

Juni 2020

therascreen[®] EGFR RGQ PCR Kit Handbuch



Version 2



In-vitro-Diagnostikum

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



874111



QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1,
40724 Hilden, DEUTSCHLAND



1121935DE

Inhalt

Verwendungszweck	5
Zusammenfassung und Erläuterung	6
Verfahrensprinzip	9
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	13
Kit-Inhalt	13
Zusätzlich benötigtes Material	14
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	16
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	16
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	18
Transportbedingungen	18
Lagerungsbedingungen	18
Lagerung und Handhabung der Spezimen	20
Verfahren	21
DNA-Extraktion und -Vorbereitung	21
Protokoll: Probenbestimmung	22
Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis	36
Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)	49
Markierungen des Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package	51
Hilfe zur Fehlerbehebung	55
Qualitätskontrolle	56
Einschränkungen	56

Leistungsmerkmale	58
Analytische Leistung.....	58
Leerwertgrenze (Limit of Blank, LOB), Arbeitsbereich, Cut-off-Werte und ΔC_T -Cut-off-Bereiche.....	58
Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte.....	59
Kreuzreaktivität	60
Genauigkeit: Vergleich mit der analytischen Referenzmethode.....	60
Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD).....	61
Störungen.....	63
Reproduzierbarkeit.....	64
Klinische Leistungsmerkmale.....	68
Klinische Ergebnisse: GIOTRIF®.....	68
Klinische Ergebnisse: IRESSA®.....	70
Literatur	73
Symbole	75
Anhang A: <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.....	76
Allgemeine Informationen	76
Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils.....	76
Verfahren (manuell).....	87
Protokoll: Probenbestimmung (manuell)	87
Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis (manuell).....	87
Protokoll: Rotor-Gene Q Konfiguration für das <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit.....	88
Interpretation der Ergebnisse (manuell)	93
Einstellungen für die Analyse in der Software.....	93

Analyse der Daten aus der Probenbestimmung.....	95
Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis	96
Anhang B: Installation der <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package Software	104
Kontakt.....	108
Bestellinformationen	109
Revisionsverlauf des Dokuments.....	111

Verwendungszweck

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist ein in-vitro-diagnostischer Test zur Detektion von 29 somatischen Mutationen im EGFR-Gen. Es ermöglicht die qualitative Bestimmung des Mutationsstatus in Tumorproben von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Die Ergebnisse sind zur Unterstützung bei der Identifizierung von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen vorgesehen, die von einer Behandlung mit EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren profitieren könnten.

Mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit werden DNA-Proben, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE-) Tumorgewebe von NSCLC-Patienten extrahiert wurden, auf einem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument getestet. Das Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

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

Zusammenfassung und Erläuterung

In menschlichen Karzinomen treten Mutationen des EGFR-Onkogens auf (1, 2). Es besteht ein Zusammenhang zwischen diesen Mutationen und der Therapieantwort auf bestimmte Tyrosinkinase-Inhibitoren (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) bei Patienten mit NSCLC (3–8). Diese Mutationen im EGFR-Onkogen kommen in der allgemeinen Population von NSCLC-Patienten in den USA, Europa oder Australien mit einer Häufigkeit von ungefähr 10 % und in Japan und Taiwan mit einer Häufigkeit von bis zu 30 % vor (1, 2, 9).

Beim *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit handelt es sich um ein gebrauchsfertiges Kit für den Nachweis von 29 Mutationen im krebsrelevanten EGFR-Gen mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System.

Das auf Scorpions® (10) und ARMS-Technologie (System der amplifizierungsresistenten Mutationen, Amplification Refractory Mutation System) (11) basierende *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ermöglicht den Nachweis von 29 Mutationen in den Exons 18, 19, 20 und 21 des EGFR-Onkogens in einem Hintergrund von genomischer Wildtyp-DNA (Tabelle 1). Dies umfasst insgesamt:

- 19 Deletionen in Exon 19 (Das Vorhandensein jeder der 19 Deletionen kann nachgewiesen werden, zwischen den einzelnen Varianten kann jedoch nicht unterschieden werden.)
- Drei Insertionen in Exon 20 (Das Vorhandensein jeder der drei Insertionen kann nachgewiesen werden, zwischen den einzelnen Varianten kann jedoch nicht unterschieden werden.)
- G719X (Das Vorhandensein von G719S, G719A oder G719C kann nachgewiesen werden, zwischen diesen kann jedoch nicht unterschieden werden.)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

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

Tabelle 1. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs

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

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 1. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs

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

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

** Die Mutationen COSM6254 (2239_2253del15) und COSM12369(2240_2254del15) führen zur Deletion von 15 Basenpaaren aus der EGFR-Sequenz. Beide Mutationen resultieren in der gleichen Endsequenz; eine Unterscheidung zwischen beiden ist daher nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Mutation COSM6254 (2239_2253del15) aus der neuesten COSMIC-Version (v83) entfernt. Beide Mutationen werden nun durch COSM12369 (2240_2254del15) repräsentiert. Dabei wird die HGVS-Richtlinie berücksichtigt, dass die dem 3' am nächsten gelegene Deletion zu repräsentieren ist. Der *therascreen* EGFR Test unterscheidet nicht zwischen den 19 Deletionsmutationen. Jedes positive Ergebnis wird als „Deletions“ (Deletionen) bezeichnet. Diese Veränderung ist nur für die Dokumentation von Bedeutung und wirkt sich nicht auf das Kit oder seine Fähigkeit, eine beliebige Einzelmutation nachzuweisen, aus.

Verfahrensprinzip

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit umfasst acht verschiedene PCR-Amplifikations-Reaktionsgemische: sieben mutationsspezifische Reaktionen in den Exons 18, 19, 20 und 21 des EGFR-Onkogens und eine Wildtyp-Kontrolle in Exon 2. Die Hauptbestandteile des Kits sind im Folgenden beschrieben.

ARMS

Die ARMS-Technologie 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 mit Hilfe der Scorpions-Technologie durchgeführt. Scorpions sind bifunktionelle Moleküle, die sich aus einem PCR-Primer und einer kovalent daran gebundenen Sonde zusammensetzen. Das Fluorophor in der 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, was zu einem nachweisbaren Anstieg der Fluoreszenz führt.

Kit-Zusammenstellung

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthält acht Assays:

- einen Kontrollassay (Control Reaction Mix, CTRL)
- sieben Mutationsassays

Alle Reaktionsgemische enthalten Reagenzien für den Nachweis der Zielsequenzen, die mit Carboxyfluorescein (FAM™) markiert sind, sowie einen internen Kontrollassay, der mit Hexachlorfluorescein (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, und 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

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit beruht auf einem Zwei-Schritt-Verfahren. Im ersten Schritt wird der Kontrollassay durchgeführt, um die gesamte amplifizierbare EGFR-DNA in einer Probe zu bestimmen. Im zweiten Schritt werden sowohl der Mutations- als auch der Kontrollassay durchgeführt, um zu bestimmen, ob mutierte DNA vorliegt.

Kontrollassay

Der mit FAM markierte Kontrollassay dient zur Bestimmung der gesamten amplifizierbaren EGFR-DNA in einer Probe. Der Kontrollassay amplifiziert eine Region von Exon 2 des EGFR-Gens. Bekannte EGFR-Polymorphismen werden aufgrund der Konzeption von Primer und Scorpions-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

Hinweis: In jedem Versuchslauf müssen Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt werden.

Positivkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrcchen 1–8 eine Positivkontrolle enthalten sein. Das *therascreen* EGFR 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 Röhrcchen 9–16 eine Negativkontrolle („Kontrolle ohne Template“, No Template Control, NTC) enthalten sein. Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthält Wasser als NTC, 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.

Interne Kontrollreaktion

Jedes Reaktionsgemisch enthält neben der Zielreaktion eine interne Kontrolle (Internal Control, IC). Eine fehlgeschlagene Kontrollreaktion zeigt an, dass entweder Inhibitoren vorhanden sind, die zu falschen Ergebnissen führen können, oder dass dem Bediener bei der Vorbereitung dieses Röhrcchens ein Fehler unterlaufen ist. Die interne Kontrolle verwendet eine nicht mit EGFR in Verbindung stehende Oligonukleotid-Zielsequenz, einen nicht markierten Primer und einen Scorpions-Primer, der HEX-markiert ist, um diesen von den FAM-markierten Scorpions in den Kontroll- und Mutations-Reaktionsgemischen zu unterscheiden. Die FAM-Amplifikation kann die konkurrierende Amplifikation der internen Kontrolle verdrängen, so dass der C_T -Wert (HEX) der internen Kontrolle außerhalb des zulässigen Bereichs liegen könnte. Die FAM-Ergebnisse sind für diese Proben weiterhin gültig.

Probenbestimmung

Wir empfehlen dringend, zur Bestimmung der gesamten in einer Probe enthaltenen amplifizierbaren EGFR-DNA das im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthaltene Kontrollreaktionsgemisch (Röhrchen CTRL) zu verwenden. Der Kontrollassay amplifiziert eine Region von Exon 2 des EGFR-Gens. Wir empfehlen, Proben ausschließlich mit dem Kontrollassay zu bestimmen, wobei die EGFR-PC als Positivkontrolle und Wasser als „Template“ für die Kontrolle ohne Template zu verwenden sind.

Hinweis: Die DNA-Bestimmung sollte auf Grundlage der PCR erfolgen und kann von der auf Extinktionsmessungen basierenden Quantifizierung abweichen. Ein zusätzliches Kontrollreaktionsgemisch (Röhrchen CTRL) ist enthalten, mit dem vor der Analyse mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit die Qualität und Quantität der DNA in den Proben bestimmt werden kann.

Plattform und Software

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist speziell für den Gebrauch mit den Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrumenten vorgesehen. Die verschiedenen Zyklusparameter bzw. „Läufe“ des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments werden mit der *therascreen* EGFR CE Assay Package Software programmiert.

Die *therascreen* EGFR CE Assay Package Software enthält zwei Vorlagen: „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ (für die Probenbestimmung) und „*therascreen* EGFR CE Locked Template“ (für den Nachweis von EGFR-Mutationen). Diese Vorlagen enthalten die PCR-Laufparameter und dienen zur Berechnung der Ergebnisse.

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit kann mit der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3, auch im offenen Modus (d. h. ohne Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package) verwendet werden. Für weitere Einzelheiten siehe Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Katalog-Nr.				874111
Anzahl der Reaktionen				24
Farbe	Identität	Röhrchen-ID		Volumen
Rot	Control Reaction Mix (Kontrollreaktionsgemisch)	1	CTRL	2 x 600 µl
Lila	T790M Reaction Mix (T790M-Reaktionsgemisch)	2	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (Deletionsreaktionsgemisch)	3	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R-Reaktionsgemisch)	4	L858R	600 µl
Grün	L861Q Reaction Mix (L861Q-Reaktionsgemisch)	5	L861Q	600 µl
Gelb	G719X Reaction Mix (G719X-Reaktionsgemisch)	6	G719X	600 µl
Grau	S768I Reaction Mix (S768I-Reaktionsgemisch)	7	S768I	600 µl
Blau	Insertions Reaction Mix (Insertionsreaktionsgemisch)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-Positivkontrolle)	9	PC	300 µl
Mintgrün	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Taq</i>	2 x 80 µl	2 x 80 µl
Weiß	Nuclease-free water for No Template Control (Nukleasefreies Wasser für die Kontrolle ohne Template)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Weiß	Nuclease-free water for Dilution (Nukleasefreies Wasser zur Verdünnung)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Handbuch				1

Zusätzlich benötigtes Material

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

Reagenzien

- Kit zur DNA-Extraktion (siehe DNA-Extraktion und -Vorbereitung)

Verbrauchsmaterialien und allgemeine Laborausrüstung

- 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)
- 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-Mix
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration mit einer Einkanalpipette (Kat.-Nr. 9018901)
- Thermomixer*, beheizter Orbitalinkubator*, Wärmeblock* oder Wasserbad* zur Inkubation bei 90 °C
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- Vortexer*

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

Ausrüstung für die PCR

- 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 Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package, Version 3.0.6 (zum Download verfügbar auf der Produkt-Website zum *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Version 2 unter www.qiagen.com. Navigieren Sie zu „Product Resources“ [Produktressourcen] > „Supplementary Protocols“ [Ergänzende Protokolle], um das Assay Package herunterzuladen.)

Hinweis: Für die Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package Software wird die Rotor-Gene Q Software der Version 2.3.5 oder höher benötigt.

* Stellen Sie sicher, dass Geräte und Ausrüstung 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 auf 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.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einweghandschuhe 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 jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Sicherheitshinweise zum Rotor-Gene Q Instrument finden Sie in der zugehörigen Gebrauchsanweisung.

Proben- und Assay-abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie stets Folgendes.

- Der Test ist für FFPE-NSCLC-Gewebespezimen vorgesehen.
- 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.
- 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 PCR-Endprodukten verhindert werden.

- Alle chemischen und biologischen Materialien sind potenziell gefährlich. Die Spezimen und Proben sind potenziell infektiös und müssen als biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
- Die Reagenzien im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wurden optimal verdünnt. Eine weitere Verdünnung der Reagenzien wird nicht empfohlen, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führen kann. Es dürfen keine Reaktionsvolumen (Reaktionsgemisch plus Probe) unter 25 µl verwendet werden, da dies das Risiko falsch negativer Ergebnisse erhöht.
- Alle im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus diesem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vorgesehen. Die im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthaltenen Reagenzien dürfen nicht durch andere Reagenzien oder durch Reagenzien aus anderen *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits ersetzt werden, da dies die Leistungsfähigkeit beeinträchtigen kann.
- Verwenden Sie ausschließlich die im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit mitgelieferte Taq-DNA-Polymerase (Röhrchen *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.
- Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Hinweis: Ergreifen Sie alle Vorsichtsmaßnahmen, um sicherzustellen, dass die Proben korrekt analysiert werden. Achten Sie diesbezüglich besonders auf falsches Einsetzen der Proben, Beladungsfehler und Pipettierfehler.

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.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Transportbedingungen

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wird auf Trockeneis versandt und muss beim Empfang gefroren sein. Wenn das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit beim Empfang nicht gefroren ist, die Umverpackung während des Transports geöffnet wurde, die Lieferung keine Stückliste, kein Handbuch oder keine Reagenzien enthält, wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort (Kontaktinformationen auf der hinteren Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Lagerungsbedingungen

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -30 bis -15 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Scorpions müssen (wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle) vor Licht geschützt werden, um Photobleichung und einen Leistungsverlust zu vermeiden. Das Kit ist bei Lagerung unter den empfohlenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

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 wird empfohlen, acht Einfrier-/Auftauzyklen nicht zu überschreiten.

Die Reagenzien müssen über einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde bis maximal 4,5 Stunden bei Raumtemperatur (15 – 25 °C) aufgetaut werden. Wenn die Reagenzien in einem gebrauchsfertigen Zustand sind, können die PCR-Reaktionen eingerichtet werden. Die Rotor-Gene Q Röhrchen, welche die Master-Mixe und die DNA-Probe enthalten, können dann sofort in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument 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 müssen (wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle) vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden und optimale Aktivität und Leistung sicherzustellen.

Hinweis: Die Proben sollten chargenweise zusammengefasst werden, um die Reagenzien im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit optimal zu nutzen. Werden die Proben einzeln getestet, hat dies einen höheren Verbrauch an Reagenzien zur Folge, wodurch die Anzahl der Proben, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden können, verringert wird.

Lagerung und Handhabung der Spezimen

Hinweis: Alle Proben sind als potenziell infektiös zu behandeln.

Das Probenmaterial muss humane genomische DNA sein, die aus FFPE-Gewebe extrahiert wurde. Zur Sicherstellung der Spezimenqualität müssen die Spezimen gemäß Pathologie-Standardverfahren transportiert werden.

Tumorproben sind nicht homogen, daher stimmen die Daten einer Tumorprobe nicht unbedingt mit den Daten anderer Abschnitte desselben Tumors überein. Tumorproben können auch nicht tumoröses Gewebe enthalten. Bei DNA aus nicht tumorösem Gewebe ist davon auszugehen, dass sie keine der mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit nachweisbaren Mutationen enthält.

So bereiten Sie Gewebeprobe für die DNA-Extraktion vor:

- Fixieren Sie die Gewebespezimen unter Verwendung von Standardmaterialien und -methoden in 10 % neutralgepuffertem Formalin (Neutral Buffered Formalin, NBF), und betten Sie die Gewebespezimen in Paraffin ein. Schneiden Sie mit einem Mikrotom 5- μ m-Serienschnitte von einem Paraffinblock ab und ziehen Sie diese auf einen Objektträger aus Glas auf.
- Lassen Sie einen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbten Schnitt von einem Spezialisten (z. B. Pathologen) untersuchen, um das Vorliegen eines Tumors zu bestätigen.
- Die eingefärbten Schnitte dürfen nicht für die DNA-Extraktion verwendet werden.
- Lagern Sie alle FFPE-Blöcke und Objektträger bei Raumtemperatur (15–25 °C). Objektträger können vor der DNA-Extraktion bis zu 1 Monat lang bei Raumtemperatur gelagert werden.

Verfahren

DNA-Extraktion und -Vorbereitung

Die Leistungsmerkmale dieses Kits wurden anhand von DNA bestimmt, die mit dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (Kat.-Nr. 60404) extrahiert wurde. Falls dieses Kit in Ihrem Land erhältlich ist, sollte es zur DNA-Vorbereitung verwendet werden. Führen Sie bei Verwendung des funktionell gleichwertigen QIAamp DNA FFPE Tissue Kits (Kat.-Nr. 56404) die DNA-Extraktion gemäß den Anweisungen im Handbuch durch. Beachten Sie dabei Folgendes:

- Die QIAGEN Deparaffinization Solution darf nicht verwendet werden. Setzen Sie zur Entparaffinierung nur die Xylen-/Ethanol-Methode ein, die im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschrieben ist.
- Es muss für alle erforderlichen Schritte Ethanol* in Molekularbiologie-Qualität verwendet werden.
- Überführen Sie für jede Probe den gesamten Gewebebereich von zwei Schnitten mit einem frischen Skalpell in ein beschriftetes Mikrozentrifugenröhrchen.
- Der Proteinase-K-Verdau (Schritt 11 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch*) muss 1 Stunde \pm 5 Minuten lang bei $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden.
- Der Proteinase-K-Verdau (Schritt 12 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch*) muss 1 Stunde \pm 5 Minuten lang bei $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden.
- Der im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* beschriebene RNase-Schritt darf nicht ausgeführt werden.
- Die Proben müssen mit 120 μl Elutionspuffer (ATE) aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Schritt 20 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch*) eluiert werden.

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe wie z. B. Methanol oder Methyläthylketon enthält.

- Genomische DNA kann nach der Extraktion 1 Woche lang bei 2–8 °C oder vor dem Gebrauch bis zu 8 Wochen lang bei –30 bis –15 °C gelagert werden.

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

Protokoll: Probenbestimmung

Dieses Protokoll dient zur Bestimmung der Gesamtmenge an amplifizierbarer DNA in Proben unter Verwendung des „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ des Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package für die automatische Probenbestimmung.

Hinweis: Informationen zur manuellen Bestimmung von DNA-Proben finden Sie unter Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass das beschriebene Mischverfahren in jedem Mischschritt im Prozess der Assaykonfiguration ausgeführt wird, um korrekte Ergebnisse zu erhalten. Mit dem vorhandenen Kontrollreaktionsgemisch können bis zu 24 Proben bestimmt werden. Lesen Sie vor Beginn der Arbeit den Abschnitt „REF_Ref507674043 \h * MERGEFORMAT Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“. 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 (Röhrchen *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 kurz unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.

- Führen Sie vor dem Test eine DNA-Bestimmung mit dem Kontrollreaktionsgemisch (Röhrchen CTRL) durch. Hinweis: Es ist wichtig, dass für diese Bestimmung wie unten beschrieben das Kontrollreaktionsgemisch verwendet wird und nicht etwa Spektralphotometrie oder andere Alternativmethoden. Stark zersetzte DNA kann u. U. nicht amplifiziert werden, obwohl die Primer kurze DNA-Fragmente erzeugen. Zur Gewährleistung eines möglichst effizienten Gebrauchs der Reagenzien des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits fassen Sie die DNA-Proben zu Chargen zusammen, damit die Testläufe 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 einem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden können, nimmt ab.

Vorbereitende Schritte

- Stellen Sie vor dem ersten Gebrauch des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments sicher, dass die *therascreen* EGFR CE Assay Package Software installiert ist (siehe Anhang B: Installation der *therascreen* EGFR CE Assay Package Software).
- Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch mindestens 1 Stunde und maximal 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig aufgetaut, durch zehnmalsiges 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 zehnmalsiges Umschwenken und zentrifugieren Sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

1. Tauen Sie das Kontrollreaktionsgemisch (CTRL), das nukleasefreie Wasser für die Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) und die EGFR-Positivkontrolle (Positive Control, PC) mindestens 1 Stunde und maximal 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) auf.

Die Zeiten zum Auftauen von Reagenzien, für die PCR-Konfiguration und die Lagerung vor dem Start des Laufs sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. 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 wird bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt. Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum vom Abschluss der PCR-Konfiguration bis zum Start des PCR-Laufs auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument.

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

- 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.

3. Setzen Sie für die DNA-Proben gemäß den Volumenangaben in Tabelle 3 ausreichend Kontroll-Master-Mix (Kontrollreaktionsgemisch (CTRL) plus *Taq*), eine EGFR-Positivkontrollreaktion und eine NTC-Reaktion an. Planen Sie Reagenzien für eine zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist. Hinweis: Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 3. Herstellung des Kontrollassay-Master-Mix

Komponente	Volumen
Kontrollreaktionsgemisch (CTRL)	$19,5 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (<i>Taq</i>)	$0,5 \mu\text{l} \times (n + 1)$
Gesamtvolumen	20 μl /Reaktion

* n = Anzahl der Reaktionen (Proben und Kontrollen). Setzen Sie ausreichend Master-Mix für eine zusätzliche Probe ($n + 1$) an, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material zur Verfügung steht. Der Wert n sollte 26 nicht überschreiten (24 Proben plus 2 Kontrollen).

Hinweis: Bei der Herstellung des Master-Mix wird zuerst das erforderliche Volumen an Kontrollreaktionsgemisch in das jeweilige Röhrchen gegeben; die *Taq* wird zuletzt zugegeben.

4. Mischen Sie den Master-Mix durch vorsichtiges zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich. Setzen Sie die benötigte Anzahl von PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 4 dargestellten Anordnung in den Ladeblock ein. Geben Sie sofort 20 μl Master-Mix in jedes PCR-Röhrchen des Streifens.

Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden. Für die DNA-Probenbestimmung geben Sie Kontrollassay-Master-Mix in ein PC-Röhrchen, ein NTC-Röhrchen und ein Röhrchen für jede Probe.

Tabelle 4. Anordnung der DNA-Probenassays im Ladeblock. Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an.

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

5. Geben Sie sofort 5 µl Wasser für die NTC in das Röhrchen an Position 2 und verschließen Sie das Röhrchen mit dem Deckel.
6. Geben Sie jeweils 5 µl Probe in die Probenröhrchen (Röhrchenpositionen 3–26), und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.
7. Geben Sie 5 µl EGFR-Positivkontrolle in das Röhrchen an Position 1 und verschließen Sie das Röhrchen mit dem Deckel.

Hinweis: Achten Sie darauf, dass bei der Zugabe von NTC, Proben und Positivkontrolle in die jeweiligen Röhrchen jegliche Beladungs- oder Pipettierfehler vermieden werden. Markieren Sie die Deckel der Röhrchen, um die Richtung anzugeben, in der die Röhrchen in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument geladen werden sollen.

8. Nachdem Sie alle PCR-Röhrchen mit Deckeln verschlossen haben, führen Sie eine Sichtkontrolle der Füllstände in den Probenröhrchen durch, um sicherzustellen, dass alle Röhrchen Probe enthalten.
9. Schwenken Sie alle PCR-Röhrchen viermal um, um Proben und Reaktionsgemische zu mischen.
10. Setzen Sie die PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 4 dargestellten Anordnung in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors ein.

Wenn nicht alle Positionen des Rotors belegt sind, bestücken Sie alle leeren Positionen im Rotor mit verschlossenen leeren Röhren.

11. Setzen Sie den 72-Well-Rotor sofort in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhren während des Laufs zu sichern. Hinweis: Bei Verwendung der manuellen Probenbestimmung finden Sie weitere Informationen unter Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.
12. Doppelklicken Sie auf dem Desktop des Computers, der an das Rotor-Gene Q MDx Instrument angeschlossen ist, auf das Symbol „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ (*therascreen* EGFR CE Kontrolllauf – Gesperrte Vorlage), um die Rotor-Gene Q Software zu starten (Abbildung 1).



Abbildung 1. Symbol „EGFR CE – Gesperrte Vorlage“ für den Kontrolllauf (Probenbestimmung).

13. Standardmäßig wird die Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) angezeigt (Abbildung 2). Vergewissern Sie sich, dass der Schließring richtig angebracht ist, und aktivieren Sie dann das Kontrollkästchen Locking Ring Attached (Schließring angebracht). Schließen Sie den Deckel des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments.

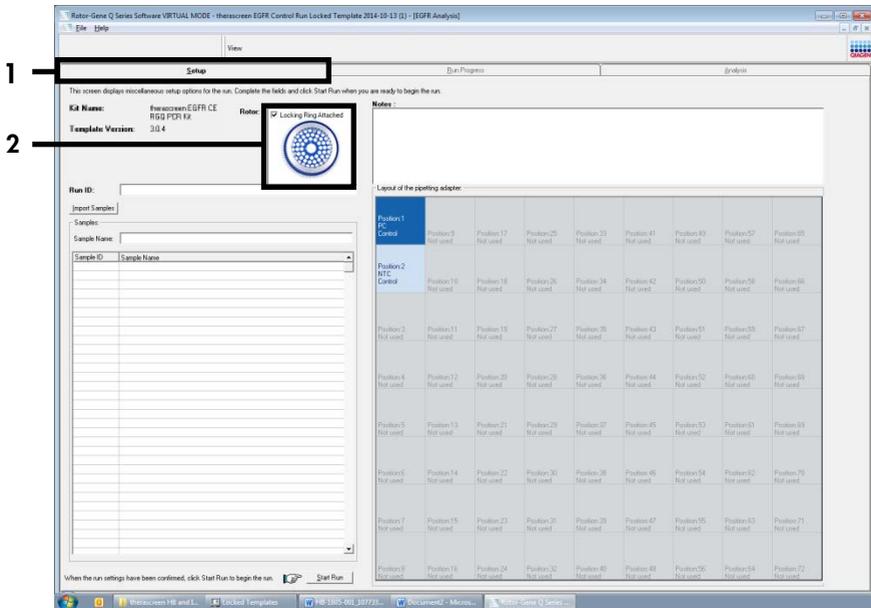


Abbildung 2. Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) (1) mit dem Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht) (2).

14. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention die Lauf-ID in das Dialogfeld Run ID (Lauf-ID) ein. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention den Probennamen in das Dialogfeld Sample Name (Probenname) ein, und drücken Sie die Return Taste (Eingabetaste).

Dadurch wird der Probenname in die unten dargestellte Probenliste eingefügt, und der Probe wird eine "Sample-ID" (Proben-ID) (1, 2, 3 usw.) zugewiesen. Darüber hinaus wird der rechte Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettieradapters) aktualisiert; er enthält nun den Probennamen (Abbildung 3).

Hinweis: Alternativ können Probennamen, die im Format *.smp (Rotor-Gene Q Probendatei) oder *.csv (kommagetrennte Werte) gespeichert wurden, über die Funktion Import Samples (Proben importieren) importiert werden. Dabei werden die Probennamen automatisch eingetragen.

Hinweis: Überprüfen Sie im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettieradapters), dass der hinzugefügte Probenname durch eine Farbänderung hervorgehoben ist und sich der Probenname in der entsprechenden Probenposition befindet (Abbildung 3).

Hinweis: Probennamen mit mehr als 8 Zeichen werden im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettieradapters) u. U. nicht vollständig angezeigt.

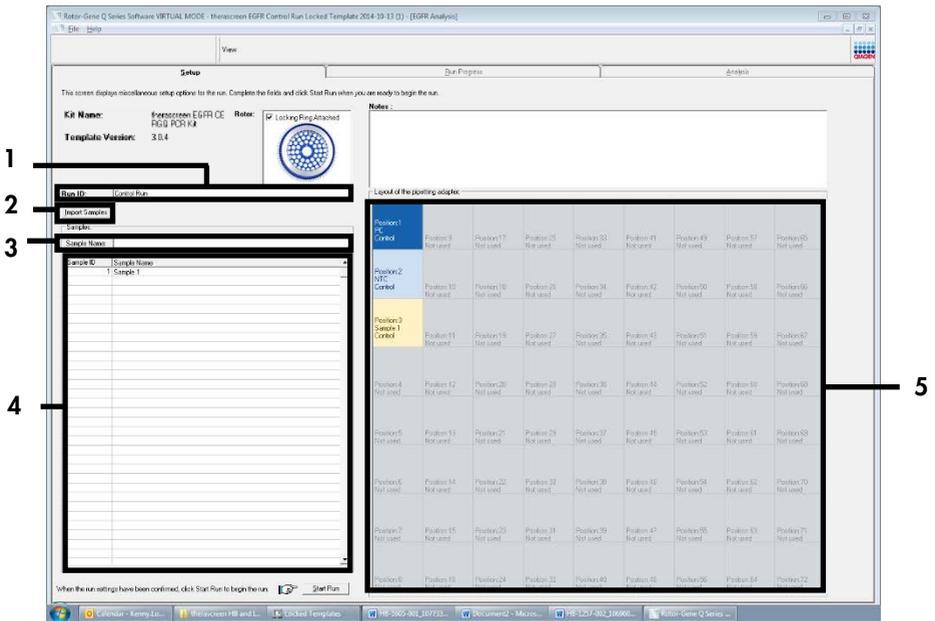


Abbildung 3. Eingabe von „Run ID“ (Lauf-ID) und „Sample Name“ (Probenname). 1 = Dialogfeld „Run ID“ (Lauf-ID), 2 = Bereich „Import Samples“ (Proben importiere), 3 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname), 4 = „Sample List“ (Probenliste), 5 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettieradapters).

15. Wiederholen Sie Schritt 14, um die Namen aller weiteren Proben einzugeben (Abbildung 4).

Hinweis: Um einen Probennamen zu bearbeiten, klicken Sie in der Probenliste auf Sample Name (Probenname); die ausgewählte Probe wird in dem darüberstehenden Dialogfeld Sample Name (Probenname) angezeigt. Bearbeiten Sie die Probe gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention, und drücken Sie die Return Taste (Eingabetaste), um den Namen zu aktualisieren.

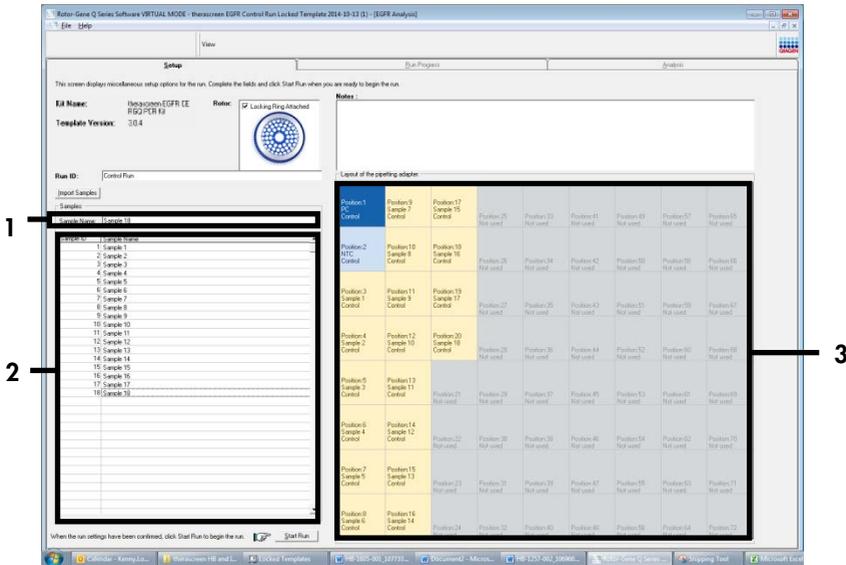


Abbildung 4. Eingabe weiterer Probennamen in das Feld „Sample Name“ (Probenname). 1 = Feld „Sample Name“ (Probenname), 2 = „Sample List“ (Probenliste), 3 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters).

16. Nachdem alle Probennamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, ob diese korrekt sind. Geben Sie bei Bedarf zusätzliche Informationen in das Feld Notes (Notizen) ein und klicken Sie dann auf Start Run (Lauf starten) (Abbildung 5).

Hinweis: Wenn eine Rotorposition unbesetzt ist, wird „Warning“ (Warnung) eingeblendet (Abbildung 5), um den Anwender daran zu erinnern, dass unbesetzte Positionen im Rotor mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt werden müssen. Stellen Sie sicher, dass alle unbesetzten Rotorpositionen mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt sind, und klicken Sie dann auf OK, um fortzufahren. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) öffnet sich.

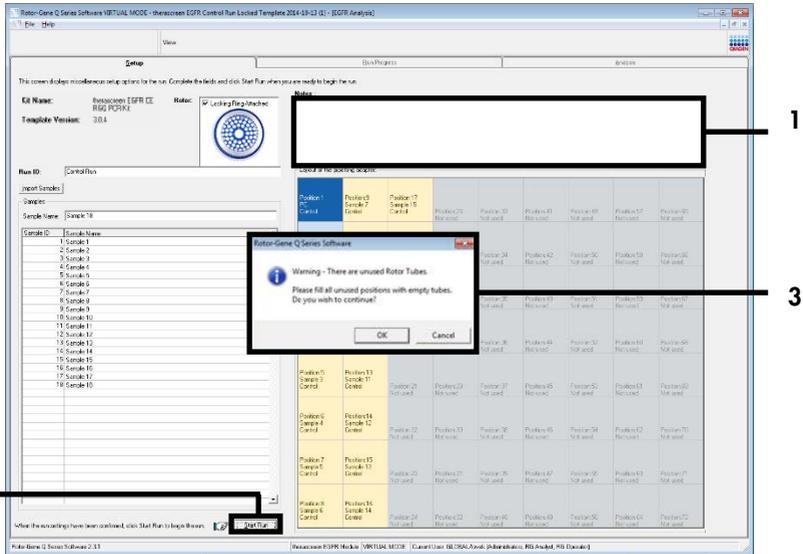


Abbildung 5. Feld „Notes“ (Notizen) (1), Schaltfläche „Start Run“ (Lauf starten) (2) und „Warning“ (Warnung) über unbesetzte Rotorpositionen (3).

17. Wählen Sie einen geeigneten Dateinamen aus und speichern Sie den PCR-Lauf als *.rex-Laufdatei am ausgewählten Speicherort. Klicken Sie auf Save (Speichern) (Abbildung 6).

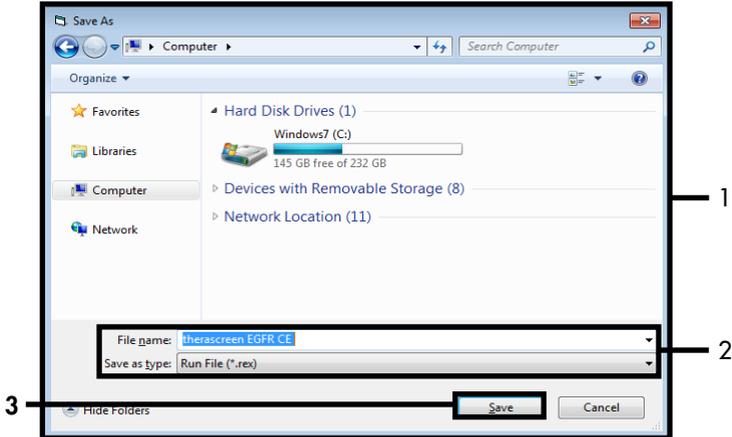


Abbildung 6. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) (1). 2 = Felder „File Name“ (Dateiname) und „Save as type“ (Dateityp); 3 = „Save“ (Speichern).

Der PCR-Lauf wird gestartet.

Hinweis: Beim Start des Laufs wird die Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt) geöffnet, auf der die Temperaturkurve und die verbleibende Laufzeit angezeigt werden (Abbildung 7).

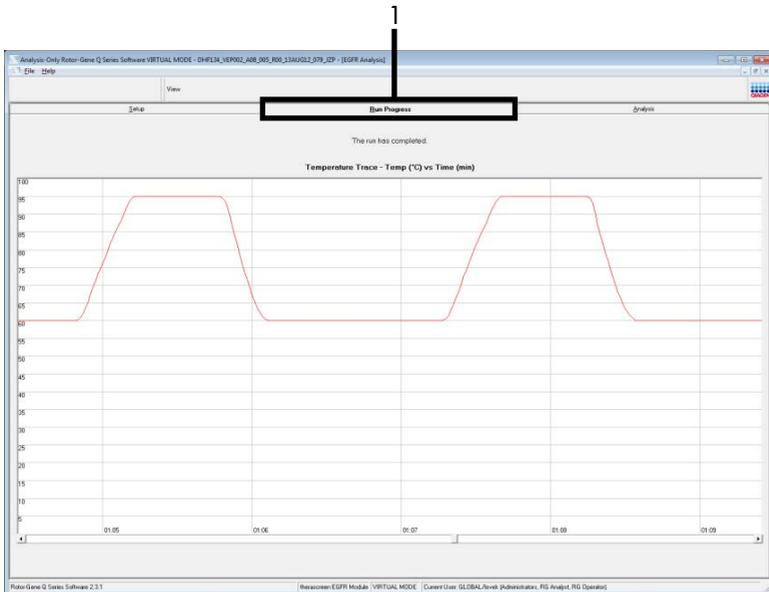


Abbildung 7. Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt) (1)

Hinweis: Nach Abschluss des Laufs wird die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) geöffnet. Wenn die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) nicht geöffnet wird, klicken Sie auf diese Registerkarte (Abbildung 8).

Hinweis: Eine Beschreibung der Berechnungsmethode finden Sie im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)“.

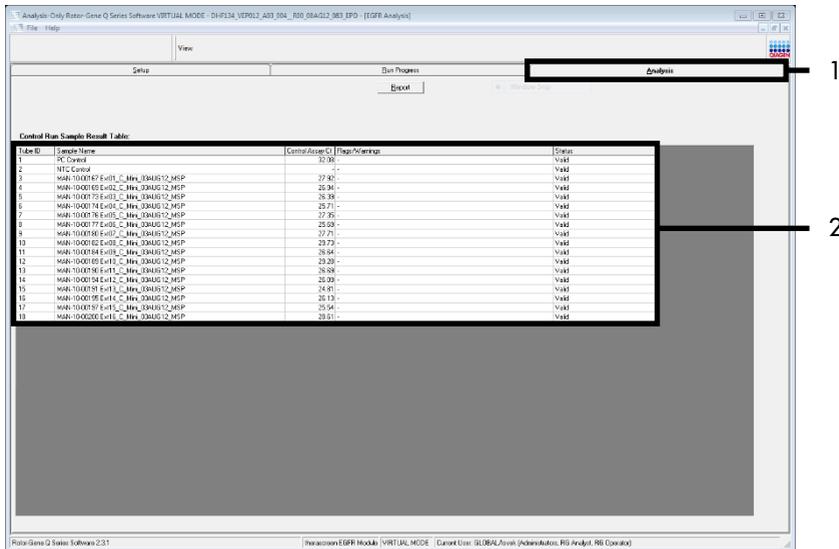


Abbildung 8. Registerkarte „Analysis“ (Analyse) (1) mit den Ergebnissen (2 = „Control Run Sample Result Table“ (Tabelle der Kontrolllauf-Probenergebnisse)).

Die Kontrollergebnisse werden wie folgt in der Tabelle „Control Run Sample Result Table“ (Tabelle der Kontrolllauf-Probenergebnisse) angegeben (Abbildung 8).

Laufkontrollen (PC und NTC, Röhrenpositionen 1 und 2). Wenn die Ergebnisse im zulässigen Bereich liegen, wird für das Ergebnis „Valid“ (Gültig) angezeigt. Andernfalls wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt.

Für Probenkontrollreaktionen mit einem $C_T > 31,10$ wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt. Die Menge an DNA ist nicht ausreichend für die Mutationsanalyse. Wiederholen Sie den Test der Probe. Wenn die Menge an DNA weiterhin unzureichend ist, extrahieren Sie mehr Tumorgewebe, sofern verfügbar.

Für Probenkontrollreaktionen mit einem $C_T < 23,70$ wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt. Die DNA-Konzentration ist zu hoch für die Mutationsanalyse. Verdünnen Sie mit nukleasefreiem Wasser zur Verdünnung (Dil.) und wiederholen Sie den Test. Verdünnen Sie auf einen C_T im Bereich von 23,70–31,10. Durch eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 erhöht sich der C_T -Wert um etwa 1,0.

Für Probenkontrollreaktionen mit einem C_T von 23,70–31,10 ($23,70 \leq \text{Kontroll-}C_T \leq 31,10$) wird „Valid“ (Gültig) angezeigt. Die DNA-Konzentration ist für die Mutationsanalyse geeignet.

Hinweis: Wenn eine erneute Extraktion oder eine Verdünnung erforderlich ist, wiederholen Sie die Kontrollreaktion, um zu bestätigen, dass die DNA-Konzentration für die Mutationsanalyse geeignet ist.

18. Klicken Sie auf Report (Bericht), um eine Berichtdatei zu erstellen. Es wird das Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser) angezeigt. Wählen Sie unter „Templates“ (Vorlagen) die Option EGFR CE Analysis Report (EGFR CE-Analysebericht) aus und klicken Sie dann auf Show (Anzeigen) (Abbildung 9).

Hinweis: Um Berichte im Web Archives-Format an einem anderen Speicherort zu speichern, klicken Sie oben links im jeweiligen Bericht auf Save As (Speichern unter).

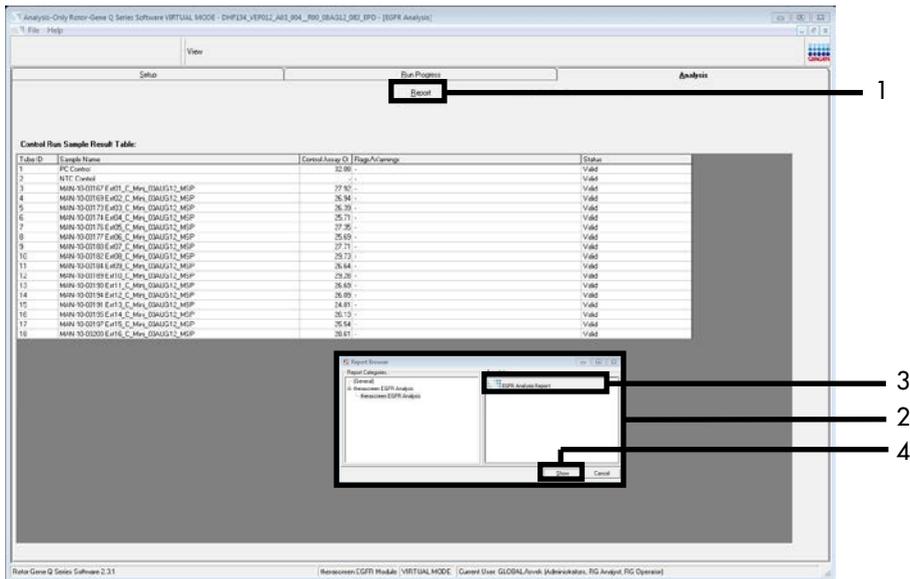


Abbildung 9. Auswahl des „EGFR CE Analysis Report“ (EGFR CE-Analysebericht). 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = Schaltfläche „EGFR Analysis Report“ (EGFR-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis

Dieses Protokoll ist für den Nachweis von EGFR-Mutationen vorgesehen. Nach einer erfolgreichen DNA-Probenbestimmung kann die Probe mit den EGFR-Mutationsassays unter Verwendung von automatisierter Software getestet werden.

Hinweis: Informationen zum manuellen Mutationsnachweis finden Sie unter Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass das beschriebene Mischverfahren in jedem Mischschritt im Prozess der Assaykonfiguration ausgeführt wird, um korrekte Ergebnisse zu erhalten. Lesen Sie vor Beginn der Arbeit den Abschnitt Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen.
- 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.
- Nach einer erfolgreichen DNA-Probenbestimmung kann die Probe mit den EGFR-Mutationsassays getestet werden.
- Die Proben sind in Chargen zu jeweils sieben Proben zu verarbeiten, um das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit effizient zu nutzen. Bei kleineren Chargengrößen wird die Anzahl der Proben, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden können, verringert.
- Für den Test einer Probe müssen alle im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vorhandenen Reaktionsgemische verwendet werden.
- Die *Taq* oder ein *Taq*-haltiges Gemisch darf nicht im Vortexer gemischt werden, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*, indem Sie die Pipettenspitze vorsichtig nur kurz unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.

Vorbereitende Schritte

- Stellen Sie vor dem ersten Gebrauch des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments sicher, dass die *therascreen* EGFR CE Assay Package Software installiert ist (siehe Anhang B: Installation der *therascreen* EGFR CE Assay Package Software).
- Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch mindestens 1 Stunde und maximal 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.
- Mischen Sie alle Proben durch zehnmaliges Umschwenken und zentrifugieren Sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens 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.

Verfahren

1. Tauen Sie alle Röhrchen mit Reaktionsgemisch, das Wasser für die NTC und die EGFR-Positivkontrolle mindestens 1 Stunde und maximal 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15–25 °C) auf.

Die Zeiten zum Auftauen von Reagenzien, für die PCR-Konfiguration und die Lagerung vor dem Start des Laufs sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5. 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 wird bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt. Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum vom Abschluss der PCR-Konfiguration bis zum Start des PCR-Laufs auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument.

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

2. 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.
3. Setzen Sie für die DNA-Proben gemäß den Volumenangaben in Tabelle 6 ausreichend Assay-Master-Mixe (Assay-Reaktionsgemisch plus *Taq*), eine EGFR-Positivkontrolle und eine NTC-Reaktion an. 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 6. Herstellung der Assay-Master-Mixe

Assay	Reaktionsgemischröhrchen	Volumen des Reaktionsgemisches	Volumen der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Röhrchen <i>Taq</i>)
Kontrolle	CTRL	19,5 µl × (n+1)*	0,5 µl × (n+1)*
T790M	T790M	19,5 µl × (n+1)	0,5 µl × (n+1)
Deletionen	Del	19,5 µl × (n+1)	0,5 µl × (n+1)
L858R	L858R	19,5 µl × (n+1)	0,5 µl × (n+1)
L861Q	L861Q	19,5 µl × (n+1)	0,5 µl × (n+1)
G719X	G719X	19,5 µl × (n+1)	0,5 µl × (n+1)
S768I	S768I	19,5 µl × (n+1)	0,5 µl × (n+1)
Insertionen	Ins	19,5 µl × (n+1)	0,5 µl × (n+1)

* n = Anzahl der Reaktionen (Proben und Kontrollen). Setzen Sie ausreichend Master-Mix für eine zusätzliche Probe (n + 1) an, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material zur Verfügung steht. Der Wert n darf sieben (plus Kontrollen) nicht überschreiten, da sieben die maximale Anzahl von Proben ist, die in einem Lauf verarbeitet werden kann.

4. Mischen Sie die Assay-Master-Mixe durch vorsichtiges zehnmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich. Setzen Sie die benötigte Anzahl von PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 7 dargestellten Anordnung in den Ladeblock ein. Geben Sie sofort 20 µl des entsprechenden Assay-Master-Mix in jedes PCR-Röhrchen des Streifens.

Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden.

Tabelle 7. Anordnung der Kontroll- und Mutationsassays im Ladeblock. Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an.

Assay	Position								
	Kontrollen		Probennummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Kontrolle	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
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insertionen	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. Geben Sie sofort 5 µl Wasser für die NTC in die Röhrchen an den Positionen 9–16 und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.

6. Geben Sie jeweils 5 µl Probe in die Probenröhrchen (Röhrchenpositionen 17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64 sowie 65–72) und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.

7. Geben Sie 5 µl EGFR-Positivkontrolle in die Röhrchen an den Positionen 1–8 und verschließen Sie die Röhrchen mit Deckeln.

Achten Sie darauf, dass bei der Zugabe von NTC, Proben und EGFR-Positivkontrolle in die jeweiligen Röhrchen jegliche Beladungs- oder Pipettierfehler vermieden werden.

Jedes Röhrchen sollte ein Reaktionsvolumen von insgesamt 25 µl haben (20 µl Assay-Master-Mix gemäß Schritt 3 (Tabelle 6) und 5 µl NTC/Probe/PC). Die Zahlen stehen für die Positionen im Ladeblock und geben die endgültige Rotorposition an.

Markieren Sie die Deckel der Röhrchen, um die Richtung anzugeben, in der die Röhrchen in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument geladen werden sollen.

8. Nachdem Sie alle PCR-Röhrchen mit Deckeln verschlossen haben, führen Sie eine Sichtkontrolle der Füllstände in den Probenröhrchen durch, um sicherzustellen, dass alle Röhrchen Probe enthalten.
9. Schwenken Sie alle PCR-Röhrchen viermal um, um Proben und Reaktionsgemische zu mischen.
10. Setzen Sie die PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 7 dargestellten Anordnung in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors ein.

Jeder PCR-Lauf kann maximal 7 Proben umfassen. Wenn nicht alle Positionen des Rotors belegt sind, bestücken Sie alle leeren Positionen im Rotor mit verschlossenen leeren Röhrchen.

11. Setzen Sie den 72-Well-Rotor sofort in das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern. Hinweis: Bei Verwendung des manuellen EGFR-Mutationsnachweises finden Sie weitere Informationen in Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.
12. Doppelklicken Sie auf dem Desktop des Notebooks, das an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument angeschlossen ist, auf das Symbol „*therascreen* EGFR CE Locked Template“ (*therascreen* EGFR CE – Gesperrte Vorlage), um die Rotor-Gene Q Software zu starten (Abbildung 10).



Abbildung 10. Symbol „EGFR CE Locked Template“ (EGFR CE Gesperrte Vorlage) (EGFR-Mutationsnachweis).

13. Standardmäßig wird die Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) angezeigt (Abbildung 11). Vergewissern Sie sich, dass der Schließring richtig angebracht ist, und aktivieren Sie dann das Kontrollkästchen Locking Ring Attached (Schließring angebracht). Schließen Sie den Deckel des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instruments.

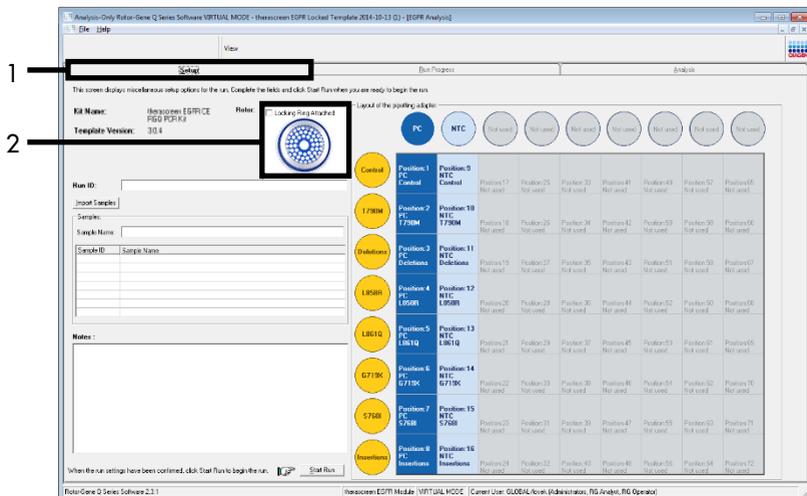


Abbildung 11. Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) (1) mit dem Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht) (2).

14. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention die Lauf-ID in das Dialogfeld Run ID (Lauf-ID) ein. Geben Sie gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention den Probenamen in das Dialogfeld Sample Name (Probenname) ein, und drücken Sie die Return Taste (Eingabetaste).

Dadurch wird der Probenname in die unten dargestellte Probenliste eingefügt, und der Probe wird eine "Sample-ID" (Proben-ID) (1, 2, 3 usw.) zugewiesen. Darüber hinaus wird der rechte Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettieradapters) aktualisiert; er enthält nun den Probenamen (Abbildung 12).

Hinweis: Alternativ können Probenamen, die im Format *.smp (Rotor-Gene Q Probendatei) oder *.csv (kommagetrennte Werte) gespeichert wurden, über die Schaltfläche Import Samples (Proben importieren) importiert werden. Dabei werden die Probenamen automatisch eingetragen.

Hinweis: Überprüfen Sie im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettieradapters), dass der hinzugefügte Probenname durch eine Farbänderung hervorgehoben ist und sich der Probenname in der entsprechenden Probenposition befindet (Abbildung 12).

Hinweis: Es können maximal 7 Proben hinzugefügt werden. Die Proben-IDs (in den Probenkreisen) werden automatisch von 1 bis 7 zugewiesen.

Hinweis: Probennamen mit mehr als 8 Zeichen werden im Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettieradapters) u. U. nicht vollständig angezeigt.

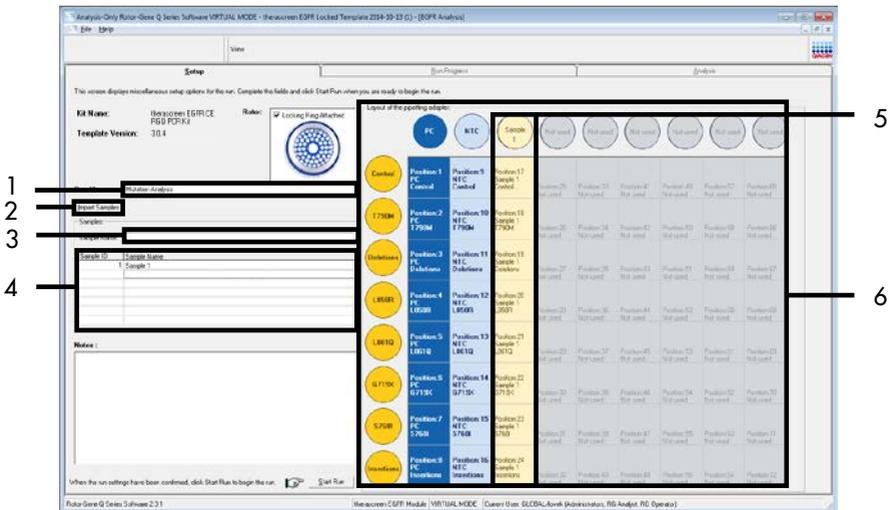


Abbildung 12. Eingabe von „Run ID“ (Lauf-ID) und „Sample Name“ (Probenname). 1 = Feld „Run ID“ (Lauf-ID), 2 = Schaltfläche „Import Samples“ (Proben importieren), 3 = Feld „Sample Name“ (Probenname), 4 = „Sample List“ (Probenliste), 5 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters), 6 = hervorgehobener Probenkreis und darunter hervorgehobene Spalte mit 8 Assays

15. Wiederholen Sie Schritt 14, um die Namen aller weiteren Proben einzugeben (Abbildung 13).

Hinweis: Um einen Probennamen zu bearbeiten, klicken Sie in der Probenliste auf Sample Name (Probenname); die ausgewählte Probe wird in dem darüberstehenden Dialogfeld Sample Name (Probenname) angezeigt. Bearbeiten Sie die Probe gemäß der vor Ort üblichen Benennungskonvention, und drücken Sie die Return Taste (Eingabetaste), um den Namen zu aktualisieren.

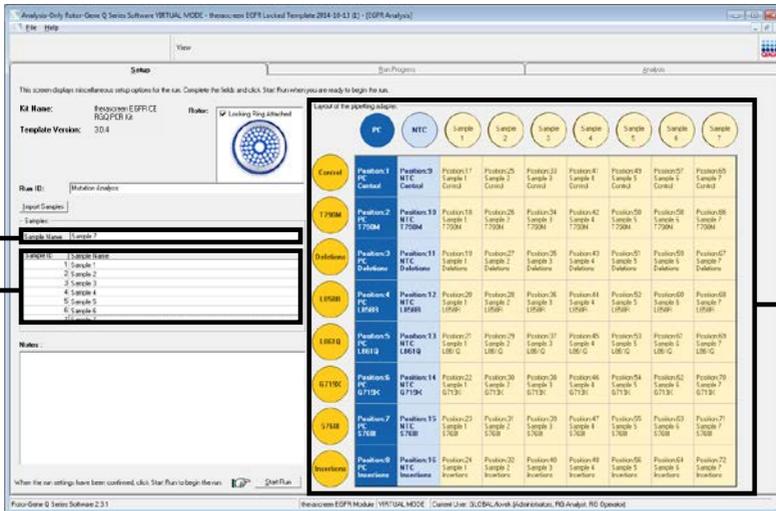


Abbildung 13. Eingabe weiterer Probenamen in das Feld „Sample Name“ (Probenname). 1 = Feld „Sample Name“ (Probenname), 2 = „Sample List“ (Probenliste), 3 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters)

16. Nachdem alle Probenamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, ob diese korrekt sind. Geben Sie bei Bedarf zusätzliche Informationen in das Feld Notes (Notizen) ein und klicken Sie dann auf Start Run (Lauf starten) (Abbildung 14).

Hinweis: Wenn eine Rotorposition unbesetzt ist, wird „Warning“ (Warnung) eingeblendet (Abbildung 14), um den Anwender daran zu erinnern, dass unbesetzte Positionen im Rotor mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt werden müssen. Stellen Sie sicher, dass alle unbesetzten Rotorpositionen mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt sind, und klicken Sie dann auf OK, um fortzufahren.

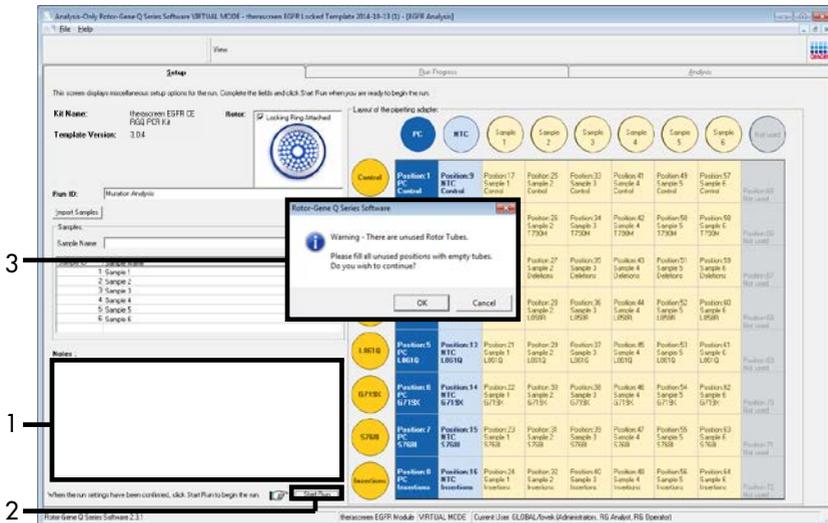


Abbildung 14. Feld „Notes“ (Notizen) (1), Schaltfläche „Start Run“ (Lauf starten) (2) und „Warning“ (Warnung) über unbesetzte Rotorpositionen (3)

17. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet. Geben Sie einen geeigneten Dateinamen ein und speichern Sie den PCR-Lauf als *.rex-Laufdatei am ausgewählten Speicherort. Klicken Sie auf Save (Speichern) (Abbildung 15).

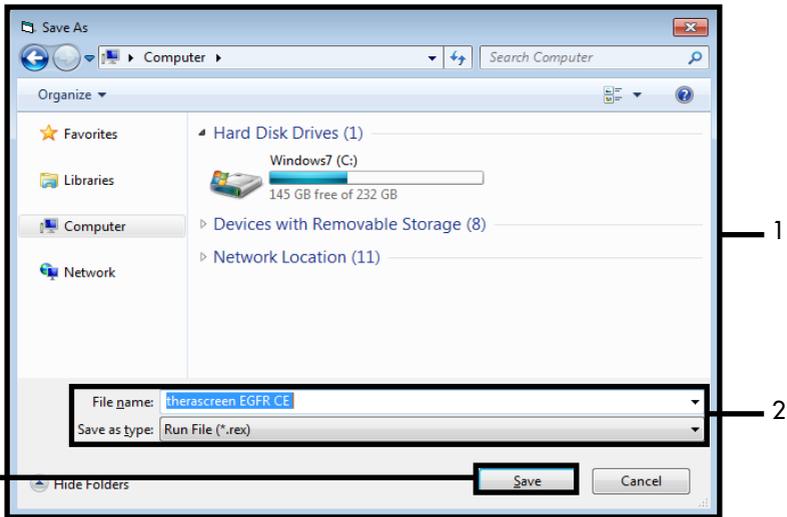


Abbildung 15. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) (1). 2 = Felder „File Name“ (Dateiname) und „Save as type“ (Dateityp); 3 = „Save“ (Speichern).

Der PCR-Lauf wird gestartet.

Hinweis: Beim Start des Laufs wird die Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt) geöffnet, auf der die Temperaturkurve und die verbleibende Laufzeit angezeigt werden (Abbildung 16).

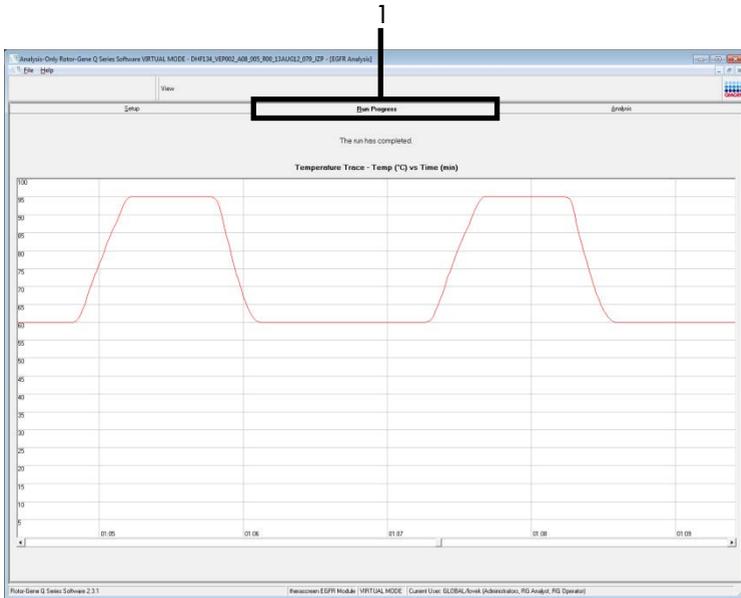


Abbildung 16. Registerkarte „Run Progress“ (Lauffortschritt).

Nach Abschluss des Laufs wird die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) geöffnet.

Hinweis: Wenn die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) nicht geöffnet wird, klicken Sie auf diese Registerkarte (Abbildung 17).

Hinweis: Eine Beschreibung der Berechnungsmethode finden Sie im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)“.

18. Klicken Sie auf Report (Bericht), um eine Berichtsdatei zu erstellen. Es wird das Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser) angezeigt. Wählen Sie unter Templates (Vorlagen) die Option EGFR CE Analysis Report (EGFR CE-Analysebericht) aus und klicken Sie dann auf Show (Anzeigen) (Abbildung 18).

Hinweis: Um einen Bericht im Web Archives-Format an einem anderen Speicherort zu speichern, klicken Sie oben links im jeweiligen Bericht auf Save As (Speichern unter).

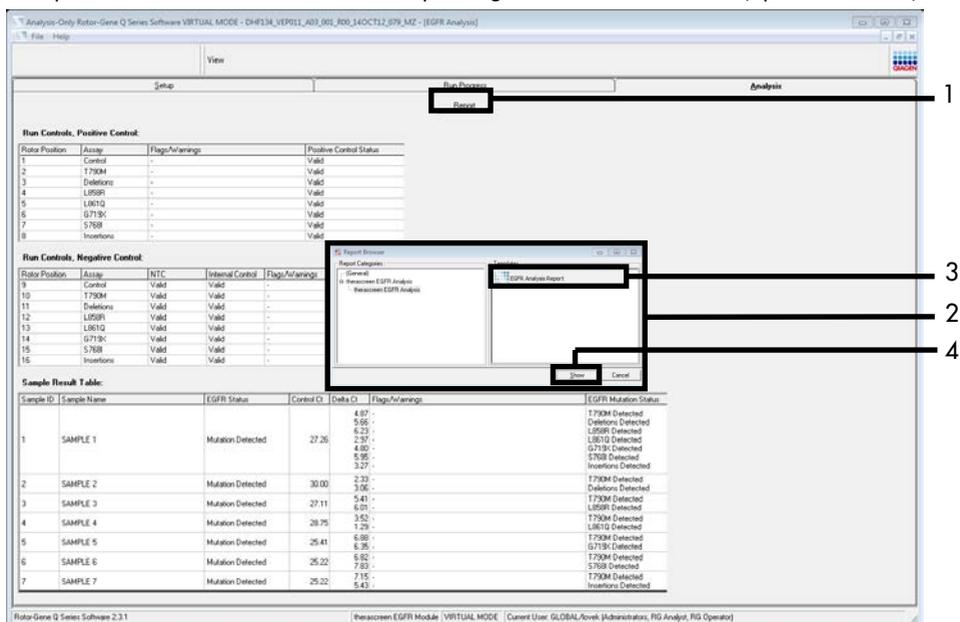


Abbildung 18. Auswahl des „EGFR CE Analysis Report“ (EGFR CE-Analysebericht). 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fensterabschnitt „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = „EGFR CE Analysis Report“ (EGFR CE-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)

Die *therascreen* EGFR Assay Package Software führt nach Abschluss eines Laufs automatisch die Analyse durch und zeigt die Mutationsergebnisse an. Im Folgenden finden Sie weitere Informationen zur Durchführung der Analyse und Anzeige der Mutationsergebnisse durch die *therascreen* EGFR Assay Package Software.

Hinweis: Informationen zur manuellen Analyse der Ergebnisse finden Sie im Abschnitt Interpretation der Ergebnisse (manuell).

Der PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz einer bestimmten Reaktion einen Schwellenwert überschreitet, wird definitionsgemäß als C_T -Wert bezeichnet. C_T -Werte sind ein Maß für die Menge der jeweils eingesetzten DNA. Niedrige C_T -Werte zeigen hohe DNA-Ausgangskonzentrationen an, wohingegen hohe C_T -Werte für niedrige DNA-Ausgangskonzentrationen stehen. Reaktionen mit einem C_T -Wert werden als positive Amplifikation klassifiziert.

In der Rotor-Gene Q Software werden die Fluoreszenzsignale zwischen zwei Messwerten interpoliert. C_T -Werte können daher eine beliebige reelle Zahl (nicht beschränkt auf ganze Zahlen) im Bereich von 0 bis 40 sein. Für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist der Schwellenwert des (FAM) Kanals Green auf 0,075 relative Fluoreszenzeinheiten und der des (HEX) Kanals Yellow auf 0,02 relative Fluoreszenzeinheiten festgelegt. Diese Werte sind im *therascreen* EGFR Assay Package automatisch konfiguriert. Die Laufkontrollen (Positivkontrolle, Kontrolle ohne Template und interne Kontrolle) werden ausgewertet, um sicherzustellen, dass die C_T -Werte im zulässigen Bereich liegen und die Reaktionen einwandfrei durchgeführt wurden.

Die ΔC_T -Werte der Proben werden für jeden Mutationsassay anhand folgender Gleichung berechnet:

$$\Delta C_T = [C_T\text{-Wert des Mutationsassays}] - [C_T\text{-Wert des Kontrollassays}]$$

Proben werden als mutationspositiv eingestuft, wenn der ΔC_T -Wert innerhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs für diesen Assay liegt. Oberhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs enthält die Probe entweder weniger als den Prozentsatz an Mutation, der mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit nachgewiesen werden kann (außerhalb der Assay-Grenzwerte), oder die Probe ist mutationsnegativ, was zu der Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) führt. Unterhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs wird die Probe als „Invalid“ (Ungültig) bewertet.

Wenn in den Mutationsreaktionen keine Amplifikation festgestellt wird, wird die Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgegeben. Von aus Hintergrundamplifikation berechneten ΔC_T -Werten wird erwartet, dass sie über dem oberen Grenzwert des ΔC_T -Cut-off-Bereichs liegen, und für die Probe wird dementsprechend die Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgegeben.

Für die Assay-Ergebnisse werden die Bewertungen „Mutation Detected“ (Mutation nachgewiesen), „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) oder „Invalid“ (Ungültig) angezeigt. Das Fehlschlagen einer Laufkontrolle führt zur Bewertung „Run Control Failed“ (Laufkontrolle fehlgeschlagen). Für mutationspositive Proben werden die jeweiligen Mutationen angegeben. Ein Tumor kann mehr als eine Mutation enthalten. In diesem Fall werden mehrere Mutationen angegeben.

Markierungen des Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package

Die Markierungen, die von der Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR Assay Package Software angezeigt werden können, ihre Bedeutung und die zu ergreifenden Maßnahmen sind in Tabelle 8 (nächste Seite) aufgeführt.

Die Bezeichnungen der Markierungen sind so aufgebaut, dass sie Informationen zur betroffenen Kit-Komponente, der betroffenen Probe oder Kontrolle und der Fehlerart liefern.

Zum Beispiel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = Die Positivkontrolle (Positive Control, PC), Kontrollassay (CTRL_ASSAY), ist fehlgeschlagen (FAIL).
- NTC_INT_CTRL_FAIL = Die Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC), interne Kontrolle (INT_CTRL), ist fehlgeschlagen (FAIL).
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = Die Probe (SAMPLE), Kontrollassay (CTRL), hat eine hohe Konzentration (HIGH_CONC).

Tabelle 8. Markierungen, Bedeutung und empfohlene Maßnahmen

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
PC_CTRL_ ASSAY_FAIL	PCR-Lauf ungültig – FAM-C _T für die Positivkontrolle in der Kontrollreaktion außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
PC_MUTATION_ ASSAY_FAIL	PCR-Lauf ungültig – FAM-C _T für mindestens eine Mutationskontrollreaktion außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
PC_CTRL_ INVALID_DATA	PCR-Lauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Positivkontrolle (Kontrollreaktionsgemisch) können nicht ausgewertet werden.	Den gesamten PCR-Lauf unter besonderer Beachtung der Mischschritte wiederholen.
PC_MUTATION_ INVALID_DATA	PCR-Lauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Positivkontrolle (Mutationsreaktionsgemisch) können nicht ausgewertet werden.	Den gesamten PCR-Lauf unter besonderer Beachtung der Mischschritte wiederholen.
NTC_INT_CTRL_ FAIL	PCR-Lauf ungültig – interne Kontrolle über dem Bereich für die Negativkontrolle.	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
NTC_INT_CTRL_ EARLY_CT	PCR-Lauf ungültig – interne Kontrolle unter dem Bereich für die Negativkontrolle.	Den gesamten PCR-Lauf wiederholen.
NTC_INVALID_ CT	PCR-Lauf ungültig – FAM für die Negativkontrolle ungültig (unterhalb des Grenzwerts).	Den gesamten PCR-Lauf unter besonderer Beachtung der Mischschritte wiederholen.
NTC_INVALID_ DATA	PCR-Lauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Negativkontrolle können nicht ausgewertet werden.	Den gesamten PCR-Lauf unter besonderer Beachtung der Mischschritte wiederholen.
SAMPLE_CTRL_ INVALID_DATA	Probe ungültig – Fluoreszenzdaten der Probenkontrolle können nicht ausgewertet werden.	Unter besonderer Beachtung der Mischschritte einen neuen PCR-Lauf einrichten, um die entsprechende(n) Probe(n) zu wiederholen.
SAMPLE_CTRL_ HIGH_CONC	Probe ungültig – FAM-C _T in Probenkontrolle zu niedrig.	Probe verdünnen, um den C _T -Wert der Kontrolle zu erhöhen. Diese Verdünnung ist auf der Grundlage der Annahme zu berechnen, dass eine Verdünnung mit dem im Kit enthaltenen Wasser im Verhältnis 1:1 den C _T um 1,0 erhöht. Nach der Verdünnung der Probe einen neuen Lauf zur Mutationsbestimmung einrichten, um die Probe zu wiederholen. Alternativ direkt mit dem Lauf zum EGFR-Mutationsnachweis unter Verwendung der verdünnten Probe fortfahren, wenn die Probe nach dem Lauf zur DNA-Probenbestimmung verdünnt wurde.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_CTRL_FAIL	Probe ungültig – FAM-C _T in der Probenkontrollreaktion zu hoch.	Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe im wiederholten PCR-Lauf ungültig und die DNA-Menge weiterhin unzureichend ist, falls möglich zwei weitere FFPE-Gewebeschnitte extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um diese Extraktion zu testen. Wenn die Probe ungültig ist, den PCR-Lauf für die zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T für die interne Kontrolle (HEX) zu hoch (oder kein C _T), FAM-Kanal mutationsnegativ.	Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch eine Mutation nachgewiesen (oder nicht nachgewiesen) wurde: Ergebnisse angeben, keine weiteren Tests erforderlich. Die Probe mit dem im Kit vorhandenen Wasser verdünnen. Dabei zugrunde legen, dass der C _T der Kontrollreaktion sich bei einer Verdünnung im Verhältnis 1:1 um 1,0 erhöht. Sicherstellen, dass das Endvolumen größer als 40 µl ist (z. B. 40 µl DNA und 40 µl Wasser aus dem DIL-Röhrchen). Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, eine Probe aus zwei weiteren FFPE-Schnitten extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um diese Extraktion zu testen. Wenn die zweite Extraktion ungültig ist, wie oben beschrieben verdünnen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutationsröhrchen ungültig – C _T -HEX für die Probe (interne Kontrolle) zu niedrig.	Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch eine Mutation nachgewiesen (oder nicht nachgewiesen) wurde: Ergebnisse angeben, keine weiteren Tests erforderlich. Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, falls möglich zwei weitere FFPE-Gewebeschnitte extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um diese Extraktion zu testen. Wenn ungültig, den PCR-Lauf für die zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesen, und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsröhrchen ungültig – Fluoreszenzdaten der internen Kontrolle können nicht ausgewertet werden.	<p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch eine Mutation nachgewiesen (oder nicht nachgewiesen) wurde: Ergebnisse angeben, keine weiteren Tests erforderlich.</p> <p>Neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, falls möglich zwei weitere FFPE-Gewebeschnitte extrahieren. Neuen PCR-Lauf einrichten, um diese Extraktion zu testen. Wenn ungültig, den PCR-Lauf für die zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Lauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt) zugewiesenen, und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.</p>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Mindestens eine Mutation ist für eine Probe positiv, und gleichzeitig ist mindestens eine Mutation für dieselbe Probe ungültig.	<p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch eine Mutation nachgewiesen (oder nicht nachgewiesen) wurde: Ergebnisse angeben, keine weiteren Tests erforderlich.</p> <p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch das Ergebnis INVALID (ungültig) erhalten wurde, die Probe nach dem Ergreifen der spezifischen Maßnahme für ungültige Markierungen mit allen Reaktionsgemischen neu testen.</p> <p>Wenn für die betroffene Probe die Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL in Verbindung mit einer anderen Markierung ausgegeben wird, muss die Maßnahme zur Verdünnung der Probe aus der Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL befolgt werden. Neuen PCR-Lauf einrichten und die Probe neu testen.</p> <p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch beim wiederholten PCR-Lauf das Ergebnis INVALID (ungültig) Ergebnis erhalten wurde, eine Probe aus zwei weiteren FFPE-Schnitten extrahieren. Einen neuen PCR-Lauf mit allen Reaktionsgemischen einrichten, um diese Extraktion zu testen.</p> <p>Wenn für diese Probe in einem klinisch relevanten Reaktionsgemisch erneut ein ungültiges Ergebnis erhalten wird, die Probe nach dem Ergreifen der spezifischen Maßnahme für ungültige Markierungen mit allen Reaktionsgemischen wiederholen. Wenn für die betroffene Probe die Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL in Verbindung mit einer anderen Markierung ausgegeben wird, muss die Maßnahme zur Verdünnung der Probe aus der Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL befolgt werden. Einen neuen PCR-Lauf einrichten und diese Probe neu testen.</p> <p>Wenn bei dieser Wiederholung die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID ausgegeben wird, erhält die Probe den Mutationsstatus „Indeterminate“ (Unbestimmt).</p>

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
MUTATION_ EARLY_CT	Probe ungültig – ΔC_T -Wert zu niedrig oder C_T -Wert unterhalb des Cut-off-Bereichs.	Unter besonderer Beachtung der Mischschritte einen neuen PCR-Lauf einrichten, um die Probe zu wiederholen.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Häufig gestellte Fragen“ (Frequently Asked Questions, FAQ) unseres Support-Centers 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

NTC-Proben zeigen im FAM-Kanal Green positive Ergebnisse

- | | |
|--|---|
| 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 Instrumente regelmäßig dekontaminiert werden. |
|--|---|

Kein Signal für die EGFR-Positivkontrolle

- | | |
|--|---|
| a) Der für die PCR-Datenanalyse ausgewählte Fluoreszenzkanal erfüllt nicht die Anforderungen des Protokolls. | 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 den Angaben im Protokoll. Wiederholen Sie den Lauf, wenn inkorrekt. |
| c) Fehlerhafte Konfiguration der PCR | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte anhand des Pipettierschemas und wiederholen Sie bei Bedarf die PCR. |

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|--|---|
| d) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Komponenten des Kits stimmen nicht mit den Anweisungen im Abschnitt „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (Seite 18) 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 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. |

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* EGFR 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 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrumente speziell eingewiesen und geschult wurden.

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 *therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbuch* 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.

Vor der Analyse der Proben mit dem *therascreen EGFR RGQ PCR Kit* müssen Menge und Qualität der DNA in der Probe bestimmt werden. Im Lieferumfang ist ein zusätzliches Kontrollreaktionsgemisch enthalten, mit dem bestimmt werden kann, ob der C_T -Wert im zulässigen Bereich für diesen Assay liegt. Extinktions-Messwerte dürfen nicht verwendet werden, da sie mit den C_T -Werten in fragmentierten DNA-Proben nicht korrelieren.

Die Primer im Reaktionsgemisch für die EGFR-Deletionen wurden so designt, 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 von 14 spezifischen Deletionen in Exon 19 demonstriert wurde (siehe Liste in Tabelle 1 in diesem Handbuch), ist nicht auszuschließen, dass durch die Deletionsprimer auch andere Mutationen (einschließlich, aber nicht beschränkt auf, weitere Deletionen in Exon 19, Insertionen in Exon 19 und der L747P-Mutation) amplifiziert werden.

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 den L858R-Assay detektiert wird. In einer entsprechenden Patientenprobe könnte daher die L858Q-Mutation zu dem Ergebnis „L858R Detected“ (L858R-Mutation nachgewiesen) führen.

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

Leistungsmerkmale

Analytische Leistung

Die Leistungsmerkmale des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits wurden in Untersuchungen an FFPE-Gewebespezimen von NSCLC-Patienten und humanen FFPE-Zelllinien bestimmt. Die FFPE-Zelllinien wurden aus einer Lungenkarzinom-Zelllinie (A549) generiert, um Zelllinien zu erhalten, die die gewünschten EGFR-Mutationen enthalten. Wenn keine Gewebespezimen oder Zelllinien vorlagen, wurde Plasmid-DNA verwendet.

Leerwertgrenze (Limit of Blank, LOB), Arbeitsbereich, Cut-off-Werte und ΔC_T -Cut-off-Bereiche

Unter Anwendung einer an NCCLS EP17-A (2004) (12) angelegten Methode wurden insgesamt 417 FFPE-Proben getestet, um die LOB und die ΔC_T -Cut-off-Werte für die verschiedenen Mutationsassays zu bestimmen. Darüber hinaus wurde der Arbeitsbereich bestimmt. Die ΔC_T -Cut-off-Bereiche sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9. ΔC_T -Cut-off-Bereiche, die für die einzelnen Mutationsassays bestimmt wurden

Assay	C_T -Bereich	ΔC_T -Cut-off-Bereich (ΔC_T)
T790M	0,00 bis 40,00	-10,00 \geq bis \leq 7,40
Deletionen	0,00 bis 40,00	-10,00 \geq bis \leq 8,00
L858R	0,00 bis 40,00	-10,00 \geq bis \leq 8,90
L861Q	0,00 bis 40,00	-10,00 \geq bis \leq 8,90
G719X	0,00 bis 40,00	-10,00 \geq bis \leq 8,90
S768I	0,00 bis 40,00	-10,00 \geq bis \leq 8,90
Insertionen	0,00 bis 40,00	-10,00 \geq bis \leq 8,00

Der C_T -Bereich der Kontrollreaktion wurde auf 23,70 bis 31,10 festgesetzt.

Die Cut-off-Werte und Arbeitsbereiche des Assays wurden anhand von Standards und weiteren FFPE-Proben verifiziert. Im Rahmen der Verifizierung wurden die Cut-off-Werte hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Differenzierung der korrekten Mutation in einem Hintergrund von Wildtyp-DNA beurteilt. Dazu wurde jeder Assay mit einer hohen Ausgangskonzentration von genomischer DNA und mutierter DNA durchgeführt (siehe Kreuzreaktivität). Auch der Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf das Mutationsergebnis wurde bewertet (siehe Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte). Eine niedrigere Grenze für den Bereich wird festgelegt, um PCR-Fluoreszenzartefakte auszuschließen.

Proben ohne Template und NSCLC-EGFR-Wildtyp-DNA wurden untersucht, um die Leistung des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits in Abwesenheit von Template 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 Ergebnisse zeigten, dass für NTC-Proben und FFPE-Wildtyp-Proben keine positiven Mutationsergebnisse erhalten werden.

Effekt der DNA-Ausgangsmenge auf die ΔC_T -Werte

Die DNA-Ausgangsmenge ist als die Gesamtmenge amplifizierbarer EGFR-DNA in einer Probe definiert. Dazu werden als Bestimmunggrundlage die C_T -Werte der Kontrollreaktion herangezogen. Um nachzuweisen, dass die Leistung des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits über den gesamten C_T -Bereich der Kontrollreaktion (23,70–31,10) konstant ist, wurden alle 7 EGFR-Mutationsassays gegen eine aus 6 Punkten bestehende 1:3-Verdünnungsreihe getestet (aus FFPE-Zelllinien extrahierte DNA). Der C_T -Zielwert für Verdünnung 1 betrug für jede Mutation ungefähr 24,70. Die letzte Verdünnung, die einen C_T -Wert von ungefähr 32–33 ergab, lag außerhalb des C_T -Bereichs der Kontrollreaktion. Die für unterschiedliche DNA-Gesamtausgangskonzentrationen gemessenen ΔC_T -Werte waren über den Arbeitsbereich des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits insgesamt konsistent.

Kreuzreaktivität

Zur Bewertung der unspezifischen Amplifikation wurde Wildtyp-EGFR-DNA mit einer hohen Ausgangskonzentration getestet. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass die niedrigsten ΔC_T -Werte die festgelegten Cut-off-Werte überschritten, was eine unspezifische Amplifikation anzeigt.

FFPE-Zelllinien mit einer hohen DNA-Ausgangsmenge wurden gegen alle Reaktionsgemische getestet, um die Kreuzreaktivität zu bestimmen. Die Ergebnisse belegen, dass keine Kreuzreaktivität zwischen den Mutationsreaktionen vorliegt. Die ΔC_T -Mindestwerte lagen für alle nicht übereinstimmenden Reaktionsgemische und DNA-Proben allesamt über den Cut-off-Werten der entsprechenden Assays.

Genauigkeit: Vergleich mit der analytischen Referenzmethode

Die Übereinstimmung zwischen dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit und bidirektionaler Sequenzierung nach Sanger beim Mutationsnachweis wurde in einer Studie belegt. In dieser Studie wurden 360 FFPE-Proben getestet.

Es wurden Proben analysiert, die sowohl nach Sanger als auch mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit gültige Ergebnisse lieferten, um die prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA), die prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) und die prozentuale Gesamtübereinstimmung (Overall Percent Agreement, OPA) zu bestimmen. Die dabei erhaltenen Prozentsätze sind zusammen mit den zweiseitigen 95 %-Konfidenzintervallen (KI) in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10. Analyse der Übereinstimmung

Parameter	Übereinstimmung (%) (N)	95 %-KI
Prozentuale positive Übereinstimmung (%)	99,4 % (157/158)	96,5–100,0 %
Prozentuale negative Übereinstimmung (%)	86,6% (175/202)	81,2–91,0 %
Prozentuale Gesamtübereinstimmung (%)	92,2% (332/360)	89,0–94,8 %

Von den 28 nicht übereinstimmenden Ergebnissen der prozentualen Gesamtübereinstimmungs-Studie:

- wurde für 1 (3,6 %) Probe mittels *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit das Ergebnis „Wildtyp“ (d. h. keine Mutation nachgewiesen), aber mittels Sanger-Sequenzierung das Ergebnis „Mutation nachgewiesen“ erhalten.
- wurde für 27 (96,4 %) Proben mittels *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit das Ergebnis „Mutation nachgewiesen“, aber mittels Sanger-Sequenzierung das Ergebnis „Wildtyp“ erhalten.

Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)

Es wurde eine Studie durchgeführt, um für jede der 29 EGFR-Mutationen die LOD zu bestimmen. Die LOD war definiert als die niedrigste Menge an mutierter DNA in einem Hintergrund von Wildtyp-DNA, bei der eine mutierte Probe in 95 % der Testergebnisse noch ein mutationspositives Ergebnis ergibt (C_{95}).

Zur Bestimmung der LOD für jede Mutation wurden Proben mit unterschiedlichen Prozentsätzen an Mutationen mit niedriger und hoher DNA-Ausgangskonzentration hergestellt und mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet (Tabelle 11). Die LOD für jeden Assay wurde mittels logistischer Regression berechnet. Zur Verifizierung der LOD wurden Mutationsproben an der ermittelten LOD getestet und die Positiv-Testrate wurde verifiziert.

Tabelle 11. LOD-Werte, die unter Verwendung von klinischen FFPE-Spezimen, FFPE-Zelllinien oder Plasmiden mit niedrigen und hohen DNA-Ausgangskonzentrationen bestimmt wurden

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

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basenaustausch	LOD (% mutiert)	
				niedrig	hoch
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Insertionen	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 [†]	– [‡]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

[†] Die LOD-Werte wurden unter Verwendung von Zelllinien bestimmt.

[‡] Die LOD-Werte unter Verwendung von Plasmiden bestimmt.

[§] Die LOD-Werte wurden unter Verwendung von klinischen Proben bestimmt.

[†] Nicht untersucht

Störungen

Effekte durch nekrotisches Gewebe

Bei klinischen NSCLC-FFPE-Spezimen mit einem Anteil von nekrotischem Gewebe bis zu 50 % wurden sowohl für Spezimen mit EGFR-Mutation als auch für Wildtyp-Spezimen keine Störungen der mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit bestimmten Ergebnisse nachgewiesen.

Exogene Substanzen

Potenziell bei der DNA-Extraktion vorliegende Störsubstanzen in mutierten und Wildtyp-Proben wurden in 10x Konzentration getestet. Zu diesen Substanzen gehörten Paraffin, Xylen, Ethanol und Proteinase K. Die Ergebnisse belegen, dass diese Substanzen die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit bestimmten Ergebnisse nicht stören.

Reproduzierbarkeit

Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit

Das Testsystem des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits umfasst zwei separate Kits: das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit oder das QIAamp DNA FFPE Tissue Kit zur DNA-Isolierung und das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit zur DNA-Amplifikation und zum Nachweis des EGFR-Mutationsstatus. Die Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit und -Austauschbarkeit wurden anhand von 3 Chargen des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits und 3 Chargen des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits nachgewiesen. Der chargenübergreifende Gesamtprozentsatz der korrekten Bestimmungen betrug für den EGFR-Mutationsassay 97,8 % (317/324) und für Wildtyp-Proben 100 % (379/379).

Handhabung der Spezimen

Die Reproduzierbarkeit des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits wurde anhand von Schnitten untersucht, die von drei FFPE-Spezimenblöcken gewonnen wurden. Im Einzelnen wurden die Deletionsmutation in Exon 19 (2235-2249 del15), die Mutation L858R in Exon 21 sowie ein Wildtyp untersucht. Für jedes Spezimen wurden an 3 Standorten Extraktionen jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt und an 3 nicht aufeinanderfolgenden Tagen über einen Zeitraum von 6 Tagen getestet. Dabei wurden für jedes Spezimen insgesamt 18 Datenpunkte erhalten. Die Tests wurden an jedem Standort von 2 Bedienern unter Verwendung von 1 Charge des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits (1 Charge pro Standort, insgesamt 3 Chargen) in Verbindung mit der gleichen Charge von *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Reagenzien (chargenübergreifend) durchgeführt.

Alle Ergebnisse der mutierten und Wildtyp-Spezimen waren gültig und ergaben die erwartete Bestimmungsrate (korrekte Bestimmungen = 100 %, 18/18 für jedes Spezimen). Dies stützt die Reproduzierbarkeit und Wiederholpräzision, die in der präanalytischen Phase der DNA-Isolierung für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit bestimmt wurden.

Präzision und Reproduzierbarkeit

Präzision und Reproduzierbarkeit des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits wurden durch das Testen von DNA untersucht, die aus klinischen NSCLC-FFPE-Spezimen oder FFPE-Zelllinien extrahiert wurde. Die verwendeten Spezimen und Zelllinien waren für alle sieben Mutationsassays des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits repräsentativ. Klinische NSCLC-FFPE-Wildtyp-Spezimen wurden im Rahmen der Studie ebenfalls untersucht (Tabelle 12).

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit des Assays wurde ein Matrix-Studiendesign implementiert. Im Rahmen dieses Designs wurden Proben in 3 Labors (Standorten) mit 3 Chargen des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits (3 Chargen an 3 Standorten) von 2 Bedienern und mit 2 Instrumenten pro Standort getestet, wobei jede einzelne Probe (in Konzentrationen nahe der LOD) über einen Zeitraum von insgesamt 16 Tagen in Doppelbestimmung getestet wurde. Die Reproduzierbarkeit wurde für jede einzelne Mutation an nicht aufeinanderfolgenden Tagen an jedem Standort untersucht. Der Anteil der korrekten Bestimmungen ist in Tabelle 12 (nächste Seite) zusammengefasst.

Tabelle 12. Reproduzierbarkeit des Assays: Anteil korrekter Bestimmungen für die getesteten EGFR-Mutationen

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Bestimmungen		% korrekt
			Korrekt/gesamt	% korrekt	Untergrenze einseitiges 95 %-KI
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Deletionen	12384	92/92	100	96,80
		12387	95/95	100	96,90
		12419	83/83	100	96,46
		12422	94/94	100	96,86
		13551	95/95	100	96,90
		6220	96/96	100	96,93
		6223	95/95	100	96,90
		6225	91/95	95,79	90,62
		6254	92/92	100	96,80
		6255	94/96	97,92	93,59
		12369	95/95	100	96,90
		12370	62/63	98,41	92,69
		12382	92/95	96,84	92,04
		12383	93/93	100	96,83
20	S768I	6241	82/82	100	96,41
		Insertionen	12376	92/92	100
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Wildtyp	–	–	77/78	98,72	94,06

* COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: <http://cancer.sanger.ac.uk/>.

Die Standardabweichung und 95 %-Konfidenzintervalle für die Intra-Lauf-, Inter-Lauf-, Inter-Tag-, Inter-Chargen- und Inter-Standort-Variabilität wurden anhand einer Varianzkomponentenanalyse bestimmt. Der Variationskoeffizient (VK) betrug für alle getesteten EGFR-Mutationen über alle Varianzkomponenten hinweg insgesamt $\leq 14,11$ %. Der prozentuale Variationskoeffizient war für die Inter-Chargen-, Inter-Tag- und Inter-Lauf-Variabilität über alle mutierten Panel-Mitglieder hinweg $\leq 8,33$ %. Der prozentuale Variationskoeffizient für die Intra-Lauf-Variabilität (Wiederholpräzision/Präzision) lag im Bereich von 5,99 bis 13,49 %.

Klinische Leistungsmerkmale

Klinische Ergebnisse: GIOTRIF®

Bei der klinischen Studie LUX-Lung 3 handelte es sich um eine internationale, multizentrische, randomisierte Open-Label-Studie der Phase III, in der Afatinib versus Chemotherapie als Erstlinientherapie für Patienten mit Lungenadenokarzinom des Stadiums IIIB oder IV mit aktivierender EGFR-Mutation untersucht wurde (ClinicalTrials.gov Nummer NCT00949650). Die Eignung eines Patienten für die Teilnahme an der Studie wurde durch die Bestimmung seines EGFR-Mutationsstatus mit dem Assay im Rahmen der klinischen Studie (Clinical Trial Assay, CTA) untersucht. Mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit wurden retrospektive Tests der Gewebespezimen durchgeführt. Die Übereinstimmung zwischen dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit und dem CTA wurde anhand einer Überbrückungsstudie untersucht.

In der randomisierten Gruppe befanden sich auf der Grundlage der CTA-Testergebnisse 345 Patienten (Afatinib: 230 Patienten, Chemotherapie: 115 Patienten). Der primäre Wirksamkeitsendpunkt, der von einer unabhängigen Prüfkommision (Independent Review Committee, IRC) bewertet wurde, war progressionsfreies Überleben (Progression-Free Survival, PFS). Von den 345 randomisierten Patienten wurden von 264 Patienten (Afatinib: 178 Patienten, Chemotherapie: 86 Patienten) Tumorproben mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit retrospektiv getestet. In der CTA+-Gesamtpopulation und der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+ /CTA+-Population wurde für die Patienten, die in die Afatinib-Gruppe randomisiert wurden, im Vergleich zu den Patienten, die in die Chemotherapie-Gruppe randomisiert wurden, von der IRC eine statistisch signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens festgestellt. Die Ergebnisse für die Gesamtwirksamkeit sind in Tabelle 13 und Abbildung 19 zusammengefasst.

Tabelle 13. Klinischer Nutzen für Patienten, die im Rahmen der klinischen Studie LUX-Lung 3 mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet wurden

Parameter	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-Population n = 264		CTA+-Population, n = 345	
	Chemotherapie	Afatinib	Chemotherapie	Afatinib
	n = 86	n = 178	n = 115	n = 230
Progressionsfreies Überleben (Progression-Free Survival, PFS)				
Anzahl der Todes- und Progressionsfälle, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)
Median PFS (Monate)	6,9	11,2	6,9	11,1
95 %-KI Median PFS	5,3; 8,2	9,7; 13,7	5,4; 8,2	9,6; 13,6
Hazard-Ratio	0,49		0,58	
Hazard-Ratio 95 %-KI	0,35; 0,69		0,43; 0,78	
p-Wert (stratifizierter Log-Rank-Test)*	< 0,0001		< 0,001	

* Nach EGFR-Mutationsstatus und ethnischer Herkunft stratifiziert

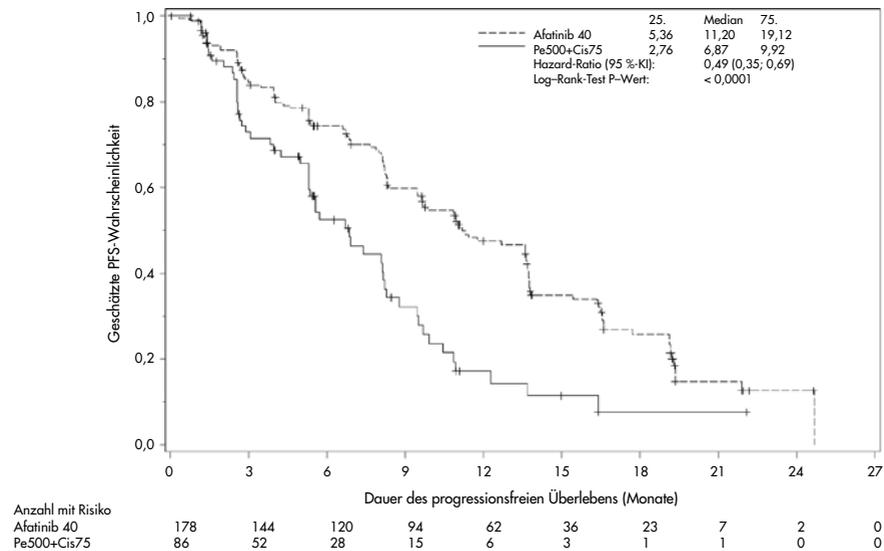


Abbildung 19. Kaplan-Meier-Kurve des von einer unabhängigen Prüfkommision bestimmten progressionsfreien Überlebens (Progression-Free-Survival, PFS) nach Behandlungsgruppe (*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-Population).

Die Analyse der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-Untergruppe (n = 264) ergab, dass bei den mit Afatinib behandelten Patienten im Vergleich zu den Patienten in der Chemotherapie-Gruppe ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben zu beobachten (PFS-Median 11,2 vs. 6,9 Monate) und die Wahrscheinlichkeit von Progression oder Tod geringer war (HR = 0,49, 95 %-KI [0,35; 0,69], p < 0,0001). Der beobachtete klinische Nutzen in der Untergruppe der Patienten, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet wurden, war mit dem der gesamten Studienpopulation (n = 345) vergleichbar.

Klinische Ergebnisse: IRESSA®

Die Studie IRESSA-Follow-up Measure (IFUM) war eine offene, einarmige Phase-IV-Studie (NCT01203917) zur Bestimmung der Wirksamkeit und Sicherheit/Verträglichkeit von Gefitinib als Erstlinientherapie bei europäischen Patienten mit EGFR-mutationspositivem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC im Stadium IIIA/B/IV. Ziel der IFUM-Studie war es, bei prospektiv ausgewählten europäischen Patienten mit EGFR-mutationspositivem NSCLC die objektive Ansprechrate gemäß RECIST-Kriterien zu bestimmen.

Geeignet waren Patienten mit einer Deletion in EGFR-Exon 19, den Substitutionsmutationen L858R, L861Q oder G719X und keiner Mutation T790M oder S768I oder Exon-20-Insertionen in Tumorspezimen. Die Mutationen wurden prospektiv mit dem CTA untersucht. Spezimen von Patienten, die für die klinische Studie IFUM gescreent worden waren, wurden mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit als unterstützendem Diagnostikum retrospektiv getestet. Es wurde eine Überbrückungsstudie durchgeführt, um die Übereinstimmung des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits mit dem CTA zu beurteilen, der zur Auswahl der Patienten für die klinische Studie IFUM verwendet worden war. Die Gesamtübereinstimmung zwischen den beiden Assays für den Nachweis von Deletionen in EGFR-Exon 19 und der Mutation L858R betrug 98,2 % (n = 700/713; 95 %-KI: 96,9 %, 99,0 %) mit einer prozentualen positiven Übereinstimmung (Positive Percentage Agreement; PPA) von 88,2 % (n = 90/102; 95 %-KI: 80,4 %, 93,8 %) und einer prozentualen negativen Übereinstimmung (Negative Percentage Agreement, NPA) von 99,8 % (n = 610/611; 95 %-KI: 99,1 %, 100,0 %).

Es wurden CTA-Testergebnisse für 859 untersuchte Patienten erhalten, von denen 106 Patienten für die Behandlung mit Gefitinib geeignet waren. Von den 859 Proben mit einem CTA-Ergebnis waren 765 Proben für nachträgliche Tests mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit verfügbar, einschließlich 87 Proben, die sowohl mit dem CTA-Test als auch mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit EGFR-mutationspositiv waren.

Der primäre Wirksamkeitsendpunkt war die objektive Ansprechrate (Objective Response Rate, ORR), die im Rahmen einer verblindeten, unabhängigen, zentralen Bewertung (Blinded Independent Central Review, BICR) und durch Prüfer bewertete wurde. Der beobachtete klinische Nutzen in der Untergruppe der Patienten, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet wurden, war mit dem der gesamten Studienpopulation vergleichbar.

Die Ergebnisse für die Gesamtwirksamkeit sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14. Klinischer Nutzen für Patienten, die im Rahmen der klinischen Studie IFUM mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet wurden

Parameter	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit+-Population, n = 87	CTA+-Population, n = 106
Objektive Ansprechrate (Objective Response Rate, ORR) nach BICR Anzahl mit Ansprechen (N)	42	53
ORR, % (95 %-KI)	48,3 (38,1–58,6)	50,0 (40,6–59,4)
Mediane Ansprechdauer (Monate)	6,9 (5,6–11,4)	6,0 (5,6–11,1)
Objektive Ansprechrate (Objective Response Rate, ORR) nach Prüfern Anzahl mit Ansprechen (N)	62	74
ORR, % (95 %-KI)	71,3 (61,0–79,7)	69,8 (60,5–77,7)
Mediane Ansprechdauer (Monate)	8,3 (7,2–11,3)	8,3 (7,6–11,3)

BICR: Blinded independent central review (Verblindete, unabhängige, zentrale Bewertung); KI: Konfidenzintervall; CTA: Clinical Trial Assay (Assay im Rahmen der klinischen Studie).

Hinweis: Kit+ sind positive Ergebnisse für Exon-19-Deletionen/L8585R/L861Q/G719X.

Da das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit nicht zur Auswahl von Patienten für die klinische Studie IFUM verwendet wurde, wurden zusätzliche Wirksamkeitsanalysen durchgeführt, um Patienten zu evaluieren, die nicht an der Studie teilnahmen, weil sie CTA-negativ waren, obwohl sie mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit hätten positiv getestet werden können (d. h., *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-). Darüber hinaus wurden Patienten evaluiert, die zwar für die Studie rekrutiert wurden, aber für die keine gültigen Ergebnisse in den Testwiederholungen mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit erhalten wurden (d. h., *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit unbekannt/CTA+). Die Ergebnisse aller hypothetischen Analysen waren im Allgemeinen mit denen des primären Endpunkts vergleichbar.

Literatur

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

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

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Reagenzien ausreichend für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer
	Vor Lichteinwirkung schützen
	Global Trade Item Number (GTIN)
Rn	R = Revision der Gebrauchsanweisung (Handbuch); n = Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vorsicht

Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll

Dieser Abschnitt enthält Anweisungen für die Verwendung des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits mit der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.5 oder höher, im offenen Modus (d. h. ohne Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Allgemeine Informationen

- Eine Liste des benötigten Materials finden Sie unter **Zusätzlich benötigtes Material**.
- Vollständige Anleitungen zur Vorbereitung und Anordnung der Proben finden Sie unter **Protokoll: Probenbestimmung** und **Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis**.
- Stellen Sie vor dem Start jedes Laufs sicher, dass die Zyklusparameter korrekt sind.

Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils

Erstellen Sie vor dem Start ein Temperaturprofil für die Analyse des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits. Die Zyklusparameter sind für die DNA-Probenbestimmung und den EGFR-Mutationsnachweis identisch.

Verfahren

Eine Übersicht der Zyklusparameter ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Temperaturprofil

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 Computers, der mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument verbunden ist, auf das Symbol der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.
2. Wählen Sie zum Erstellen einer neuen Vorlage Empty Run (Leerer Lauf) und klicken Sie dann auf New (Neu), um den „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) aufzurufen.
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 20).

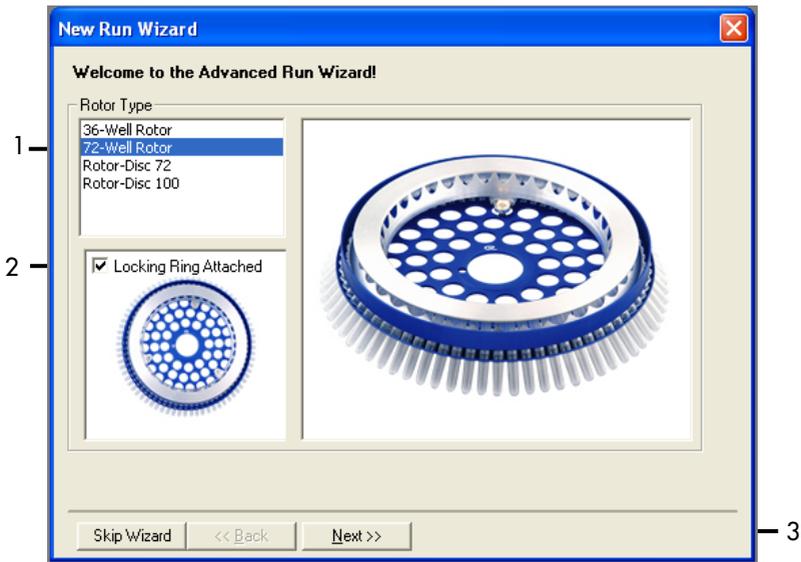


Abbildung 20. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe). 1 = „Rotor Type“ (Rotortyp), 2 = Kästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht), 3 = „Next“ (Weiter).

4. Geben Sie den Namen des Bediener ein. Geben Sie Anmerkungen ein und wählen Sie für Reaktionsvolumen den Wert 25 aus. Vergewissern Sie sich, dass im Feld Sample Layout (Probenkonfiguration) 1, 2, 3... ausgewählt ist. Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 21).

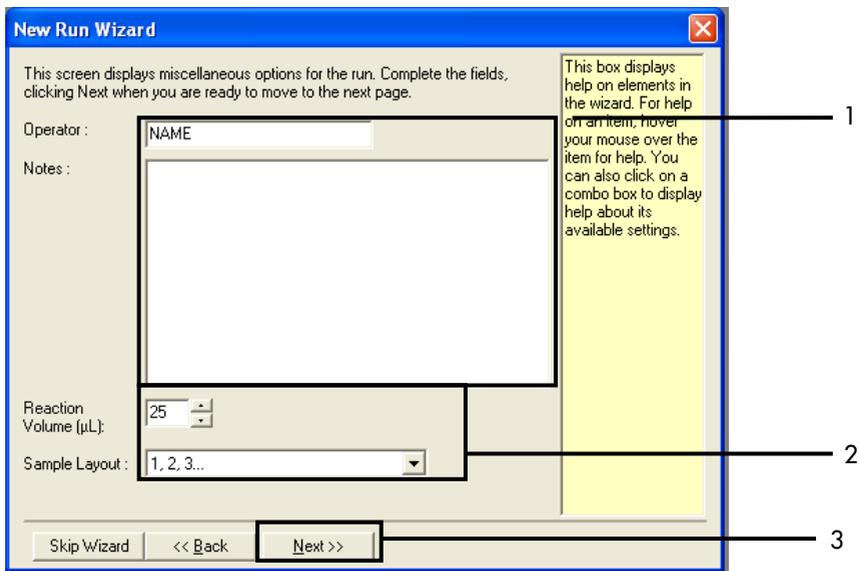


Abbildung 21. Eingeben des Bediennamens und des Reaktionsvolumens. 1 = Dialogfelder „Operator“ (Bediener) und „Notes“ (Notizen), 2 = Felder „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen) und „Sample Layout“ (Probenkonfiguration), 3 = „Next“ (Weiter).

5. Klicken Sie im Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) auf Edit Profile (Profil bearbeiten) (Abbildung 22) und überprüfen Sie wie in den folgenden Schritten beschrieben die Laufparameter.

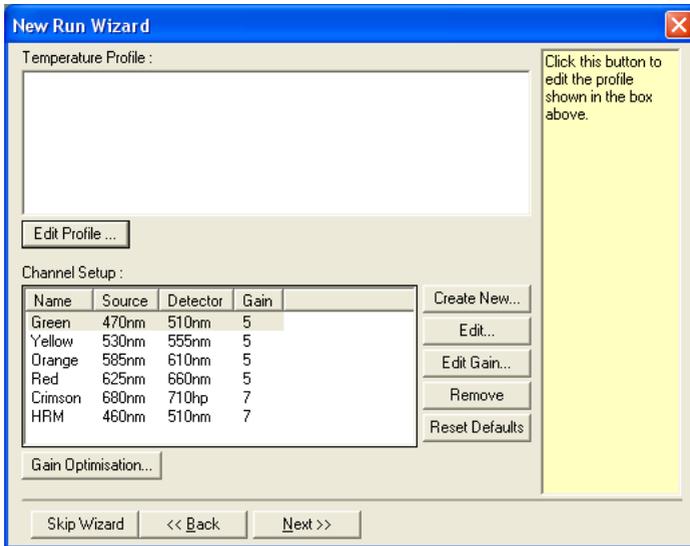


Abbildung 22. „Edit Profile“ (Profil bearbeiten) im Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe).

6. Klicken Sie auf Insert after (Einfügen nach) und wählen Sie die Option New Hold at Temperature (Neue Temperatur halten) (Abbildung 23).

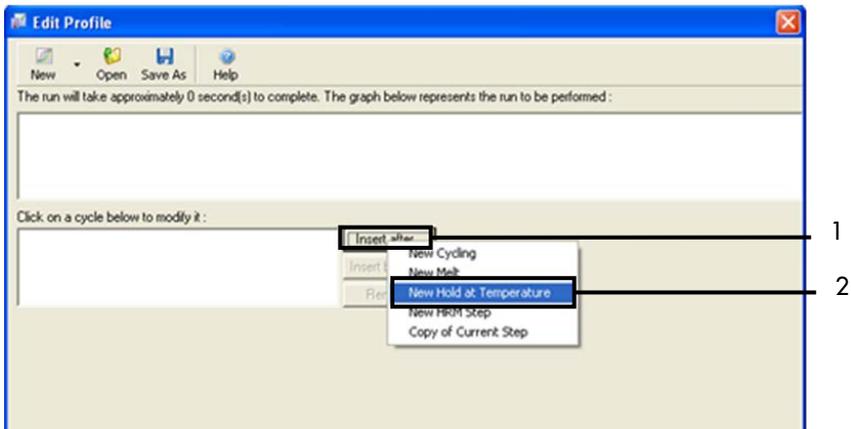


Abbildung 23. Einfügen eines ersten Inkubationsschritts. 1 = „Insert after“ (Einfügen nach), 2 = „New Hold at Temperature“ (Neue Temperatur halten).

7. Stellen Sie den Wert im Feld Hold Temperature (Haltetemperatur) auf 95 °C und den Wert im Feld Hold Time (Haltedauer) auf 15 mins 0 secs (15 Min. 0 Sek.) ein. Klicken Sie auf Insert After (Einfügen nach) und wählen Sie New Cycling (Neuer Zyklus) (Abbildung 24).

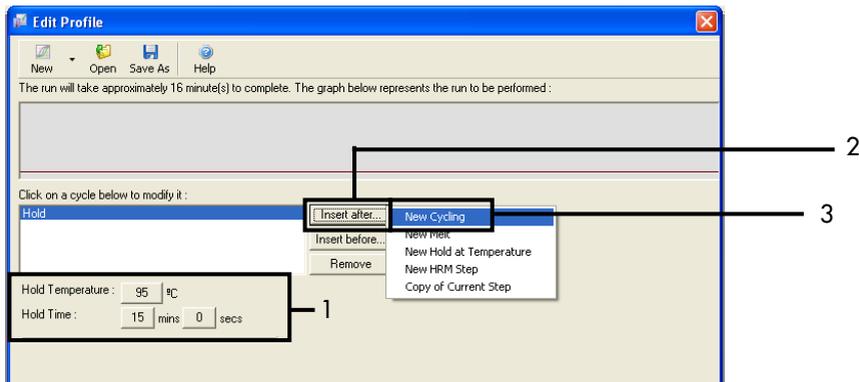


Abbildung 24. Erster Inkubationsschritt bei 95 °C. 1 = „Hold Temperature“ (Haltetemperatur) und „Hold Time“ (Haltedauer), 2 = „Insert after“ (Einfügen nach), 3 = „New Cycling“ (Neuer Zyklus).

8. Stellen Sie die Anzahl der Zykluswiederholungen auf 40 ein. Wählen Sie den ersten Schritt aus und stellen Sie diesen auf 95 °C für 30 s ein (Abbildung 25).

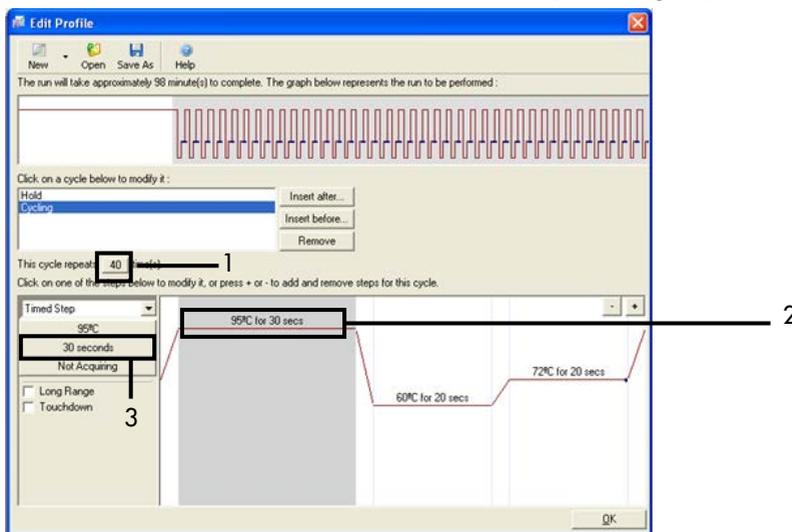


Abbildung 25. Zyklusschritt bei 95 °C. 1 = Kästchen „Cycle repeats“ (Zykluswiederholungen), 2 = Temperatureinstellung für ersten Schritt, 3 = Zeiteinstellung für ersten Schritt.

9. Markieren Sie den zweiten Schritt und stellen Sie diesen auf 60 °C für 60 s ein. Klicken Sie auf Not Acquiring (Keine Erfassung), um die Datenerfassung für diesen Schritt zu aktivieren. (Abbildung 26).

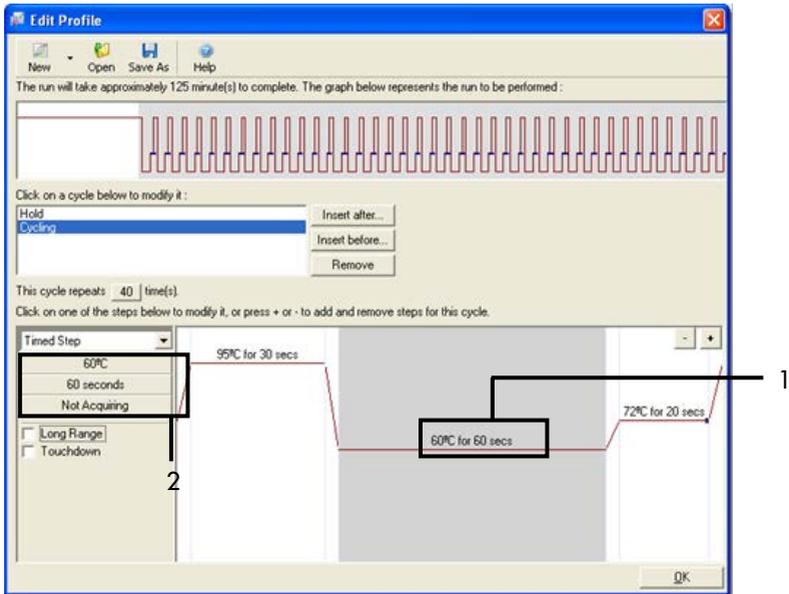


Abbildung 26. Zyklusschritt bei 60 °C. 1 = Temperatur- und Zeiteinstellung für zweiten Schritt, 2 = „Not Acquiring“ (Keine Erfassung).

10. Wählen Sie Green und Yellow als „Acquiring Channels“ (Erfassende Kanäle) aus. Klicken Sie auf >, um diese Kanäle aus der Liste „Available Channels“ (Verfügbare Kanäle) in den Abschnitt Acquiring Channels (Erfassende Kanäle) zu verschieben. Klicken Sie auf OK (Abbildung 27).

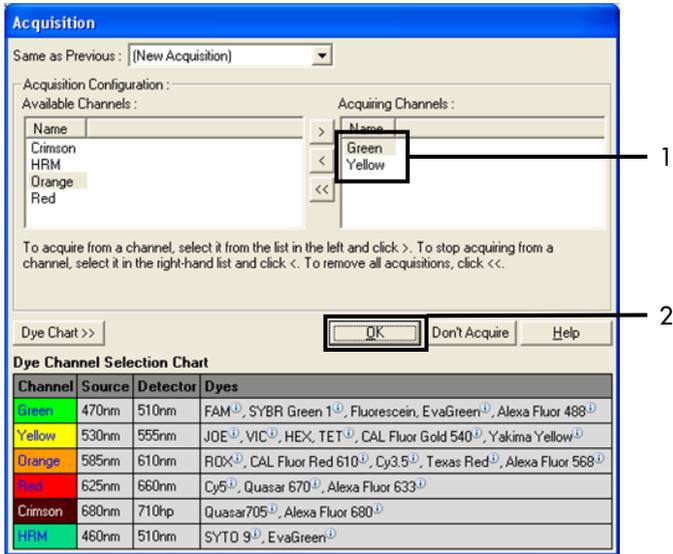


Abbildung 27. Erfassung im Zyklusschritt bei 60 °C. 1 = Ausgewählte Kanäle, 2 = „OK“.

11. Markieren Sie den dritten Schritt und löschen Sie diesen, indem Sie auf - klicken. Klicken Sie auf OK (Abbildung 28).

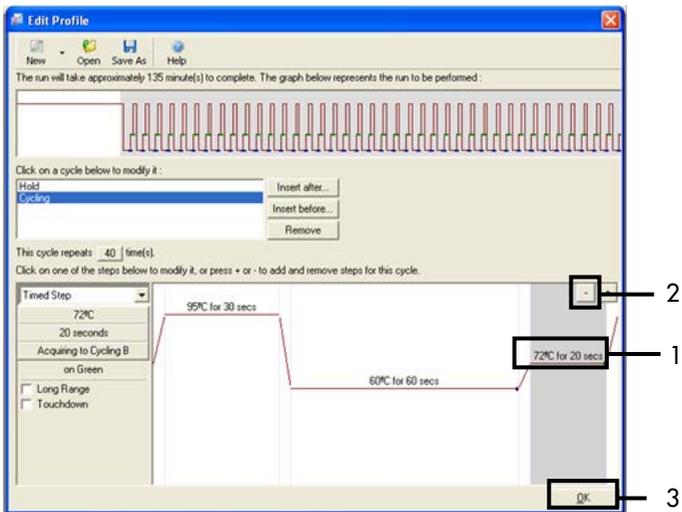


Abbildung 28. Entfernen des Verlängerungsschrittes. 1 = Dritter Schritt, 2 = „Delete“ (Löschen), 3 = „OK“.

12. Klicken Sie im nächsten Dialogfeld auf Gain Optimisation (Verstärkungsoptimierung) (Abbildung 29).

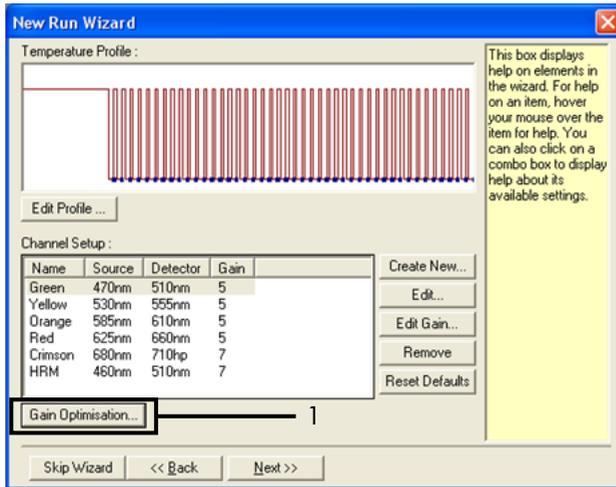


Abbildung 29. Gain optimisation (1) (Verstärkungsoptimierung (1)).

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 30).

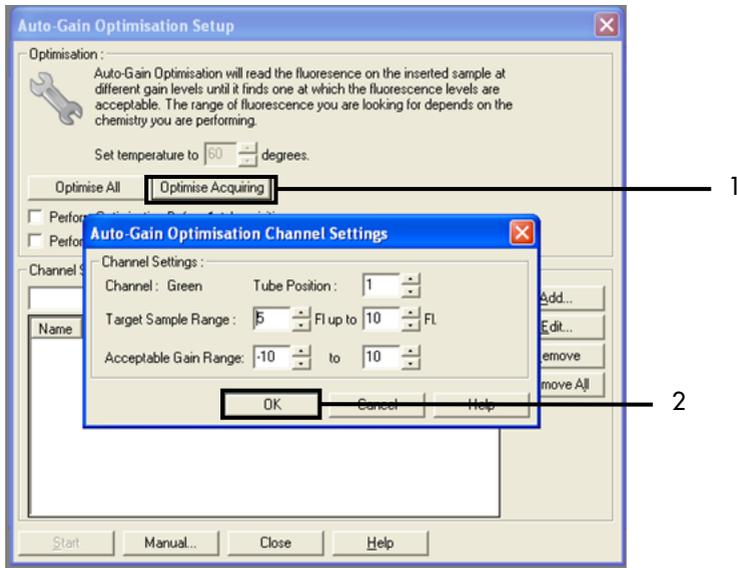


Abbildung 30. Automatische Verstärkungsoptimierung für den Kanal Green. 1 = „Optimise Acquiring“ (Erfassung optimieren), 2 = „OK“.

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 31).

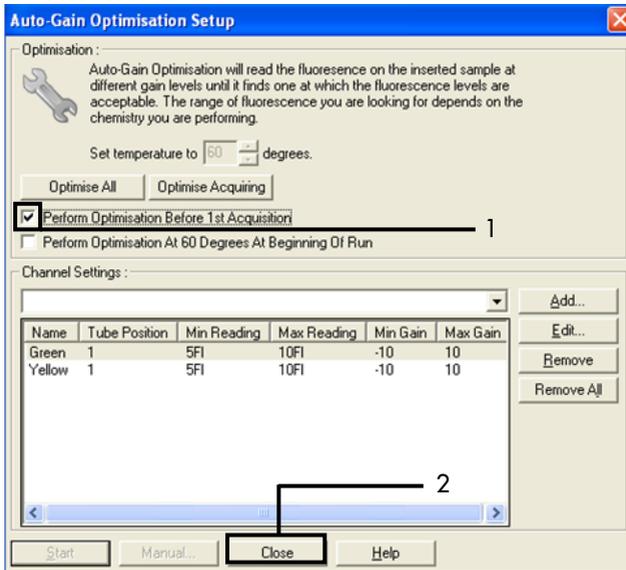


Abbildung 31. Auswahl der Kanäle Green und Yellow 1 = Kontrollkästchen „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen), 2 = „Close“ (Schließen).

15. Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 32). Klicken Sie auf Save Template (Vorlage speichern), um die Vorlage für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (*.ret-Datei) am gewünschten Speicherort zu speichern.

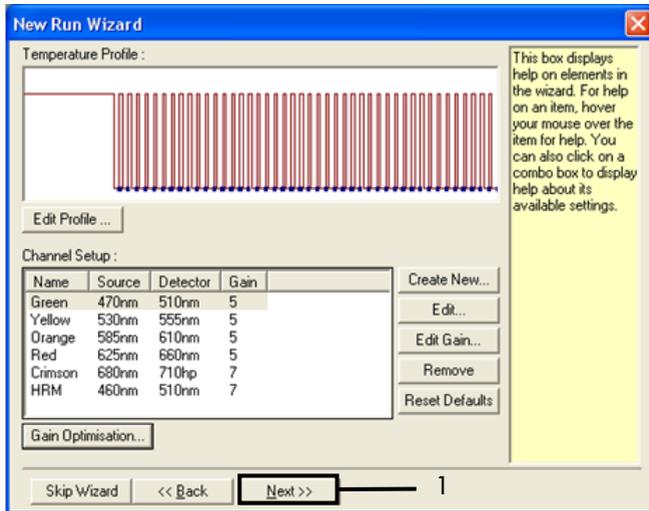


Abbildung 32. „Next“ (Weiter) (1).

Verfahren (manuell)

Protokoll: Probenbestimmung (manuell)

Dieses Protokoll wird zur Bestimmung der Gesamtmenge an amplifizierbarer DNA in Proben verwendet und muss vor der EGFR-Mutationsanalyse durchgeführt werden.

- Bereiten Sie die Proben wie im Abschnitt Protokoll: Probenbestimmung beschrieben bis Schritt 11 vor.
- Richten Sie den PCR-Lauf auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument wie im Abschnitt Protokoll: Rotor-Gene Q Konfiguration für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit beschrieben ein.
- Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß der Anleitung im Abschnitt Analyse der Daten aus der Probenbestimmung.

Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis (manuell)

- Nach einer erfolgreichen Probenbestimmung kann die Probe zum Nachweis von EGFR-Mutationen getestet werden.
- Bereiten Sie die Proben wie unter „Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis“ beschrieben bis Schritt 11 vor.
- Richten Sie den PCR-Lauf auf dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument wie im Abschnitt Protokoll: Rotor-Gene Q Konfiguration für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit beschrieben ein.
- Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß der Anleitung im Abschnitt Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis.

Protokoll: Rotor-Gene Q Konfiguration für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Verfahren

1. Öffnen Sie die Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.5 oder höher, und rufen Sie das gewünschte Temperaturprofil des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits (*.ret-Datei) auf.
Informationen zum Erstellen des Temperaturprofils und zur Überprüfung der Laufparameter finden Sie unter Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils.
2. Vergewissern Sie sich, dass der korrekte Rotor ausgewählt ist, und aktivieren Sie das Kontrollkästchen Locking Ring Attached (Schließring angebracht). Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 33).

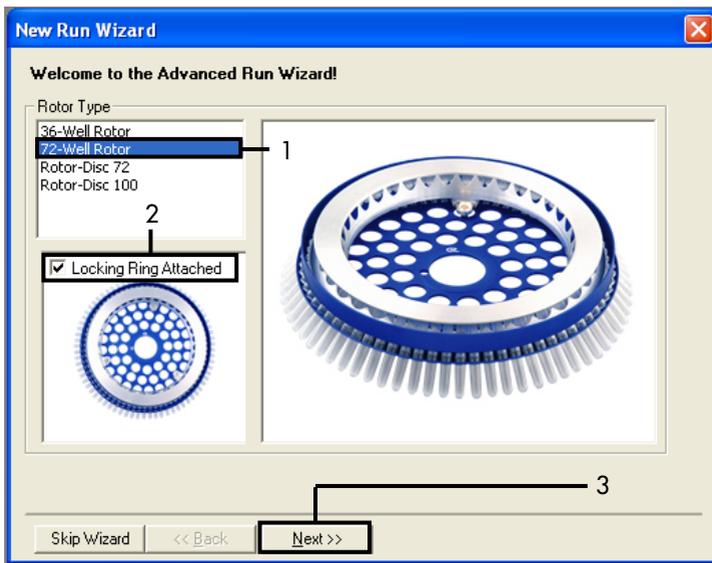


Abbildung 33. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) mit Willkommensfenster. 1 = „Rotor Type“ (Rotortyp), 2 = Kästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht), 3 = „Next“ (Weiter).

3. Geben Sie den Namen des Bedieners ein. Geben Sie unter „Notes“ Anmerkungen ein und stellen Sie sicher, dass das Reaktionsvolumen auf 25 eingestellt ist und im Feld Sample Layout (Probenkonfiguration) der Wert 1, 2, 3... angezeigt wird. Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 34).

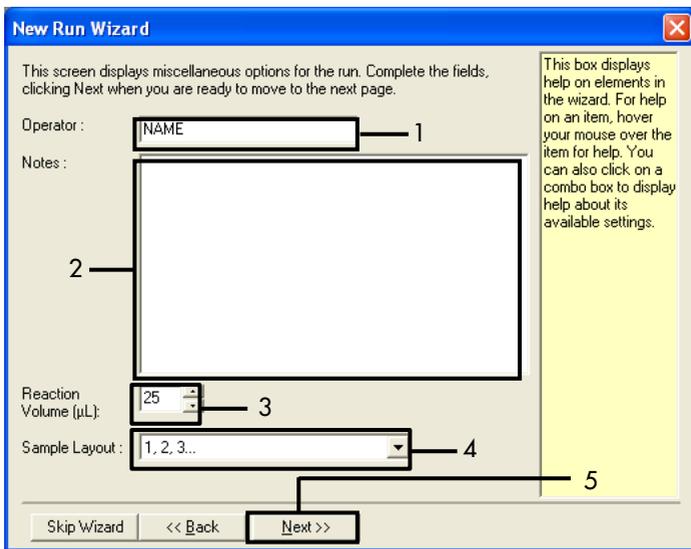


Abbildung 34. Optionsfenster des Dialogfelds „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) 1 = „Operator“ (Bediener); 2 = Feld „Notes“ (Notizen), 3 = „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen); 4 = Feld „Sample Layout“ (Probenkonfiguration), 5 = „Next“ (Weiter).

Hinweis: Im nächsten Fenster kann das Temperaturprofil bearbeitet werden. (Wenn das Temperaturprofil gemäß der Anleitung unter Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils erstellt wurde, ist keine Bearbeitung notwendig.)

4. Klicken Sie auf Next (Weiter) (Abbildung 35).

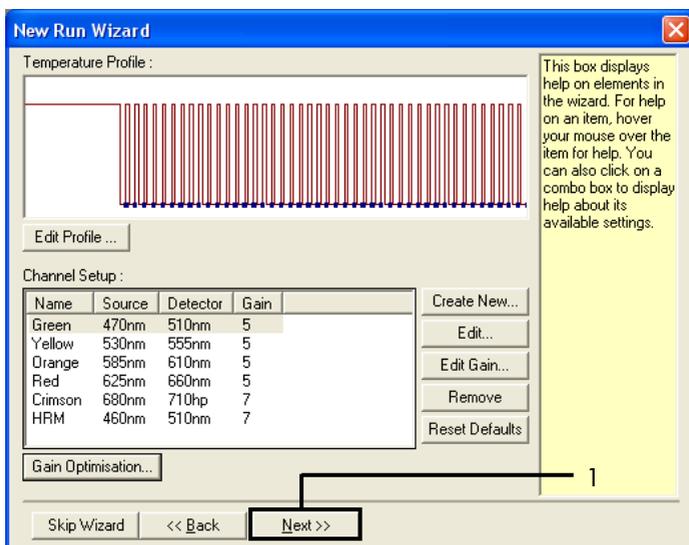


Abbildung 35. Temperaturbearbeitungsfenster des Dialogfelds „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) (1 = „Next“ (Weiter)).

- Überprüfen Sie den Bereich Zusammenfassung und klicken Sie auf Start Run (Lauf starten), um die Laufdatei zu speichern und den Lauf zu starten (Abbildung 36).

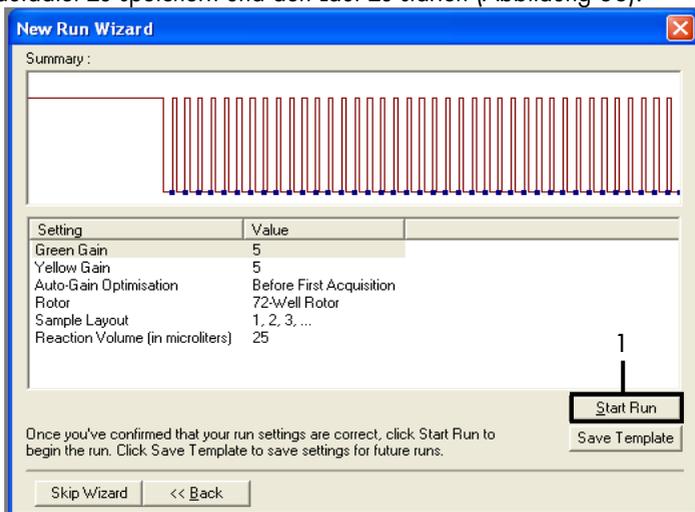


Abbildung 36. Zusammenfassungsfenster des Dialogfelds „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) (1 = „Start Run“ (Lauf starten)).

6. Führen Sie in dem neuen Fenster, das nach Beginn des Laufs erscheint, einen der folgenden Schritte aus:

- Geben Sie die Probenamen ein.
- Klicken Sie auf Finish (Fertigstellen) und geben Sie die Probenamen später ein.

Wählen Sie dafür während oder nach Abschluss des Laufs Sample (Probe) aus.

Wichtig: Wenn Sie auf Finish (Fertigstellen) und Lock Samples (Proben sperren) klicken, können Sie die Probenamen nicht mehr bearbeiten. Gehen Sie beim Eingeben der Probenamen besonders sorgfältig vor, um einen korrekten Testablauf und eine korrekte Analyse der Proben zu gewährleisten.

Hinweis: Bei der Benennung von Proben sollten die Felder für leere Röhrchen in der Spalte „Name“ (Name) leer bleiben.

7. Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs wie im Abschnitt Analyse der Daten aus der Probenbestimmung oder Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis beschrieben.

8. Falls Quantifizierungsberichte erforderlich sind, klicken Sie in der Symbolleiste der Rotor-Gene Q Laufdatei auf das Symbol Reports (Berichte).

9. Klicken Sie in der Berichtansicht unter „Report Categories“ (Berichtskategorien) auf Cycling A. Green (page 1) (Seite 1) (Abbildung 37).

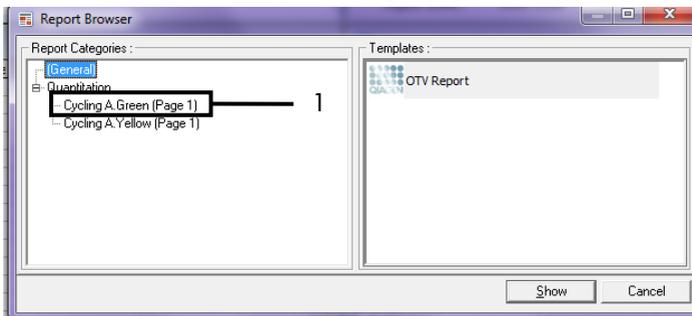


Abbildung 37. Berichtansicht (1 = „Cycling A. Green [Page 1]“ (Seite 1)).

10. Wählen Sie unter „Templates“ (Vorlagen) die Option Quantitation (Full Report) (Quantifizierung (Vollständiger Bericht)) aus (Abbildung 38).

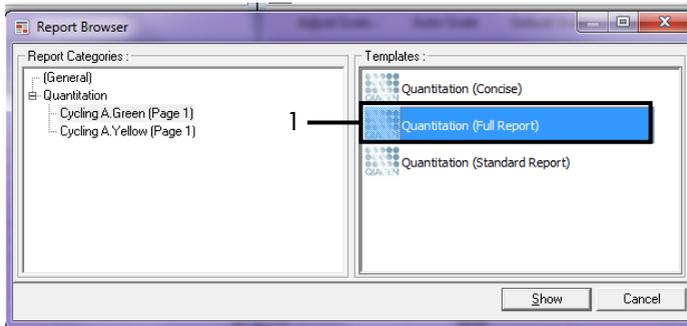


Abbildung 38. Vollständiger Quantifizierungsbericht (1).

11. Klicken Sie auf Show (Anzeigen), um den Bericht zu generieren.
12. Klicken Sie auf Save As (Speichern unter), um den Bericht als Datei zu speichern.
13. Wiederholen Sie diese Schritte für Cycling A. Yellow (Page 1) (Seite 1).

Interpretation der Ergebnisse (manuell)

Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (zur Bestimmung der DNA-Probe und zur EGFR-Mutationsanalyse) wie folgt:

- Softwareeinstellungen für die Analyse
- Analyse der DNA-Probenbestimmung (manuell)
Hinweis: Die Röhrenanordnung finden Sie in Tabelle 4.
- Analyse des EGFR-Mutationsnachweises (manuell)
Hinweis: Die Röhrenanordnung finden Sie in Tabelle 7.

Einstellungen für die Analyse in der Software

1. Öffnen Sie über die Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.5 oder höher, die entsprechende Laufdatei (*.rex).
2. Wenn die Proben nicht schon vor dem Lauf benannt wurden, klicken Sie auf Edit Samples (Proben bearbeiten).
3. Geben Sie die Namen der Proben in die Spalte „Name“ ein.
Hinweis: Lassen Sie die Namen für leere Röhren leer.
4. Klicken Sie auf Analysis (Analyse). Klicken Sie auf der Analysenseite auf Cycling A. Yellow, um den (HEX) Kanal Yellow zu aktivieren.
5. Klicken Sie auf Named On (Mit Benennung).
Hinweis: Auf diese Weise wird sichergestellt, dass leere Röhren in der Analyse nicht berücksichtigt werden.
6. Wählen Sie Dynamic tube (Dynamisches Röhren).
7. Wählen Sie Slope correct (Steigungskorrektur).
8. Wählen Sie Linear scale (Lineare Skalierung).

9. Wählen Sie Take off Adj. (Ausgangspunkt anpassen) und geben Sie im oberen Feld („If take off point was calculated before cycle“ (Wenn Ausgangspunkt vor Zyklus berechnet wurde)) den Wert 15.01 und in das untere Feld („then use the following cycle and take off point“ (dann folgenden Zyklus und Ausgangspunkt verwenden)) den Wert 20.01 ein.
10. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0.02 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte des (HEX) Kanals Yellow.
11. Klicken Sie auf der Analysenseite auf Cycling A. Green, um den (FAM) Kanal Green anzuzeigen.
12. Wählen Sie Named On (Mit Benennung).
13. Wählen Sie Dynamic tube (Dynamisches Röhrchen).
14. Wählen Sie Slope correct (Steigungskorrektur).
15. Wählen Sie Linear scale (Lineare Skalierung).
16. Wählen Sie Take off Adj. (Ausgangspunkt anpassen) und geben Sie im oberen Feld („If take off point was calculated before cycle“ (Wenn Ausgangspunkt vor Zyklus berechnet wurde)) den Wert 15.01 und in das untere Feld („then use the following cycle and take off point“ (dann folgenden Zyklus und Ausgangspunkt verwenden)) den Wert 20.01 ein.
17. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0.075 ein und überprüfen Sie die C_T -Werte des (FAM) Kanals Green.

Analyse der Daten aus der Probenbestimmung

Sehen Sie nach Abschluss des Laufs zur DNA-Probenbestimmung den Abschnitt Einstellungen für die Analyse in der Software ein und analysieren die Daten wie folgt (siehe Röhrenchenanordnung in Tabelle 4 auf Seite 26).

Analyse der Laufkontrollen

Negativkontrolle

Um eine Template-Kontamination auszuschließen, darf der C_T -Wert der Kontrolle ohne Template im (FAM) Kanal Green nicht unter 40 liegen.

Um sicherzustellen, dass der Lauf korrekt eingerichtet wurde, muss die Kontrolle ohne Template im (HEX) Kanal Yellow eine Amplifikation von 29,85 bis 35,84 aufweisen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs zählen noch zu den zulässigen Werten.

Positivkontrolle

Der C_T -Wert der EGFR-Positivkontrolle muss im (FAM) Kanal Green im Bereich von 28,13 bis 34,59 liegen. Ein Wert außerhalb dieses Bereichs zeigt ein Problem bei der Assay-Konfiguration an. Der Lauf ist fehlgeschlagen.

Hinweis: Die Probandaten dürfen nicht verwendet werden, wenn die Negativ- oder Positivkontrolle fehlgeschlagen ist.

Probenanalyse

Wenn die Kontrollen des Laufs zur DNA-Probenbestimmung gültig sind, kann die Analyse fortgesetzt werden. Der C_T -Wert einer Probe muss im (FAM) Kanal Green im Bereich von 23,70 bis 31,10 liegen. Wenn die Probe außerhalb dieses C_T -Bereichs liegt, gehen Sie wie folgt vor:

- C_T-Wert des Probenkontrollassays < 23,70

Proben mit einem Kontroll-C_T von < 23,70 (hohe DNA-Konzentration) müssen verdünnt werden, da sie die Mutationsassays sonst überlasten würden. Um jede Mutation in einer niedrigen Konzentration nachzuweisen, werden überkonzentrierte Proben so verdünnt, dass der C_T-Wert im Bereich von 23,70 bis 31,10 liegt. Durch die Verdünnung der DNA in der Probe erhöht sich der C_T-Wert (eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 erhöht den C_T-Wert um ungefähr 1,0). Verdünnen Sie die Proben mit dem im Kit enthaltenen Wasser (Wasser zur Verdünnung (Dil.)).

- C_T-Wert des Probenkontrollassays > 31,10

Bei einem Kontroll-C_T > 31,10 im (FAM) Kanal Green wird eine erneute Extraktion der Proben empfohlen. Es liegt nicht genug DNA-Starttemplate vor, um alle EGFR-Mutationen an den für den Assay angegebenen Cut-off-Werten nachzuweisen.

Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis

Eine Probe muss die DNA-Probenbestimmung bestehen, bevor sie auf EGFR-Mutationen getestet werden kann (siehe Analyse der Daten aus der Probenbestimmung).

Nach Abschluss des Laufs zum EGFR-Mutationsnachweis sehen Sie den Abschnitt Einstellungen für die Analyse in der Software ein und analysieren die Daten wie folgt. (Siehe Röhrenanordnung in Tabelle 7.)

Analyse der Laufkontrollen

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Flussdiagramm in Abbildung 39.

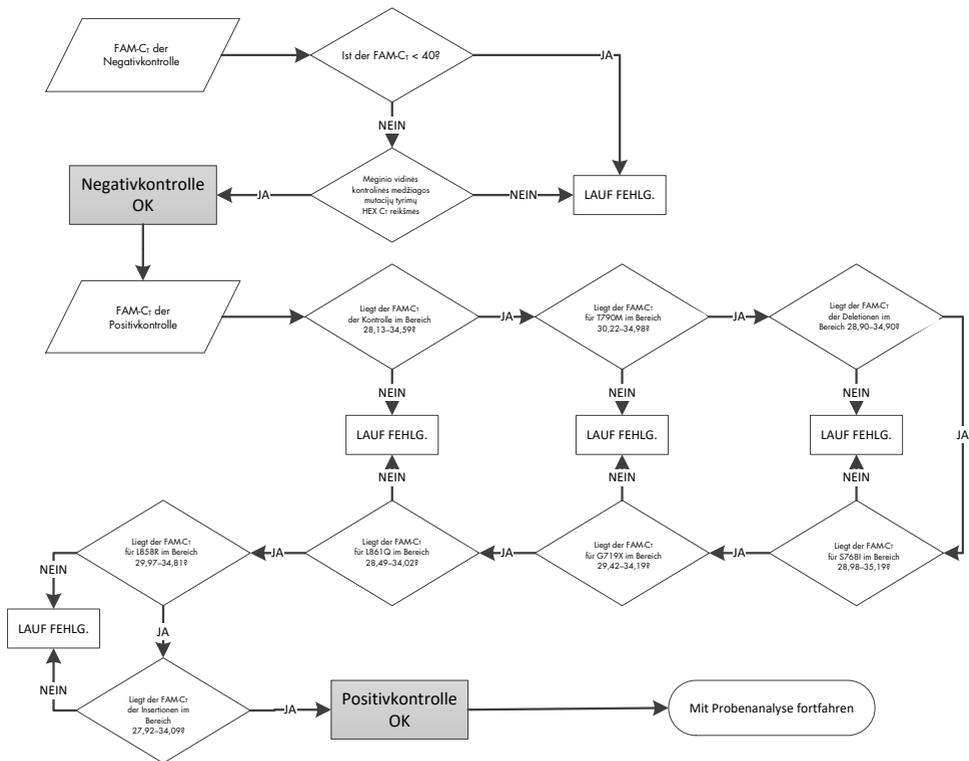


Abbildung 39. Flussdiagramm zur Analyse der Laufkontrollen für den EGFR-Mutationsnachweis.

Negativkontrolle

Um eine Template-Kontamination auszuschließen, darf der C_T -Wert der Kontrolle ohne Template für jeden EGFR-Mutationsassay im (FAM) Kanal Green nicht unter 40 liegen.

Um sicherzustellen, dass der Lauf korrekt eingerichtet wurde, muss die Kontrolle ohne Template im (HEX) Kanal Yellow eine Amplifikation von 29,85 bis 35,84 aufweisen. Die beiden angegebenen Grenzwerte des Bereichs zählen noch zu den zulässigen Werten.

Positivkontrolle

Der C_T -Wert der EGFR-Positivkontrolle muss für jeden EGFR-Mutationsassay im (FAM) Kanal Green in dem Bereich liegen, der in Tabelle 16 angegeben ist. Ein Wert außerhalb dieses Bereichs zeigt ein Problem bei der Assay-Konfiguration an. Der Lauf ist fehlgeschlagen.

Hinweis: Die Probandaten dürfen nicht verwendet werden, wenn die Negativ- oder Positivkontrolle des Laufs fehlgeschlagen ist.

Tabelle 16. Akzeptable C_T -Bereiche für Positivkontrollen (EGFR-Mutationsnachweis)

Reaktionsgemisch	Probe	Kanal	ΔC_T -Cut-off-Bereich
Kontrolle	PC	Green	28,13 bis 34,59
T790M	PC	Green	30,22 bis 34,98
Deletionen	PC	Green	28,90 bis 34,90
L858R	PC	Green	29,97 bis 34,81
L861Q	PC	Green	28,49 bis 34,02
G719X	PC	Green	29,42 bis 34,19
S768I	PC	Green	28,98 bis 35,19
Insertionen	PC	Green	27,92 bis 34,09

Probenanalyse – C_T-Wert für den (FAM) Kanal Green der Probenkontrolle

Wenn die Positiv- und Negativkontrollen des Laufs zum EGFR-Mutationsnachweis gültig sind, kann der EGFR-Mutationsnachweis der Proben fortgesetzt werden.

Der C_T-Wert der Probe muss im (FAM) Kanal Green im Bereich von 23,70 bis 31,10 liegen. (Siehe Röhrenchenanordnung in Tabelle 7.)

Wenn der C_T-Wert der Probenkontrolle 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 (hohe DNA-Konzentration) müssen verdünnt werden, da sie die Mutationsassays sonst überlasten würden. Um jede Mutation in einer niedrigen Konzentration nachzuweisen, werden überkonzentrierte Proben so verdünnt, dass der C_T-Wert im Bereich von 23,70 bis 31,10 liegt. Durch die Verdünnung der DNA in der Probe erhöht sich der C_T-Wert (eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 erhöht den C_T-Wert um ungefähr 1,0). Verdünnen Sie die Proben mit dem im Kit enthaltenen Wasser (Wasser zur Verdünnung (Dil.)).

- C_T-Wert des Probenkontrollassays > 31,10

Bei einem Kontroll-C_T > 31,10 im (FAM) Kanal Green wird eine erneute Extraktion der Proben empfohlen. Es liegt nicht genug DNA-Starttemplate vor, um alle EGFR-Mutationen an den für den Assay angegebenen Cut-off-Werten nachzuweisen.

Weitere Informationen zum EGFR-Mutationsnachweis finden Sie im Flussdiagramm zur Probenanalyse in Abbildung 40.

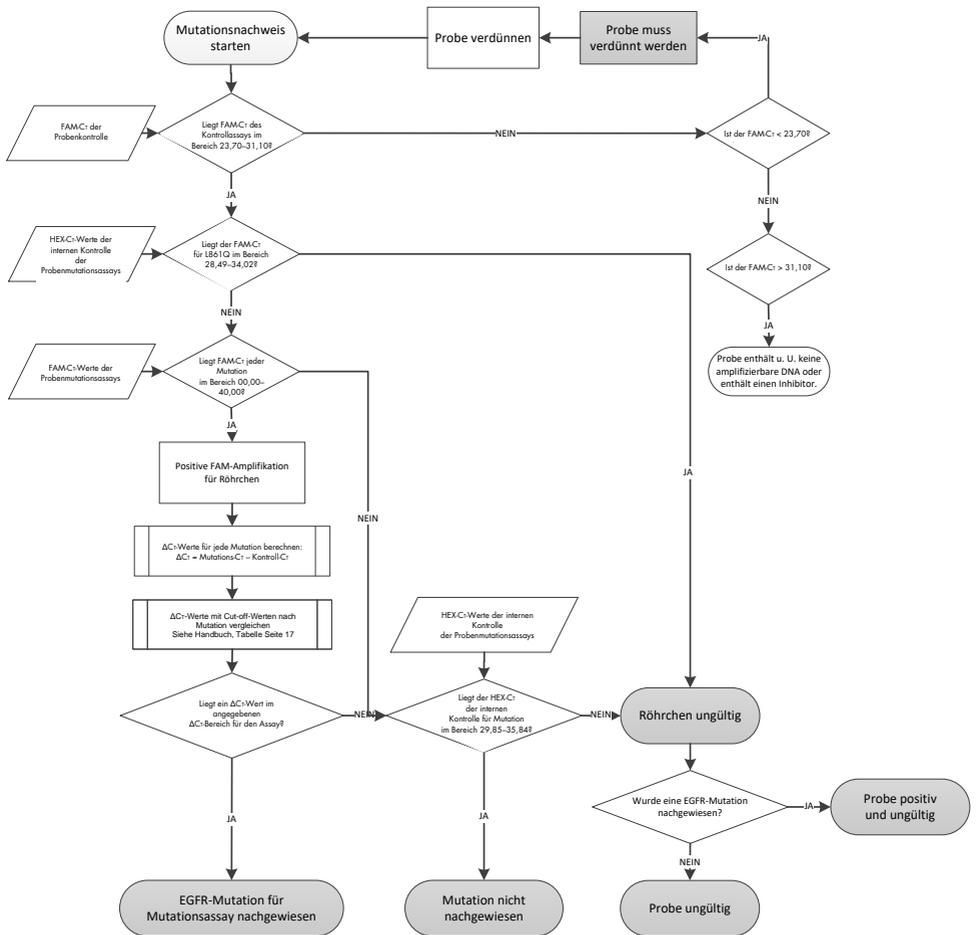


Abbildung 40. Flussdiagramm der Probenanalyse für den EGFR-Mutationsnachweis.

Probenanalyse – C_T -Wert für den (HEX) Kanal Yellow der internen Probenkontrolle

Hinweis: Weitere Informationen zum EGFR-Mutationsnachweis finden Sie im Flussdiagramm zur Probenanalyse in Abbildung 40.

Es müssen alle Röhren jeder Probe analysiert werden. Stellen Sie sicher, dass die interne Kontrolle im Kanal (HEX) Yellow in jedem Röhren ein HEX-Signal im Bereich von 29,85 bis 35,84 erzeugt. Es gibt 3 Möglichkeiten:

- Wenn der C_T -Wert der internen Kontrolle unter dem festgelegten Bereich ($< 29,85$) für jeden Mutationsassay liegt, ist das Ergebnis für die Amplifikation im (HEX) Kanal Yellow ungültig. Die Amplifikation des (HEX) Kanals Yellow ist für dieses Röhren ungültig.
- Wenn der C_T -Wert der internen Kontrolle im festgelegten Bereich (29,85 bis 35,84) liegt, ist das Ergebnis für die Amplifikation im (HEX) Kanal Yellow positiv. Die Amplifikation des (HEX) Kanals Yellow ist für dieses Röhren gültig.
- Wenn der C_T -Wert der internen Kontrolle über dem festgelegten Bereich ($> 35,84$) liegt, ist das Ergebnis für die Amplifikation im (HEX) Kanal Yellow negativ.

Wenn im (FAM) Kanal Green Amplifikation vorliegt und der ΔC_T -Wert dieser Reaktion für dieses Röhren kleiner als der oder gleich dem Cut-off-Wert des Assays ist, so ist die Amplifikation im (HEX) Kanal Yellow gültig. Liegt im (FAM) Kanal Green für dieses Röhren keine Amplifikation vor oder liegt ein ΔC_T -Wert über dem Cut-off-Wert des Assays, ist die Amplifikation für den (HEX) Kanal Yellow ungültig.

Die Amplifikation der internen Kontrolle kann im (HEX) Kanal Yellow aufgrund einer PCR-Inhibition fehlschlagen. Der Effekt von Inhibitoren kann durch eine Verdünnung der Probe reduziert werden. Bedenken Sie, dass dadurch auch die Ziel-DNA in der Probe verdünnt wird. Verdünnen Sie die Proben mit dem im Kit enthaltenen Wasser (Wasser zur Verdünnung (Dil.)).

Probenanalyse – C_T-Wert für den (FAM) Kanal Green des Probenmutationsassays

Die Werte des (FAM) Kanals Green sind für alle sieben EGFR-Mutationsreaktionsgemische mit den in Tabelle 17 aufgeführten Werten zu vergleichen. Die angegebenen Werte liegen innerhalb des zulässigen Bereichs, einschließlich der angegebenen Werte. (Siehe Röhrenanordnung in Tabelle 7.)

Tabelle 17. Zulässige Werte für EGFR-Mutationsreaktionen der Probe im (FAM) Kanal Green (EGFR-Mutationsassay)

Assay	C _T -Bereich	ΔC _T -Cut-off-Bereich
T790M	0,00 bis 40,00	-10,00 ≥ bis ≤ 7,40
Deletionen	0,00 bis 40,00	-10,00 ≥ bis ≤ 8,00
L858R	0,00 bis 40,00	-10,00 ≥ bis ≤ 8,90
L861Q	0,00 bis 40,00	-10,00 ≥ bis ≤ 8,90
G719X	0,00 bis 40,00	-10,00 ≥ bis ≤ 8,90
S768I	0,00 bis 40,00	-10,00 ≥ bis ≤ 8,90
Insertionen	0,00 bis 40,00	-10,00 ≥ bis ≤ 8,00

- Wenn der C_T-Wert des (FAM) Kanals Green für die Probe im angegebenen Bereich liegt, ist die FAM-Amplifikation positiv.
- Wenn der C_T-Wert des (FAM) Kanals Green für die Probe über dem angegebenen Bereich liegt oder keine Amplifikation stattfindet, ist die FAM-Amplifikation negativ.

Berechnen Sie für jedes EGFR-Mutationsröhrchen mit einer positiven FAM-Amplifikation wie folgt den ΔC_T-Wert und achten Sie darauf, dass die Mutations- und Kontroll-C_T-Werte von derselben Probe stammen. (Siehe Röhrenanordnung in Tabelle 7.)

$$\Delta C_T = [C_T\text{-Wert des Mutationsassays}] - [C_T\text{-Wert des Kontrollassays}]$$

Vergleichen Sie den ΔC_T-Wert der Probe mit dem ΔC_T-Cut-off-Bereich des betroffenen Assays (Tabelle 17). Stellen Sie sicher, dass der korrekte ΔC_T-Cut-off-Bereich angewendet wird.

Ist der obere Grenzwert des ΔC_T-Cut-off-Bereichs überschritten, so könnte ein positives Signal für einen Assay auch nur ein Hintergrundsignal des ARMS-Primers bei Wildtyp-DNA sein. Liegt

der ΔC_T -Wert der Probe über dem ΔC_T -Cut-off-Bereich eines Assays, so wird die Probe für diesen Assay als negativ oder außerhalb der Nachweisgrenzen des Kits eingestuft.

Liegt der Wert der Probe unterhalb des unteren Grenzwerts des ΔC_T -Cut-off-Bereichs, könnte der Grund dafür ein Fluoreszenzartefakt sein.

Die verschiedenen Mutationsreaktionen der Proben können den folgenden Status haben:

- „Mutation detected“ (Mutation nachgewiesen)
- „Mutation not detected“ (Mutation nicht nachgewiesen)
- „Invalid“ (Ungültig)

Mutation nachgewiesen

Die Amplifikation des Kanals Green (FAM) ist positiv und der ΔC_T -Wert liegt innerhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs. Wenn für eine Probe mehrere Mutationen nachgewiesen werden, können sie alle angegeben werden.

Mutation nicht nachgewiesen

Die Amplifikation des (FAM) Kanals Green ist positiv und der ΔC_T -Wert liegt oberhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs.

Die Amplifikation des (FAM) Kanals Green ist negativ und die Amplifikation des (HEX) Kanals Yellow (interne Kontrolle) ist positiv.

Ungültig

Die Amplifikation des (HEX) Kanals Yellow (interne Kontrolle) ist ungültig.

Die Amplifikation des (FAM) Kanals Green ist negativ und die Amplifikation des (HEX) Kanals Yellow (interne Kontrolle) ist negativ.

Hinweis: Für eine Probe kann die Amplifikation des (HEX) Kanals Yellow in einem Röhrchen negativ, aber die Amplifikation des (FAM) Kanals Green in einem zweiten Röhrchen positiv sein. In diesem Fall kann das Ergebnis „mutation detected“ (Mutation nachgewiesen) im zweiten Röhrchen als gültig betrachtet werden, die nachgewiesene Mutation ist jedoch u. U. nicht die einzig mögliche Mutation in dieser Probe.

Der berechnete ΔC_T -Wert liegt unterhalb des ΔC_T -Cut-off-Bereichs und die Amplifikation des Kanals Yellow (HEX) (interne Kontrolle) liegt innerhalb des erwarteten Bereichs.

Anhang B: Installation der *therascreen* EGFR CE Assay Package Software

Das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist für den Gebrauch mit dem Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument und einem 72-Well-Rotor bestimmt. Das *therascreen* EGFR CE Assay Package steht auf der Produkt-Website zum *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit unter www.qiagen.com zum Download bereit. Navigieren Sie zu Product Resources (Produktressourcen) > Supplementary Protocols (Zusatzprotokolle), um das Assay Package herunterzuladen. Das Assay Package enthält die Vorlagen „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ und „*therascreen* EGFR CE Locked Template“.

Hinweis: Das *therascreen* EGFR CE Assay Package ist nur mit der Rotor-Gene Q Software der Version 2.3.5 oder höher kompatibel. Stellen Sie vor der Installation des *therascreen* EGFR CE Assay Package sicher, dass die richtige Version der Rotor-Gene Q Software installiert ist. Wenn Ihr Rotor-Gene Q MDx Instrument mit einer früheren Softwareversion ausgeliefert wurde, aktualisieren Sie diese, indem Sie die Rotor-Gene Q Software der Version 2.3.5 oder höher von der Produktseite des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (im Abschnitt „Product Resources“ [Produktressourcen] unter „Operating Software“ [Betriebssoftware]) herunterladen; siehe www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources.

Verfahren

1. Laden Sie das *therascreen* EGFR CE Assay Package von www.qiagen.com herunter und speichern Sie es auf einem virenfreien USB-Speichergerät.
Hinweis: Das Assay Package ist auf der Produkt-Website zum *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Version 2 verfügbar. Navigieren Sie zu Product Resources (Produktressourcen) > Supplementary Protocols (Zusatzprotokolle), um das Assay Package herunterzuladen.
2. Verbinden Sie das USB-Speichergerät mit dem Computer, der an das Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument angeschlossen ist.
3. Suchen Sie die Datei *therascreen* EGFR CE Assay Package.
4. Rechtsklicken Sie auf *therascreen* EGFR CE Assay Package und wählen Sie dann Extract all (Alle extrahieren), um die Datei zu entpacken.
5. Doppelklicken Sie auf *therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.6.exe*, um den Installationsvorgang zu starten.

Ansonsten suchen Sie im Dateibrowser des angeschlossenen Computers nach dieser ausführbaren Datei und starten Sie sie.

Der Einrichtungsassistent des *therascreen* EGFR CE Assay Package wird geöffnet.

6. Klicken Sie auf Next (Weiter), um fortzufahren (Abbildung 41).

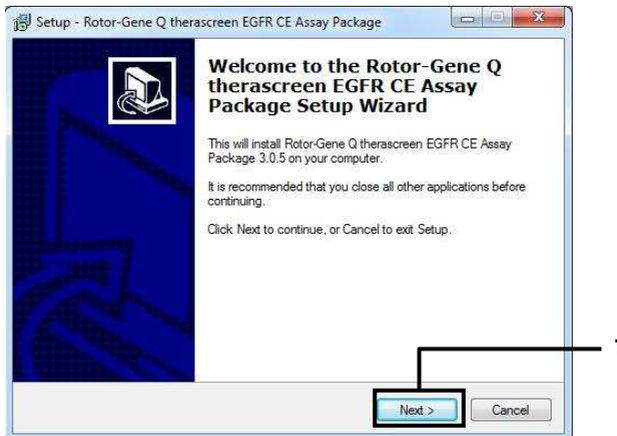


Abbildung 41. Das Dialogfeld „Setup Wizard“ (Einrichtungsassistent); 1 = „Next“ (Weiter)

7. Lesen Sie die Lizenzvereinbarung und wählen Sie I accept the agreement (Ich stimme der Vereinbarung zu) aus. Klicken Sie auf Next (Weiter), um fortzufahren (Abbildung 42). Die Einrichtung wird automatisch gestartet.

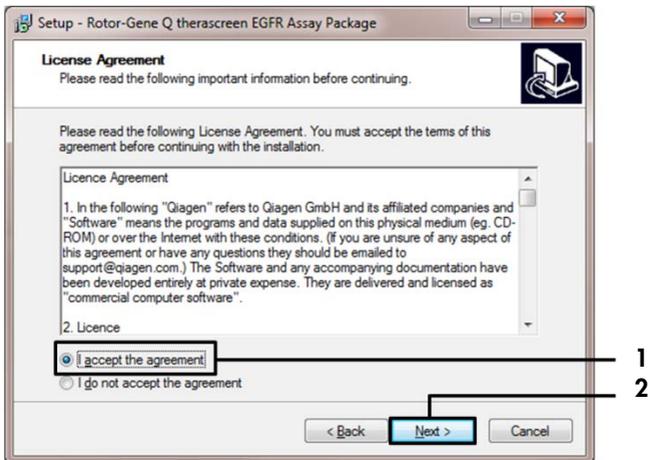


Abbildung 42. Das Dialogfeld „License Agreement“ (Lizenzvereinbarung). 1 = „I accept the agreement“ (Ich stimme der Vereinbarung zu), 2 = „Next“ (Weiter).

8. Klicken Sie nach Abschluss der Installation im letzten Dialogfeld des Setup Wizard (Einrichtungsassistent) auf Finish (Fertigstellen) (Abbildung 43).

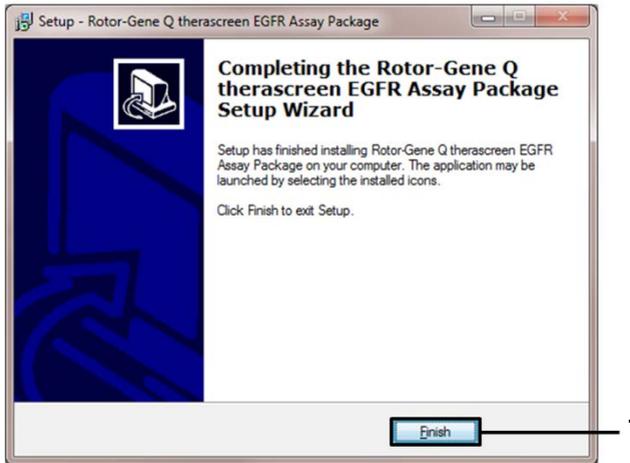


Abbildung 43. Schließen des Einrichtungsassistenten (1 = „Finish“ (Fertigstellen)).

9. Starten Sie den Computer neu.

Es werden automatisch Verknüpfungen zu den beiden Vorlagen „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ (*therascreen* EGFR CE Kontrolllauf – Gesperrte Vorlage) und „*therascreen* EGFR CE Locked Template“ (*therascreen* EGFR CE Gesperrte Vorlage) erstellt und auf dem Desktop angezeigt (Abbildung 44).

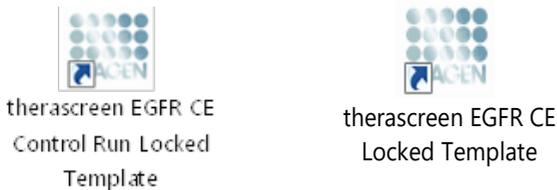


Abbildung 44. Symbole für „EGFR CE Control Run Locked Template“(EGFR CE Kontrolllauf – Gesperrte Vorlage) und „EGFR CE Locked Template“ (EGFR CE Gesperrte Vorlage).

Kontakt

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem TechniksUPPORT-Zentrum unter www.qiagen.com/Support. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service oder Ihr lokaler Händler gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: Kontrollassay, 7 Mutationsassays, Positivkontrolle, Taq-DNA-Polymerase, Wasser als NTC und Wasser zur Probenverdünnung	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package	Softwarepaket mit Protokollen für das <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit und das QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Instrument	Herunterladen
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: QIAamp MinElute® Säulen, Proteinase-K, Puffer und Collection tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 Präparationen: 50 QIAamp MinElute Säulen, Proteinase-K, Puffer, Collection Tubes (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 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, Installation und Schulung	9002033

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	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	9002032
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen	981106

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Haftungsausschlüsse finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN-Kits sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Revisionsverlauf des Dokuments

Datum	Änderungen
R5, Januar 2019	Bevollmächtigten (Titelseite) hinzugefügt. Abschnitt „Symbole“ aktualisiert.
R6, Oktober 2019	Hersteller i. S. d. Gesetzes geändert (Titelseite). Namen des Instruments von Rotor-Gene Q MDx zu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM geändert, um Übereinstimmung mit dem Geräteetikett zu erreichen. Abschnitt „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ um Lagerungsbedingungen für Reagenzien ergänzt. Tabelle 1 durch Hinzufügen eines Hinweises auf die Entfernung von COSM6254 aus der COSMIC-Datenbank aktualisiert. Abschnitt „Einschränkungen“ um Informationen zum Exon-19-Deletionsassay und dem L858R-Assay ergänzt. Symbol „EC + REP“ von der Titelseite und aus dem Abschnitt „Symbole“ entfernt.
R7, Juni 2020	Versionsnummer des EGFR Assay Package von „3.0.5“ zu „3.0.6“ aktualisiert. Hinweise auf RGQ Softwareversion von „2.3“ zu „2.3.5 oder höher“ geändert. Tabellen 9 und 17 aktualisiert, um neue Cut-off-Bereiche zu implementieren, und alle relevanten Beschreibungen entsprechend angepasst (im gesamten Handbuch). Alle Protokollkapitel aktualisiert, um Informationen hinsichtlich der Wichtigkeit des Mischens in die Abschnitte „Wichtige Hinweise vor Beginn“ aufzunehmen; Mischdetails in allen Mischschritten hervorgehoben; wo erforderlich, Mischschritte hinzugefügt. In Tabelle 8 die Markierung MUTATION_EARLY_CT hinzugefügt. Alle Verweise auf CD entfernt und durch Download-Informationen ersetzt.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender 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 zu den Panels gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Panels gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Benutzern für andere QIAGEN-Benutzer 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 Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie unter www.qiagen.com.

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

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist ein CE-gekennzeichnetes Diagnose-Kit gemäß der europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika. Nicht in allen Ländern erhältlich.

1121935 06-2020 HB-1909-007 © 2020 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

