$$

Sammenlign ΔC_T -værdien for prøven med ΔC_T -cutoff-området for den pågældende analyse (tabel 8), og sørg for, at det korrekte cutoff-punkt anvendes for hver enkelt analyse.

Tabel 8. ΔC_T -cutoff-område for mutationsanalyse

Mutationsanalyse	ΔC_T -cutoff-område
T790M	-10,00 \geq til \leq 7,40
Deletioner	-10,00 \geq til \leq 8,00
L858R	-10,00 \geq til \leq 8,90

Den øverste grænse for ΔC_T -cutoff-området er det punkt, over hvilket et positivt signal potentielt kunne skyldes et baggrundssignal i ARMS-primeren på vildtype-DNA. Hvis prøvens ΔC_T -værdi er højere end det øverste punkt for ΔC_T cutoff-området, klassificeres den som "Mutation not detected" (Mutation ikke påvist) eller uden for kittets detektionsgrænse. Hvis prøvевærdien er inden for ΔC_T -cutoff-punktet, anses prøven for at være positiv for en mutation, der er påvist af den pågældende analyse. Hvis prøvевærdien er under den nedre grænse for ΔC_T -cutoff-området, kan dette potentielt skyldes en fluorescensartefakt.

Bemærk: For prøver, der ikke viser nogen FAM mutations-C_T, er det nødvendigt at bedømme den interne kontrol (HEX) C_T for at afgøre, om mutationen ikke er påvist, eller om analysen er

ugyldig. Hvis HEX C_T -værdien er mellem 29,85 og 35,84, er mutationen ikke påvist. Hvis HEX ΔC_T -cutoff-værdien er uden for dette område, er prøven ugyldig.

Kort fortalt vil hver mutationsreaktion for hver prøve få en status som påvist mutation, mutation ikke påvist eller ugyldig efter følgende kriterier.

- Mutation påvist: FAM-amplifikation er positiv, og ΔC_T ligger inden for ΔC_T -cutoff-området. Hvis der påvises flere mutationer, kan de alle rapporteres.
- Mutation ikke påvist:
 - FAM-amplifikation er positiv, ΔC_T -cutoff-værdien ligger over ΔC_T -cutoff-området, og HEX (intern kontrol) ligger inden for 29,85-35,84.
 - FAM-amplifikation er negativ, og HEX (intern kontrol) ligger inden for 29,85-35,84.
- Ugyldig: FAM-amplifikation er negativ, og HEX-forstærkning er uden for specifikationerne.
 - Den beregnede ΔC_T er under ΔC_T -cutoff-området, og HEX (intern kontrol) er inden for det forventede område. En ΔC_T -værdi under -10,00 er tegn på, at der kan være forekommet en fluorescensatfekt.

Fejlsøgningsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. Yderligere information kan også fås på siden med ofte stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGEN Teknisk 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

Intet signal med positiv kontrol (Positive Control, PC) for EGFR i fluorescenskanalen Cycling Green

- | | |
|---|---|
| a) Den valgte fluorescenskanal for PCR-dataanalyse stemmer ikke overens 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, og gentag kørslen, hvis den er forkert. |
| 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 de instruktioner, der er angivet i "Opbevaring og håndtering af reagenser" (på side 14) | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt kit. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit er for gammelt | Kontrollér opbevaringsbetingelserne og udløbsdatoen for reagenserne (se kittets etiket), og brug evt. et nyt kit. |

Kommentarer og forslag

Signaler med de negative kontroller i fluorescenskanalen og Cycling Green for den analytiske PCR

- | | |
|---|--|
| a) 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. |
|---|--|

Fleere tærskler overskredet, eller ΔC_T -værdi under cutoff-området

- | | |
|--|---|
| a) Forkert blanding under analyseopsætningen | Gentag PCR, hvis dette påvirker en kontrol, eller gentest den ikke-beståede prøve.
Følg brugsanvisningen, og vær meget opmærksom på blandingstrin. |
|--|---|

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af *therascreen* EGFR Plasma 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-instrumentet.

Der er udført analytiske kontrolundersøgelser ved hjælp af humant DNA, der er ekstraheret fra plasmaprøver.

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

therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit Handbook 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.

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.

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 specifikke deletioner i exon 19 (se tabel 13 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 Reaction Mix. Hvis L858Q-mutationen konstateres i en patientprøve, kan det derfor resultere i "L858R Mutation Detected" (L858R-mutation påvist).

Ydelseskarakteristika

Analysesensitivitet – tomgrænse (Limit of Blank, LOB)

For at vurdere ydelsen i *therascreen* EGFR Plasma 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 en lav koncentration af mutation, blev NSCLC-plasma EGFR-vildtype DNA evalueret ud fra 59 forskellige prøver. Godkendelseskriteriet for denne undersøgelse (mindst 95 % af vildtypeprøverne skal have en ΔC_T -værdi over den pågældende cutoff) blev opfyldt.

Påvisningsgrænse (Limit of Detection, LOD)

LOD er den laveste procentdel af mutant-DNA, der kan påvises på en baggrund af vildtype-DNA, når det samlede amplificerbare DNA (inden for det angivne input-område) gav korrekte bestemmelser ved 95 % for hver mutationspositive prøve (C95). Arbejdsområdet for DNA-input for analysen er defineret af det prædefinerede område for kontrollens C_T på 23,70 til 31,10.

LOD blev bestemt ved lave DNA-inputniveauer (kontrol- C_T ca. 30,10) ved hjælp af DNA hentet fra FFPE-væv til *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. LOD blev fastlagt ved hjælp af både kliniske FFPE-prøver og FFPE-cellelinjer ved lave DNA-inputniveauer for disse EGFR-mutationer.

LOD-værdier, der blev fastlagt ved hjælp af FFPE-væv, blev verificeret for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit med DNA hentet fra kunstige mutantpositive plasmaprøver.

De endelige LOD-værdier, som er angivet i tabel 9 på næste side, viser den mutationsprocent, der gav en sandsynlighed for påvisning på 95 % for hver af mutationerne.

Table 9. LOD'er for hver EGFR-mutationsanalyse

Exon	Mutation	COSMIC-id*	% LOD-værdi
20	T790M	6240	17,5*
		6223	6,4*
		13551	4,24*
		12728	2,43†
		12419	16,87†
		12422	3,24†
		6218	9,83†
		6210	7,44†
		6254	10,2*
		12370	8,1*
19	Deletioner	12678	10,40†
		12367	4,39†
		12384	7,54†
		6225	6,5*
		6220	2,7*
		6255	0,81*
		12382	1,45*
		12383	4,58*
21	L858R	6224	5,94*
		12387	4,91†
		12369	4,94*

* LOD-værdier, som er verificeret i plasma som en del af LOD-bekræftelsesundersøgelsen for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

† Disse mutationer blev ikke bekræftet i plasma.

Analysesensitivitet – ΔC_T -cutoffs og ΔC_T -cutoff-område

Der blev brugt en risikobaseret tilgang med hensyn til falsk-positive rater ved indstilling af analysens cutoffs, og de estimerede LOB-værdier blev brugt som en komponent i udviklingen af cutoff-værdier.

De respektive ΔC_T -cutoff-områder, der er fastlagt for hver mutationsanalyse i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, fremgår af tabel 10.

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

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

Repetérbarhed og reproducerbarhed

Repetérbarheden og reproducerbarheden blev vurderet ved at teste prøver med et højt mutationsniveau ved $3 \times \text{LOD}$ mod en baggrund af vildtype-genomisk DNA på 3 teststeder med batches med flere kits, operatører og kørsler over forskellige dage med 2 replikater for hver prøve. For alle 3 mutationsanalyser blev 100 % af mutant-DNA-prøverne testet mutationspositive. Vildtypeprøver blev testet mutationsnegative i alle analyser på alle steder.

Effekten af DNA-input på C_T -værdier

DNA-inputniveauet defineres som den samlede kvantitet af amplificerbart EGFR DNA i en prøve som bestemt ved C_T -værdierne fra kontrolreaktionen. For at vise, at ydelsen i *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit er konstant over kontrolreaktionens C_T -område (23,70-31,10), blev alle 3 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 -cutoff-værdier, der blev målt ved forskellige samlede DNA-inputniveauer, konstante over arbejdsområdet for *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit.

Interfererende stoffer

Endogene interfererende stoffer

De potentielt interfererende stoffer blev tilsat i kunstige 3xLOD-mutantpositive plasmaprøver. Prøverne blev derefter testet med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Prøver med potentielt interfererende stoffer blev sammenlignet med kunstige 3xLOD-mutantpositive plasmaprøver uden tilsatte interfererende stoffer. Hvert interfererende stof blev testet med 4 replikater.

En forskel på $> 2\times$ standardafvigelse (Standard Deviation, SD) (taget fra præcisionsundersøgelsen) mellem "testen" og "kontrollen" ΔC_T (dvs. ingen interfererende stoffer) blev anset for at indikere en potentiel interferens. I disse tilfælde vises den observerede forskel i ΔC_T .

De testkoncentrationer, der er angivet i tabel 11, blev valgt på baggrund af CLSI's retningslinje EP07-A2 og er de maksimale koncentrationer, der kan forventes i en klinisk prøve.

Bemærk: Disse endogene stoffer blev tilsat i kunstige mutantpositive plasmaprøver, som bestod af plasma fra raske donorer. Disse endogene stoffer ville derfor have været naturligt til stede i prøverne i ukendte koncentrationer før tilsætning. Den endelige koncentration af hvert potentielt endogent interfererende stof ville sandsynligvis være højere end testkoncentrationen.

Tabel 11. Potentielle interfererende endogene stoffer

Potentielt interfererende stoffer (IS)	Testkoncentration
Ukonjugeret bilirubin	15 mg/dl
Hæmoglobin (humant)	0,2 g/dl
Triglycerider	3 g/dl

T790M-analyse

Følgende endogene stoffer i de koncentrationer, der er angivet i tabel 11, viste sig at have en indvirkning $> 2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) på ydeevnen i T790M-analysen:

- Triglycerider, forskel på $1,37 \Delta C_T$

Analyse af delektioner

Følgende endogene stoffer i de koncentrationer, der er angivet i tabel 11, viste sig at have en indvirkning $> 2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) på ydeevnen i analysen af delektioner:

- Hæmoglobin, forskel på $\Delta 0,80 C_T$

L858R-analyse

Følgende endogene stoffer i de koncentrationer, der er angivet i tabel 11, viste sig at have en indvirkning $> 2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) på ydeevnen i L858R-analysen:

- Bilirubin, forskel på $1,13 \Delta C_T$
- Triglycerider, forskel på $1,53 \Delta C_T$

Eksogene interfererende stoffer

De potentielt interfererende stoffer blev tilsat i kunstige 3xLOD-mutantpositive plasmaprøver. Prøverne blev derefter testet med *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. Prøver med potentielt interfererende stoffer blev sammenlignet med kunstige 3xLOD-mutantpositive plasmaprøver uden tilsatte interfererende stoffer. Hvert interfererende stof blev testet med 4 replikater.

En forskel på $> 2 \times$ standardafvigelse (taget fra præcisionsundersøgelsen) mellem "testen" ΔC_T og "kontrollen" ΔC_T (dvs. ingen interfererende stoffer) blev anset for at indikere en potentiel interferens. I disse tilfælde vises den observerede forskel i ΔC_T .

De testkoncentrationer, der er angivet i tabel 12, blev valgt på baggrund af CLSI's retningslinje EP07-A2 og er højere end den terapeutiske koncentrationen i alle tilfælde.

Tabel 12. Potentielle interfererende endogene stoffer

Potentielt interfererende stof (IS)	Testkoncentration ($\mu\text{g/ml}$)
Citalopram hydrobromid	0,75
Paroxetinhydrochloridhemihydrat	1,14
Sertralinhydrochlorid	0,67
Fluoxetinhydrochlorid	3,87
Acetaminophen	200,7
K ₂ EDTA	3600

T790M-analyse

Følgende eksogene stoffer i de koncentrationer, der er angivet i tabel 12, viste sig at have en indvirkning $> 2 \times \text{SD}$ ($0,40 \Delta C_T$) på ydeevnen i T790M-analysen:

- Citalopramhydrobromid, forskel på $0,52 \Delta C_T$
- Sertralinhydrochlorid, forskel på $0,47 \Delta C_T$
- Fluoxetinhydrochlorid, forskel på $0,48 \Delta C_T$

Analyse af delektioner

Følgende eksogene stoffer i de koncentrationer, der er angivet i tabel 12, viste sig at have en indvirkning $> 2 \times SD$ ($0,71 \Delta C_T$) på ydeevnen i analysen af delektioner:

- Fluoxetin, forskel på $0,73 \Delta C_T$

L858R-analyse

Følgende eksogene stoffer i de koncentrationer, der er angivet i tabel 12, viste sig at have en indvirkning $> 2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) på ydeevnen i L858R-analysen:

- Citalopramhydrobromid, forskel på $0,72 \Delta C_T$
- Paroxetinhydrochloridhemihydrat, forskel på $0,92 \Delta C_T$
- Sertralinhydrochlorid, forskel på $0,82 \Delta C_T$
- Fluoxetinhydrochlorid, forskel på $0,98 \Delta C_T$
- Acetaminophen, forskel på $0,81 \Delta C_T$
- K_2 EDTA, forskel på $0,57 \Delta C_T$

Klinisk ydeevne

Det kliniske NCT01203917-forsøg var et enkeltarmet open-label-forsøg i fase IV til vurdering af effektiviteten og sikkerheden/tolerancen i første linje-behandling med gefitinib blandt kaukasiske patienter med stadie IIIA/B/IV, EGFR-mutationspositiv NSCLC.

Patienternes egnethed til deltagelse i det kliniske NCT01203917-forsøg blev bestemt ud fra tilstedeværelsen af EGFR-sensitiserende mutationer. EGFR-mutationsstatusen for NSCLC-patienter blev vurderet ved hjælp af en klinisk forsøgsanalyse (Clinical Trial Assay, CTA) med DNA fra matchende vævs- og plasmaprøver. På baggrund af en forudplanlagt biomarkør havde undersøgelsen til formål at fastlægge, hvorvidt plasmaprøverne kan anvendes til mutationsanalyse, hvis der ikke er tilgængelige vævsprøver. Resultaterne påviste høje rater af overensstemmelse mellem matchende vævs- og plasmaprøver ved 94,3 % med en analysespecificitet på 99,8 % og en sensitivitet på 65,7 %.

Retrospektive test af plasmaprøver fra patienter, som screenes til det kliniske NCT01203917-forsøg, blev udført ved hjælp af *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit. En overgangsundersøgelse blev udført for at vurdere overensstemmelsen mellem *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit og den CTA, der blev anvendt til at udvælge patienter til det kliniske NCT01203917-forsøg. Ækvivalensen mellem CTA og *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit blev påvist.

Litteraturhenvisninger













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

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 QIAGEN Teknisk Service eller lokale forhandlere (se bagsiden, eller besøg www.qiagen.com).

Symboler

Følgende symboler kan evt. findes i brugsanvisningen på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
 <N>	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Holdbarhedsdato
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer (dvs. etiketten på komponenten)
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Globalt handelsvarenummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning
	Producent

Symbol

Symboldefinition



Læs brugsanvisningen



Advarsel/forsigtig

Bilag A: Oplysninger om mutationer

Tabel 13 viser COSMIC-id'er fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabel 13. Liste over mutationer og COSMIC-id'er

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

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – til påvisning af mutationer i EGFR-genet		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaktioner: 1 kontrolanalyse, 7 mutationsanalyser, positiv kontrol, Taq-DNA-polymerase	870311
Rotor-Gene Q MDx og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler og High Resolution Melt-analysator med 5 kanaler (grøn, gul, orange, rød, violet) plus HRM-kanal, bærbar computer, software, tilbehør, 1 års garanti på reservedele og arbejds løn, installation og uddannelse ikke inkluderet	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler og High Resolution Melt-analysator 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	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblok til manuel opsætning af reaktioner med enkeltkanalspipette i 72 x 0,1 ml rør	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips a 4 rør og hætter til 1.000 reaktioner	981103

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips a 4 rør og hætter til 10.000 reaktioner	981106
Relaterede produkter		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Til 50 præparater: QIAamp-minikolonner, rørforlængere (20 ml), QIAGEN Proteinase K, carrier-RNA, buffere, VacConnectors og Collection Tubes (1,5 ml og 2 ml)	55114

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser kan ses i håndbogen eller brugsvejledningen til det aktuelle QIAGEN-kit. Håndbøger og brugsvejledninger til QIAGEN-kits kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale distributør.

Revisionshistorik for dokumentet

Revision

Beskrivelse

R4, 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
Ændring af anvisninger for opbevaring af reagenser fra 90 dage til 12 måneder eller indtil udløbsdatoen
Opdatering af afsnittet Begrænsninger med oplysninger om analysen af exon 19-deletioner og L858R-analysen
Revidering af **tabel 9** for at erstatte dupliserede exon 21 L858R-deletioner med exon 19-deletioner
Fjernelse af EC + REP-symbolet på forsiden og i afsnittet Symboler

R5, juni 2020

Opdateret henvisningerne til RGQ-softwareversion fra 2.3 til 2.3.5 eller senere
Opdateret tabel 8 og 10 til implementering af de nye ΔC_T -cutoff-områder og justeret alle relevante beskrivelser i overensstemmelse hermed overalt i håndbogen
Opdateret alle protokollkapitler, så de indeholder oplysninger om vigtigheden af at blande under Vigtige punkter, før sektioner startes; fremhævede blandingsoplysningerne ved alle blandettrin
Tilføjet et blandettrin i afsnittet "Protokol: Påvisning af EGFR-mutationer"
Opdateret afsnittet Fejlfinding for at tilføje løsning på overskridelse af flere tærskler

R6, juni 2022

Opdateret tabel i afsnittet Interfererende stoffer for at revidere testkoncentrationen for ukonjugeret bilirubin fra 150 til 15 mg/dbl

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

Denne side skal være tom

Aftale om begrænset licens til *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit

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

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

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

Varemærker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], *therascreen*[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®] (QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); 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.

Juni-2022 HB-1898-007 1127512DA © 2022 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

