

therascreen[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung



Version 1

IVD

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Zur Verwendung mit Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM Instrumenten

CE

REF

870311



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R6 **MAT**

1127512DE

Inhalt

Verwendungszweck	5
Zusammenfassung und Erläuterung	6
Verfahrensprinzip	7
Kit-Zusammenstellung	7
Assays	8
Kontrollen	9
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	10
Kit-Inhalt	10
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	11
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	12
Sicherheitshinweise	12
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	12
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	14
Lagerung und Handhabung der Proben	16
Verfahren	17
Protokoll: Nachweis von EGFR-Mutationen	18
Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-Konfiguration	24
Analyse der Daten aus der Mutationsbestimmung	31
Hilfe zur Fehlerbehebung	39
Qualitätskontrolle	41
Einschränkungen	41
Leistungsmerkmale	43

Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze (Limit of Blank, LOB)	43
Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD)	43
Analytische Sensitivität – ΔC_T -Cut-off-Werte und ΔC_T -Cut-off-Bereich	45
Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit.....	45
Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die C_T -Werte.....	46
Störsubstanzen.....	46
Klinische Leistungsmerkmale.....	51
Literatur	52
Kontakt.....	53
Symbole	54
Anhang A: Weitere Informationen zu Mutationen.....	56
Bestellinformationen	57
Revisionsverlauf des Dokuments.....	59

Verwendungszweck

Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ist ein in-vitro-diagnostischer Test zum Nachweis von Deletionen in Exon 19 und Substitutionen in Exon 20 und 21 (T790M bzw. L858R) in dem Gen, das für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) kodiert, und ermöglicht die qualitative Bestimmung des Mutationsstatus. Die Ergebnisse sind zur Unterstützung bei der Identifizierung von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen vorgesehen, die von einer Behandlung mit IRESSA® (Gefitinib) profitieren könnten, wenn keine Gewebeprobe untersucht werden kann.

Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung an DNA-Proben verwendet werden, die aus Plasma aus dem Blut von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) extrahiert wurden.

Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ist für den Gebrauch als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen.

Zusammenfassung und Erläuterung

Beim *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit handelt es sich um ein gebrauchsfertiges Kit für den Nachweis von Mutationen im krebsrelevanten EGFR-Gen mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) auf Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrumenten.

Das auf der Scorpions®- und der ARMS-Technologie beruhende *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit ermöglicht den Nachweis der folgenden Mutationen des EGFR-Gens auf einem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA.

- Deletionen in Exon 19
- T790M
- L858R

Die angewendeten Methoden sind hochgradig selektiv und können je nach DNA-Gesamtmenge zum Nachweis eines geringen prozentualen Anteils der Mutation auf einem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA verwendet werden. Dank diesem Maß an Selektivität und diesen Nachweisgrenzen ist dieses Verfahren weitaus präziser als andere Technologien, wie z. B. die Sequenzierung mittels Farbstoff-Terminator.

Verfahrensprinzip

Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit nutzt für den Nachweis von Mutationen mittels Real-time-PCR zwei Technologien: ARMS und Scorpions.

ARMS

ARMS (Amplification Refractory Mutation System) dient zur allel- oder mutationsspezifischen Amplifikation. Mit der Taq-DNA-Polymerase (Taq) kann äußerst genau zwischen einer Übereinstimmung und einer Nichtübereinstimmung am 3'-Ende eines PCR-Primers unterschieden werden. Spezifische mutierte Sequenzen werden selbst in Proben, bei denen die Mehrzahl der Sequenzen die Mutation nicht aufweist, selektiv amplifiziert. Wenn der Primer vollständig übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation mit voller Effizienz. Wenn die 3'-Base nicht übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation nur im Hintergrund auf niedrigem Niveau.

Scorpions

Der Nachweis der Amplifikation wird mithilfe der Scorpions-Technologie durchgeführt. Scorpions sind bifunktionelle Moleküle, die sich aus einem PCR-Primer und einer kovalent daran gebundenen Sonde zusammensetzen. Das Fluorophor in dieser Sonde interagiert mit einem ebenfalls in die Sonde integrierten Quencher, welcher die Fluoreszenz reduziert. Wenn die Sonde während der PCR an das Amplifikat bindet, werden Fluorophor und Quencher getrennt. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsröhrchen.

Kit-Zusammenstellung

Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit enthält vier Assays:

- einen Kontrollassay (Control Reaction Mix, CTRL)

- drei Mutationsassays

Alle Reaktionsgemische enthalten Reagenzien für den Nachweis der mit FAM™ markierten Zielsequenzen, sowie einen internen Kontrollassay, der mit HEX™ markiert ist. Mit dem internen Kontrollassay kann nachgewiesen werden, ob Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch negativen Ergebnissen führen können. Die FAM-Amplifikation kann die konkurrierende Amplifikation der internen Kontrolle verdrängen; die interne Kontrolle dient lediglich dem Nachweis, dass es sich beim Ausbleiben einer FAM-Amplifikation tatsächlich um ein negatives Ergebnis und nicht etwa um eine fehlgeschlagene PCR-Reaktion handelt.

Assays

Kontrollassay

Der mit FAM gekennzeichnete Kontrollassay dient zur Bestimmung der Gesamt-DNA in einer Probe. Dieser Assay amplifiziert eine Region von Exon 2 des EGFR-Gens. Bekannte EGFR-Polymorphismen werden aufgrund der Konzeption von Primer und Sonde vermieden.

Mutationsassays

Jeder Mutationsassay enthält eine FAM-markierte Scorpions-Sonde sowie einen ARMS-Primer zur Unterscheidung zwischen der Wildtyp-DNA und einer spezifischen mutierten DNA.

Kontrollen

Alle Versuchsläufe müssen die folgenden Kontrollen enthalten:

Positivkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 1–4 eine Positivkontrolle enthalten sein. Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit enthält eine EGFR-Positivkontrolle (Positive Control, PC), die in der Positivkontrollreaktion als Template zum Einsatz kommt. Mit den Ergebnissen der Positivkontrolle wird sichergestellt, dass das Kit die angegebenen Akzeptanzkriterien erfüllt.

Negativkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 9–12 eine Negativkontrolle (Kontrolle ohne Template, No Template Control, NTC) enthalten sein. Die NTC besteht aus nukleasefreiem Wasser (H₂O), das für die Kontrolle ohne Template als „Template“ dient. Die Kontrolle ohne Template dient dem Nachweis von möglicherweise bei der Laufkonfiguration aufgetretenen Kontaminationen sowie zur Leistungsbeurteilung der internen Kontrollreaktion.

Beurteilung der internen Kontrollreaktion

Jedes Reaktionsgemisch enthält neben der Zielreaktion eine interne Kontrolle. Eine fehlgeschlagene Kontrollreaktion zeigt an, dass entweder Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch negativen Ergebnissen führen können, oder dass der Bediener bei der Vorbereitung dieses Röhrchens einen Fehler begangen hat.

Wenn das Fehlschlagen der internen Kontrollreaktion auf eine PCR-Inhibition zurückzuführen ist, kann der Effekt der Inhibitoren u. U. durch Verdünnen der Probe verringert werden; allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die Ziel-DNA verdünnt wird. Die FAM-Amplifikation kann die konkurrierende Amplifikation der internen Kontrolle unterdrücken, so dass der CT-Wert (HEX) der internen Kontrolle außerhalb des zulässigen Bereichs liegen kann. Die FAM-Ergebnisse sind für diese Proben weiterhin gültig.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit Katalog-Nr. Anzahl der Reaktionen			(24) 870311 24
Rot	Control Reaction Mix (Kontrollreaktionsgemisch)	Ctrl	2 x 600 µl
Lila	T790M Reaction Mix (T790M-Reaktionsgemisch)	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (Deletionsreaktionsgemisch)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R-Reaktionsgemisch)	L858R	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-Positivkontrolle)	PC	300 µl
Minzgrün	Taq-DNA-Polymerase	Taq	2 x 80 µl
Weiß	Nuclease-free water for No Template Control (Nukleasefreies Wasser für die Kontrolle ohne Template)	NTC	1 x 1,9 ml
Weiß	Nuclease-free water for Dilution (Nukleasefreies Wasser zur Verdünnung)	Dil	1 x 1,9 ml
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch)			1

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- Kit zur DNA-Extraktion (siehe „Verfahren“, Seite 17)
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Probenvorbereitung
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Herstellung des PCR-Master-Mix
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Dispensierung von Template-DNA
- DNase-, RNase- und DNA-freie Pipettenspitzen mit Filtern (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern)
- Wasserbad oder ähnliches Gerät zur Temperierung von 50-ml-Zentrifugenröhrchen auf 60 °C
- Heizblock oder ähnliches Gerät zur Inkubation bei 56 °C†
- Zerstoßenes Eis
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 2-ml-Reaktionsröhrchen
- Vortexer
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument* † mit den Fluoreszenzkanälen „Cycling Green“ und „Cycling Yellow“ (für den Nachweis von FAM bzw. HEX)
- Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.5 oder höher
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, zur Verwendung mit einem 72-Well-Rotor (Kat.-Nr. 981103 oder 981106)
- DNase-, RNase- und DNA-freie Mikrozentrifugenröhrchen zum Ansetzen von Master-Mixes
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration mit einer Einkanalpipette (QIAGEN, Kat.-Nr. 9018901)

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

† In einigen Ländern kann ggf. das Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument mit Produktionsdatum ab Mai 2011 verwendet werden. Das Produktionsdatum kann der Seriennummer an der Rückseite des Instruments entnommen werden. Die Seriennummer hat das Format „mmjjnnn“, wobei „mm“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „jj“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „nnn“ für die eindeutige Instrumentenkennung steht.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Für den professionellen Gebrauch

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als praktische und kompakte PDF-Datei zum Einsehen und Ausdrucken.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes ist vom Anwender stets zu beachten:

- Verwenden Sie DNase-, RNase- und DNA-freie Pipettenspitzen mit Filtern und achten Sie darauf, dass die Pipetten gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibriert wurden.
- Lagern und extrahieren Sie positive Materialien (sowohl Spezimen als auch Positivkontrollen) getrennt von allen anderen Reagenzien und geben Sie sie in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzu.
- Lassen Sie alle Komponenten vor Assay-Beginn bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig auftauen.
- Mischen Sie nach dem Auftauen die Komponenten durch zehnmaliges Umschwenken jedes Röhrchens und zentrifugieren Sie kurz.

Hinweis: Äußerste Vorsicht ist geboten, um die Kontamination von PCR-Reaktionen mit synthetischem Kontrollmaterial zu vermeiden. Wir empfehlen, zum Ansetzen von Reaktionsgemischen und Hinzufügen von DNA-Templates verschiedene Spezialpipetten zu verwenden. Die Herstellung und Dispensierung der Reaktionsgemische darf nicht in dem Bereich durchgeführt werden, in dem die Template-Zugabe erfolgt. Die Rotor-Gene Q Röhrchen dürfen nach Abschluss des PCR-Laufs nicht geöffnet werden. Auf diese Weise soll eine Kontamination des Labors mit post-PCR-Produkten verhindert werden.

Hinweis: Die Reagenzien sind für die manuelle Einrichtung validiert. Bei automatisierten Methoden ist die Anzahl der möglichen Reaktion u. U. niedriger, da ein Teil der Reagenzien zum Füllen des „Totvolumens“ dieser automatisierten Systeme verloren geht.

Hinweis: Alle Reagenzien im *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit wurden speziell für die Anwendung mit den angegebenen Tests formuliert. Alle in einem *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus diesem *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit vorgesehen.

Zur Gewährleistung einer optimalen Leistung dürfen die Reagenzien des Kits nicht ausgetauscht werden.

Hinweis: Verwenden Sie ausschließlich die im Kit mitgelieferte *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*). Diese darf nicht durch die *Taq*-DNA-Polymerase aus anderen Kits desselben Typs oder eines anderen Typs oder durch die *Taq*-DNA-Polymerase anderer Hersteller ersetzt werden.

Hinweis: Die Reagenzien im *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit wurden optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien wird nicht empfohlen, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann. Des Weiteren wird von der Verwendung von Reaktionsvolumen unter 25 µl abgeraten, da dies das Risiko falsch negativer Ergebnisse erhöht.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versendet. Wenn Bestandteile des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits beim Empfang nicht gefroren sind, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde, die Lieferung keine Stückliste, keine Gebrauchsanleitung oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktinformationen siehe www.qiagen.com).

Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -30 bis -15 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Bei Lagerung unter den angegebenen Lagerungsbedingungen ist das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit bis zum Ablauf des angegebenen Verfallsdatums stabil.

Nach dem Öffnen können die Reagenzien 12 Monate, maximal jedoch bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum, bei -30 bis -15 °C in der Originalverpackung gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Es dürfen maximal acht Einfrier-/Auftauzyklen durchgeführt werden.

Die Reagenzien müssen über einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde bis maximal 4,5 Stunden bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Sobald die Reagenzien in einem gebrauchsfertigen Zustand sind, können die PCR-Reaktionen eingerichtet werden. Die Rotor-Gene Q MDx Röhren, welche die Master-Mixe und die DNA-Probe enthalten, sollten dann sofort in den Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM geladen werden. Die Gesamtzeit zwischen Beginn der PCR-Konfiguration und Beginn des Laufs sollte die folgenden Zeiten nicht überschreiten:

- 6 Stunden bei Lagerung bei Raumtemperatur
Hinweis: Diese Zeit umfasst sowohl die PCR-Konfiguration als auch die Lagerung.
- 18 Stunden bei Lagerung im Kühlschrank ($2-8$ °C)
Hinweis: Diese Zeit umfasst sowohl die PCR-Konfiguration als auch die Lagerung.

Hinweis: Scorpions (wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle) in den Reaktionsgemisch-Reagenzien sind lichtempfindlich. Kontroll- und Reaktionsgemisch-Reagenzien müssen vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden.

Die Reagenzien im *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit sind optimal verdünnt, sodass vor dem Gebrauch in der Analyse gemäß Handbuch zum *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit keine weitere Aufreinigung oder Vorbehandlung erforderlich ist.

Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Lagerung und Handhabung der Proben

Hinweis: Alle Proben sind als potenziell infektiös zu behandeln.

Als Probenmaterial muss humane genomische DNA verwendet werden, die aus Plasma extrahiert wurde. Zur Sicherstellung der Spezimenqualität müssen die Spezimen gemäß Pathologie-Standardverfahren transportiert werden.

Verfahren

DNA-Extraktion

Die Leistungsmerkmale dieses Kits wurden anhand von mit dem QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Kat.-Nr. 55114) extrahierter DNA bestimmt. Führen Sie bei Verwendung des QIAamp Circulating Nucleic Acid Kits die DNA-Extraktion gemäß den Anweisungen im Handbuch durch. Beachten Sie dabei Folgendes:

- Das Plasma-Anfangsvolumen beträgt 2 ml.
- Vor der DNA-Extraktion müssen 2 ml Plasma 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Röhrchen überführt werden.
- Es wird ein Proteinase-K-Volumen von 250 µl benötigt.
- Der Proteinase-K-Verdau muss 1 Stunde lang bei 60 °C durchgeführt werden.
- Die aufgereinigte genomische DNA muss in 55 µl Buffer AVE (im QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit enthalten) eluiert werden.
- Lagern Sie aufgereinigte genomische DNA bei -30 bis -15 °C.

Hinweis: Alle Assays im *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit erzeugen kurze PCR-Produkte. Das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit funktioniert jedoch nicht bei stark fragmentierter DNA.

Protokoll: Nachweis von EGFR-Mutationen

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass bei jedem Mischschritt während der Assaykonfiguration das beschriebene Mischverfahren durchgeführt wird, um korrekte Ergebnisse zu erhalten.
- Bei jedem Lauf können bis zu 16 Proben untersucht werden.
- Lesen Sie vor Beginn den Abschnitt „Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“, auf Seite 12.
- Machen Sie sich mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument ausreichend vertraut, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen. Lesen Sie die Gebrauchsanweisung zum Instrument.
- Mischen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) oder andere Gemische, die *Taq*-DNA-Polymerase enthalten, nicht im Vortexer, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*, indem Sie die Pipettenspitze nur knapp unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze mit überschüssigem Enzym in Berührung kommt.
- Kontroll- und Mutationsassay müssen für jede DNA-Probe im gleichen PCR-Lauf analysiert werden, um Variationen zwischen den einzelnen Läufen zu vermeiden.
- Zur Gewährleistung eines möglichst effizienten Gebrauchs der Reagenzien des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits fassen Sie die DNA-Proben zu Chargen zusammen, damit die Läufe möglichst voll besetzt sind. Durch das Testen einzelner Proben oder kleiner Serien von Proben steigt der Reagenzienverbrauch an, und die Gesamtzahl der Proben, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden können, nimmt ab.

Vorbereitende Schritte

- Alle Reagenzien müssen vor jedem Gebrauch mindestens 1 Stunde und höchstens 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig aufgetaut, durch zehnmaliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt.
- Überprüfen Sie vor der Verwendung, dass die *Taq* Raumtemperatur erreicht hat (15–25 °C). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.
- Mischen Sie alle Proben durch zehnmaliges Umschwenken und zentrifugieren Sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

1. Tauen Sie alle Röhrchen mit Reaktionsgemisch, das nukleasefreie Wasser für die Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) und die EGFR-Positivkontrolle (Positive Control, PC) mindestens 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig auf (Tabelle 1). Mischen Sie die Reagenzien nach dem Auftauen, indem Sie jedes Röhrchen zehnmal umschwenken, um im gesamten Röhrchen eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten, und zentrifugieren Sie dann kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.

Tabelle 1. Zeiten für Auftauen und PCR-Konfiguration sowie Lagertemperaturen

Minimale Auftauzeit	Maximale Auftauzeit	Lagertemperatur nach der PCR-Konfiguration	Max. Zeit für PCR-Konfiguration und Lagerung
1 Stunde	4,5 Stunden	Raumtemperatur (15–25 °C)	6 Stunden
1 Stunde	4,5 Stunden	2–8 °C	18 Stunden

Hinweis: Die PCR-Konfiguration muss bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum vom Abschluss der PCR-Konfiguration bis zum Start des PCR-Testlaufs auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Hinweis: Bringen Sie die *Taq*-DNA-Polymerase (Röhrchen *Taq*) gleichzeitig mit den anderen Reagenzien auf Raumtemperatur (15–25 °C) (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“, Seite 14). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

2. Führen Sie die folgenden Schritte aus:

- 2a. Kennzeichnen Sie vier Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) entsprechend den in Tabelle 2 aufgeführten Reaktionsgemischen.
- 2b. Setzen Sie gemäß den Volumenangaben in Tabelle 2 ausreichend Master-Mixe (Kontroll- oder Mutationsreaktionsgemisch [Röhrchen CTRL, T790M, Deletionen, L858R] sowie *Taq*-DNA-Polymerase [*Taq*]) für die DNA-Proben, eine Reaktion mit EGFR-Positivkontrolle (Röhrchen PC) und eine Reaktion mit nukleasefreiem Wasser als Kontrolle ohne Template (Röhrchen NTC) an.

Hinweis: Planen Sie Reagenzien für eine zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.

Die Master-Mixe enthalten mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 2. Herstellung der Master-Mixe*

Assay	Reaktionsgemischröhrchen	Volumen des Reaktionsgemisches	Volumen der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Röhrchen <i>Taq</i>)
Kontrolle	CTRL	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
T790M	T790M	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
Deletionen	Del	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)
L858R	L858R	19,50 µl × (n+1)	0,50 µl × (n+1)

* Planen Sie beim Ansetzen des Master-Mix eine zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.

Hinweis: Bei der Herstellung des Master-Mix wird zuerst das erforderliche Volumen an Kontroll- oder Mutationsreaktionsgemisch in das jeweilige Röhrchen gegeben; erst dann wird die *Taq*-DNA-Polymerase zugegeben.

3. Setzen Sie die benötigte Anzahl von PCR-4-Röhrchenstreifen (jeder Streifen besteht aus 4 Röhrchen) gemäß der Anordnung in Tabelle 3 in den Ladeblock. Verschließen Sie die Röhrchen nicht.

Hinweis: Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden.

4. Verschließen Sie das Master-Mix-Röhrchen mit dem Deckel und mischen Sie den Master-Mix durch zehnmaliges Umschwenken. Zentrifugieren Sie das Röhrchen anschließend kurz, damit sich das Gemisch unten im Röhrchen sammelt. Geben Sie sofort 20 µl Master-Mix in jedes erforderliche PCR-Röhrchen des Streifens.
5. Geben Sie sofort 5 µl nukleasefreies Wasser (H₂O) in den PCR-Röhrchenstreifen für die Kontrolle ohne Template (PCR-Röhrchen 9–12) und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.
6. Geben Sie jeweils 5 µl Probe in die Probenröhrchen (PCR-Röhrchen 5–8, 13–16 und 17–22) und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.
7. Geben Sie 5 µl EGFR-Positivkontrolle (Positive Control, PC) in die Positivkontrollröhrchen (PCR-Röhrchen 1–4) und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln. Jede DNA-Probe muss mit dem Kontroll- und allen Mutationsassays getestet werden. Die hierfür erforderliche Anordnung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Anordnung von Kontroll- und Mutationsassays

Assay	Kontrollen		Probennummer						
	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
Deletionen	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
Probennummer									
Assay	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
Deletionen	7	15	23	31	39	47	55	63	71
L858R	8	16	24	32	40	48	56	64	72

8. Kennzeichnen Sie mit einem wasserfesten Filzstift die Deckel der ersten Röhrcchen, die sich in jedem PCR-4-Röhrcchenstreifen in der Position mit der niedrigsten Nummer befinden (z. B. Positionen 1, 5, 9 usw.), um die Ausrichtung für das Laden der Röhrcchen in den 72-Well-Rotor des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM anzuzeigen.
9. Schwenken Sie die verschlossenen Röhrcchen 4-mal um, um Probe und Reaktionsgemisch zu mischen.
10. Setzen Sie alle PCR-4-Röhrcchenstreifen in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors ein und stellen Sie durch eine Sichtprüfung sicher, dass alle Röhrcchen das gleiche Volumen enthalten.
Hinweis: Achten Sie darauf, dass die Röhrcchenstreifen beim Einsetzen in den Rotor nicht umgedreht werden.
11. Wenn der Rotor nicht voll ist, setzen Sie verschlossene leere Röhrcchen in die unbesetzten Positionen ein.

12. Setzen Sie sofort den Rotor in den Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q MDx) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhren während des Laufs zu sichern.
13. Informationen zum Erstellen des Temperaturprofils und Starten des Laufs finden Sie in der Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Systemeinrichtung (siehe „Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-Konfiguration“, Seite 24).

Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-Konfiguration

Die Zyklusparameter sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4. Zyklusparameter

Zyklen	Temperatur	Zeit	Datenerfassung
1	95 °C	15 Minuten	Keine
40	95 °C	30 Sekunden	Keine
	60 °C	60 Sekunden	Green und Yellow

1. Doppelklicken Sie auf dem Desktop des Notebooks, das mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM verbunden ist, auf das Symbol der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3. Wählen Sie im daraufhin angezeigten Dialogfeld „New Run“ (Neuer Lauf) die Registerkarte „Advanced“ (Erweitert) aus.
2. Wählen Sie zum Erstellen einer neuen Vorlage Empty Run (Leerer Lauf) aus und klicken Sie dann auf New (Neu).
Das Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) erscheint.
3. Wählen Sie 72-Well Rotor (72-Well-Rotor) als Rotortyp aus. Vergewissern Sie sich, dass der Schließring angebracht ist und aktivieren Sie das Kontrollkästchen Locking Ring Attached (Schließring angebracht). Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 1).

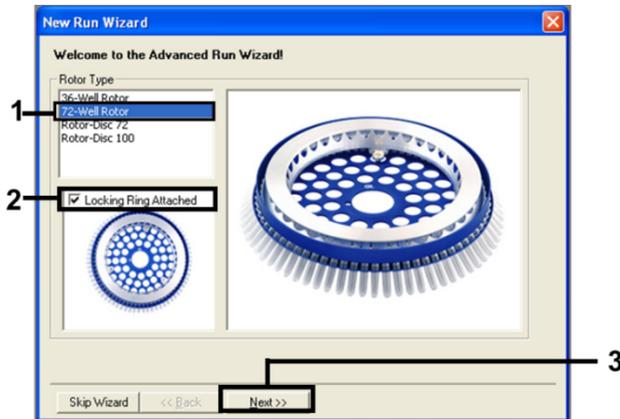


Abbildung 1. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe).

4. Geben Sie in das Feld Operator (Bediener) den Namen des Bedieners ein. Geben Sie Anmerkungen ein und stellen Sie den Wert im Feld Reaction Volume (Reaktionsvolumen) auf 25 ein. Vergewissern Sie sich, dass für die Werte im Feld Sample Layout (Probenkonfiguration) 1, 2, 3... ausgewählt ist. Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 2).

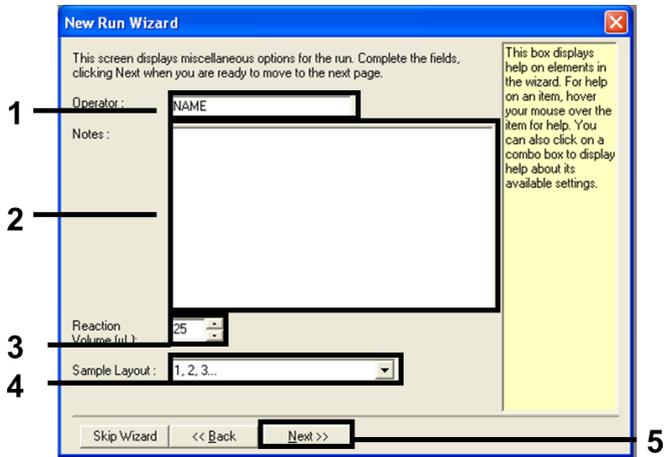


Abbildung 2. Eingeben des Bedienernamens und der Reaktionsvolumen.

5. Klicken Sie im Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) auf Edit Profile (Profil bearbeiten) (Abbildung 3) und überprüfen Sie wie in den folgenden Schritten beschriebene die Laufparameter.



Abbildung 3. Bearbeiten des Profils.

6. Klicken Sie auf Insert after (Einfügen nach) und wählen Sie die Option New Hold at Temperature (Neue Haltetemperatur) (Abbildung 4).

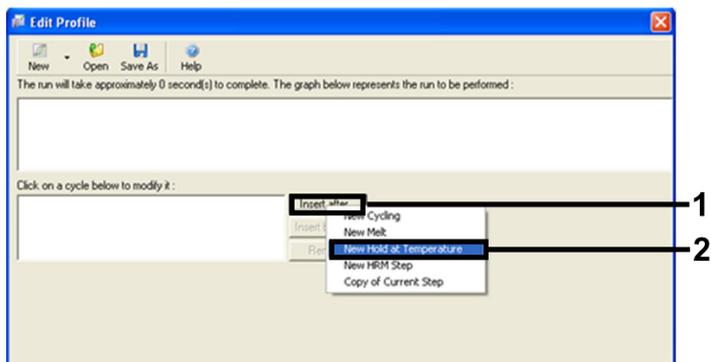


Abbildung 4. Einfügen eines ersten Inkubationsschritts.

7. Stellen Sie die Werte im Feld Hold Temperature (Haltetemperatur) auf 95 °C und den Wert unter Hold Time (Haltedauer) auf 15 mins 0 secs (15 Min. 0 Sek.) ein. Klicken Sie auf Insert after (Einfügen nach) und wählen Sie dann New Cycling (Neuer Zyklus) (Abbildung 5).

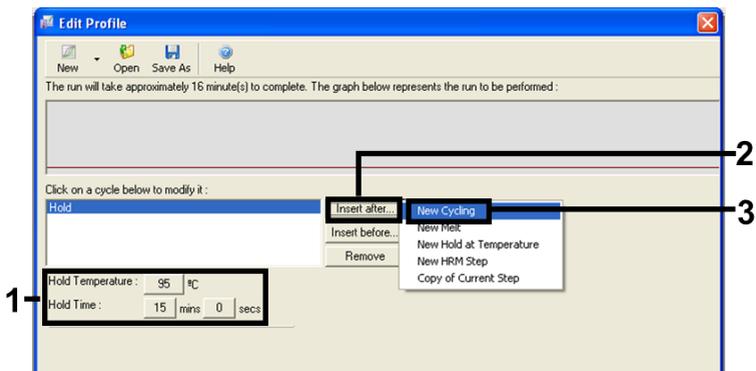


Abbildung 5. Erster Inkubationsschritt bei 95 °C.

8. Stellen Sie die Anzahl der Zykluswiederholungen auf 40 ein. Wählen Sie den ersten Schritt aus und stellen Sie diesen auf 30 Sek. bei 95 °C ein (Abbildung 6).

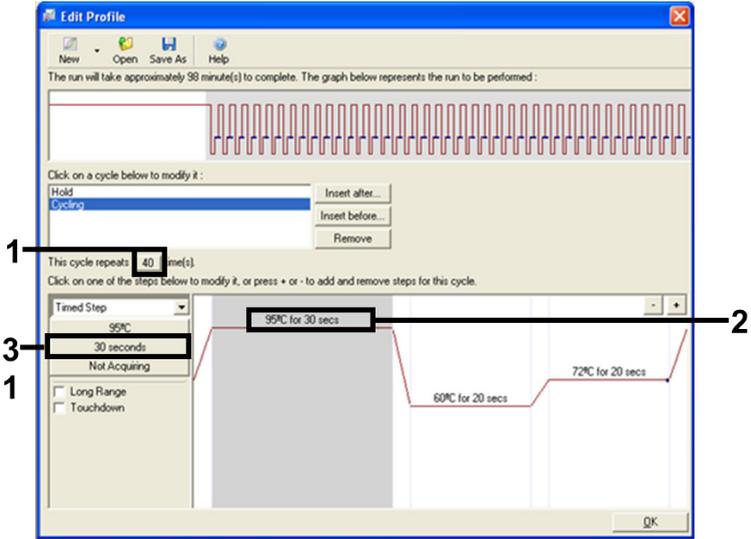


Abbildung 6. Zyklusschritt bei 95 °C.

9. Markieren Sie den zweiten Schritt und stellen Sie diesen auf 60 Sek. bei 60 °C ein. Klicken Sie auf Not Acquiring (Keine Erfassung), um die Datenerfassung für diesen Schritt zu aktivieren. (Abbildung 7).

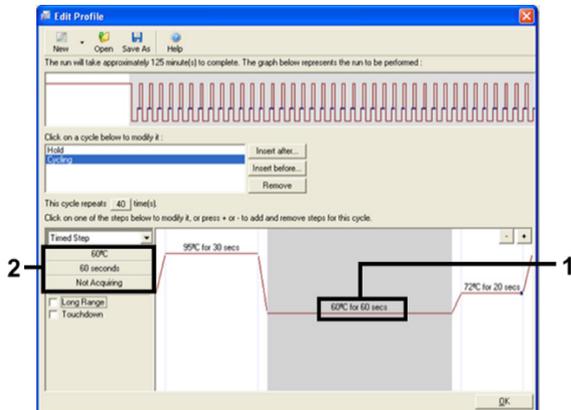


Abbildung 7. Zyklusschritt bei 60 °C.

10. Wählen Sie aus der Liste Variable Channels (Verfügbare Kanäle) Green (Grün) und Yellow (Gelb) aus. Klicken Sie dann auf >, um sie in die Liste Acquiring Channels (Erfassende Kanäle) zu verschieben. Klicken Sie auf OK (Abbildung 8).

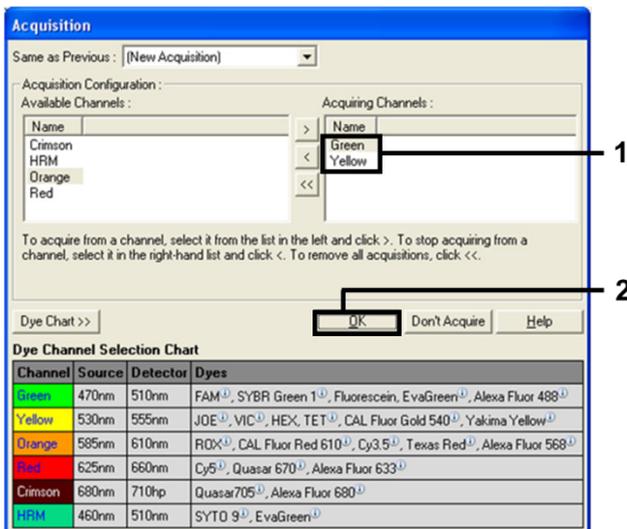


Abbildung 8. Erfassung im Zyklusschritt bei 60 °C.

11. Markieren Sie den dritten Schritt und klicken Sie auf die Schaltfläche -, um diesen zu löschen. Klicken Sie auf OK (Abbildung 9).

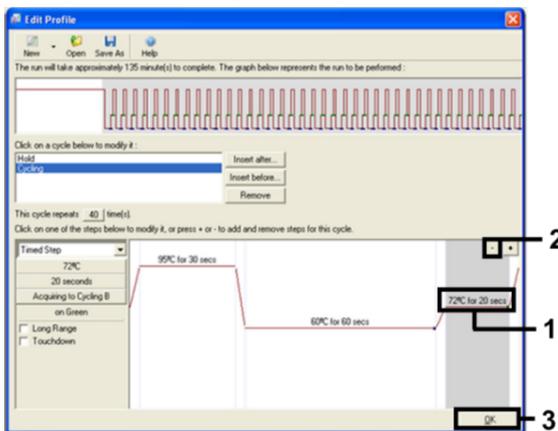


Abbildung 9. Entfernen des Verlängerungsschrittes.

12. Klicken Sie im nächsten Dialogfeld auf Gain Optimisation (Verstärkungsoptimierung) (Abbildung 10).

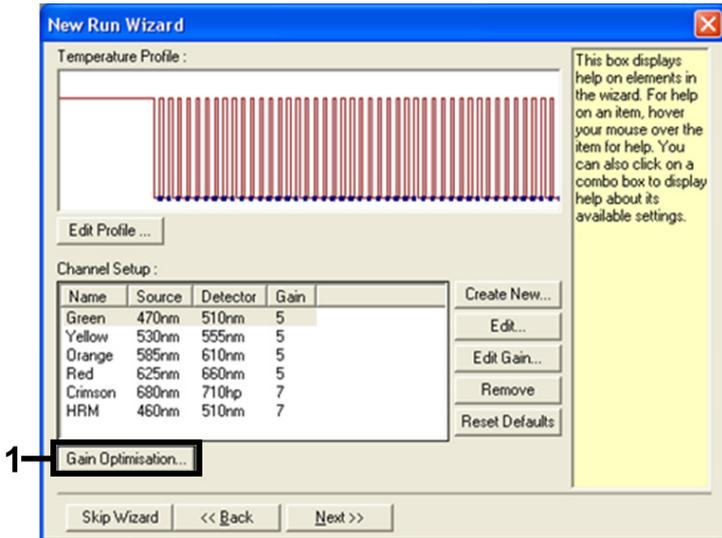


Abbildung 10. „Gain Optimization“ (Verstärkungsoptimierung).

13. Klicken Sie auf Optimise Acquiring (Erfassung optimieren). Es werden für jeden Kanal die Kanaleinstellungen angezeigt. Klicken Sie auf OK, um diese Standardwerte für beide Kanäle zu akzeptieren. (Abbildung 11).

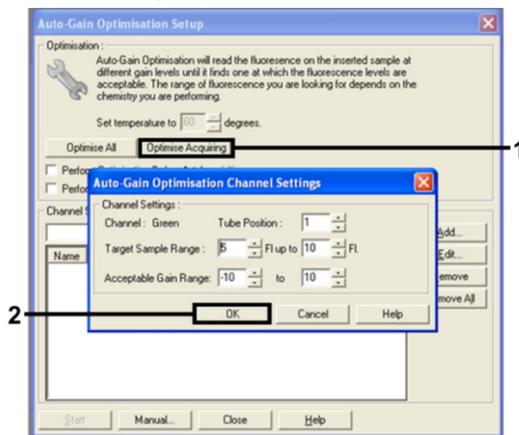


Abbildung 11. Automatische Verstärkungsoptimierung für den Kanal Green.

14. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen Perform Optimisation before 1st Acquisition (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen) und klicken Sie dann auf Close (Schließen), um zum Assistenten zurückzukehren (Abbildung 12).

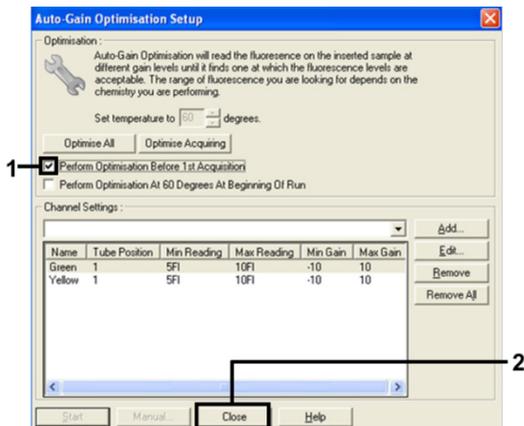


Abbildung 12. Auswahl der Kanäle Green (Grün) und Yellow (Gelb).

15. Klicken Sie auf Next (Weiter), um die Vorlage am gewünschten Speicherort zu speichern. Klicken Sie dazu auf „Save Template“ (Vorlage speichern).

Analyse der Daten aus der Mutationsbestimmung

Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß dem folgenden Verfahren.

Einrichtung der Software-Analyse

1. Öffnen Sie über die Rotor-Gene Q Series Software der Version 2.3.5 oder höher die entsprechende Datei.
2. Falls vor dem Lauf noch keine Probenamen eingegeben wurden, klicken Sie auf Edit Samples (Proben bearbeiten).
3. Geben Sie die Namen der Proben in die Spalte Name ein.
Hinweis: Für leere Wells sollte kein Name eingetragen werden.
4. Klicken Sie auf Analysis (Analyse). Klicken Sie auf der Analysenseite auf Cycling A Yellow, um den HEX-Kanal zu aktivieren.
5. Stellen Sie sicher, dass die Option Dynamic Tube (Dynamisches Röhrchen) aktiviert ist. Klicken Sie auf Slope Correct (Steigungskorrektur) und Linear Scale (Linearer Bereich).
6. Klicken Sie auf Take Off Adj (Ausgangspunkt anpassen) und geben Sie 15.01 und 20.01 ein, wie in Abbildung 13 gezeigt.

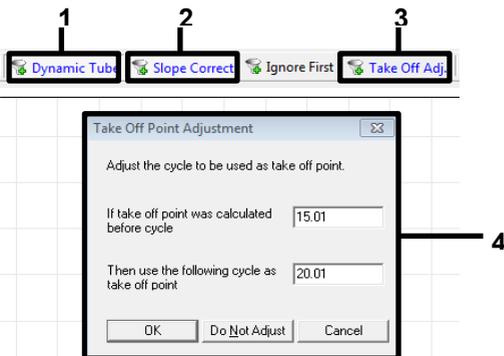


Abbildung 13. Normalisierungseinstellungen für die EGFR-Analyse. 1 = „Dynamic Tube“ (Dynamisches Röhrchen), 2 = „Slope Correct“ (Steigungskorrektur), 3 = „Take Off Adj“ (Ausgangspunkt anpassen), 4 = Dialogfenster „Take Off Adj“ (Anpassung des Ausgangspunkts) mit Parameterwerten.

7. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0,02 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte für HEX.

8. Klicken Sie auf der Analysenseite auf Cycling A, Green, um den FAM-Kanal anzuzeigen. Stellen Sie die Parameter wie in Abbildung 13 oben gezeigt ein.
Das dynamische Röhrchen sollte markiert sein.
9. Klicken Sie auf Slope Correct (Steigungskorrektur) und Linear Scale (Linearer Bereich).
10. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0.075 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte für FAM.

Analyse der Laufkontrollen

Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs wie folgt.

- **Negativkontrolle:** Um eine Template-Kontamination auszuschließen, darf der C_T -Wert der NTC im grünen Kanal (FAM) nicht unter 40 liegen. Um sicherzustellen, dass der Lauf korrekt eingerichtet wurde, muss die NTC im gelben Kanal (HEX; interne Kontrolle) eine Amplifikation von 29,85 bis 35,84 aufweisen.
Wenn eine positive Amplifikation im grünen Kanal vorliegt und/oder die Amplifikation im gelben Kanal außerhalb des Bereichs von 29,85 bis 35,84 liegt, ist der Lauf ungültig.
- **Positivkontrolle:** Die EGFR-Positivkontrolle (Positive Control, PC) muss für jedes Reaktionsgemisch einen C_T -Wert in dem in Tabelle 5 angegebenen Bereich ergeben. Liegt der Positivkontrollwert in einem Lauf außerhalb dieses Bereichs, weist dies auf ein Problem mit der Assay-Konfiguration hin, und der Lauf sollte als fehlgeschlagen betrachtet werden. Wenn der C_T -Wert der Positivkontrolle im Bereich (FAM) liegt, aber der C_T -Wert (HEX) einer internen Kontrolle außerhalb des Bereichs von 29,85 bis 35,84 liegt, fahren Sie mit der Analyse fort.
Hinweis: Die Probanddaten dürfen nicht verwendet werden, wenn die Negativ- oder Positivkontrolle fehlgeschlagen ist.

Tabelle 5. Zulässiger C_T-Bereich für Laufkontrollen

Reaktionskontrolle	Assay	Kanal	C _T -Bereich
Positivkontrolle	Kontrolle	Green (FAM)	28,13-34,59
	T790M	Green (FAM)	30,22-34,98
	Deletionen	Green (FAM)	28,90-34,90
	L858R	Green (FAM)	29,97-34,81
Kontrolle ohne Template	Alle vier Reaktionsgemische	Green (FAM)	≥ 40,00
	Alle vier Reaktionsgemische	Yellow (HEX)	29,85–35,84

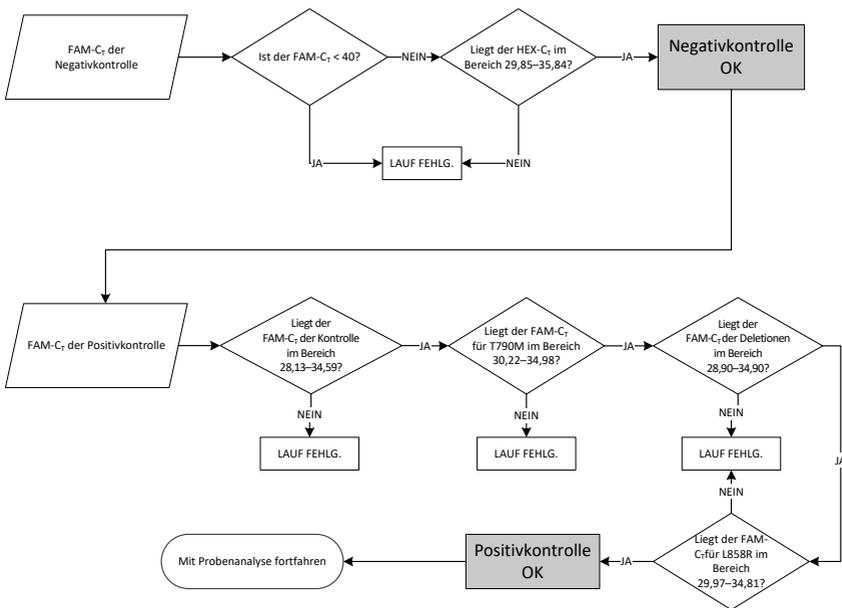


Abbildung 14. Arbeitsablauf zur Analyse der Laufkontrollen.

Wenn beide Laufkontrollen gültig sind, muss der CT-Wert jedes Probenkontrollassays im grünen Kanal (FAM) zwischen 23,70 und 31,10 liegen (Tabelle 6).

Tabelle 6. Zulässiger FAM-C_T-Bereich für die Probenkontrollreaktion

Reaction mix (Reaktionsgemisch)	Kanal	Zulässiger C _T -Bereich
Kontrolle	Green (FAM)	23,70–31,10

Wenn die Probe außerhalb dieses Bereichs liegt, gehen Sie wie folgt vor.

- C_T-Wert des Probenkontrollassays < 23,70: Proben mit einem Kontroll-C_T von < 23,70 müssen verdünnt werden, da sie die Mutationsassays sonst überlasten würden. Damit die verschiedenen Mutationen schon in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden können, müssen übermäßig hoch konzentrierte Proben so verdünnt werden, dass sie im oben angegebenen Bereich liegen. Als Faustregel hierbei gilt, dass eine Verdünnung um die Hälfte den C_T-Wert um 1 erhöht.
- C_T-Wert des Probenkontrollassays > 31,10: Die Probe enthält nicht ausreichend DNA für eine Analyse.

Wenn beide Laufkontrollen gültig sind und der Kontrollassay im in Tabelle 6 angegebenen Bereich liegt, muss der C_T-Wert jeder Probenmutation im grünen Kanal (FAM) innerhalb des in Tabelle 7 angegebenen Bereichs liegen. Wenn die Probe außerhalb dieses Bereichs liegt, gehen Sie wie folgt vor.

Tabelle 7. Zulässige Werte für Probenmutationsreaktionen

Reaktion	Reaction mix (Reaktionsgemisch)	Kanal	C _T -Bereich
Mutationsreaktion	T790M	Green (FAM)	0,00-40,00
	Deletionen	Green (FAM)	0,00-40,00
	L858R	Green (FAM)	0,00-40,00
	Alle drei Mutationen	Yellow (HEX)	29,85–35,84

Hinweis: Wenn eine Probe keinen ausreichend hohen C_T (d. h. $C_T > 40$) ergibt, kann dies darauf zurückzuführen sein, dass ein Inhibitor vorhanden ist, bei der Assay-Konfiguration ein Fehler aufgetreten ist oder dass keine amplifizierbare EGFR-DNA vorhanden ist.

- C_T -Wert der internen Kontrolle liegt im Bereich 29,85 bis 35,84: Es ist keine amplifizierbare EGFR-DNA vorhanden.
- C_T -Wert der internen Kontrolle liegt nicht im Bereich von 29,85 bis 35,84: Dies könnte einen Fehler bei der Assay-Konfiguration oder die Gegenwart eines Inhibitors anzeigen. Die Wirkung eines Inhibitors kann zwar durch Verdünnung der Probe verringert werden, allerdings ist zu beachten, dass dadurch auch die DNA verdünnt wird.

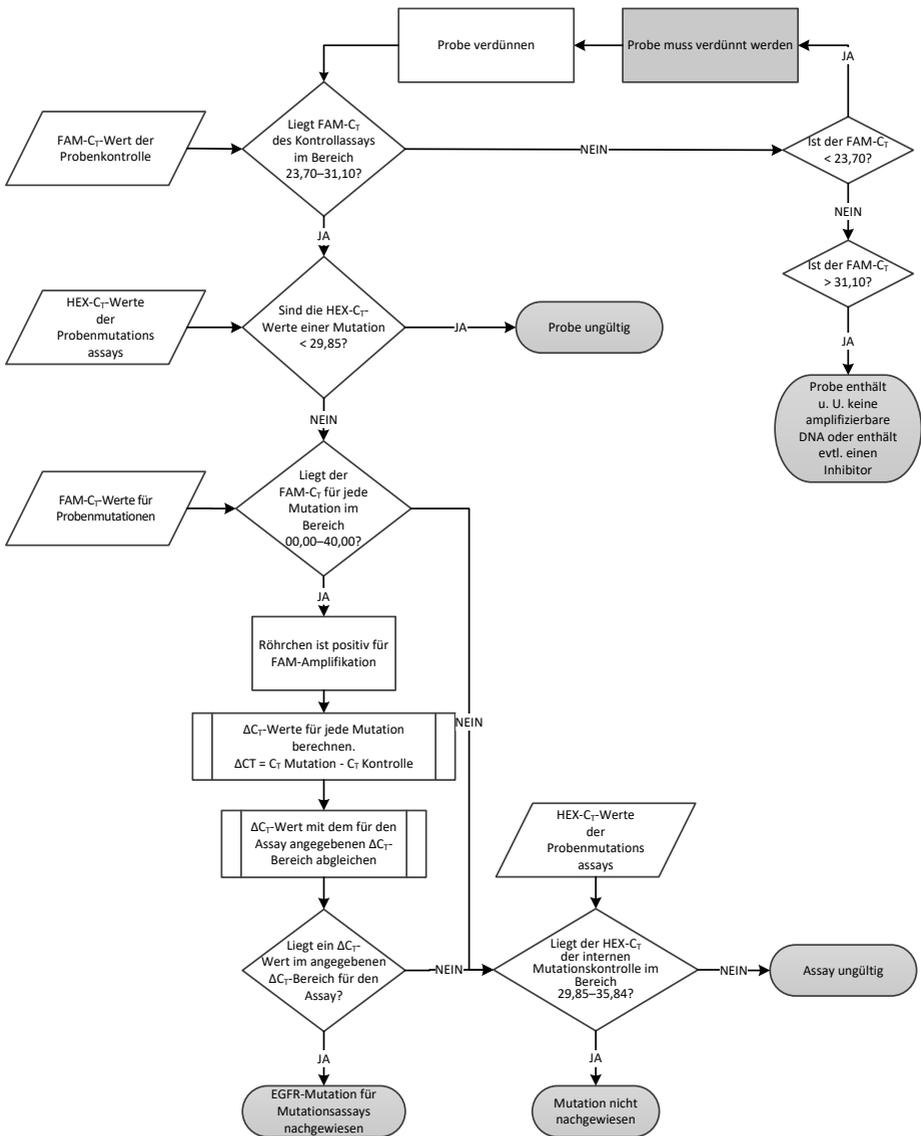


Abbildung 15. Flussdiagramm der Mutationsanalyse.

FAM-C_T-Wert der Probenmutationsassays

Die FAM-Werte aller drei Mutationsreaktionsgemische sind mit den in Tabelle 8 aufgeführten Werten zu vergleichen.

Berechnen Sie für jede Mutationsprobe mit einer positiven Amplifikation wie folgt den ΔC_T -Cut-off-Wert und achten Sie darauf, dass die Mutations- und Kontroll-C_T-Werte von derselben Probe stammen.

$$\Delta C_T = \text{Mutations-C}_T - \text{Kontroll-C}_T$$

Vergleichen Sie den ΔC_T -Wert der Probe mit dem ΔC_T -Cut-off-Bereich des jeweiligen Assays (Tabelle 8) und achten Sie darauf, dass für jeden Assay der korrekte Cut-off-Wert verwendet wird.

Tabelle 8. ΔC_T -Cut-off-Bereiche der Mutationsassays

Mutationsassay	ΔC_T -Cut-off-Bereich
T790M	-10,00 \geq bis \leq 7,40
Deletionen	-10,00 \geq bis \leq 8,00
L858R	-10,00 \geq bis \leq 8,90

Ist der obere Grenzwert des ΔC_T -Cut-off-Bereichs überschritten, so könnte ein positives Signal auch nur ein Hintergrundsignal des ARMS-Primers bei Wildtyp-DNA sein. Liegt der ΔC_T -Wert der Probe höher als der obere Grenzwert des ΔC_T -Cut-off-Bereichs, so wird sie als „Mutation not detected“ (Mutation nicht nachgewiesen) oder außerhalb der Nachweisgrenze des Kits eingestuft. Liegt der Wert der Probe innerhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs, so wird die Probe als positiv für die in diesem Assay getestete Mutation eingestuft. Liegt der Wert der Probe unterhalb des unteren Grenzwerts des ΔC_T -Cut-off-Bereichs, könnte der Grund dafür ein Fluoreszenzartefakt sein.

Hinweis: Bei Proben, die keinen C_T -Wert für die FAM-Mutation zeigen, muss der C_T -Wert der internen Kontrolle (HEX) evaluiert werden, um zu bestimmen, ob die Mutation nicht nachgewiesen wurde oder der Assay ungültig ist. Wenn der HEX- C_T -Wert zwischen 29,85 und 35,84 liegt, wurde die Mutation nicht nachgewiesen. Liegt der HEX- ΔC_T -Cut-off-Wert jedoch außerhalb dieses Bereichs, so ist die Probe ungültig.

Es werden also alle Mutationsreaktionen für jede Probe nach den folgenden Kriterien mit dem Status „Mutation detected“ (Mutation nachgewiesen), „Mutation not detected“ (Mutation nicht nachgewiesen) oder „Invalid“ (Ungültig) bewertet.

- Mutation nachgewiesen: Die FAM-Amplifikation ist positiv und der ΔC_T -Wert liegt innerhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs. Wenn mehrere Mutationen nachgewiesen werden, können alle angegeben werden.
- Mutation nicht nachgewiesen:
 - Die FAM-Amplifikation ist positiv, der ΔC_T -Cut-off-Wert liegt oberhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs und der HEX-Wert (interne Kontrolle) liegt im Bereich 29,85–35,84.
 - Die FAM-Amplifikation ist negativ und der HEX-Wert (interne Kontrolle) liegt im Bereich 29,85–35,84.
- Ungültig: Die FAM-Amplifikation ist negativ und die HEX-Amplifikation liegt außerhalb des zulässigen Bereichs.
 - Der berechnete ΔC_T -Wert liegt unterhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs und der HEX-Wert (interne Kontrolle) liegt innerhalb des erwarteten Bereichs. Ein ΔC_T -Wert unter -10,00 deutet darauf hin, dass ein Fluoreszenzartefakt aufgetreten sein könnte.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In dem vorliegenden Abschnitt „Hilfe zur Fehlerbehebung“ finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen, FAQ) unseres TechniksUPPORT-Zentrums unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Die Wissenschaftler des Technischen Service von QIAGEN helfen Ihnen in allen Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Assay-Technologien gerne weiter (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Kein Signal mit der EGFR-Positivkontrolle (Positive Control, PC) im Fluoreszenzkanal „Cycling Green“

- | | |
|--|---|
| a) Der ausgewählte Fluoreszenzkanal für die PCR-Auswertung entspricht nicht dem Protokoll. | Wählen Sie bei der Datenanalyse für die analytische EGFR-PCR-Reaktion den Fluoreszenzkanal „Cycling Green“ und für die PCR-Reaktion der internen Kontrolle den Fluoreszenzkanal „Cycling Yellow“. |
| b) Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils für das Rotor Gene Q MDx 5plex HRM Instrument. | Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll und wiederholen Sie den Lauf, wenn das Profil nicht korrekt ist. |
| c) Fehlerhafte Konfiguration der PCR | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte anhand des Pipettierschemas und wiederholen Sie ggf. die PCR. |
| d) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Komponenten des Kits stimmen nicht mit den Anweisungen im Abschnitt „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 14 überein. | Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit. |
| e) Das <i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit ist abgelaufen. | Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit. |

Kommentare und Vorschläge

Signale bei den Negativkontrollen im Fluoreszenzkanal und bei Cycling Green der analytischen PCR

- a) Kontamination bei Vorbereitung der PCR
- Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit neuen Reagenzien.
- Verschließen Sie die PCR-Röhrchen möglichst sofort nach der Zugabe der zu testenden Probe.
- Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

Mehrere Grenzwertüberschreitungen oder ΔC_T -Wert unterhalb des Cut-off-Bereichs

- a) Falsches Mischen während der Assaykonfiguration
- Wiederholen Sie die PCR, falls dies eine Kontrolle oder eine im Wiederholungstest fehlgeschlagene Probe betrifft.
- Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung und achten Sie besonders auf die Mischschritte.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Einschränkungen

Zur Auswertung der mit dem Produkt erhaltenen Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen und labortechnischen Daten berücksichtigt werden. Die Ergebnisse dürfen nicht alleine für die Diagnose verwendet werden.

Das Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die für die Anwendung in-vitro-diagnostischer Verfahren und das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument speziell eingewiesen und geschult wurden.

Es wurden analytische Validierungsstudien unter Verwendung humaner DNA durchgeführt, die aus Plasmaproben extrahiert wurde.

Das Produkt ist ausschließlich für die Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Real-time-PCR-Thermocycler vorgesehen.

Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse müssen die Anweisungen im Handbuch zum *therascreen EGFR Plasma RGQ PCR Kit* genau befolgt werden. Eine Verdünnung der Reagenzien, die von den in diesem Handbuch beschriebenen Anweisungen abweicht, ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führt.

Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Die Primer im Reaktionsgemisch für die EGFR-Deletionen wurden so konzipiert, dass sie auf mehrere Deletionen in Exon 19 zwischen den Nukleotiden 55174772 und 55174795 (GRCh38 chr7) abzielen, einen Bereich von 23 bp.

Obwohl der Exon-19-Deletionsassay analytisch validiert und der Nachweis spezifischer Deletionen in Exon 19 demonstriert wurde (siehe Tabelle 13 in diesem Handbuch), ist nicht auszuschließen, dass das Deletionsreaktionsgemisch auch andere Mutationen (einschließlich, aber nicht beschränkt auf, weitere Deletionen in Exon 19, Insertionen in Exon 19 und der L747P-Mutation) amplifiziert.

Sollten solche Mutationen vorhanden sein, würden sie für die entsprechende Patientenprobe zu dem Ergebnis „Deletions Detected“ (Deletionen nachgewiesen) führen.

Weiterhin ist es möglich, dass die L858Q-Mutation durch das L858R-Reaktionsgemisch detektiert wird. In einer entsprechenden Patientenprobe könnte daher die L858Q-Mutation zu dem Ergebnis „L858R Mutation Detected“ (L858R-Mutation nachgewiesen) führen.

Leistungsmerkmale

Analytische Sensitivität – Leerwertgrenze (Limit of Blank, LOB)

Aus NSCLC-Plasma gewonnene EGFR-Wildtyp-DNA aus 59 verschiedenen Proben wurde untersucht, um die Leistung des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits in der Abwesenheit von Templates zu bestimmen und um sicherzustellen, dass eine Leerprobe oder eine Probe mit Wildtyp-DNA kein analytisches Signal liefert, das eine niedrige Mutationskonzentration anzeigen könnte. Die Akzeptanzkriterien der Studie (der ΔC_T -Wert musste bei mindestens 95 % der Wildtypproben über dem jeweiligen Cut-off-Wert liegen) wurden erfüllt.

Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD)

Die LOD ist der Mindestprozentsatz an mutierter DNA, der in einem Hintergrund von Wildtyp-DNA noch nachgewiesen werden kann, vorausgesetzt, die Gesamtmenge an amplifizierbarer DNA (geeignete Ausgangsmenge) liefert bei jeder mutationspositiven Probe mit 95 % korrekte Mutationsbestimmungen (C95). Die DNA-Ausgangsmengen des Assays werden durch den Kontroll- C_T -Wert im vorgegebenen Bereich von 23,70 bis 31,10 definiert.

Die LOD für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wurde bei einer niedrigen Ausgangsmenge (Kontroll- C_T ca. 30,10) von DNA bestimmt, die aus FFPE-Gewebe extrahiert wurde. Die LOD wurde unter Verwendung von sowohl klinischen FFPE-Spezimen als auch FFPE-Zelllinien mit niedrigen DNA-Ausgangsmengen für diese EGFR-Mutationen bestimmt.

Die mit FFPE-Gewebe bestimmten LOD-Werte wurden für das *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit mit DNA validiert, die aus künstlich hergestellten mutationspositiven Plasmaproben extrahiert wurde.

Die endgültigen LODs, die in Tabelle 9 auf der nächsten Seite aufgeführt sind, geben den prozentualen Mutationsanteil an, der bei den einzelnen Mutationen eine voraussichtliche Wahrscheinlichkeit korrekter Bestimmungen von 95 % ergab.

Tabelle 9. LODs für die EGFR-Mutationsassays

Exon	Mutation	COSMIC-ID*	Angegebene LOD in %
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	Deletionen	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*

* Die angegebenen LODs wurden im Rahmen der Bestätigungsstudie für die LODs des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits validiert.

[†] Diese Mutationen wurden nicht in Plasma bestätigt.

Analytische Sensitivität – ΔC_T -Cut-off-Werte und ΔC_T -Cut-off-Bereich

Bei der Festlegung der Assay-Cut-off-Werte wurde im Hinblick auf Falsch-positiv-Raten ein risikobasierter Ansatz gewählt; unter anderem die geschätzten LOBs flossen in die Entwicklung der Cut-off-Werte ein.

Die jeweiligen ΔC_T -Cut-off-Wertebereiche, etabliert für die einzelnen Mutationsassays im *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit, sind in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10. ΔC_T -Cut-off-Bereiche des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits

Mutationsassay	ΔC_T -Cut-off-Bereich
T790M	-10,00 \geq bis \leq 7,40
Deletion	-10,00 \geq bis \leq 8,00
L858R	-10,00 \geq bis \leq 8,90

Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit

Wiederholpräzision und Reproduzierbarkeit wurden durch Testen eines der 3x LOD entsprechenden Mutationsgrades in einem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA bestimmt. Die Tests wurden an drei verschiedenen Standorten unter Verwendung mehrerer Kitchargen, Bediener und Läufe an verschiedenen Tagen mit zwei Replikaten pro Probe durchgeführt. Für alle drei Mutationsassays wurden 100 % der Proben mit mutierter DNA positiv auf Mutationen getestet. Die Wildtyp-Proben waren in allen Assays und an allen Standorten mutationsnegativ.

Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die C_T -Werte

Die DNA-Ausgangsmenge ist definiert als die Gesamtmenge amplifizierbarer EGFR-DNA in einer Probe. Als Bestimmungsgrundlage werden die C_T -Werte der Kontrollreaktion herangezogen. Um nachzuweisen, dass die Leistung des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits über den gesamten C_T -Bereich der Kontrollreaktion (23,70–31,10) konstant ist, wurden alle drei EGFR-Mutationsassays gegen eine aus sechs Punkten bestehende 1:3-Verdünnungsreihe getestet (aus FFPE-Zelllinien extrahierte DNA). Der C_T -Zielwert für die erste Verdünnung betrug für jede Mutation etwa 24,70. Die letzte Verdünnung, die einen C_T -Wert von etwa 32–33 ergab, lag außerhalb des C_T -Bereichs der Kontrollreaktion. Die für unterschiedliche DNA-Gesamtangabemengen gemessenen ΔC_T -Cut-off-Werte waren über den Messbereich des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits konsistent.

Störsubstanzen

Endogene Störsubstanzen

Künstlich hergestellte mutationspositive Plasmaproben bei 3x LOD wurden mit potenziellen Störsubstanzen versetzt. Anschließend wurden die Proben mit dem *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit getestet. Die Proben, die die potenziellen Störsubstanzen enthielten, wurden mit künstlich hergestellten mutationspositiven Plasmaproben bei 3x LOD verglichen, die nicht mit Störsubstanzen versetzt worden waren. Jede Störsubstanz wurde mit 4 Replikaten getestet.

Ein Unterschied im ΔC_T -Wert von $> 2x$ Standardabweichungen (Standard Deviation, SD) (aus der Genauigkeitsprüfung) zwischen dem „Test“ und der „Kontrolle“ (d. h. ohne Störsubstanz) wurde als Grenzwert betrachtet, der eine potenzielle Störung anzeigt. In diesen Fällen ist die beobachtete ΔC_T -Differenz angegeben.

Die in Tabelle 11 aufgeführten Testkonzentrationen wurden nach den Empfehlungen der CLSI-Richtlinie EP07-A2 gewählt und sind repräsentativ für die Höchstkonzentrationen, die in klinischen Proben zu erwarten sind.

Hinweis: Diese endogenen Verbindungen wurden zu künstlich hergestellten mutationspositiven Plasmaproben gegeben, deren Plasma von gesunden Spendern stammte. Diese endogenen Verbindungen waren daher wahrscheinlich bereits vor ihrer Zugabe in unbekannter Konzentration natürlicherweise in den Proben vorhanden. Die tatsächlich getestete Endkonzentration der einzelnen potenziellen endogenen Störsubstanzen war somit wahrscheinlich höher als die Testkonzentration.

Tabelle 11. Potenzielle endogene Störsubstanzen

Potenzielle Störsubstanzen (IS)	Testkonzentration
Unkonjugiertes Bilirubin	15 mg/dl
Hämoglobin (human)	0,2 g/dl
Triglyceride	3 g/dl

T790M-Assay

Die folgenden endogenen Verbindungen hatten in den in Tabelle 11 aufgeführten Konzentrationen einen Effekt von $> 2 \times SD$ ($0,40 \Delta C_T$) auf die Leistung des T790M-Assays:

- Triglyceride, Differenz von $1,37 \Delta C_T$

Deletionsassay

Die folgenden endogenen Verbindungen hatten in den in Tabelle 11 aufgeführten Konzentrationen einen Effekt von $> 2 \times \text{SD}$ ($0,71 \Delta C_T$) auf die Leistung des Deletionsassays:

- Hämoglobin, Differenz von $0,80 \Delta C_T$

L858R-Assay

Die folgenden endogenen Verbindungen hatten in den in Tabelle 11 aufgeführten Konzentrationen einen Effekt von $> 2 \times \text{SD}$ ($0,56 \Delta C_T$) auf die Leistung des L858R-Assays:

- Bilirubin, Differenz von $1,13 \Delta C_T$
- Triglyceride, Differenz von $1,53 \Delta C_T$

Exogene Störsubstanzen

Künstlich hergestellte mutationspositive Plasmaproben bei $3 \times \text{LOD}$ wurden mit potenziellen Störsubstanzen versetzt. Anschließend wurden die Proben mit dem *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit getestet. Die Proben, die die potenziellen Störsubstanzen enthielten, wurden mit künstlich hergestellten mutationspositiven Plasmaproben bei $3 \times \text{LOD}$ verglichen, die nicht mit Störsubstanzen versetzt worden waren. Jede Störsubstanz wurde mit 4 Replikaten getestet.

Ein Unterschied im ΔC_T -Wert von $> 2 \times$ Standardabweichungen (aus der Genauigkeitsprüfung) zwischen dem „Test“ und der „Kontrolle“ (d. h. ohne Störsubstanz) wurde als Grenzwert betrachtet, der eine potenzielle Störung anzeigt. In diesen Fällen ist die beobachtete ΔC_T -Differenz angegeben.

Die in Tabelle 12 aufgeführten Testkonzentrationen wurden nach den Empfehlungen der CLSI-Richtlinie EP07-A2 gewählt und liegen in allen Fällen über den therapeutischen Konzentrationen.

Tabelle 12. Potenzielle endogene Störsubstanzen

Potenzielle Störsubstanz	Testkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)
Citalopramhydrobromid	0,75
Paroxetinhydrochlorid-Hemihydrat	1,14
Sertralinhydrochlorid	0,67
Fluoxetinhydrochlorid	3,87
Acetaminophen	200,7
K ₂ -EDTA	3600

T790M-Assay

Die folgenden exogenen Verbindungen hatten in den in Tabelle 12 aufgeführten Konzentrationen einen Effekt von $> 2x$ SD ($0,40 \Delta C_T$) auf die Leistung des T790M-Assays:

- Citalopramhydrobromid, Differenz von $0,52 \Delta C_T$
- Sertralinhydrochlorid, Differenz von $0,47 \Delta C_T$
- Fluoxetinhydrochlorid, Differenz von $0,48 \Delta C_T$

Deletionsassay

Die folgenden exogenen Verbindungen hatten in den in Tabelle 12 aufgeführten Konzentrationen einen Effekt von $> 2x$ SD ($0,71 \Delta C_T$) auf die Leistung des Deletionsassays:

- Fluoxetin, Differenz von $0,73 \Delta C_T$

L858R-Assay

Die folgenden exogenen Verbindungen hatten in den in Tabelle 12 aufgeführten Konzentrationen einen Effekt von $> 2 \times SD$ ($0,56 \Delta C_T$) auf die Leistung des L858R-Assays:

- Citalopramhydrobromid, Differenz von $0,72 \Delta C_T$
- Paroxetinhydrochlorid-Hemihydrat, Differenz von $0,92 \Delta C_T$
- Sertralinhydrochlorid, Differenz von $0,82 \Delta C_T$
- Fluoxetinhydrochlorid, Differenz von $0,98 \Delta C_T$
- Acetaminophen, Differenz von $0,81 \Delta C_T$
- K_2 -EDTA, Differenz von $0,57 \Delta C_T$

Klinische Leistungsmerkmale

Die klinische Studie NCT01203917 war eine offene, einarmige Phase-IV-Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit/Verträglichkeit von Gefitinib als Erstlinientherapie bei europäischen Patienten mit EGFR-mutationspositivem NSCLC im Stadium IIIA/B/IV.

Ob Patienten zur Aufnahme in die Studie NCT01203917 infrage kamen, wurde anhand des Vorliegens von die EGFR-Empfindlichkeit erhöhenden Mutationen bestimmt. Der EGFR-Mutationsstatus der NSCLC-Patienten wurde mit dem Assay im Rahmen der klinischen Studie (Clinical Trial Assay, CTA) unter Verwendung von DNA aus patientengleichen Gewebe- und Plasmaproben bestimmt. Die Studie umfasste eine vorher geplante Zielsetzung für explorative Biomarker, um zu ermitteln, ob Plasmaproben zur Mutationsanalyse herangezogen werden können, wenn keine Gewebeproben verfügbar sind. Die Ergebnisse zeigten ein mit 94,3 % hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den patientengleichen Gewebe- und Plasmaproben; die Assay-Spezifität lag bei 99,8 % und die Sensitivität bei 65,7 %.

Plasmaspezimen von Patienten, die für die klinische Studie NCT01203917 gescreent worden waren, wurden mit dem *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit retrospektiv getestet. Es wurde eine Überbrückungsstudie durchgeführt, um die Übereinstimmung des *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kits mit dem CTA zu beurteilen, der zur Auswahl der Patienten für die Studie NCT01203917 verwendet worden war. Darin wurde die Gleichwertigkeit von CTA und *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit nachgewiesen.

Literatur

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

Kontakt

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem technischen Support-Center unter www.qiagen.com/Support. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000, oder wenden Sie sich an eine der Abteilungen des Technischen Service von QIAGEN oder an örtliche Händler (siehe hintere Umschlagseite oder www.qiagen.com).

Symbole

Die folgenden Symbole können in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet werden:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 Σ \triangle <N>	Reagenzien ausreichend für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer (z. B. Kennzeichnung von Komponenten)
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Internationale Artikelnummer
Rn	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Temperaturbegrenzung
	Hersteller

Symbol

Bedeutung des Symbols



Gebrauchsanweisung beachten



Warnung/Vorsicht

Anhang A: Weitere Informationen zu Mutationen

In Tabelle 13 sind die COSMIC-IDs aufgeführt, die dem Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic) entnommen wurden.

Tabelle 13. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs

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

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit – für den Nachweis von Mutationen im EGFR-Gen		
<i>therascreen</i> EGFR Plasma RGQ PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: 1 Kontrollassay, 7 Mutationsassays, Positivkontrolle, Taq-DNA-Polymerase	870311
Rotor-Gene Q MDx und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (Grün, Gelb, Orange, Rot, Dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Plattform	Real-time PCR-Thermocycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (Grün, Gelb, Orange, Rot, Dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002032

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionsvorbereitung mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen	981106
Zugehörige Produkte		
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Für 50 Präparationen: QIAamp Mini Columns, Röhrchenverlängerungen (20 ml), QIAGEN Proteinase K, Carrier-RNA, Puffer, VacConnectors und Collection Tubes (1,5 ml und 2 ml)	55114

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Revisionsverlauf des Dokuments

Revision	Beschreibung
R4, Oktober 2019	<p>Hersteller i. S. d. Gesetzes geändert (Titelseite).</p> <p>Namen des Instruments von Rotor-Gene Q MDx zu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM geändert, um Übereinstimmung mit dem Geräteetikett zu erreichen.</p> <p>Lagerungsvorschriften für die Reagenzien von 90 Tagen auf 12 Monate oder bis Ablauf des Verfallsdatums korrigiert.</p> <p>Abschnitt „Einschränkungen“ um Informationen zum Exon-19-Deletionsassay und dem L858R-Assay ergänzt.</p> <p>In Tabelle 9 doppelte L858R-Mutation in Exon 21 durch Exon-19-Deletionen ersetzt.</p> <p>Symbol „EC + REP“ von der Titelseite und aus dem Abschnitt „Symbole“ entfernt.</p>
R5, Juni 2020	<p>Hinweis auf RGQ Softwareversion von „2.3“ zu „2.3.5 oder höher“ geändert.</p> <p>Tabellen 8 und 10 aktualisiert, um den neuen ΔC_T-Cut-off-Bereich zu implementieren, und alle relevanten Beschreibungen im gesamten Handbuch entsprechend angepasst.</p> <p>Alle Protokollkapitel aktualisiert, um Informationen hinsichtlich der Wichtigkeit des Mischens in die Abschnitte „Wichtige Hinweise vor Beginn“ aufzunehmen.</p> <p>Mischdetails in allen Mischschritten hervorgehoben.</p> <p>Dem Abschnitt „Protokoll: Nachweis von EGFR-Mutationen“ einen Mischschritt hinzugefügt.</p> <p>Den Fehlerbehebungsabschnitt um eine Lösung für mehrere Grenzwertüberschreitungen ergänzt.</p>
R6, Juni 2022	<p>Tabelle im Abschnitt „Störsubstanzen“ aktualisiert, um die Testkonzentration für unkonjugiertes Bilirubin von 150 auf 15 mg/dbl zu ändern</p>

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das *therascreen*[®] EGFR Plasma RGQ PCR Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen Käufer oder Benutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Panel gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Panel gehören, zu verwenden oder zu kombinieren. Davon ausgenommen sind Anwendungen, die in den mit dem Produkt oder diesem Handbuch gelieferten Protokollen und zusätzlichen Protokollen, die unter www.qiagen.com verfügbar sind, beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen. Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

Marken: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], *therascreen*[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®](QIAGEN Group); FAM[™], HEX[™] (Thermo Fisher Scientific Inc.); IRESSA[®] (AstraZeneca Group). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

June-2022 HB-1898-007 1127512DE © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

