Juni 2020

Handbok för *therascreen*® EGFR RGQ PCR Kit



Version 2



För in vitro-diagnostisk användning

För användning med Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM-instrument



R7 MAT

874111

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

1121935SE



Sample to Insight

Innehåll

Avsedd användning5
Sammanfattning och förklaring
Testprincipen
Material som medföljer
Kitinnehåll13
Material som behövs men inte medföljer14
Varningar och försiktighetsåtgärder16
Allmänna säkerhetsåtgärder16
Förvaring och hantering av reagenser
Leveransvillkor
Förvaring18
Hantering och förvaring av prover20
Procedur
Extraktion och beredning av DNA21
Protokoll: Provbedömning22
Protokoll: EGFR-mutationsdetektion34
Tolkning av resultat (automatiskt)
Rotor-Gene Q therascreen EGFR-analyspaketets flaggor
Felsökningsguide
Kvalitetskontroll
Begränsningar

Prestandaegenskaper	56
Analytisk prestanda	56
Blankgräns (Limit of Blank, LOB), arbetsintervall, cutoff-värden och ∆C⊤-cutoff-intervall	56
Effekt av DNA-input på ∆C⊤-värden	57
Korsreaktivitet	57
Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod	58
Värden för detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)	59
Interferens	61
Reproducerbarhet	62
Klinisk prestanda	66
Kliniska resultatdata: GIOTRIF®	66
Kliniska resultatdata: IRESSA®	68
Referenser	70
Symboler	72
Bilaga A: Manuellt protokoll för therascreen EGFR RGQ PCR Kit	73
Allmän information	73
Protokoll: Skapa en temperaturprofil	73
Procedur (manuell)	84
Protokoll: Provbedömning (manuell)	84
Protokoll: EGFR-mutationsdetektion (manuell)	84
Protokoll: konfiguration av therascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q	85
Tolkning av resultat (manuellt)	90
Programinställningar för analys	90

Analys av provbedömningsdata	92
Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata	93
Bilaga B: Installation av therascreen EGFR CE Assay Package	
Kontaktinformation	104
Beställningsinformation	105
Dokumentrevisioner	

Avsedd användning

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är ett in vitro-diagnostiskt test för detektion av 29 somatiska mutationer i EGFR-genen. Det ger en kvalitativ bedömning av mutationsstatusen i tumörprover tagna från patienter med icke-småcellig lungcancer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC).

Resultaten ska hjälpa läkarna att identifiera patienter med NSCLC som är sannolikt lämpade för behandling med EGFR-tyrosinkinashämmare.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit testar DNA-prover som extraherats från formalinfixerad paraffininbäddad (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE) tumörvävnad tagen från patienter med NSCLC, och körs på ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Det ska användas av utbildad personal i en professionell laboratoriemiljö.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning.

Sammanfattning och förklaring

Mutationer i EGFR-onkogenen förekommer i cancerformer hos människor (1, 2). Förekomsten av de här mutationerna korrelerar med respons på behandling med vissa tyrosinkinashämmare (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) hos patienter med NSCLC (3–8). Sådana mutationer i EGFRonkogenen förekommer hos den allmänna populationen av patienter med NSCLC, med en frekvens på ca 10 % hos patienter från USA, Europa eller Australien och upp till 30 % hos patienter från Japan och Taiwan (1, 2, 9).

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är ett kit färdigt för användning för detektion av 29 mutationer i den cancerrelaterade EGFR-genen med PCR-teknik (Polymerase Chain Reaction, PCR) på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

Med teknikerna Scorpions® (10) och ARMS (Amplification Refractory Mutation System) (11) möjliggör *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit detektion av 29 mutationer i exon 18, 19, 20 och 21 i EGFR-onkogenen mot en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA (tabell 1). Sammanfattningsvis:

- 19 borttagningar i exon 19 (detekterar närvaron av vilken som helst av de 19 borttagningarna men särskiljer dem inte)
- Tre tillägg i exon 20 (detekterar närvaron av vilket som helst av de tre tilläggen men särskiljer dem inte)
- G719X (detekterar närvaron av G719S, G719A eller G719C men särskiljer dem inte)
- S768I
- T790M
- L858R
- L861Q

De metoder som används är mycket selektiva, och beroende på den totala mängden närvarande DNA kan en låg procentandel mutant-DNA detekteras i en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA. Denna selektivitet och detektionsgräns är överlägsen annan teknik, t.ex. färgsekvensering.

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basskifte
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Borttagningar	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

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identite
--

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]: http://cancer.sanger.ac.uk/.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabellen fortsätter från föregående sida

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

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]: http://cancer.sanger.ac.uk/.

** Mutationerna COSM6254 (2239_2253del15) och COSM12369(2240_2254del15) resulterar i borttagning av 15 baspar från EGFR-sekvensen. Samma slutsekvens genereras av bägge mutationerna och de går inte att skilja åt från varandra. Därmed har mutationen COSM6254 (2239_2253del15) tagits bort från den senaste versionen av COSMIC (v83) och bägge mutationer representeras av COSM12369 (2240_2254del15). Det här följer HGVS-riktlinjen för att representera den mesta 3'borttagningen. therascreen EGFR-testet skiljer inte mellan någon av de 19 borttagningsmutationerna och alla positiva borttagningar kallas "Deletions" [Borttagningar]. Den här ändringen påverkar enbart dokumentationen och inte kitet eller dess förmåga att detektera enskilda mutationer.

Testprincipen

therascreen EGFR RGQ PCR Kit består av åtta separata PCR-amplifieringsreaktionsmixar: sju mutationsspecifika reaktioner i exon 18, 19, 20 och 21 i EGFR-onkogenen och en vildtyp-kontroll i exon 2. De viktigaste komponenterna i kitet förklaras nedan.

ARMS

Allel- eller mutationsspecifik amplifiering uppnås med hjälp av ARMS. *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) är effektivt när det gäller att skilja på en matchning och en felmatchning vid 3'-änden av en PCR-primer. Specifikt muterade sekvenser amplifieras selektivt, även i prover där majoriteten av sekvenserna inte bär på mutationen. När primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3'-basen inte matchar sker endast bakgrundsamplifiering på låg nivå.

Scorpions

Detektion av amplifiering utförs genom att använda Scorpions. Scorpions är bifunktionella molekyler med en PCR-primer som är kovalent bunden till en prob. Fluoroforen i proben samverkar med en quencher, även den integrerad i proben, som minskar fluorescensen. När proben binder till amplikonet under PCR separeras fluoroforen och quenchern, vilket leder till en detekterbar ökning av fluorescensen.

Kitets format

Åtta analyser ingår i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit:

- En kontrollanalys (CTRL)
- Sju mutationsanalyser

Samtliga reaktionsmixar innehåller reagenser för att detektera mål som är märkta med karboxyfluorescein (FAM[™]), och en intern kontrollanalys som är märkt med hexaklorofluorescein (HEX[™]). Den interna kontrollanalysen möjliggör detektion av hämmare, vilka kan leda till att ett falskt negativt resultat uppstår. FAM-amplifiering kan konkurrera ut internkontrollamplifieringen och syftet med internkontrollen är helt enkelt att visa att om det inte finns någon FAM-amplifiering är resultatet sant negativt och inte en misslyckad PCR-reaktion.

Analyser

therascreen EGFR RGQ PCR Kit består av en procedur i två steg. I det första steget utförs kontrollanalysen för att bedöma den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov. I det andra steget utförs både mutations- och kontrollanalyser för att bestämma förekomst eller frånvaro av mutant-DNA.

Kontrollanalys

Kontrollanalysen, märkt med FAM, används för att bedöma den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 2 i EGFR-genen. Primrarna och Scorpions-proberna har utformats så att de undviker kända EGFR-polymorfismer.

Mutationsanalys

Varje mutationsanalys innehåller en FAM-märkt Scorpions-prob och en ARMS-primer för urskiljning mellan vildtyps-DNA och ett specifikt mutant-DNA.

Kontroller

Obs! Alla experimentkörningar måste innehålla positiva och negativa kontroller.

Positiv kontroll

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1–8. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit innehåller EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) som ska användas som mall i den positiva kontrollreaktionen. De positiva kontrollresultaten bedöms för att garantera att kitet fungerar inom de angivna acceptanskriterierna.

Negativ kontroll

Varje körning måste innehålla en negativ kontroll ("kontroll utan mall": No Template Control, NTC) i rör 9–16. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit innehåller vatten för NTC som ska användas som "mall" i kontrollen utan mall. Kontrollen utan mall används för att bedöma potentiell kontaminering under körningskonfigurationen samt för att bedöma effekten hos den interna kontrollreaktionen.

Bedömning av internkontrollreaktion

Varje reaktionsmix innehåller en internkontroll (Internal Control, IC) utöver målreaktionen. Ett misslyckande indikerar antingen förekomst av hämmare som kan leda till ett felaktigt resultat eller en felaktig hantering av det aktuella röret vid förberedelsen. IC använder en icke-EGFRrelaterad oligonukleotid-målsekvens, en omärkt primer och en Scorpions-primer märkt med HEX för att särskilja den från FAM-märkta Scorpions-primers i kontroll- och mutationsreaktionerna. FAM-amplifiering kan konkurrera ut IC-amplifieringen så att det genererade IC C_T (HEX)-värdet kan hamna utanför angivet intervall. FAM-resultaten är fortfarande giltiga för dessa prover.

Provbedömning

Vi rekommenderar starkt att använda kontrollreaktionsmixen (CTRL-rör) som medföljer therascreen EGFR RGQ PCR Kit för att bedöma den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 2 i EGFR-genen. Vi rekommenderar iordningställande av prover med endast kontrollanalysen och att använda EGFR PC som en positiv kontroll och vatten för "mallen" som kontroll utan mall. Obs! DNA-bedömningar bör baseras på PCR och kan variera i kvantifiering beroende på avläsningar av absorbans. Extra kontrollreaktionsmix (CTRL-rör) medföljer för bedömning av kvalitet och kvantitet av DNA i prover innan analysen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Plattform och programvara

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är särskilt utformat för att användas med Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet är programmerat för olika cykelparametrar eller "körningar" med hjälp av *therascreen* EGFR CE Assay Package.

therascreen EGFR CE Assay Package består av två mallar: "therascreen EGFR CE Control Run Locked Template" (för provbedömning) och "therascreen EGFR CE Locked Template" (för detektion av EGFR-mutationer). De här mallarna innehåller PCR-körningsparametrarna och beräknar resultaten.

Det är även möjligt att använda *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit med programmet Rotor-Gene Q version 2.3 i öppet läge (dvs. utan Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package). Mer information finns i Bilaga A: Manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Material som medföljer

Kitinnehåll

<i>therascreen</i> EGF	R RGQ PCR Kit			(24)
Katalognr.				874111
Antal reaktioner				24
Färg	Identitet	Rör-ID		Volym
Röd	Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix)	1	CTRL	2 × 600 µl
Lila	T790M Reaction Mix (T790M-reaktionsmix)	2	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (reaktionsmix för borttagningar)	3	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R-reaktionsmix)	4	L858R	600 µl
Grön	L861Q Reaction Mix (L861Q-reaktionsmix)	5	L861Q	600 µl
Gul	G719X Reaction Mix (G719X-reaktionsmix)	6	G719X	600 µl
Grå	S7681 Reaction Mix (S7681-reaktionsmix)	7	S768I	600 µl
Blå	Insertions Reaction Mix (Reaktionsmix för tillägg)	8	Ins	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-positiv kontroll)	9	Positiv kontroll	300 µl
Mintfärgad	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeras)	Taq	2 × 80 µl	2 × 80 µl
Vit	Nuclease-free water for No Template Control (Nukleasfritt vatten för kontroll utan mall)	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Vit	Nuclease-free water for Dilution (Nukleasfritt vatten för spädning)	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
Handbok för the	erascreen EGFR RGQ PCR Kit			1

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Reagenser

• DNA-extraktionskit (se Extraktion och beredning av DNA)

Förbrukningsartiklar och allmän laboratorieutrustning

- Pipetter avsedda * (justerbara) för provberedning
- Särskilda pipetter* (justerbara) för beredning av PCR-huvudmix
- Särskilda pipetter* (justerbara) för dosering av DNA-mall
- DNAse-, RNAse- och DNA-fria pipettspetsar med filter (för att undvika korskontaminering, pipettspetsar med aerosolbarriär rekommenderas)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, f
 ör anv
 anv
 andning med 72-well rotor (kat.nr. 981103 eller 981106)
- DNAse-, RNAse- och DNA-fria mikrocentrifugrör för beredning av huvudmixar
- Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes, aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett (kat.nr 9018901)
- Termomixer*, uppvärmd skakinkubator*, värmeblock* eller vattenbad* som klarar inkubation på 90 °C
- Bänkcentrifug* med rotor för 2ml-reaktionsrör
- Vortexblandare*

* Kontrollera att instrumenten och utrustningen har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

Utrustning för PCR

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Yellow (detektion av FAM respektive HEX) * †
- Programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller högre
- Rotor-Gene Q therascreen EGFR CE Assay Package, version 3.0.6 (finns tillgängligt för nedladdning på produktwebbsidan för therascreen EGFR RGQ PCR Kit Version 2 på www.qiagen.com. Navigera till Product Resources [Produktresurser] > Supplementary Protocols [Tilläggsprotokoll] om du vill ladda ner analyspaketet.)

Obs! Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package-programvaran kräver programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare.

^{*} Kontrollera att instrumenten och utrustningen har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens rekommendationer.

^{†1} vissa länder kan instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum maj 2011 eller senare användas. Tillverkningsdatumet kan utläsas från serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret har formatet "mmyynnn" där "mm" anger månaden i tillverkningsdatumet med siffror, "yy" anger de två sista siffrorna i tillverkningsåret och "nnn" är en unik identifieringskod för instrumentet.

Varningar och försiktighetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS). De finns tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan hitta, visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Säkerhetsinformation om instrumentet Rotor-Gene Q finns i användarmanualen som medföljer instrumentet.

Kassera avfall från prover och analyser i enlighet med lokala säkerhetsregler.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Lägg alltid särskild vikt vid följande.

- Testet är avsett för användning med FFPE NSCLC-vävnadsprover.
- Förvara och extrahera positivt material (prover och positiva kontroller) separerat från alla andra reagenser, och tillsätt dem i reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- lakttag största försiktighet för att förhindra att PCR kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial. Vi rekommenderar att separata, för ändamålet avsedda, pipetter används för iordningställande av reaktionsmixar och tillsats av DNA-mall. Beredning och fördelning av reaktionsmixar ska utföras i ett område avskilt från området där mall tillsätts. Rotor-Gene Q-rör får inte öppnas efter att PCR-körningen har avslutats. Detta för att förhindra laboratoriekontaminering från produkter efter PCR-körningen.
- Alla kemikalier och allt biologiskt material är potentiellt farliga. Prover är potentiellt smittsamma och måste hanteras som smittfarligt material.

- Reagenser till therascreen EGFR RGQ PCR Kit har spätts ut optimalt. Späd inte ut reagenserna ytterligare då det kan resultera i förlorad prestanda. Använd inte reaktionsvolymer (reaktionsmix plus prov) på mindre än 25 µl då det ökar risken för ett falskt negativt resultat.
- Alla reagenser som medföljer therascreen EGFR RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser som ingår i samma therascreen EGFR RGQ PCR Kit. Byt inte ut reagenserna i therascreen EGFR RGQ PCR Kit eller mellan olika therascreen EGFR RGQ PCR Kit eftersom prestandan då kan påverkas.
- Använd endast det Taq DNA-polymeras (Taq-rör) som medföljer i therascreen EGFR RGQ PCR Kit. Byt inte ut det mot Taq DNA-polymeras från andra kit av samma typ eller annan typ, och byt inte heller ut det mot Taq DNA-polymeras från en annan leverantör.
- Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Obs! laktta försiktighet med betoning på att undvika felaktig provinmatning, laddningsfel och pipetteringsfel för att säkerställa korrekt provtestning.

Obs! Reagenserna är validerade för manuellt iordningställande. Om en automatisk metod används kan antalet möjliga reaktioner minska eftersom reagenserna måste fylla "dödvolymer" på dessa instrument.

Förvaring och hantering av reagenser

Leveransvillkor

therascreen EGFR RGQ PCR Kit levereras på torris och måste frysas vid ankomst. Om therascreen EGFR RGQ PCR Kit inte är fruset vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, handbok, eller reagenser i leveransen ska du kontakta QIAGENs tekniska serviceavdelning eller din lokala distributör (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Förvaring

therascreen EGFR RGQ PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -30 till -15 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus. Scorpions (liksom alla fluorescensmärkta molekyler) måste skyddas mot ljus för att undvika fotoblekning och förlorad prestanda. Vid korrekt förvaring i originalförpackningen enligt rekommendationerna är kitet hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

När reagenser har öppnats kan de förvaras i originalförpackningen vid -30 till -15 °C i 12 månader eller som längst fram till det utgångsdatum som anges på förpackningen. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Vi rekommenderar att kitet tinas högst åtta gånger.

Reagenserna måste tinas i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme och maximalt 4,5 timmar. När reagenserna är klara för användning kan PCR-reaktionerna göras i ordning och Rotor-Gene Q-rören som innehåller huvudmixarna och DNA-provet ska omgående laddas i ett Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument. Den totala tiden från start av PCR-konfigurationen till körningens start ska inte överskrida: • 6 timmar vid förvaring i rumstemperatur

Obs! Den här tiden inkluderar både PCR-konfiguration och förvaring.

18 timmar vid förvaring i kyl (2–8 °C)

Obs! Den här tiden inkluderar både PCR-konfiguration och förvaring.

Obs! För garanterad optimal aktivitet och effekt måste Scorpions (liksom alla fluorescensmärkta molekyler) skyddas mot ljus för att undvika fotoblekning.

Obs! För att uppnå optimal användning av reagenser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit måste proverna indelas i batchar. Om prover testas individuellt krävs mer reagenser, vilket leder till att färre prover kan testas med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Hantering och förvaring av prover

Obs! Alla prover måste behandlas som potentiellt infektiöst material.

Provmaterialet måste vara mänskligt, genomiskt DNA extraherat från FFPE-vävnad. Proverna måste transporteras enligt standardmässig patologisk metod för att garantera provets kvalitet.

Tumörprover är inte homogena och data från ett tumörprov kanske inte stämmer överens med andra sektioner från samma tumör. Tumörprover kan även innehålla tumörfri vävnad. DNA från tumörfri vävnad förväntas inte innehålla mutationer som detekteras av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Så här förbereder du vävnadsprover för DNA-extraktion:

- Använd standardmaterial och -metoder och fixera vävnadsprovet i 10 % neutralbuffrat formalin (NBF) och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- Låt en utbildad person (t.ex. en patolog) bedöma ett H&E-färgat (Hematoxilyn & Eosin) snitt för att bekräfta förekomst av tumör.
- De färgade snitten får inte användas för DNA-extraktion.
- Förvara alla FFPE-block och objektglas i rumstemperatur (15–25 °C). Objektglas kan förvaras i rumstemperatur i upp till 1 månad innan DNA-extraktion.

Procedur

Extraktion och beredning av DNA

Prestandaegenskaper för kitet togs fram med hjälp av DNA som extraherats med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 60404). Den här satsen ska användas för DNA-beredning, om det är tillgängligt i ditt land. Om du använder QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 56404) som har likvärdig funktion, utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande:

- Använd inte QIAGENs Deparaffinization Solution. Använd endast xylen-/etanolmetoden för deparaffinisering enligt beskrivningen i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Använd etanol som är avsedd för molekylärbiologibruk * för alla steg.
- Skrapa ned hela vävnadsområdet från två snitt i ett märkt mikrocentrifugrör med hjälp av en ny skalpell för varje prov.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 11 i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) måste utföras i 1 timme ± 5 minuter i 56 °C ± 3 °C.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 12 i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) måste utföras i 1 timme ± 5 minuter i 90 °C ± 3 °C.
- Använd inte RNase-steget som beskrivs i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Proverna måste elueras med 120 µl elueringsbuffert (ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (steg 20 i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit).
- Genomiskt DNA kan förvaras i 2–8 °C i 1 vecka efter extraktion, eller i –30 till –15 °C i upp till 8 veckor innan användning.

Obs! Alla analyser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ger korta PCR-produkter. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit fungerar emellertid inte på mycket fragmenterat DNA.

^{*} Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon.

Protokoll: Provbedömning

Det här protokollet ska användas vid bedömning av den totala mängden amplifierbart DNA i prover med *"therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" i Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package för automatisk provanalys.

Obs! Information om manuell bedömning av DNA-prover finns i Bilaga A: *Manuellt* protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Viktigt att tänka på före start

- För att erhålla korrekta resultat, se till att det beskrivna blandningsförfarandet utförs vid varje blandningssteg i analyskonfigurationen.
- Upp till 24 prover kan bedömas med den tillgängliga kontrollreaktionsmixen.
- Innan du startar proceduren ska du läsa avsnittet Allmänna säkerhetsåtgärder.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM innan du startar protokollet. Se användarmanualen till instrumentet.
- Vortexblanda inte Taq DNA-polymeraset (Taq-rör) eller någon mix som innehåller Taq DNA-polymeras, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* genom att placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.
- Använd kontrollreaktionsmix (CTRL-rör) för att bedöma DNA innan testning.
 Obs! Det är viktigt att använda kontrollreaktionsmix enligt beskrivningen nedan för den här bedömningen och inte spektrofotometri eller någon annan metod. Kraftigt nedbrutet DNA kanske inte amplifieras fastän primrarna genererar korta DNA-fragment.
- För effektiv användning av reagenserna i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ska DNA-proverna indelas i batcher i så stor utsträckning som möjligt för att skapa fullständiga körningar. Testning av enskilda prover eller ett mindre antal prover ökar förbrukningen av reagenser och minskar det totala antal prover som kan testas med ett enstaka *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Saker som måste göras före start

- Kontrollera att therascreen EGFR CE Assay Package-programvaran är installerad innan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet används första gången (se Bilaga B: Installation av therascreen EGFR CE Assay Package).
- Före varje användning måste alla reagenser tinas ordentligt i minst 1 timme och högst 4,5 timmar i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom att vända 10 gånger och centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Se till att Taq håller rumstemperatur (15–25 °C) före varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.
- Blanda genom att vända 10 gånger och centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.

Procedur

 Tina kontrollreaktionsmix (CTRL), nukleasfritt vatten f
ör kontroll utan mall (No Template Control, NTC) och EGFR-positiv kontroll (Positive Control, PC) i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme och h
ögst 4,5 timmar.

Tiderna för upptining av reagenser, PCR-konfiguration och förvaring innan start av körningen anges i tabell 2.

Tabell 2. Upptiningstider,	tider för PCR-konfiguration och	förvarinastemperaturer

Minsta upptiningstidMax upptiningstid1 h4,5 h1 h4,5 h	ax upptiningstid	Förvaringstemperatur efter PCR- konfiguration	Maximal tid för PCR- konfiguration och förvaring			
1h 4,	,5 h	Rumstemperatur (15–25 °C)	6 h			
1 h 4,	,5 h	2-8 °C	18 h			

Obs! PCR-konfiguration utförs i rumstemperatur (15–25 °C). Termen "förvaring" avser tiden mellan slutförande av PCR-konfigurationen och start av PCR-körningen på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Obs! Få upp *Taq* till rumstemperatur (15–25 °C) samtidigt som de andra reagenserna (se Förvaring och hantering av reagenser). Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

- När reagenserna har tinat ska du blanda dem genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer och sedan centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Bered tillräckligt med huvudmix för kontroll (kontrollreaktionsmix [CTRL] plus Taq) för DNA-proverna, en EGFR PC-reaktion och en NTC-reaktion enligt volymerna som anges i tabell 3. Inkludera reagenser för ett extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCRkonfigurationen.

Obs! Huvudmixen innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Komponent	Volym
Kontrollreaktionsmix (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
Taq DNA-polymeras (Taq)	0,5 µl × (n + 1)
Total volym	20 µl/reaktion

Tabell 3. Beredning av huvudmix för kontrollanalys

* n = antal reaktioner (prover plus kontroller). Bered tillräckligt med huvudmix för ett extra prov (n + 1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen. Värdet n ska inte överstiga 26 (24 prover plus 2 kontroller).

Obs! Vid beredning av huvudmixen läggs den volym kontrollreaktionsmix som krävs till i det aktuella röret först och *Taq* läggs till sist.

 Blanda huvudmixen noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Placera det korrekta antalet rör i laddningsblocket enligt layouten i tabell 4. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje PCR-rör.

Locken ligger kvar i sin plastbehållare tills de behövs. För bedömning av DNA-prover ska huvudmix för kontrollanalys tillsättas i ett PC-rör, ett NTC-rör och i ett rör för varje prov.

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

Tabell 4. Layout för DNA-provbedömningsanalyser i laddningsblocket. Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

- 5. Tillsätt omedelbart 5 µl vatten för NTC i röret i position 2 och förslut röret.
- 6. Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (rörpositionerna 3–26) och förslut rören.
- 7. Tillsätt 5 µl EGFR PC i röret i position 1 och förslut röret.

Obs! Var noga med att inte göra fel vid laddning eller pipettering så att du säkerställer att rätt mängd NTC, prover och PC tillsätts i rätt rör. Markera rörens lock för att visa i vilken riktning rören ska laddas på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

- När alla PCR-rör har förslutits ska du göra en visuell kontroll av provrörens fyllnadsnivå för att säkerställa att prov har tillsatts i alla rör.
- 9. Vänd alla PCR-rör 4 gånger för att blanda prover och reaktionsmixar.
- 10. Placera PCR-rören på remsa i sina korrekta positioner i 72-well rotorn enligt layouten i tabell 4.

Om rotorn inte är fullbelagd fyller du alla tomma positioner på rotorn med förslutna, tomma rör.

 Placera omedelbart 72-Well rotorn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Se till att låsringen (tillbehör till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen. Obs! Om du använder manuell bedömning av prover, se information i Bilaga A: *Manuellt* protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

12. Starta Rotor-Gene Q-programvaran genom att dubbelklicka på ikonen therascreen EGFR CE Control Run Locked Template [therascreen EGFR CE låst mall för kontrollkörning] på skrivbordet till den dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx-instrumentet (Figur 1).



Figur 1. EGFR CE EGFR CE låst mall -ikon för kontrollkörning (bedömning av prover).

 Fliken "Setup" [Konfiguration] öppnas som standard (Figur 2). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera sedan kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

View									
Setup		<u>B</u> un Pr	>greis		ĩ			Analysis	
This screen display microlikenesus retup options for the sus. Complete the field and di- Kit Name: free account EGFR CE Robot: REG POR Fix Template Version: 30.4	ck Start Run when you are ready to beg	in the run							
Run ID:	Layout of the	pipetting adapter.							_
Import Samples Samples Sample Name.	Position 1 PC Control	Position 3 Not used		Peolion 25 Not used					Postion 55 Not used
Sample ID Sample Name	Position:2 NTC Control			Pasitori 26 Not used	Positor 34 Not used	Position 42 Rot used		Position 58 Not used	Position 66 Not used
	Postor 3 Not used				Postor 35 Not used	Position #3 Not used			
	Position 4 Not used				Poston 36 Not used	Position 44 Not used			Position 68 Not cared
	Position 5 Not used					Position:45 Not used			
	Position 6 Not used	Position 14 Not used		Position 30 Not used	Position 38 Not used	Provision 45 Not used	Position 54 Not used		
	Postory7 Not used		Postian 23 Not used	Position 35 Not used	Position 29 Not used		Position 55 Not used		
	Pasioni	Posten 16	Position 24	Postor 32	Position 40	Petitor 49	Position 55	Postor:64	Postion 72

Figur 2. Fliken "Setup" [Konfiguration] (1) och rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast] (2).

14. Skriv in körnings-ID i fältet Run ID [Körnings-ID] enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i fältet Sample Name [Provnamn] enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur]-tangenten.

Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" [Prov-ID] (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern] på höger sida med provnamnet (Figur 3).

Obs! Alternativt kan provnamn som sparats i formaten *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaavgränsade värden) importeras via funktionen "Import Samples" [Importera prover]. Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden. Obs! Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern] att provnamnet som har lagts till markeras genom en ändring av färgen och att provnamnet är i provpositionen (Figur 3).

Obs! Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern].

View										
Setup	ĩ		Bun Progress)			Analysis	
This screen displays miscellaneous setup options for the run. Complete the	n finkla and click Stat Run when you are re	ody to begin the run.								
Kit Name: Eferasceen EGFR CE Roter:	Vol	01 :								
HGU PCH Kt Template Version: 3.0.4										
Run ID: Control Hun		poor of the pipeting.	acapia.							
Samples.	n Pr	patient1								
Sample Name		ritol Past Note		on17 Pos and Not	nor 25 l		Position 41 Not used	Postor 49 Netwood	Packins,57 Not used	Postor/65 Not used
Sample ID Sample Name	•	where 2								
		rC antrol Post		eril0 Per	kor 20	Portion 34	Faitish 42	Postor:50	Pathon 50	Posher66
										100.030
	Pr	selfion:3 ample 1								Carlow C.
		Het y		and Not		Not yord	Not used		Not used	Not used
		ostion:4 Post at used Not s		xrt20 Pas and Not	Hum 21 USED	Postion 36 Net yead	Paulain 44 Not brief		Paskue M Not used	Positian 68 Not used
	8	willor(5 Post		ion25 Pas	tion 25	Poenors37	Poston 45	Postor 53	Postine 61	Postiar 63
										Nin used
										Residence 700
	10	it used Not a						Not used		Netweej
	PX	senterc? Post blused Note			tion 31 is	Position 39 Nationed	Posiban 42 Not used	Poston til Not ured	Profiler 83 Not used	Postion 71 Not used

Figur 3. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn]. 1 = Dialogfältet "Run ID" [Körnings-ID]; 2 = Panelen "Import Samples" [Importera prover]; 3 = Dialogfältet "Sample Name" [Provnamn]; 4 = "Sample List" [Provlista]; 5 = Panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern].

15. Upprepa steg 14 för att ange namnen på alla ytterligare prover (Figur 4).

Obs! Om du vill redigera ett provnamn klickar du Sample Name [Provnamn] i provlistan så visas det valda provet i fältet Sample Name [Provnamn] ovan. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur]-tangenten för att uppdatera namnet.



Figur 4. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" [Provnamn]. 1 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 2 = "Sample List" [Provlista], 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern].

16. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i fältet "Notes" [Anteckningar] om det behövs, klicka sedan på "Start Run" [Starta körning] (Figur 5).

Obs! Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (Figur 5) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med förslutna, tomma rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med förslutna, tomma rör och klicka på OK för att fortsätta. Fönstret "Save As" [Spara som] öppnas.

	v	Sec.										
	Setup			BiaPi	caress	_			_	gratisti	_	QUOIN
	- 100 - 10 - 10 - 10 - 10 - 10 - 10 - 1	a mana aman										
his screen disple	ero misselleneous selup options for the run	Complete the fields and click Start F	fun when you are ready to be;	in he se								
Kit Name:	Relatoren EEFR CE	Rotor: Triation Disa Amer	Rates									
	REG PORKI:											
reagate ve	50 100 1. 3014)									
	[Control Dec		- 12004 # 190	are the second								
IUN IU:	Transmiss						_	_				
import Samples			and the second second									
Samples			PC.	Sample 7	Sample 15							
Sancle Name	Sample 18		Carlot	Losing	Castol	Picubor(25) Not good						
	In the second se											-
Sanpie IU	Serole Nerw 1 Serole 1		Inter Come Differing for			- C - C - C - C - C - C - C - C - C - C						
	2 Serole 2	1	with dame of senio we	ware			1000 CO.					
2	3 Sanple 3						Plasson:34 Volumed					
	4 Sample 4		the second s									
	E		Warning - 71	here are unuse	d Rotor Tuber	23	0.000					
	5 Sanole 5 E Camela C		Warning - Ti	here are unuse	d Rotor Tuber	10.						
	5 Sanako 5 6 Senake 6 7 Sanake 7		Warning - Ti Please fill all	here are unuse unused positio	d Rotor Tuber	y tubes.						
	5 Sangle 5 6 Sangle 6 7 Sangle 7 8 Sangle 9		Warning - Ti Please fill all Do you wish	here are unuse unused positio to continue?	d Rotor Tube ons with empl	y tubes.	Fastion F	Peolice 63	Testar 3	Position 59	Pestari57	
5 7 8 7 8	5 Sanole 5 6 Sanole 6 7 Sanole 7 8 Sanole 9 9 Sanole 9		Warning - Ti Please fill all De you wish	here are unuse unused positie to continue?	d Rotor Tuber ons with empl	i y tubes.	Failer X Schard	Pedier 61 Networf	Popular 5 Not and	Police 51 Refuerd	Pestari57 Nif goal	
5 2 3 5 10	5 Sanola 5 6 Sanola 6 7 Sanola 7 8 Sanola 9 9 Sanola 9 9 Sanola 9 0 Sanola 10		Warning - Ti Please fill all De you wish	here are unuse unused positie to continue?	d Rotor Tuber ons with empl	y tubes.	Pailor X Set and	Pecker (J Network)	Position 51 Softword	Position 50 Ref used	Pestan57 Nif geal	
5 10 11	5 Sanaka 5 6 Senaka 5 7 Senaka 7 8 Senaka 9 9 Senaka 0 9 Senaka 0 1 Senaka 10 1 Senaka 12		Warning - Ti Please fill all De you wish	here are unuse unused positie to continue?	d Rotor Tubes	ytubes.	Position (K Net and	Profess (3) Horizonal	Poptar 51 Set and	Podier 59 Not used	Prestor 57 Mal goal	
10 11 12 12	5 Sande 5 6 Gende 6 7 Sande 7 8 Sande 8 9 Sande 0 0 Sande 10 1 Sande 11 2 Sande 12 2 Sande 12		Warning - Ti Please fill all De you wish	here are unuse unused positio to continue?	d Rotor Tubes	y tubes. Cancel	Faster F Schand	Peoblex 83 History	Postar-51 Soft and Postar-52	Position 59 Review 61	Pestan 57 Not goal	
5 7 8 10 11 12 12 12 12	5 Sanola 5 6 Sanola 6 7 Sanola 7 7 Sanola 7 8 Sanola 0 9 Sanola 0 9 Sanola 10 1 Sanola 11 2 Sanola 12 4 Sanola 12 4 Sanola 14		Warning - 71 Please fill all De you wish	here are unuse unused positio to continue?	d Rotor Tubes ons with empl	y tubes. Cancel	Fasilor 36 Not and Pasilor 38 Not and	Peoblex 83 History Postacy 84 Hotured	Postar-51 Soft and Postar-52 Not and	Position 59 Review 60 Position 80 Review 60	Protort67 Mill good Pastort68 Mill jood	
11 12 12 12 12 12 12 12 12 12	5 Saroko 5 6 Cende 6 7 Saroko 7 8 Cende 9 9 Cende 9 9 Cende 10 9 Saroko 10 9 Saroko 10 6 Cende 11 2 Saroko 12 4 Cende 10 5 Saroko 12 5 Saroko 13		Warning - Ti Please fill all De you wish	here are unuse unused posifie to continue?	d Rotor Tubes ons with empl	y tubes. Cancel	Pasitor X Vitravid Pasitor 38 Not ared	Position (1) Historial Position (4) Hotorial	Postar 5 Set and Postar St Not ared	Position 53 Rectand Position 80 Rectand	Peofers57 Maligned Peoslars88 Maligned	
5 10 11 12 12 14 15 16	5 Sanaka 5 5 Sanaka 6 7 Sanaka 9 9 Sanaka 9 9 Sanaka 10 1 Sanaka 11 1 Sanaka 11 4 Sanaka 12 4 Sanaka 12 4 Sanaka 12 5 Sanaka 14 5 Sanaka 16 5 Sanaka		Warning - Ti Please fill all De you wish	here are unuse unused positie to continue?	d Rotor Tuber ons with empl	: y tubes. Cancel	Tester X Notand Partor X Notared	Peaker (3) Betweet Peaker (4) Notwood	Perior 5 Net and Perior 52 Not and	Politics 59 Rectard Politics 80 Net cost	Peeter 57 Nif assi Pestar 61 Nif assi	
5 7 7 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	5 Sanaka 6 6 Sanaka 6 7 Sanaka 7 9 Sanaka 0 9 Sanaka 0 9 Sanaka 10 10 Sanaka 10 10 Sanaka 11 10 Sanaka 12 10 Sanaka 12 10 Sanaka 14 10 Sanaka 14		Warning - Ti Please fill all De you wish	here are unuale unused positie to continue? Postarc13 Sanke 11 Sanke 11	d Rotor Tuber	y tubes. Cancel	Factor X Not and Pactor & Voluced	Peoker 83 Berneri Peaker 84 Berneri	Perior 5 Not and Pactor 52 Not and	Position 51 Rei tand Position 83 Rei tand	Perform 57 Not goal Post or 100 Not goal	
10 11 12 12 14 15 15 16 16 17 16 17 16	5 Sanaka 6 5 Sanaka 7 5 Sanaka 7 5 Sanaka 9 5 Sanaka 10 5 Sanaka 10 5 Sanaka 10 5 Sanaka 12 5 Sanaka 12 5 Sanaka 12 5 Sanaka 15 5 Sanaka		Warning - Ti Please fill all Do you wish	here are unuale unused positie to continue? Pustant3 Sanok 11 Como	d Rotor Tuber ons with empl K	r tubes. Cancel	Parties 2 Not and Parties 28 Not and Parties 27 Not and	Peaker 0 Bit and Peaker 84 Not cod	Perior 5 Set and Pastor 50 Not and Perior 50 Not and	Position 50 Rel tead Position 80 Not card	Pestor 57 Natural Pestor 67 Natural Pestor 52 Natural	
5 5 10 11 12 12 14 15 16 16 17 17 16	5 Sanaka 6 5 Sanaka 7 5 Sanaka 7 5 Sanaka 7 9 Sanaka 0 9 Sanaka 10 9 Sanaka 10 9 Sanaka 10 5 Sanaka 10 6 Sanaka 1		Warning - Ti Please fill all De you wish	Here are unuale unused positie to continue! Postant3 Sando 11 Conto	d Rotor Tuber Ins with employed	r tubes. Cancel Peaker20 Noruse	Fastor 3: Infand Pastor 3: Voluced	Peoffect #3 Bio(score) Peoffect #4 Noticed Peoffect #5 Bioticed	Perior 5 Set and Pastor 52 Not and Postor 52 Not and	Position 53 Rectand Position 83 Noticed Position 61 Noticed	Pestor 67 Net assi Pestor 67 Net asso Pestor 99 Net ass	
5 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	5 Sanaka 6 5 Sanaka 7 5 Sanaka 7 5 Sanaka 9 5 Sanaka 10 5 Sanaka		Warning - Ti Please fill all De you wish	Poster13 Sanok 11 Dester13	d Rotor Tuber Ins with empl IX Fautor 21 Norused	Cancel	Factor X Net and Pactor 38 Not and Pettor 37 Not used	Profeer 0 Becared Profeer 44 Notwood Profeer 45 Notwood	Perior 51 Not and Perior 52 Not and Perior 52 Not and	Position 53 Protocol 13 Position 83 Ref cond Position 61 Net cond	Pestor:57 Nit asst Postor:68 Mit sod Pestor:92 Nit sed	
5 5 10 11 12 12 14 15 16 17 16 17 17 16	S state 5 Sende 7 Sende 7 Sende 7 Sende 10 Distate 10 Sende 10 Sende 11 Sende 11 Sen		Warning - 11 Please fill all De you wish Some 5 Contol Contol	Here are unuale unused positie to continue? Postarct3 Sanoc13 Sanoc11 Como Postarct14 Sanoc12	Rotor Tuber Ins with employed	r grubes. Cancel Pedirection Hormore	Factor 35 Not and Pastor 38 Not and Pactor 37 Not and	Peofer 63 Noticed Peofer 84 Noticed Peofer 85 Noticed	Partier 51 Sof and Partier 52 Not and Partier 52 Not and	Politice 50 Rectaed Politice 10 Record Politice 10 Record	Peeter 67 N.4 and Pastor 69 Nat sed Pestor 99 Nat sed	
5 7 8 5 10 13 13 13 13 13 13 13 13 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15	Sanda S Sanda S Sanda 7 Sanda 7 Sanda 10 Sanda 10 Sanda 10 Sanda 11 Sanda 11		Warning - 11 Please fill all De you with Starte 3 Control Porteon 5 Somp 4 Porteon 5 Somp 4	Product 14 Service 14 Product 13 Service 14 Service 14 Service 14 Service 14	d Rotor Tuber ons with empl K Rotor 21 Nor cel Fastar 22	r tubes. Cancel Pediesc20 Noruse Pediesc30	Parities 7 Tot and Parities 3 Parities 3 Parities 2 Parities 2	Profess 6 Bit tool Profess 8 Bit tool Profess 6 Bit tool Profess 6 Bit tool	Protocol S Not and Protocol S Not and Protocol S Not and Protocol S	Position 51 Review 51 Position 80 Review 51 Review 51 Review 52	Perstant ST Not send Perstant SP Not send Perstant SP Not send	
8 7 8 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	S stude 5 Sector 6 Sector 6 Sector 6 Sector 7 Sector 7 Secto		Warning - 11 Project Rill all De you wish Same 3 Same 4 Same 4 Same 4	Protect 12 Como Protect 12 Como Protect 13 Sande 11 Como Protect 14 Sande 12 Como	d Rotor Tuber ons with empt (K) Rollon 21 for used Rollon 22 for used	y tubes. Cancel Peaker(3) Net used Pecker(30 Net mac	Partice 25 Vef and Partice 26 Vef and Partice 27 Vef and Partice 29 Vef and	Pedilor 43 Belon 44 Noticed Pedilor 45 Ber und Pedilor 45 Ber und	Perior 51 SH and Perior 52 SH and Perior 54 SH and SH and	Position 53 Rectard Position 63 Rectard Position 63 Rectard Position 62 Rectard	Perfort57 Mid seat Pastar-88 Mid peet Pestar-99 Not and Pestar-90 Not and	
5 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	South 5 South 5 South 2 South 2 South 3 South 1 South		Please fill all De you wish Rate of Same 3 Control Protection Same 4 Control	Here are unused posifie to continue? Pestinx13 Series11 Dealer Pestinx13 Series11 Series12 Series12	d Rotor Tuber ons with employed W Rotor 21 Rotor 22 Rotor 22	y tubes. Cancel Peaker23 Nervose Peaker20 Nervose	Pastor 30 Verand Pastor 30 Verand Verand Verand Verand	Profess (1) Recently Profess (4) Recently Recently Recently Recently Recently	Perior 51 Ski and Perior 50 Ski and Perior 51 Ski and Perior 54	Police 69 Record 0 Police 60 Record 0 Record 0 Record 0 Record 0 Record 0 Record 0 Record 0	Pestan 67 Not avail Pestan 88 Not avail Pestan 30 Not avail Pestan 70 Not avail	
8 9 10 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	S stude 5 (steps 6 (steps 6 (steps 6 (steps 6 (steps 6 (steps 6 (steps 1))))))))))))))))))))))))))))))))))))		Place fill all Place fill all De you with Parken 5 Cartel Polyton 5 Cartel Polyton 5 Cartel Polyton 5 Cartel Polyton 5 Cartel	here are unused positie to continue? Pestant3 Sande11 Domo Pestant3 Sande12 Domo	d Rotor Tube: ons with employed W Roston 21 Norused Patton 22 Norused	Cancel Peotex20 Nexuse Peotex20 Herma	Pastor 36 To Fand Pastor 36 Voluced Pastor 37 Voluced	Poder (7) Notice 1 Poder R Notice 3 Rocket 5 Notice 45 Notice 45	Peelon 51 St 4 and Peelon 52 Not and Peelon 52 Not and Peelon 54 Vot and	Podien 53 Rei und Rei und Podien 61 Nei und Podien 61 Nei und	Pectan 67 Mid avail Pectan 69 Mid avail Pectan 92 Not seed Pectan 92 Not seed	
5 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	S stock 5 Sector 8 Sector 9 Sector 9 Secto		Warning -1 Prese fill all De you wash Same 5 Same 5 Same 5 Same 6 Same 1 Desten 7 Desten 7 Desten 7	here are unused posifie to continue? Puttor 13 Serole 12 Como Pestion 13 Serole 12 Como Pestion 13 Serole 12 Como	A Rotor Tube: Ins with employed W Rodoc 21 Notwel Police 22 Rodoc 23 Police 22 Police 22	y tubes.	Postor X Velacel Velacel Postor X Velacel Postor X Velacel Postor X	Pedievel Pedievel Pedievel Pedievel Pedievel Pedievel Pedievel Pedievel	Perior 51 Stif and Pastor 57 Ud and Postor 59 Sti and Postor 54 Sti and Postor 54	Police 57 Reliced Police 10 Reliced Police 10 Reliced Reliced Police 52 Reliced Police 52	Pestan 57 Not assi Pastan 67 Not assi Pastan 57 Not assi Pastan 70 Not assi	
	S horde 5 Sonde 2 Sonde 8 Sonde 8 Sonde 1 Sonde 1 Sonde 11 Sonde 11 Sonde 11 Sonde 11 Sonde 11 Sonde 11 Sonde 11 Sonde 10 Sonde 10		Place fill all Place fill all De you with Parken 5 Central Polyton 5 Central Polyton 5 Central Polyton 5 Central	Pesterial Pesterial Pesterial Pesterial Pesterial Pesterial Sector 12 Denterial Denterial	d Rotor Tube: ons with employed W Rotion 21 Norwed Norwed	Pedioc23 Network Pedioc23 Network Pedioc23 Network Pedioc23 Network	Postor 3 Triand Pastor 3 Volumed Postor 3 Volumed	Poster (C) Relation Poster R Rocene Poster S Rocene Poster S Rocene Poster S	Peolon 51 Sci and Peolon 52 Not and Peolon 52 Not and Peolon 54 Not and Peolon 54 Not and	Position 53 Rev used Position 63 Rev used Position 62 Rev used Position 62 Rev used	Peolan 57 Mid and Peolan 58 Not used Peolan 59 Not and Peolan 70 Not and Peolan 70 Not and	
	Stands 5 Stands 7 Stands 7 Stands 7 Stands 10 Stands 10		Please fill all De you web	Pester15 Server12	A Rotor Tube: M Rotor 21 Noruse3 Patron 22 Noruse3 Patron 22 Noruse3	Cancel Pediev20 Pedie	Pastor 2 Print and Pastor 28 Colored Pastor 27 Uclused Pastor 28 Uclused	Pedilor (1 Pedier (1 Pedier (4 Pedier (5 Record)	Persion 51 States Persion 57 Vol and Persion 52 Vol and Persion 54 Vol and Persion 54 Vol and	Positive 51 Positive 53 Positive 53 Positive 53 Notices 53 Reference Positive 52 Reference Positive 53	Pestanib/ Mid and Pastanib/ Mid and Pastanib/ Mid and Pastani/ Mid and	
	Socials 6 (social) - (social) - (Warning -11 Prese fail all Do you wash	Paster15 Pester15 Pes	d Rotor Tube: ons with employed W	Cancel Product 23 Bit mach	Partice 35 Vet and Partice 35 Vet and Detailed Partice 37 Vet and Vet and Partice 37 Vet and Partice 37 Vet and Partice 35 Vet	Pedge (7 Bet and Pedge 8 Bet and Pedge 65 Bet and Pedge 65 Bet and Pedge 65	Participants Visit and Participants Visit and Participants Visit and Visit and Visit and Participants Visit and Visit and Participants	Positive 51 Bertond Restarctiff Bertond Positions Bertond Bertond Bertond Bertond	Periferenti Mediana Di Mediana Di	

Figur 5. Fältet "Notes" [Anteckningar] (1), knappen "Start Run" [Starta körning] (2) och "Warning" [Varning] för oanvända rotorpositioner (3).

17. Välj ett lämpligt Välja och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen. Klicka på "Save" [Spara] (Figur 6).



Figur 6. Fönstret "Save As" [Spara som] (1). 2 = fälten "File Name" [Filnamn] och "Save as type" [Spara som typ], 3 = "Save" [Spara].

2

PCR-körningen startar.

Obs! När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (Figur 7).



Figur 7. Fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] (1).

Obs! När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" [Analys]. Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på den (Figur 8).

Obs! En förklaring av beräkningsmetoden ges i avsnittet "Tolkning av resultat (automatiskt)".

540 Tes Sangle Rendt Tallor 10 Sept 10 Sent Sangle Rendt Tallor 10 Sept 10 S	Ben Roome 	Ones Ones 0.000 0.000 0.000	
And Res Saugh Renall Late: #0 Saugh New Record RC Coned No. Coned No. Coned MC Coned No. Cone No. Cone MC Cone No. Cone	Bend Control Article Cl. Phan-Newine 2004 200	Deem VAR VAR	
And Run Sangle Reval Table: 10 Sing Inter 111 Const 11	ComitAtare C Part Noring 2000 - 2000 - 20	Dens Orad Orad Orad Orad Orad Orad Orad Orad	
4 Fan Saugh Read Table:	Cantof Accer C Page Warran 2020 3 2030 - 2030 -	Draw Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit	
After A Single Result Lake: Security Transmission 1 Security Transmission Security Transmission 1 Total Construction Security Transmission 9 Security Transmission Security	CantolAster C Pap Netrice 20 M - 79 V - 20 V - 2	Crean Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit Visit	
All the Support Head Table:) Segnitive: HTCCsee HTCCs	CathsAuer C Page Meeting 22 W - 23 91 - 33 91 - 35 97 - 25 97 - 25 97 - 25 97 - 25 97 - 25 97 - 25 97 - 25 97 - 25 92 - 25 92 - 25 92 - 26 93 - 26 94 - 27 95 - 28 94 - 29 95 - 20 94 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 - 20 95 <th>Deen UNA UNA UNA UNA UNA UNA UNA UNA</th> <th></th>	Deen UNA UNA UNA UNA UNA UNA UNA UNA	
important important	Landzare () Transforma 	United States St	
111 C Card 111 C		VAL VAL VAL VAL VAL VAL VAL VAL	
WHI 1000 F GHT _ LHK_ DALES (249 WHI 1000 F GHT _ LHK_ DALES (2400 F HT _ LHK_ DALES (2400 F HT _ LHK_ DALES (240	2 2 (k) 2 3 3 4 2 3 7 2 3 7 2 7 2 7 2 7 2 7 2 7 2 7 2 7 2	Unit Unit Unit Unit Unit Unit Unit Unit	
Web-bodt Led, Z. (Hr., 2004) Supp.	30 10 - 30 20 -	VAB VAB VAB VAB VAB VAB VAB VAB VAB VAB	
941-0017 6-01 _ (10, 0003) 249 944-0017 6-01 _ (10, 0003) 249	8 39 371 371 373 373 374 377 377 377 384 384 384 384 384 384 384 384 384 385 386 385 385 385 385 385 385 385 385 389 385	Vial Vada Vada Vada Vada Vada Vada Vada Va	
	37). 373. 773. 773. 774. 373. 373. 373. 373. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 383. 393. 393. 393. 393.	UNAL UNAL UNAL UNAL UNAL UNAL UNAL UNAL	
	27 55. 28 397. 29 77. 20 77. 28 49. 28 49. 28 39. 28 39. 28 39. 28 49. 28 49. 29 49. 20 40	Unité de la construir de la co	
Here Hourt Facing, C. Hu, Sandol J. Hur Here Hourt Facing, C. Hu, Sandol J. Hur Here Hourt Facing, C. Hur, David Y. Lery Here Hourt Facing, C. Hur, David Y. Lery Here Hourt Facing, C. Hur, Sandol J. Lery	3 291 3 272 3 273 3 3 4 3 3 4 3 284 3 284 3 284 3 284 3 291 3	Vali Vali Vali Vali Vali Vali Vali Vali	
- Mart 1990 Card 2014, 2014 (2016) Card - Mart 1990 Card 2014, 2014 (2016) Card - Mart 1990 Card 2014, 2014, 2014 (2017) - Mart 1990 Card 2014, 2014, 2014 (2017) - Mart 1990 Card 2014, 2014, 2014 (2017) - Mart 1990 Card 2014 (2017) - Mart 1990 Ca	2079 - 2020 - 20	Unit Unit Unit Unit Unit Unit Unit Unit	
WHITTOOTHELETING, LINE, SHAREN, LEWIST, LEWIST, LEWIST, MARK, LONGON, LINE,	2894 - 2820 - 2820 - 2820 - 2820 - 2821 - 2824 - 2824 - 2824 - 2824 - 2824 -	Vield Vield Vield Vield Vield Vield Vield	
WHE ROOM TO LETTER CHILD AND TO AN	2 2 20 - 28 89 - 26 00 - 26 491 - 26 10 - 25 54 - 28 54 -	Vadi Vadi Vadi Vadi Vadi Vadi Vadi	
WHENDOODS HAT 2, LINE, DUBYES, LINE WHENDOODS HAT 2, LINE, DUBYES, LINE	28.99 - 26.00 - 24.91 - 26.12 - 26.54 - 26.54 - 20.51 -	Vaa Vaa Vaa Vaa Vaa Vaa Vaa	
MARHOOD SEATURE (LINE, DANNER), KARAN MARHOOD SEATURE (LINE, DANNER), KARAN	26 00) - 24 31 - 26 13 - 25 54 - 28 51 -	Vald Vald Vald Vald Vald	
MARTOODISE ENTLC/IFL/DAUGT2/MSP MARTOODISE LICC/IFL/DAUGT2/MSP MARTOODISE ENTLC/IFL/DAUGT2/MSP MARTOODISE ENTLC/IFL/DAUGT2/MSP	2481 - 2610 - 2556 - 2861 -	vald Vald Vald Vald	
MAN-1000195 EUTE C, HIN, DAUG E, MEP MAN-100025 EUTE C, HIN, DAUG E, MEP MAN-1000200 EUTE C, HIN, DAUG E, MEP	26.13 - 25.54 - 20.61 -	Vaid Vaid Vaid	
MM-100059 EHIS_CUM_03MUSI2_MSP MM-1000000EHIS_CUM_03MUSI2_MSP	2554 - 2861 -	Vald Vald	
MAN-100000 Exits, C, NH, 004UG 12, MSP	28.61] -	Vald	

Figur 8. Fliken "Analysis" [Analys] (1) och rapportering av resultat (2 = "Control Run Sample Result Table" [Provresultattabell för kontrollkörning])

Kontrollresultat rapporteras på följande sätt i "Control Run Sample Result Table" [Provresultattabell för kontrollkörning] (Figur 8).

Körningskontroller (PC och NTC, rörpositioner 1 respektive 2). Om resultaten ligger inom acceptabla intervaller visas "Valid" [Giltigt]. Annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].

 C_T >31,10 för provets kontrollreaktion visas som "Invalid" [Ogiltigt]. Mängden DNA är inte tillräcklig för mutationsanalys. Testa om provet. Om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du mer tumörvävnad om det finns tillgängligt.

 $C_T < 23,70$ för provets kontrollreaktion visas som "Invalid" [Ogiltigt]. DNA-koncentrationen är för hög för mutationsanalys. Späd med nukleasfritt vatten för spädning (Dil.) och gör om testet. Späd till ett C_T-värde på 23,70–31,10. En 1:1-spädning ökar C_T-värdet med ca 1,0.

 C_T på 23,70–31,10 för provets kontrollreaktion (23,70 \leq kontroll- C_T -värde \leq 31,10) visas som "Valid" [Giltigt]. DNA-koncentrationen är lämplig för mutationsanalys.

Obs! Om det behövs en ny extraktion eller spädning upprepar du kontrollreaktionen för att bekräfta att DNA-koncentrationen är lämplig för användning.

 Klicka på "Report" [Rapport] om du vill skapa en rapportfil. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] öppnas. Välj "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport] under "Templates" [Mallar] klicka sedan på "Show" [Visa] (Figur 9).

Obs! Om du vill spara rapporter på en annan plats i Web Archives-format klickar du på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



Figur 9. Välja "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport]. 1 = "Report" [Rapport], 2 = fönstret "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = alternativet "EGFR Analysis Report" [EGFR-analysrapport], 4 = "Show" [Visa].

Protokoll: EGFR-mutationsdetektion

Detta protokoll är avsett för detektion av EGFR-mutationer. När ett prov har klarat DNA-provbedömningen kan det testas med EGFR-mutationsanalyser som använder automatisk programvara.

Obs! Information om manuell mutationsdetektion finns i Bilaga A: Manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Viktigt att tänka på före start

- För att erhålla korrekta resultat, se till att det beskrivna blandningsförfarandet utförs vid varje blandningssteg i analyskonfigurationen.Innan du startar proceduren ska du läsa avsnittet Allmänna säkerhetsåtgärder.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM innan du startar protokollet. Se användarmanualen till instrumentet.
- Ett prov kan testas med EGFR-mutationsanalyserna när det har klarat DNA-provbedömningen.
- För effektiv användning av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit måste prover grupperas i en batchstorlek på sju. Mindre batchstorlekar innebär att färre prover kan testas med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Ett prov måste testas med alla reaktionsmixar som medföljer i therascreen EGFR RGQ PCR Kit.
- Vortexa inte Taq eller någon mix som innehåller Taq eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* genom att försiktigt placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.

Saker som måste göras före start

 Kontrollera att therascreen EGFR CE Assay Package-programvaran är installerad innan Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet används första gången (se Bilaga B: Installation av therascreen EGFR CE Assay Package).

- Före varje användning måste alla reagenser tinas ordentligt i minst 1 timme och högst 4,5 timmar i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom att vända 10 gånger och centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Blanda genom att vända 10 gånger och centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Se till att *Taq* håller rumstemperatur (15–25 °C) före varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

Procedur

Tina alla reaktionsmixrör, vatten för NTC och EGFR PC i rumstemperatur (15–25 °C) i minst
 timme och högst 4,5 timmar.

Tiderna för upptining av reagenser, PCR-konfiguration och förvaring innan start av körningen anges i tabell 5.

Minsta upptiningstid	Max upptiningstid	Förvaringstemperatur efter PCR- konfiguration	Maximal tid för PCR- konfiguration och förvaring
1 h	4,5 h	Rumstemperatur (15–25 °C)	6 h
1 h	4,5 h	2-8 °C	18 h

Obs! PCR-konfiguration utförs i rumstemperatur (15–25 °C). Förvaring avser tiden mellan slutförande av PCR-konfigurationen och start av PCR-körningen på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Obs! Se till att Taq (Taq-rör) har rumstemperatur (15–25 °C) samtidigt som de andra reagenserna (se Förvaring och hantering av reagenser). Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

 När reagenserna har tinat ska du blanda dem genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer och sedan centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp. Bered tillräckligt med huvudmixar för analys (analysreaktionsmix plus *Taq* för DNA-proverna, en EGFR PC- och en NTC-reaktion enligt volymerna som anges i tabell 6. Inkludera reagenser för ett extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Huvudmixarna innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Analys	Reaktionsmixrör	Volym reaktionsmix	Volym för <i>Taq</i> DNA-polymeras (<i>Taq</i> -rör)
Kontroll	CTRL	19,5 µl × (n + 1)*	0,5 µl × (n + 1)*
T790M	T790M	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
Borttagningar	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)
Tillägg	Ins	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)

Tabell 6. Beredning av huvudmixar för analys

* n = antal reaktioner (prover plus kontroller). Bered tillräckligt med huvudmix för ett extra prov (n + 1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen. Värdet n ska inte överstiga sju (plus kontroller) eftersom sju är det maximala antalet prover som får plats i en körning.

4. Blanda huvudmixarna för analys noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Placera det korrekta antalet rör i laddningsblocket enligt layouten i tabell 7. Tillsätt omedelbart 20 µl av rätt huvudmix för analys i varje PCR-rör.

Locken ligger kvar i sin plastbehållare tills de behövs.
	Kontr	oller			<u>Position</u> Provnumr	ner			
Analys	Positiv kontroll	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Kontroll	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Borttagningar	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
Tillägg	8	16	24	32	40	48	56	64	72

Tabell 7. Layout för kontroll- och mutationsanalyser i laddningsblocket. Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

- 5. Tillsätt omedelbart 5 µl vatten för NTC i rören i position 9–16 och förslut rören.
- 6. Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (rörpositionerna 17–24, 25–32, 33–40, 41–48, 49–56, 57–64, och 65–72) och förslut rören.
- 7. Tillsätt 5 µl EGFR PC i rören i position 1–8 och förslut rören.

Var noga med att inte göra fel vid laddning eller pipettering så att du säkerställer att rätt mängd NTC, prover och EGFR PC tillsätts i rätt rör.

Varje rör ska innehålla en total reaktionsvolym på 25 µl (20 µl huvudmix för analys som har beretts i steg 3 (tabell 6) plus 5 µl NTC/prov/PC). Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

Markera rörens lock för att visa i vilken riktning rören ska laddas på instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

- 8. När alla PCR-rör har förslutits ska du göra en visuell kontroll av provrörens fyllnadsnivå för att säkerställa att prov har tillsatts i alla rör.
- 9. Vänd alla PCR-rör 4 gånger för att blanda prover och reaktionsmixar.

10. Placera PCR-rören på remsa i sina korrekta positioner i 72-well rotorn enligt layouten i tabell 7.

Maximalt 7 prover kan inkluderas i varje PCR-körning. Om rotorn inte är fullbelagd fyller du alla tomma positioner på rotorn med förslutna, tomma rör.

 Placera omedelbart 72-Well rotorn i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet. Se till att låsringen (tillbehör till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.

Obs! Om du använder manuell EGFR-mutationsdetektion, se information i "Bilaga A: manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

12. Starta Rotor-Gene Q-programvaran genom att dubbelklicka på ikonen therascreen EGFR CE Locked Template [therascreen EGFR CE låst mall] på skrivbordet till den bärbara dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet (Figur 10).



therascreen EGFR CE Locked Template

Figur 10. Ikonen EGFR CE Locked Template [EGFR CE låst mall] (EGFR-mutationsdetektion).

 Fliken "Setup" [Konfiguration] öppnas som standard (Figur 11). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera sedan kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.

View									
Setup		Bun Progress			ľ		é	nal/sit	
This screen diploys incodencess solid polices for the unit Couplete he fields and dick that Kat Name: themsoren EGFR CE Roter: FGD PDR KJ Template Version: 30.4	I flux when you are ready to beg tached	in the sus ding adapter PC NTC	Notword	Not cased	Returned) (Not cased	Returned) (Not used) (NX 4
Run ID:	Control	osition:1 C ontrol	Postov17 Netused	Position:25 Not used	Pasition 33 Not used	Position 41 Not used	Position:48 National	Position 57 Not used	Postan 65 Not used
Incost Samples Samples Sample Name		oution:2 C NTC 790M T790M	Position:18 Net used	Peoliorc25 Not-used	Position:34 Not used	Position:42 Not used	Position:50 Not used	Position 50 Not used	Position 66 Not used
Sample ID Sampin Name		orition: 3 C eletions Parition: 11 NTC Deletions	Position:19 Net used	Pesition:27 Not used	Position:35 Not used	Position 43 Net used	Position:51 Nat used		Position/67 Not used
		osition:4 C NTC 8588	Position 20 Not used	Peolitors28 Not used	Position:36 Not used	Position:44 Not used	Position:52 Not used	Position 50 Not used	Position 68 Not used
Notes :	E	osition:5 C BETQ BETQ BETQ	Position 21 Not used	Pesition:29 Not used		Position 45 Net used	Position:53 Nationed		Position 65 Not used
	6713%	oution: 6 C 71SK Position: 14 NTC 671SK	Position 22 Not used	Peolion:30 Not used	Position: 38 Not used	Position: 46 Net used	Position:54 Nationed	Position 52 Not used	Position 70 Not used
	57601	osition: 7 C 7681 Position: 15 NTC S7681	Position 23 Not used	Pesition:31 Not used	Pasition:39 Not used	Position 47 Not used	Position:55 Nationed	Position 63 Not used	Postan 71 Not used
1		osition: B C Insertions	Position 24	Peoliore32	Position:40	Positon 48	Postor:55	Poster 54	Position 72

Figur 11. Fliken "Setup" [Konfiguration] (1) och rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast] (2).

14. Skriv in körnings-ID i fältet Run ID [Körnings-ID] enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i fältet Sample Name [Provnamn] enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur]-tangenten.

Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" [Prov-ID] (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern] på höger sida med provnamnet (Figur 12).

Obs! Alternativt kan provnamn som sparats i formaten *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaavgränsade värden) importeras via knappen "Import Samples" [Importera prover]. Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden.

Obs! Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern] att provnamnet som har lagts till markeras genom en ändring av färgen och att provnamnet är i provpositionen (Figur 12).

Obs! Maximalt 7 prover kan läggas till. Prov-ID (i provcirklarna) tilldelas automatiskt från 1 till 7.

Obs! Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern].



Figur 12. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn]. 1 = fältet "Run ID" [Körnings-ID], 2 = knappen "Import Samples" [Importera prover], 3 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 4 = "Sample List" [Provlista], 5 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern], 6 = markerad provcirkel och kolumn med 8 analyser under panelen.

15. Upprepa steg 14 för att ange namnen på alla ytterligare prover (Figur 13).

Obs! Om du vill redigera ett provnamn klickar du Sample Name [Provnamn] i provlistan visas det valda provet i fältet Sample Name [Provnamn] ovan. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på Return [Retur-] tangenten för att uppdatera namnet.



Figur 13. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" [Provnamn]. 1 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 2 = "Sample List" [Provlista], 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptern].

16. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i fältet "Notes" [Anteckningar] om det behövs, klicka sedan på "Start Run" [Starta körning] (Figur 14).

Obs! Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (Figur 14) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med förslutna, tomma rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med förslutna, tomma rör och klicka på OK för att fortsätta.



Figur 14. Fältet "Notes" [Anteckningar] (1), knappen "Start Run" [Starta körning] (2) och "Warning" [Varning] för oanvända rotorpositioner (3).

17. Fönstret "Save As" [Spara som] öppnas. Ange ett lämpligt filnamn och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen. Klicka på Save [Spara] (Figur 15).

Organize 🔻		 ?
🔆 Favorites	 Hard Disk Drives (1) 	
🥽 Libraries	Windows7 (C:) 145 GB free of 232 GB	
🖳 Computer	Devices with Removable Storage (8)	
🗣 Network	▷ Network Location (11)	
File <u>n</u> ame: t	herascreen EGFR CE	•

Figur 15. Fönstret "Save As" [Spara som] (1). 2 = fälten "File Name" [Filnamn] och "Save as type" [Spara som typ], 3 = "Save" [Spara].

PCR-körningen startar.

Obs! När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (Figur 16).



Figur 16. Fliken "Run Progress" [Körningsförlopp].

När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" [Analys].

Obs! Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på den (Figur 17).

Obs! En förklaring av beräkningsmetoden ges i avsnittet "Tolkning av resultat (automatiskt)".

			view											
		Şela			1			BenProgram	÷				 Analysia	
								Lepot	1		_			
Run Csetrals	Positive Carte	iat C												
Notor Position	Auny	Plags/w/an	erg:		Postiv	Control Se	latus							
10000000	Earteal				Valid		Min Carrow							
2	Deletione				Valid									
4	1,95091				Valid		-							
5	L9010				Valid		_							
7	5708				Veld									
8	brankers				Vald		-							
Run Controls	Negative Con	irot:												
Tota Postion	Aurey	N7C	Internal Control	(Bage/We	nings :			Negative Control St	alut					
8	Corteal	Valid	VNet					Valid						
11	Deletore	Valid	Valid					Vald						
2	L150R	Valid	Vald					Veld	-					
13	L3610	Valid	Valid					Vald						
5	\$708	Valid	Valid					Vald						
16	Incetions	Valid	Valid	41				Vald						
Sample Resu	# Table:									-				
Sarate D Sa	ngle Newe		COFFI Status	6	and D	O effe Cl	Rep.Warr	rya			CCFT1 Vistations	Stell.		
						4.0	3				1790M Detector	£		
1 12			101.02			62	3				1858R Detected			
64	NPLS 1		Mutation Dated	22	17.36	29	έ.				671% Detected			
						33					5768 Detected			
2 54	NPLE 2		Mutation Dated	ed	30.00	23	ð -				1290M Ceteche	6		
54	NPLE D		Mutation Detroit	ed .	27.11	34	1.				Creations Detected	1		
1 EA	NR.E 4		Mutation Dated	ed	29.75	33	-				1290M Detector	1		
5 5.4	NPLES		Midation Dates	wed .	254	69	2				7230M Detecter			
s SA	MPLE 6		Mutation Detec	ied	7522	63	2				7790M Detecter \$200 Detecter	6		
					-	71	ε.				7790M Entration			

Figur 17. Fliken "Analysis" [Analys] (1) och rapportering av resultat. 2 = panelen "Run Controls, Positive Control" [Körningskontroller, positiv kontrol]], 3 = panelen "Run Controls, Negative Control" [Körningskontroller, negativ kontrol]], 4 = "Sample Result Table" [Tabell med provresultat], 5 = panelen "Mutation Status" [Mutationsstatus].

Analysresultat rapporteras på följande sätt (Figur 18).

Run Controls, Positive Control [Körningskontroller, positiv kontroll]: Om resultaten ligger inom det acceptabla intervallet visas "Valid" [Giltigt] för "Positive Control Status" [Status för positiv kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].

Run Controls, Negative Control [Körningskontroller, negativ kontroll]: Om både resultatet "NTC" och "Internal Control" [Internkontroll] ligger inom de acceptabla intervallen visas "Valid" [Giltigt] för "Negative Control Status" [Status för negativ kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].

Sample Result Table [Tabell med provresultat]: Specifika mutationer rapporteras för de mutationspositiva proverna i kolumnen "EGFR Mutation Status" [EGFR-mutationsstatus].

 Klicka på "Report" [Rapport] om du vill skapa en rapportfil. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] öppnas. Välj "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport] under "Templates" [Mallar] klicka sedan på "Show" [Visa] (Figur 18). Obs! Om du vill spara en rapport på en annan plats i Web Archives-format klickar du på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



Figur 18. Välja "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport]. 1 = "Report" [Rapport], 2 = panelen "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = "EGFR CE Analysis Report" [EGFR CE-analysrapport], 4 = "Show" [Visa].

Tolkning av resultat (automatiskt)

Analysen och mutationsbestämningarna utförs automatiskt av *therascreen* EGFR Assay Package när en körning har slutförts. Följande information förklarar hur *therascreen* EGFR-analyspaketet gör analysen och mutationsbestämningarna.

Obs! Information om manuell analys av resultat finns i avsnitt Tolkning av resultat (manuellt).

PCR-cykeln vid vilken fluorescensen från en viss reaktion går över ett tröskelvärde definieras som C_T-värdet. C_T-värdena indikerar mängden av ett specifikt input-DNA. Låga C_T-värden indikerar högre nivåer av input-DNA och höga C_T-värden indikerar lägre nivåer av input-DNA. Reaktioner med ett C_T-värde klassificeras som positiva amplifieringar.

Programmet Rotor-Gene Q interpolerar fluorescenssignaler mellan två registrerade värden (vilka som helst). CT-värdena kan därför vara vilket reellt tal som helst (inte begränsat till heltal) i intervallet från 0 till 40. För *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är tröskelvärdet inställt på 0,075 relativa fluorescensenheter för den Green (FAM) kanalen och 0,02 för den Yellow (HEX) kanalen. De här värdena konfigureras automatiskt i *therascreen* EGFR-analyspaketet. Körningskontrollerna (PC, NTC och IC) bedöms för att säkerställa att acceptabla CT-värden uppfylls och att reaktionerna utförs korrekt.

Provets $\Delta C_{T}\text{-v}\ddot{a}rden$ beräknas för varje mutationsanalys med hjälp av ekvationen:

 $\Delta C_T =$ [mutationsanalysens C_T-värde] – [kontrollanalysens C_T-värde]

Prover klassas som mutationspositiva om de ger ett ΔC_T -värde som ligger inom ΔC_T -cutoffintervallet för den analysen. Över ΔC_T -cutoff-intervallet kan provet antingen innehålla mindre än den procentandel mutation som kan detekteras av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (bortom gränsen för analyserna) eller så är provet mutationsnegativt och rapporteras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad]. Under ΔC_T -cutoff-intervallet rapporteras provet som "Invalid" [Ogiltigt].

Ingen amplifiering i mutationsreaktioner räknas som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad]. ΔC_{T} -värden som beräknas genom bakgrundsamplifiering förväntas vara högre än den övre cutoff-gränsen för ΔC_{T} -cutoff-intervallet och provet klassas som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad].

Analysresultaten visas som "Mutation Detected" [Mutation detekterad], "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad], "Invalid" [Ogiltigt] eller, om en körningskontroll misslyckas, "Run Control Failed" [Körningskontrollen misslyckades]. För de mutationspositiva proverna rapporteras specifika mutationer. En tumör kan innehålla mer än en mutation. I sådana fall kommer mer än en mutation att rapporteras.

Rotor-Gene Q therascreen EGFR-analyspaketets flaggor

Tabell 8 (nästa sida) listar de flaggor som kan genereras av Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR-analyspaketet, deras betydelse och vilka åtgärder som kan vidtas.

Flaggnamnen utformas för att ge information om den komponent i kitet, det prov eller den kontroll som berörs, samt om felstatusen.

Till exempel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = kontrollanalysen (CTRL_ASSAY) för den positiva kontrollen (Positive Control, PC) har misslyckats (FAIL)
- SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = provet (SAMPLE) f
 f
 ir kontrollanalysen (CTRL) har h
 b
 ig
 koncentration (HIGH_CONC).

Tabell 8.	Flaaaor,	betvdelse	och å	åtaärder	som s	ka vidtas
Tabell 0.	naggor,	001740150		aigaiaci	50	ta manas

Flagga	Betydelse	Åtgärd
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C⊤ utanför intervallet för positiv kontroll i kontrollreaktionen.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_ ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C _T utanför intervallet för en eller flera mutationskontrollreaktioner.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_CTRL_INVALID_ DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (kontrollreaktionsmix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
PC_MUTATION_ INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (mutationsreaktionsmix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen ovanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INT_CTRL_ EARLY_CT	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen är nedanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INVALID_CT	Ogiltig PCR-körning – ogiltigt FAM (mindre än gränsvärdet) för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
NTC_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i negativ kontroll kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen och var uppmärksam på blandningsstegen.
SAMPLE_CTRL_ INVALID_DATA	Ogiltigt prov – fluorescensdata i provkontrollen kan inte tolkas.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa de relevanta proverna. Var uppmärksam på blandningsstegen.
Sample_CTRL_ High_Conc	Ogiltigt prov – FAM Cī är för lågt i provkontrollen.	Späd provet för att öka kontroll- C_T -värdet. Den här spädningen ska beräknas baserat på antagandet att spädning 1:1 med vattnet som medföljer kitet kommer att öka C_T med 1,0. När provet har spätts ut ska du konfigurera en ny mutationsbedömning och upprepa provet. Om provet har spätts efter DNA-provbedömningskörningen fortsätter du direkt med EGFR-mutationsdetektionskörning med det spädda provet.

Tabellen fortsätter från föregående sida

Flagga	Betydelse	Åtgärd
SAMPLE_CTRL_FAIL	Ogiltigt prov – FAM C _T är för högt i provkontrollreaktionen.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat och om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du 2 ytterligare FFPE-vävnadssnitt om sådana finns tillgängliga. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den här extraktionen. Om provet är ogiltigt upprepar du PCR-körningen med den andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
Sample_INT_CTRL_ Fail	Cτ för högt (eller inget Cτ] för internkontroll (HEX), FAM-kanalen mutationsnegativ.	För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat, ingen ytterligare testning krävs.
		Späd ut provet med vattnet som medföljer kitet baserat på antagandet att spädning 1:1 kommer att öka C_T för kontrollreaktionen med 1,0, Kontrollera att den slutliga volymen är >40 µl (t.ex. 40 µl DNA och 40 µl vatten från röret märkt med DIL).
		Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från två ytterligare FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR- körning för att testa den här extraktionen.
		Om den andra extraktionen är ogiltig så späd ut enligt beskrivningen ovan.
		Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
SAMPLE_INT_CTRL_ EARLY_CT	Mutationsrör ogiltigt – C⊤ HEX för lågt för provet (internkontroll)	För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat, ingen ytterligare testning krävs.
		Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du 2 ytterligare FFPE-vävnadssnitt om sådana finns tillgängliga. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den här extraktionen. Om den ger ett ogiltigt resultat upprepar du PCR-körningen med den andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.

Flagga	Betydelse	Åtgärd
SAMPLE_INVALID_ DATA	Mutationsrör ogiltigt – fluorescensdata i internkontroll kan inte tolkas.	För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat; ingen ytterligare testning krävs. Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du 2 ytterligare FFPE-vävnadssnitt om sådana finns tillgängliga. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den här extraktionen. Om den ger ett ogiltigt resultat upprepar du PCR- körningen med den andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID	En eller flera mutationer för ett prov är positiva, och samtidigt är en eller flera mutationer för samma prov ogiltiga.	För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med en mutation detekterad (eller inte detekterad) i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: rapportera resultat, ingen ytterligare testning krävs. För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med ett INVALID (Ogiltigt) resultat som erhållits i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix gäller: Testa om provet med alla reaktionsmixar efter den specifika åtgärden för ogiltigflaggan. Om flaggan SAMPLE_INT_CTRL_FAIL genereras i kombination med en annan flagga för det berörda provet måste åtgärden för spädning av provet från flaggan SAMPLE_INT_CTRL_FAIL följas. Konfigurera en ny PCR- körning och testa om provet. För prover som genererar flaggan SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID (Prov positivt och ogiltigt) med ett INVALID (Ogiltigt) resultat som erhållits i en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix vid den upprepade PCR-körningen gäller: Extrahera provet från 2 ytterligare FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning med alla reaktionsmixar för att testa den här extraktionen. Om provet uppvisar ett ogiltigt resultat igen för en kliniskt relevant mutationsreaktionsmix ska du upprepa provet med alla reaktionsmixar efter den specifika åtgärden för ogiltigflaggan. Om SAMPLE_INT_CTRL_FAIL genereras i kombination med en annan flagga för det berörda provet måste åtgärden för spädning av provet från flaggan SAMPLE_INT_CTRL_FAIL följas. Konfigurera en ny PCR- körning och testa om provet. Om flaggan SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID observeras vid upprepandet får provet en obestämd mutationsstatus.

Tabellen fortsätter från föregående sida

rabolion longalonal inan	Ta	beller	n fortsätter	från	förec	dende	sida
--------------------------	----	--------	--------------	------	-------	-------	------

Flagga	Betydelse	Åtgärd
MUTATION_EARLY_CT	Ogiltigt prov $-\Delta C_T$ är för lågt eller så är C_T under cutoff- intervallet	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Var uppmärksam på blandningsstegen.

Felsökningsguide

Den här felsökningshandboken kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan Vanliga frågor [Frequently Asked Questions, FAQ] på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGENs tekniska service gärna på frågor om informationen och protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, se sista sidan eller besök www.qiagen.com).

Kommentarer	och	förslag	på	åtgärd
-------------	-----	---------	----	--------

NTC-proverna visar positiva resultat i (Green FAM-kanalen
Kontaminering har uppstått vid beredning av PCR	Upprepa PCR med oanvända reagenser i replikat. Stäng om möjligt PCR-rören direkt när du har tillsatt det prov som ska testas. Försäkra dig om att arbetsytor och instrument dekontamineras regelbundet.

Ingen signal med den EGFR-positiva kontrollen

a)	Den valda fluorescenskanalen för PCR-dataanalysen överensstämmer inte med protokollet.	För dataanalys väljer du fluorescenskanalen Cycling Green för analytisk EGFR PCR och fluorescenskanalen Cycling Yellow för internkontroll-PCR.					
b)	Felaktig programmering av temperaturprofilen för Rotor- Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	Jämför temperaturprofilen felaktighet.	med	protokollet.	Upprepa	körningen	vid

Kommentarer och förslag på åtgärd

c)	Felaktig konfiguration av PCR	Kontrollera dina arbetssteg med hjälp av pipetteringsschemat och upprepa PCR om det behövs.
d)	Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämde inte med de instruktioner som gavs i "Förvaring och hantering av reagenser" (sida 18)	Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på kitet) för reagenserna och använd ett nytt kit vid behov.
e)	Utgångsdatum för <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit har passerats	Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatumet (se etiketten på kitet) för reagenserna och använd ett nytt kit vid behov.
K٧	valitetskontroll	

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Begränsningar

Enbart resultaten från produkten ska inte ligga till grund för diagnos, utan de måste tolkas med hänsyn till resultat från alla relevanta kliniska studier eller laboratoriestudier.

Produkten är avsedd att användas endast av personal som fått särskild utbildning i in vitrodiagnostiska procedurer och Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument.

Produkten är endast avsedd för användning på en Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM real-time PCR-cykler.

För optimalt resultat krävs att anvisningarna i *handboken för therascreen EGFR RGQ PCR Kit* följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrad prestanda.

Det är viktigt att mängden och kvaliteten hos DNA i provet utvärderas korrekt innan provanalys utförs med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Ytterligare kontrollreaktionsmix tillhandahålls för att bestämma om C_T-värdet är godkänt för analysen. Absorbansavläsningar ska inte användas då de inte överensstämmer med C_T-värden i fragmenterade DNA-prover.

Primrarna i EGFR reaktionsmix för borttagningar har utformats för att rikta in sig mot flera Exon 19-borttagningar som sträcker sig från nukleotiderna 55174772 till 55174795 (GRCh38 chr7), ett intervall på 23 bp.

Även om Exon 19-borttagningsanalysen har validerats analytiskt och demonstrerats detektera 14 specificerade borttagningar inom Exon 19 (se listan i Tabell 1 i den här bruksanvisningen) så är det dock möjligt att ytterligare mutationer (inklusive men inte begränsat till ytterligare Exon 19 infogningar och L747P-mutationen) amplifieras av Borttagningsprimeruppsättningen.

Om de finns ger sådana ytterligare mutationer upphov till resultatet "Deletions Detected" [Borttagningar detekterade] för ett givet patientprov.

Dessutom är det möjligt att L858Q-mutationen detekteras av L858R-analysen. Om den finns i ett patientprov kan L858Q-mutationen därmed ge upphov till resultatet "L858R Detected" [L858R detekterad].

Var uppmärksam på de utgångsdatum och förvaringsvillkor som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Prestandaegenskaper

Analytisk prestanda

De specifika prestandaegenskaperna för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit fastställdes med hjälp av studier av FFPE-vävnadsprover tagna från NSCLC-patienter och mänskliga FFPEcellinjer (FFPE-cellinjer). FFPE-cellinjerna genererades med hjälp av en cellinje från lungcancer (A549) för att skapa cellinjer som innehåller de önskade specifika EGFR-mutationerna. När vävnadsprover eller cellinjer inte var tillgängliga användes plasmid-DNA.

Blankgräns (Limit of Blank, LOB), arbetsintervall, cutoff-värden och $\Delta C_{\text{T}}\text{-}\text{cutoff-intervall}$

Totalt 417 FFPE-prover testades i en studio enligt instruktionerna i NCCLS EP17-A (2004) (12) för att bestämma LOB och ΔC_T -cutoff-värden för varje mutationsanalys. Dessutom bestämdes arbetsintervallet. ΔC_T -cutoff-intervallen visas i Tabell 9.

Analys	C⊤-intervall	ΔC_{T} -cutoff-intervall (ΔC_{T})
T790M	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤7,40
Borttagningar	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,00
L858R	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
L861Q	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
G719X	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
S768I	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
Tillägg	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,00

Tabell 9. Fastställda ∆C₁-cutoff-interval	ll för varje mutationsanalys
---	------------------------------

Kontrollreaktionens CT-intervall fastställdes från 23,70 till 31,10 CT.

Analysens cutoff-värden och arbetsintervall verifierades med hjälp av standarder och ytterligare FFPE-prover. Under verifieringen bedömdes cutoff-värdena efter förmågan att särskilja korrekt mutation i en bakgrund med vildtyps-DNA genom att bedöma varje analys med genomiskt input-DNA med hög koncentration och mutations-input-DNA med hög koncentration (se Korsreaktivitet). Effekten av input-DNA på mutationsklassificering bedömdes också (se Effekt av DNA-input på ΔC_{T} -värden). En nedre gräns för intervallet har introducerats för att exkludera en PCR-fluorescensartefakt.

För att bedöma prestandan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vid frånvaro av mall och för att säkerställa att ett blankprov eller ett prov med vildtyps-DNA inte genererar en analytisk signal som kan indikera en låg koncentration av mutation, utvärderades prover utan mall och NSCLC EGFR-vildtyps-DNA. Resultaten visade inga positiva mutationsklassificeringar för NTC-prover och för FFPE-vildtypsprover.

Effekt av DNA-input på ∆C_T-värden

DNA-inputnivån definieras som den totala mängden amplifierbart EGFR DNA i ett prov enligt bestämningen av kontrollreaktionens C_T-värden. För att påvisa att prestandan för therascreen EGFR RGQ PCR Kit är konsekvent över intervallet för kontrollreaktionens C⊤värde (23,70-31,10) testades alla 7 EGFR-mutationsanalyser mot en 6-punkters, 1 till 3-spädningsserie (DNA som extraherats från FFPE-cellinjer). C_T-målvärdet för spädning 1 för varje mutation var ca 24,70. Den slutliga spädningen, som gav ett Cī på ca 32–33, låg utanför kontrollreaktionens C_T-intervall. Generellt var de ΔC_T -värden som mättes upp vid olika nivåer av total DNA-input konsekventa över hela arbetsintervallet för therascreen EGFR RGQ PCR Kit.

Korsreaktivitet

Vildtyps-EGFR DNA vid hög DNA-input testades för att bedöma den icke-specifika amplifieringen. Resultaten visade att de lägsta ΔC_{T} -värdena överskred de fastställda cutoff-värdena, vilket indikerade att icke-specifik amplifiering inte förekom.

FFPE-cellinjer vid hög DNA-input testades mot alla reaktionsmixar för att bedöma potentiell korsreaktivitet. Resultaten visade ingen påverkan orsakad av korsreaktivitet mellan mutantreaktioner. Minimi- ΔC_T -värdena var samtliga högre än de respektive cutoff-värdena för analysen för alla icke-matchande reaktionsmixar och DNA-prover.

Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod

En studie påvisade överensstämmelsen i mutationsdetektion för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i relation till bidirektionell Sanger-sekvensering. I den här studien testades 360 FFPE-prover.

Prover med giltiga resultat för både Sanger och *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit analyserades för att bedöma den positiva överensstämmelsen i procent (Positive Percent Agreement, PPA), den negativa överensstämmelsen i procent (Negative Percent Agreement, NPA) och den totala överensstämmelsen i procent (Overall Percent Agreement, OPA). De här procentvärdena tillsammans med de motsvarande tvåsidiga 95-procentiga konfidensintervallen (KI) sammanfattas i tabell 10.

Mätning	Överensstämmelse i procent (N)	95 % KI
Positiv överensstämmelse i procent	99,4% (157/158)	96,5–100,0 %
Negativ överensstämmelse i procent	86,6% (175/202)	81,2–91,0 %
Total överensstämmelse i procent	92,2% (332/360)	89,0–94,8 %

Tabell 10. Analys av överensstämmelse

För de 28 diskordanta resultaten för total överensstämmelse i procent:

- 1 (3,6 %) prov var vildtyp (dvs. ingen mutation detekterad) med therascreen EGFR RGQ
 PCR Kit men hade resultatet mutation detekterad med Sanger-sekvensering.
- 27 (96,4 %) prover hade resultatet mutation detekterad med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit men var vildtyp med Sanger-sekvensering.

Värden för detektionsgräns (Limit of Detection, LOD)

En studie utfördes för att fastställa LOD för var och en av de 29 EGFR-mutationerna. LOD definierades som den lägsta andelen mutant-DNA i en bakgrund med vildtyps-DNA då ett mutantprov ger mutationspositiva resultat för 95 % av testresultaten (C95).

För att bestämma LOD för varje mutation preparerades prover med olika procentvärden för mutation vid låga och höga input-DNA-koncentrationer och testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (tabell 11). LOD för varje analys beräknades med logistisk regression. För att verifiera LOD testades mutationsprover vid fastställd LOD och den positiva testandelen verifierades.

				<u>LOD (%</u>	<u>mutant)</u>
Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basskifte	Låga	Höga
18	G719A	6239	2156G>C	7,41†	1,57†
	G719S	6252	2155G>A	5,08‡	7,75§
	G719C	6253	2155G>T	10,30‡	_1
19	Borttagningar	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†	_1
		12728	2236_2253del18	2,43†	_1
		12367	2237_2254del18	2,72†	_1
		6210	2240_2251del12	4,09†	_1
		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§

Tabell 11. LOD fastställd med kliniska FFPE-prover,	FFPE-cellinier eller	plasmider vid låga ocl	n höga DNA-inputnivåer

I abellen fortsatter fran foregaenae sia	Tabellen	fortsätter	från	föregå	ande	side
--	----------	------------	------	--------	------	------

				<u>LOD (%</u>	<u>mutant)</u>
Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basskifte	Låga	Höga
20	S768I	6241	2303G>T	7,66†	2,18†
	Tillägg	12376	2307_2308insGCCAGCGT G	11,61†	_1
		12378	2310_2311insGGT	4,91†	1,31†
		12377	2319_2320insCAC	2,40†	0,65†
	T790M	6240	2369C>T	9,72†	5,09†
21	L858R	6224	2573T>G	5,94†	1,13†
	L861Q	6213	2582T>A	2,22†	0,66†

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]: http://cancer.sanger.ac.uk/.

[†] LOD-värden fastställdes med cellinjer

[‡] LOD-värden fastställdes med plasmider

§ LOD-värden fastställdes med kliniska prover

[¶] Har inte bedömts

Interferens

Effekter av nekrotisk vävnad

Kliniska NSCLC FFPE-prover med ett innehåll av nekrotisk vävnad på upp till 50 % för både EGFR-mutant- och vildtypsprover interfererade inte med resultaten från bestämningen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Exogena substanser

Potentiellt interfererande substanser som förekom i DNA-extraktionsprocessen testades i mutanta prover och vildtypsprover vid 10x-koncentration: paraffinvax, xylen, etanol och Proteinas K. Resultaten visade att de här substanserna inte interfererade med resultaten från bestämningen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Reproducerbarhet

Reproducerbarhet mellan loter

Testsystemet *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit använder två separata kit: QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit eller QIAamp DNA FFPE Tissue Kit för isolering av DNA, och *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit för amplifiering av DNA och detektion av EGFR-mutationsstatus. Reproducerbarhet och utbytbarhet mellan loter påvisades med hjälp av 3 loter av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit och 3 loter av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Den totala procentandelen korrekta bestämningar mellan loter för EGFR-mutationsanalysen var 97,8 % (317/324) och för vildtypsprover var den 100 % (379/379).

Hantering av prover

Reproducerbarheten för QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit undersöktes med snitt som togs från tre FFPE-provblock: ett prov med borttagningsmutation (2235-2249 del15) i exon 19, ett prov med mutationen L858R i exon 21 och ett vildtypsprov. För varje prov utfördes extraktioner i duplikat på 3 platser och testades i 3 dagar (ej i följd) under en period av 6 dagar, vilket gav totalt 18 datapunkter per prov. På varje plats utförde 2 operatörer testning med 1 lot av QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (1 lot per plats, totalt 3 loter) i kombination med samma lot av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-reagenser på samtliga platser. Alla resultat för mutanta prover och vildtypsprover var giltiga och gav det förväntade resultatet vid bestämningen (korrekt bestämning = 100 %, 18/18 för varje prov), vilket gav stöd för reproducerbarheten och repeterbarheten för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vid det föranalytiska steget av DNA-isoleringen.

Precision och reproducerbarhet

Precisionen och reproducerbarheten för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit undersöktes genom att testa DNA som extraherats från kliniska NSCLC FFPE-prover eller FFPE-cellinjer och som representerade alla sju mutationsanalyser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Kliniska NSCLC FFPE-vildtypsprover ingick också i studien (tabell 12).

En utformad studiematris implementerades för att bedöma analysens reproducerbarhet genom att testa prover på 3 laboratorier (platser) med 3 loter av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (3 loter på 3 platser) med 2 operatörer per plats och 2 instrument per plats, där varje prov (som preparerats på en nivå nära LOD) testades i duplikat under totalt 16 dagar. Reproducerbarheten för varje individuell mutation testades under icke efterföljande dagar på varje plats. Andelen korrekta bestämningar visas i Tabell 12, nästa sida.

			Bestämn	ingar	% korrekta
Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Korrekta/totalt	% korrekta	Nedre ensidiga 95 % Cl
18	G719A	6239	77/78	98,72	94,06
19	Borttagningar	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
	Tillägg	12376	92/92	100	96,80
		12378	93/93	100	96,83
		12377	94/94	100	96,86
	T790M	6240	92/92	100	96,80
21	L858R	6224	83/84	98,81	94,48
	L861Q	6213	84/84	100	96,50
Vildtyp	_	-	77/78	98,72	94,06

Tabell 12. Analysens reproducerbarhet – andel korrekta bestämningar för testade EGFR-mutationer

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer [Katalog över somatiska cancermutationer]: http://cancer.sanger.ac.uk/. En varianskomponentanalys användes för att uppskatta standardavvikelsen och de 95procentiga konfidensintervallen för variabilitet inom körningar, mellan körningar, mellan dagar, mellan loter och mellan platser. Den totala variationskoefficienten (Coefficient of Variation, CV) var $\leq 14,11$ % för alla EGFR-mutationer som testades med samtliga varianskomponenter. För alla mutanta prover i panelen var procentandelen CV $\leq 8,33$ % mellan loter, mellan dagar och mellan körningar. Procentandelen CV för variabilitet inom körning (repeterbarhet/precision) låg mellan 5,99 och 13,49 %.

Klinisk prestanda

Kliniska resultatdata: GIOTRIF®

Den kliniska studien LUX-Lung 3 var en internationell, öppen, randomiserad fas 3-multicenterstudie av afatinib jämfört med kemoterapi som första linjens behandling för patienter med lungadenocarcinom i fas IIIB eller IV som innehöll en EGFR-aktiverande mutation (ClinicalTrials.gov-nr NCT00949650). Lämpligheten för patienter för deltagande i den kliniska studien bestämdes genom att testa EGFR-mutationsstatusen hos patienten med hjälp av analys vid klinisk studie (Clinical Trial Assay, CTA). Retrospektiva tester av vävnadsprover genomfördes med hjälp av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En överbryggande studie genomfördes för att bedöma överensstämmelsen mellan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit och CTA-analysen.

Baserat på testresultaten från CTA-analysen var 345 patienter i den randomiserade gruppen (afatinib: 230 patienter; kemoterapi: 115 patienter). Det primära effektiva utfallet var progressionsfri överlevnad (Progression-Free Survival, PFS) enligt bedömning av en oberoende granskningskommitté (Independent Review Committee, IRC). Av de 345 randomiserade patienterna testades tumörprover från 264 patienter (afatinib: 178 patienter; kemoterapi: 86 patienter) retrospektivt med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En statistiskt signifikant förbättring av PFS enligt bedömning av IRC påvisades för patienter som randomiserats till afatinib jämfört med de som randomiserats till kemoterapi i en allmän CTA+ population och i den *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-populationen. Resultaten för det totala utfallet sammanfattas i tabell 13 och Figur 19.

Tabell	13.	Klinisk nytta	hos patienter	som testades	s med therascre	en EGFR RGG	PCR Kit i de	en kliniska LUX-Lu	Jng 3-
studien	1		-						-

	therascreen EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-population n = 264		CTA-positiv population, n = 345		
	Kemoterapi Afatinib		Kemoterapi	Afatinib	
Parameter	n = 86	n = 178	n = 115	n = 230	
Progressionsfri överlevnad (Progression-Free Survival, PFS)					
Antal dödsfall eller progressioner, N (%)	53 (61,6 %)	120 (67,4%)	69 (60,0%)	152 (66,1%)	
Median-PFS (månader)	6,9	11,2	6,9	11,1	
Median-PFS 95 % CI	5,3; 8,2	9,7, 13,7	5,4, 8,2	9,6, 13,6	
Riskkvot	0,	49	0,	58	
Riskkvot 95 % Cl	0,35,	, 0,69	0,43	0,78	
P-värde (stratifierat log-ranktest)*	<0,0	0001	<0,	001	

* Stratifierat efter EGFR-mutationsstatus och ras.



Figur 19. Kaplan-Meier-kurva över progressionsfri överlevnad (PFS) enligt oberoende bedömning efter behandlingsgrupp (*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-population). Analys av delmängden för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+ (n = 264) visade att hos de patienter som behandlades med afatinib ökade PFS-tiden signifikant (median-PFS 11,2 jämfört med 6,9 månader) och sannolikheten för progressiv sjukdom eller dödsfall minskade (HR = 0,49, 95 % KI [0,35; 0,69], p < 0,0001) jämfört med de patienter som behandlades med kemoterapi. Den observerade kliniska nyttan hos delmängden patienter som testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit var jämförbar med den som observerades i den fullständiga studiepopulationen (n = 345).

Kliniska resultatdata: IRESSA®

Studien IRESSA Follow-up Measure (IFUM) var en fas 4, öppen engruppsstudie (NCT01203917) för att bedöma effekten och säkerheten/toleransen för gefitinib som första linjens behandling av kaukasiska patienter med EGFR-mutationspositiv lokalt framskriden eller metastaserande NSCLC fas IIIA/B/IV. IFUM-studien utformades för att utvärdera den objektiva svarsfrekvensen enligt RECIST-kriterier hos presumtiva kaukasiska patienter med EGFR-mutant NSCLC.

Lämpliga patienter skulle ha en borttagning i EGFR-exon 19, L858R, L861Q eller G719X-substitutionsmutation och ingen T790M- eller S768I-mutation eller exon 20-tillägg i tumörprover enligt presumtiv bestämning med hjälp av CTA. Retrospektiva tester av prover från patienter som screenats för den kliniska IFUM-studien genomfördes med hjälp av det tillhörande diagnostiska *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. En överbryggande studie genomfördes för att bedöma överensstämmelsen för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit med CTA-analysen som användes för att välja ut patienter till den kliniska IFUM-studien. Den övergripande överensstämmelsen mellan de två analyserna för detektion av EGFR-exon 19-borttagningar och L858R-mutation var 98,2 % (n = 700/713; 95 % CI: 96,9 %, 99,0 %) med PPA på 88,2 % (n = 90/102; 95 % CI: 80,4 %, 93,8 % och NPA på 99,8 % (n = 610/611; 95 % CI: 99,1 %, 100,0 %).

CTA-testresultat erhölls för 859 screenade patienter, av vilka 106 patienter var lämpliga för behandling med gefitinib. Av 859 prover med ett CTA-resultat så var 765 prover tillgängliga för testning retrospektivt med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit, inklusive 87 prover som var EGFR-mutationspositiva med både CTA och *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. Det primära effektiva utfallet var objektiv svarsfrekvens (objective response rate, ORR) enligt bedömning vid en blindad oberoende central granskning (Blinded Independent Central Review, BICR) och av utredare. Den observerade kliniska nyttan hos delmängden patienter som testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit var jämförbar med den som observerades i den fullständiga studiepopulationen.

Resultaten för det totala utfallet sammanfattas i tabell 14.

Tabell 14. Klinisk nytta hos patienter som testades med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit i den kliniska IFUMundersökningen

Parameter	therascreen EGFR RGQ PCR Kit+-population, n = 87	CTA-positiv population, n = 106
Objektiv svarsfrekvens (Objective Response Rate, ORR) enligt BICR		
Antal svar (N)	42	53
ORR, % (95 % CI)	48,3 (38,1-58,6)	50,0 (40,6-59,4)
Mediantid för svar (månader)	6,9 (5,6-11,4)	6,0 (5,6-11,1)
Objektiv svarsfrekvens (Objective Response Rate, ORR) enligt utredare Antal svar (N)	62	74
ORR, % (95 % CI)	71,3 (61,0-79,7)	69,8 (60,5-77,7)
Mediantid för svar (månader)	8,3 (7,2-11,3)	8,3 (7,6-11,3)

BICR: Blinded independent central review (Blindad oberoende central granskning); CI: Confidence interval (Konfidensintervall); CTA: Clinical trial assay (Analys vid klinisk studie).

Obs! Kit-positiva är resultat som är positiva för exon 19-borttagningar/L8585R/L861Q/G719X.

Givet att *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit inte användes för att välja patienter för den kliniska IFUM-studien utfördes ytterligare effektivitetsanalyser för att överväga patienter som inte inkluderades i studien eftersom de testats negativt med CTA men kunde ha testats positivt med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (dvs. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA-), liksom patienter som var inskrivna i studien men som inte hade giltiga omtestningsresultat från *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit (dvs. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit okänt/CTA+). Resultaten från alla de hypotetiska analyserna liknade generellt resultaten från den primära effektivitetsanalysen.

Referenser

- 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.
- Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. J. Clin. Oncol. 24, 3340.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:

Symbol	Symbolförklaring
∑ <n≻< th=""><th>Innehåller reagens som räcker till <n> reaktioner</n></th></n≻<>	Innehåller reagens som räcker till <n> reaktioner</n>
Σ	Utgångsdatum
IVD	In vitro-diagnostisk medicinsk produkt
REF	Katalognummer
LOT	Lotnummer
MAT	Materialnummer
类	Skyddas mot ljus
GTIN	GS-artikelnummer
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen (handboken) och n är revisionsnumret
	Temperaturbegränsning
	Tillverkare
i	Läs bruksanvisningen innan användning
\triangle	lakttag försiktighet
Bilaga A: Manuellt protokoll för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Det här avsnittet innehåller instruktioner om hur *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit används med programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare i öppet läge (dvs. utan Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Allmän information

- En lista med det material som behövs finns på Material som behövs men inte medföljer.
- Fullständiga instruktioner om provberedning och provlayout finns i Protokoll: Provbedömning och Protokoll: EGFR-mutationsdetektion.
- Säkerställ inför varje körning att cykelparametrarna är korrekta.

Protokoll: Skapa en temperaturprofil

Innan du startar skapar du en temperaturprofil för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-analysen. Cykelparametrarna är desamma för både DNA-provbedömning och EGFR-mutationsdetektion.

Procedur

En sammanfattning av cykelparametrarna visas i tabell 15.

Tabell 15. Temperaturprofil

Cykler	Temperatur	Tid	Datahämtning
1	95 °C	15 minuter	Ingen
40	95 °C 60 °C	30 sekunder 60 sekunder	Ingen Green och Yellow

- 1. Dubbelklicka på programikonen för Rotor-Gene Q-programmet 2.3 på skrivbordet på den dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
- För att skapa en ny mall väljer du "Empty Run" [Tom körning] och klickar sedan på "New" [Ny] för att komma till "New Run Wizard. [Guide för ny körning].
- Välj "72-Well Rotor" [Rotor med 72 brunnar] som rotortyp. Bekräfta att låsringen sitter fast och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Klicka på "Next" [Nästa] (Figur 20).



Figur 20. Dialogrutan "New Run Wizard" (Guide för ny körning). 1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = "Next" [Nästa].

 Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och ange reaktionsvolymen 25. Kontrollera att 1, 2, 3... har angetts i fältet Sample Layout [Provlayout]. Klicka på "Next" [Nästa] (Figur 21).

New Run Wizard 🛛 🔀	
This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.	
Operator : NAME Or or term, hover the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.	
Reaction Volume (µL):	
Sample Layout : 1, 2, 3	2
Skip Wizard << Back Next >>	3

Figur 21. Ange namn på operatör och reaktionsvolymer. 1 = dialogfältet "Operator" [Användare] och dialogfältet "Notes" [Anteckningar], 2 = fältet "Reaction Volume" [Reaktionsvolym] och fältet "Sample Layout" [Provlayout], 3 = "Next" [Nästa].

5. Klicka på "Edit Profile" [Ändra profil] i dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] (Figur 22) och kontrollera körningsparametrarna enligt följande steg.

New Run	Wizard						×
Temperatu	re Profile :					Click this button to	-
Edit Profil	le					edit the profile shown in the box above.	
Name	Source	Detector	Gain	[Create New		
Green	470nm	510nm	5				
Yellow	530nm	555nm	5		E dit		
Orange	585nm	610nm	5		Edit Gain		
Red	625nm	660nm	5				
Crimson	680nm	710hp	7		Remove		
НВМ	460nm	510nm	7		Reset Defaults		
Gain Opti	misation]					
Skip W	/izard	<< <u>B</u> ack		<u>N</u> ext>>			_

Figur 22. "Edit Profile" [Ändra profil] i "New Run Wizard" [Guide för ny körning].

6. Klicka på "Insert after" [Infoga efter] och välj "New Hold at Temperature" [Ny bibehållning vid temperatur] (Figur 23).



Figur 23. Infoga ett initialt inkubationssteg. 1 = "Insert after" [Sätt in efter], 2 = "New Hold at Temperature" [Ny hålltemperatur].

 Sätt värdet i fältet Hold Temperature [Hålltemperatur] till 95 °C och värdet i fältet Hold Time [Hålltid] till 15 mins 0 secs [15 min 0 sek]. Klicka på Insert After [Infoga efter], välj sedan New Cycling [Ny cykling] (Figur 24).



Figur 24. Initialt inkubationssteg vid 95 °C. 1 = "Hold Temperature and Hold Time" [Bibehållen temperatur och bibehållen tid], 2 = "Insert after" [Sätt in efter], 3 = "New Cycling" [Ny cykling].

 Ställ in antalet cykelrepetitioner till 40. Välj det första steget och ställ in på 95 °C i 30 sekunder (Figur 25).



Figur 25. Cyklingssteg vid 95 °C. 1 = rutan "Cycle repeats" [Cykelrepetitioner], 2 = temperaturinställning för det första steget, 3 = tidsinställning för det första steget.

9. Markera det andra steget och ställ in på 60 °C i 60 sekunder. Klicka på Not Acquiring [hämtar inte] för att aktivera datahämtning under det här steget (Figur 26).

New Open Save As	Help	the sum to be exclusived.
e run will take approximately 12:	minute(s) to complete. The graph below represents	the run to be performed :
100		
k on a cycle below to modify it :		
ld	Insert after	
ow ty	Insert before	
	Remove	
s cycle repeats 40 time(s).	Remove	
s cycle repeats 40 time(s), k on one of the steps below to	Remove diffy it, or press + or - to add and remove steps for	this cycle.
s cycle repeats 40 time(s). k on one of the steps below to med Step	Remove hodfy it, or press + or - to add and remove steps for 95PC for 30 secs	this cycle.
is cycle repeats 40 time(s), ck on one of the steps below to imed Step 60°C	Remove nodify it, or press + or - to add and remove steps for 95%C for 30 secs	this cycle.
is cycle repeats 40 time(s), ck on one of the steps below to imed Step • 60°C 60 seconds Not Acquiring	Remove nodify it, or press + or - to add and remove steps for 95%C for 30 secs	this cycle.
is cycle repeats 40 time(s) & on one of the steps below to ined Step • 60% 60% 60% 60% 60% 60% 60% 60%	Remove	this cycle.
s cycle repeats 40 time(s) k on one of the steps below to imed Step • 60 seconds Not Acquing Touchdown	Remove	this cycle.
s cycle repeats 40 time(s) k on one of the steps below to ined Step • 60PC 60 seconds Not Acquiring Touchdown 2	Remove	this cycle.
s cycle repeats 40 time(s) k on one of the steps below to ined Step • 60°C 60 seconds Not Acquiring Touchdown 2	Remove	this cycle.

Figur 26. Cyklingssteg vid 60 °C. 1 = temperatur- och tidsinställning för andra steget, 2 = "Not Acquiring" [Hämtar inte].

 Välj Green och Yellow som hämtningskanaler. Klicka på > för att överföra dessa kanaler från listan Available Channels [Tillgängliga kanaler] till avsnittet Acquiring Channels [Hämtar kanaler]. Klicka på OK (Figur 27).

cquisiti	ion			
Same as P	revious :	(New Acqui	sition)	
Acquisitio Available	on Configu Channels	ration : :	Acquiring Channels :	
Name			> Name	
Crimson			Green	
Orange			Tellow	
Red			<<	
To acqui	re from a c	hannel, sele	ect it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a	
To acqui channel,	re from a c select it in	hannel, sele the right-ha	ect it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acqui channel,	re from a c select it in	hannel, sele the right-ha	ect it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acquir channel,	re from a c select it in	hannel, sele the right-ha	ect it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acquir channel, Dye Char	re from a c select it in t >>	hannel, sele the right-ha	sct it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acquir channel, Dye Char Dye Char	te from a c select it in t>>	hannel, sele the right-ha	cct it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	;
To acquir channel, Dye Char Dye Char Channel	t>> t>> t>> source	hannel, sele the right-ha ction Cha Detector	ect it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	:
To acquii channel, Dye Char Dye Char Channel Green	t>> select it in t>> Source 470nm	hannel, sele the right-ha ction Cha Detector 510nm	ect it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acquii channel, Dye Char Dye Char Channel Green Yellow	t>> select it in t>> Source 470nm 530nm	ction Cha Detector 510nm 555nm	trom the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acqui channel, Dye Char Dye Char Channel Green Yelow Orange	e from a c select it in t>> nnel Sele 500rce 470nm 530nm 585nm	ction Cha Detector 510nm 555nm 610nm	ct it from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acquir channel, Dye Char Dye Char Channel Green Yelow Drange Rad	e from a c select it in t>>> Source 470nm 530nm 585nm 625nm	ction Cha Detector 510nm 555nm 610nm	ct if from the list in the left and click >. To stop acquiring from a nd list and click <. To remove all acquisitions, click <<.	
To acquir channel, Dye Char Dye Char Channel Green Yellow Orange Rod Crimson	t From a c select it in select it in t Select Source 470nm 530nm 530nm 585nm 625nm 680nm	hannel, sele the right-ha ction Cha Detector 510nm 555nm 610nm 660nm 710hp	tt Dyes FAM ⁽²⁾ , SYBR Green 1 ⁽¹⁾ , Fluorescein, EvaGreen ⁽²⁾ , Alexa Fluor 488 ⁽²⁾ JDE ⁽²⁾ , VIC ⁽²⁾ , HEX, TET ⁽²⁾ , CAL Fluor Gold 540 ⁽²⁾ , Yakima Yellow ⁽²⁾ RDX ⁽²⁾ , CAL Fluor Red 610 ⁽²⁾ , Cy3.5 ⁽²⁾ , Texas Red ⁽²⁾ , Alexa Fluor 568 ⁽²⁾ Cy5 ⁽²⁾ , Quasar 670 ⁽²⁾ , Alexa Fluor 633 ⁽²⁾ Quasar 705 ⁽²⁾ , Alexa Fluor 630 ⁽²⁾	
To acquinchannel, Dye Char Dye Char Channel Green Yellow Orange Rod Crimson HRM	t>> select it in select it in t>> select it in select select source 470nm 530nm 530nm 530nm 625nm 680nm 460nm	hannel, sele the right-ha ection Cha Detector 510nm 555nm 610nm 660nm 710hp 510nm	tt Cyclic Control Con	

Figur 27. Hämtning vid cyklingssteg vid 60 °C. 1 = valda kanaler, 2 = "OK."

11. Markera det tredje steget och tryck - för att radera. Klicka på OK (Figur 28).

Edit Profile		
. . .		
The run will take approximately 135 minute(s	to complete. The graph below represents the run to	be performed :
	*****************	*****************
	iddiddddddddddd	adduddddddddddd
Llick on a cycle below to modify it : Hold	Incest after	
Cycling	Incert before	
	Bettove	
This curls uppeals (0 [time[a]		
This cycle repeats une(s).	or press + or - to add and remove steps for this cucle.	
Timed Step		
72%	C for 30 secs	
20 seconds	1	/
Acquiring to Cycling B		72°C for 20 secs
on Green	500° (m 50	/
Long Range	00000	1000
louchdown		
		<u>O</u> K

Figur 28. Ta bort förlängningssteg. 1 = tredje steget, 2 = "Delete" [Ta bort], 3 = "OK".

12. I nästa dialogruta klickar du på Gain Optimisation [optimering av förstärkning] (Figur 29).

New Run	Wizard					
Temperatu	re Profile :					This box displays
Edit Profi	le					help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about it's available settings.
Channel Se	stup :	0.1.1	C. i		 Crasta Nam	
Name	A70mm	E10vm	l Gan		 Cleate New	
Yellow	470nm 530nm	555nm	5		Edit	
Orange	585nm	610nm	5		Edit Gain.	
Red	625nm	660nm	5			
Crimson	680nm	710hp	7		Remove	
HRM	460nm	510nm	7		Reset Defaults	
Gain Opti	misation]		1	,	
Skip W	/izard	<< <u>B</u> ack		<u>N</u> ext >>		

Figur 29. Gain optimisation [Optimering av förstärkning] (1).

 Klicka på "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning]. Kanalinställningarna för varje kanal visas. Klicka på OK för att godta dessa standardvärden för bägge kanaler (Figur 30).

Auto-Gain Optimisation Setup	
Optimisation : Auto-Gain Optimisation will read the fluorescence on the inserted sample at different gain levels until it finds one at which the fluorescence levels are acceptable. The range of fluorescence you are looking for depends on the chemistry you are performing. Set temperature to So degrees. Optimise All Optimise Acquiring	
Perfor Auto-Gain Optimisation Channel Settings Perfor Channel Settings : Channel Settings : Channel Settings : Target Sample Range : F = Flup to 10 = Fl. Acceptable Gain Range: -10 = to 10 = OK Cancel Help	- 2

Figur 30. Automatisk nivåoptimering för Green-kanalen. 1 = "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning], 2 = "OK".

14. Markera kryssrutan Perform Optimisation before 1st Acquisition [Utför optimering för första hämtning], klicka på Close [Stäng] för att återgå till guiden (Figur 31).

Auto-Gair	n Optimisatio	n Setup				
Optimisation	an : Auto-Gain Opti different gain le acceptable. Th chemistry you a Set temperatur ise All Optimisation Br n Optimisation Al	nisation will reac vels until it finds are performing. a to 60d imise Acquiring fore 1st Acquisi 60 Degrees At	d the fluoresence one at which th escence you are legrees. <u>tion</u> Beginning Of Ru	on the inse e fluorescer looking for	rited sample a roce levels are depends on t	at he
Channel S	ettings :					
					•	Add
Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain	<u>E</u> dit
Green	1	5FI	10FI	-10	10	<u>R</u> emove
1 eilow	'	JFI	TUPT	-10	10	Remove All
					2	
<					>	
<u>S</u> tart	Manu	al C	lose	<u>H</u> elp		

Figur 31. Val av Green och Yellow kanaler. 1 = kryssrutan "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" [Utför optimering före första hämtning], 2 = "Close" [Stäng].

15. Klicka på Next [Nästa] (Figur 32). Klicka på Save Template [Spara mall] för att spara *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-mallen (*.ret-filen) på en lämplig plats.

New Run Wizard			X
Temperature Profile :			This box displays
			help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its
E dit Profile			available settings.
Channel Setup :			
Name Source Detector	Gain	Create New	
Green 470nm 510nm	5	Edt	
Yellow 530nm 555nm	5		
Urange 585nm 610nm	5	Edit Gain	
Crimson 680nm 710hn	7	Remove	
HRM 460nm 510nm	7		
		Reset Defaults	
Gain Optimisation			
Skip Wizard << <u>B</u> ack	<u>N</u> ext >>	— 1	,

Figur 32. "Next" [Nästa] (1).

Procedur (manuell)

Protokoll: Provbedömning (manuell)

Det här protokollet används för att bedöma den totala mängden amplifierbart DNA i prover och ska utföras innan EGFR-mutationsanalys.

- Bered proverna enligt beskrivningen i avsnittet Protokoll: Provbedömning, fram till steg 11.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet enligt beskrivningen i avsnitt Protokoll: konfiguration av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet Analys av provbedömningsdata.

Protokoll: EGFR-mutationsdetektion (manuell)

- När ett prov har klarat provbedömningen kan det testas för att detektera EGFR-mutationer.
- Förbered proverna enligt beskrivningen i avsnittet Protokoll: EGFR-mutationsdetektion, fram till steg 11.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet enligt beskrivningen i avsnitt Protokoll: konfiguration av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene Q.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata.

Protokoll: konfiguration av therascreen EGFR RGQ PCR Kit Rotor-Gene ${\rm Q}$

Procedur

1. Öppna programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare och öppna motsvarande temperaturprofil (*.ret-fil) för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

Instruktioner om hur du skapar temperaturprofilen och kontrollerar körningsparametrarna finns i Protokoll: Skapa en temperaturprofil.

2. Kontrollera att rätt rotor har valts och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Klicka på Next [Nästa] (Figur 33).



Figur 33. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och välkomstfönstret. 1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = "Next" [Nästa].

 Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden, bekräfta att reaktionsvolymen är inställd på 25 och att det i rutan "Sample Layout" [Provlayout] står "1, 2, 3... Klicka på Next [Nästa] (Figur 34).

New Run Wiza	rd	×
This screen displ clicking Next whe Operator : Notes : 2	ays miscellaneous options for the run. Complete the fields, n you are ready to move to the next page. NAME1	This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.
Reaction Volume (µL): Sample Layout : 	25 3 1, 2, 3 4 << Back Next >>	5

Figur 34. Alternativfönstret "New Run Wizard" [Guide för ny körning]. 1 = "Operator" [Användare], 2 = fältet "Notes" [Anteckningar], 3 = "Reaction Volume" [Reaktionsvolym], 4 = fältet "Sample Layout" [Provlayout], 5 = "Next" [Nästa].

Obs! I nästa fönster kan du redigera temperaturprofilen. (Ingen redigering krävs eftersom temperaturprofilen har skapats enligt instruktionerna i Protokoll: Skapa en temperaturprofil)

4. Klicka på Next [Nästa] (Figur 35).

New Run Wizard			X
Temperature Profile :			This box displays
			help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its
Edit Profile			available settings.
Channel Setup :			
Name Source Detector	Gain	Create New	
Green 470nm 510nm	5	Edit	
Yellow 530nm 555nm	5		
Urange 585nm 610nm	5	Edit Gain	
Crimoon 620nm 710hn	5	Bemove	
HBM 460pm 510pm	7		
		Reset Defaults	
Gain Optimisation			1
Skip Wizard << <u>B</u> ack	<u>N</u> ext >>		,

Figur 35. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och fönstret för temperaturredigering (1 = "Next" [Nästa]).

5. Verifiera sammanfattningen och klicka på "Start Run" [Starta körning] för att spara körningsfilen och starta körningen (Figur 36).

N	New Run Wizard 🛛 🛛 🔀		
	Summary :		
	Setting Green Gain Yellow Gain Auto-Gain Optimisation Rotor Sample Layout Reaction Volume (in microliters)	Value 5 5 Before First Acquisition 72/Well Rotor 1, 2, 3, 25	
Once you've confirmed that your run settings are correct, click Start Run to begin the run. Click Save Template to save settings for future runs.			
	Skip Wizard << <u>B</u> ack		

Figur 36. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och sammanfattningsfönstret (1 = "Start Run" [Starta körning]).

- 6. Utför ett av följande steg i det nya fönster som visas efter att körningen startar:
 - Ange provnamnen.
 - Klicka på Finish [slutför] och ange provnamnen senare. Gör det här genom att välja Sample [Prov] under körningen eller efter att körningen har slutförts.

Viktigt: Om du klickar på Finish and Lock Samples [avsluta och lås prover], kan du inte längre redigera provnamnen. laktta särskild försiktighet när du anger provnamn för att säkerställa korrekt provtestning och analys.

Obs! Vid namngivning av prover ska du inte ange något namn i fälten för tomma rör i kolumnen "Name" [Namn].

- 7. När körningen är avslutad analyserar du data enligt avsnitten Analys av provbedömningsdata eller Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata enligt behov.
- 8. Om du behöver kvantifieringsrapporter klickar du på ikonen "Reports" [Rapporter] i verktygsfältet i Rotor-Gene Q-körningsfilen.
- I rapportmenyn klickar du på Cycling A Green (page 1) (sida 1) under "Report Categories" [Rapportkategorier] (Figur 37).



Figur 37. Rapportmeny (1 = "Cycling A. Green (Page 1)" (sida 1)).

 Välj "Quantitation" (Full Report) [Kvantifiering (fullständig rapport)] under "Templates" [Mallar] (Figur 38).



Figur 38. Kvantifieringsrapport (fullständig rapport) (1).

- 11. Generera rapporten genom att klicka på Show [Visa].
- 12. Klicak på Save As [Spara som] om du vill spara en elektronisk version.
- 13. Upprepa för Cycling A Yellow (Page 1) (sida 1).

Tolkning av resultat (manuellt)

Efter att *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit har körts (för bedömning av DNA-prover eller EGFR-mutationsanalys) analyserar du data enligt följande procedurer:

- Programinställningar för analys
- DNA-provbedömningsanalys (manuell)
 Obs! I tabell 4 anges rörlayouten.
- EGFR-mutationsdetektionsanalys (manuell) Obs! I tabell 7 anges rörlayouten.

Programinställningar för analys

- 1. Öppna aktuell körningsfil (*.rex) med programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare.
- Om proverna inte har namngetts innan körningen ska utföras klickar du på Edit Samples [Redigera prover].
- 3. Skriv in namnen på proverna i kolumnen "Name" [Namn].

Obs! Ange inget namn för tomma rör.

- Klicka på Analysis [analys]. På analyssidan klickar du på Cycling A. Yellow" för att kontrollera Yellow (HEX) kanalen.
- 5. Klicka på Named On [namngiven].

Obs! Detta säkerställer att inga tomma rör ingår i analysen.

- 6. Välj Dynamic tube [Dynamiskt rör].
- 7. Välj Slope correct [Lutningskorrigering].
- 8. Välj Linear scale [linjär skala].

- 9. Välj Take Off Adj [Take off-just] och ange värdet 15.01 i den övre rutan ("If take off point was calculated before cycle" [om take off-punkten beräknades innan cykeln]) och 20.01 i den nedre rutan ("then use the following cycle and take off point" [använd då följande cykel och take off-punkt]).
- 10. Ställ in tröskeln på 0.02 och kontrollera C_T-värdena för Yellow (HEX) kanal.
- 11. På analyssidan klickar du på "Cycling A. Green" för att kontrollera Green (FAM) kanalen.
- 12. Välj "Named On" [Namngiven].
- 13. Välj Dynamic tube [Dynamiskt rör].
- 14. Välj Slope correct [Lutningskorrigering].
- 15. Välj Linear scale [linjär skala].
- 16. Välj Take Off Adj [Take off-just] och ange värdet 15.01 i den övre rutan ("If take off point was calculated before cycle" [om take off-punkten beräknades innan cykeln]) och 20.01 i den nedre rutan ("then use the following cycle and take off point" [använd då följande cykel och take off-punkt]).
- 17. Ställ in tröskeln på 0.075 och kontrollera CT-värdena för Green (FAM) kanal.

Analys av provbedömningsdata

Efter avslutad DNA-provbedömningskörning läser du avsnittet Programinställningar för analys och analyserar data på följande sätt. (Rörlayout visas i tabell 4, sida 25.)

Kör kontrollanalys

Negativ kontroll

För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får NTC inte generera ett CT-värde under 40 i Green (FAM) kanalen.

För att garantera att körningen har konfigurerats korrekt måste NTC visa amplifiering i intervallet 29,85 till 35,84 i Yellow (HEX) kanalen. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.

Positiv kontroll

EGFR PC måste ge ett C_T-värde i Green (FAM) kanalen inom intervallet 28,13 till 34,59. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen. Körningen har misslyckats.

Obs! Om antingen den negativa eller den positiva kontrollen har misslyckats får provdata inte användas.

Provanalys

Om körningskontrollerna för DNA-provbedömning är giltiga får analysen fortsätta. Kontroll- C_T -värdet för ett prov måste vara inom intervallet 23,70 till 31,10 i Green (FAM) kanalen. Om provets C_T är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

• Provkontrollanalysens C_T <23,70

Prover med ett kontroll-C_T på < 23,70 (hög DNA-koncentration) överbelastar mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom C_T-intervallet 23,70 till 31,10. Spädning av prov-DNA ökar C_T-värdet (en 1:1-spädning ökar C_T-värdet med ca 1,0). Späd proverna med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).

• C_T-värde för provets kontrollanalys >31,10

Omextraktion av provet rekommenderas med ett kontroll-C_T-värde > 31,10 i Green (FAM) kanalen. Det finns inte tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla EGFR-mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

Analys av EGFR-mutationsdetektionsdata

Ett prov måste klara DNA-provbedömningen innan det kan testas för att detektera EGFR-mutationer (se Analys av provbedömningsdata).

Efter avslutad EGFR-mutationsdetektionskörning läser du Programinställningar för analys och analyserar data på följande sätt. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

Kör kontrollanalys

Se flödesdiagrammet för körning av kontrollanalys i Figur 39.



Figur 39. Flödesdiagram för körning av kontrollanalys för EGFR-mutationsdetektion.

Negativ kontroll

För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får NTC för varje EGFR-mutationsanalys inte generera ett C_T-värde under 40 i Green (FAM) kanalen.

För att garantera att körningen har konfigurerats korrekt måste NTC visa amplifiering i intervallet 29,85 till 35,84 i Yellow (HEX) kanalen. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.

Positiv kontroll

För varje EGFR-mutationsanalys måste EGFR PC ge ett C_T-värde i Green (FAM) kanalen inom intervallet enligt tabell 16. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen. Körningen har misslyckats.

Obs! Provdata får inte användas om antingen den negativa eller den positiva körningskontrollen har misslyckats.

Reaktionsmix	Prov	Kanal	ΔC_{T} -cutoff-intervall
Kontroll	PC	Green	28,13 till 34,59
T790M	PC	Green	30,22 till 34,98
Borttagningar	PC	Green	28,90 till 34,90
L858R	PC	Green	29,97 till 34,81
L861Q	PC	Green	28,49 till 34,02
G719X	PC	Green	29,42 till 34,19
S768I	PC	Green	28,98 till 35,19
Tillägg	PC	Green	27,92 till 34,09

Tabell 16. Acceptabla Cr-intervall för positiva kontroller (EGFR-mutationsdetektionsanalys)

Provanalys – kontroll-CT-värde för prov i Green (FAM) kanalen

Om de positiva och negativa kontrollerna för EGFR-mutationsdetektionskörningen är giltiga får EGFR-mutationsdektion i prover fortsätta.

Kontroll-C_T-värdet för ett prov i Green (FAM) kanalen måste vara inom intervallet 23,70 till 31,10. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

Om provets kontroll-C_T-värde är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

• Provkontrollanalysens C_T <23,70

Prover med ett kontroll-C_T på < 23,70 (hög DNA-koncentration) överbelastar mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom C_T-intervallet 23,70 till 31,10. Spädning av prov-DNA ökar C_T-värdet (en 1:1-spädning ökar C_T-värdet med ca 1,0). Späd proverna med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).

CT-värde för provets kontrollanalys > 31,10
 Omextraktion av provet rekommenderas med ett kontroll-CT-värde > 31,10 i Green (FAM) kanalen. Det finns inte tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla EGFR-mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

Se Flödesdiagram för provanalys för EGFR-mutationsdetektion i Figur 40.



Figur 40. Flödesdiagram för provanalys för EGFR-mutationsdetektion.

Provanalys – C_T-värde för provets internkontroll i Yellow (HEX) kanalen

Obs! Se Flödesdiagram för provanalys för EGFR-mutationsdetektion i Figur 40.

Alla rör i varje prov måste analyseras. Kontrollera att varje rör genererar en HEX-signal inom intervallet 29,85 till 35,84 från den interna kontrollen i Yellow (HEX) kanalen. Det finns 3 möjliga slutresultat.

- Om den interna kontrollens C_T är under det angivna intervallet (< 29,85) för en mutationsanalys är resultatet ogiltigt för HEX-amplifiering (Yellow kanal). HEX-amplifieringen (Yellow kanal) är ogiltig för det aktuella röret.
- Om den interna kontrollens C_T hamnar inom det angivna intervallet (29,85 till 35,84) är resultatet positivt för HEX-amplifiering (Yellow kanal) HEX-amplifieringen (Yellow kanal) är giltig för det aktuella röret.
- Om den interna kontrollens CT är ovanför det angivna intervallet (> 35,84) är resultatet negativt för HEX-amplifiering (Yellow kanal).

Om det finns amplifiering i Green (FAM) kanalen och ΔC_T -värdet för den reaktionen är mindre än eller lika med analysens cutoff-värde för det röret så är HEX-amplifieringen (Yellow kanal) giltig. Om det inte finns amplifiering i Green (FAM) kanalen för det röret eller ett ΔC_T -värde större än analysens cutoff-värde så är HEX-amplifieringen (Yellow kanal) ogiltig.

Internkontrollamplifieringen i den Yellow (HEX) kanalen kan misslyckas på grund av PCR-hämmare. Om provet späds kan effekten från hämmare minskas. Observera att den här åtgärden även leder till spädning av mål-DNA i provet. Späd proverna med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).

Provanalys – C_T-värde för provmutationsanalys i Green (FAM) kanalen

FAM-värdena (Green kanal) för alla sju EGFR-mutationsreaktionsmixarna ska kontrolleras mot värdena som visas i tabell 17. De angivna värdena är inom och inklusive de värden som visas. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

Analys	C₁-intervall	∆C _T -cutoff-intervall
T790M	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤7,40
Borttagningar	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,00
L858R	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
L861Q	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
G719X	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
S768I	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,90
Tillägg	0,00 till 40,00	-10,00 ≥ till ≤8,00

Tabell 17. Acceptabla provvärden för EGFR-mutationsreaktioner i Green kanalen (FAM) (EGFR-mutationsdetektionsanalys)

 Om Green kanalens (FAM) C_T f
 f
 r provet hamnar inom angivet intervall
 är FAMamplifieringen positiv.

 Om Green kanalens (FAM) C_T för provet hamnar ovanför angivet intervall eller om amplifiering saknas är FAM-amplifieringen negativ.

Beräkna ∆C⊤-värdet för varje EGFR-mutationsdetektionsrör med positiv FAM-amplifiering enligt nedan, för att garantera att mutations- och kontroll-C⊤-värdena kommer från samma prov. (Se tabell 7 för rörlayouten.)

 $\Delta C_{T} = [mutations analysens \ C_{T} - v \ddot{a} r de] - [kontrollanalysens \ C_{T} - v \ddot{a} r de]$

Jämför ΔC_T -värdet för provet med ΔC_T -cutoff-intervallet för den aktuella analysen (Tabell 17). Säkerställ att korrekt ΔC_T -cutoff-intervall tillämpas.

Den övre punkten för ΔC_T -cutoff-intervallet är den punkt ovanför vilken en positiv signal för en analys eventuellt kan bero på bakgrundssignal för ARMS-primern i vildtyps-DNA. Om provets ΔC_T -värde är högre än ΔC_T -cutoff-intervallet för en analys klassas provet som negativt eller som liggande utanför kitets detektionsgräns för den analysen. Om provvärdet ligger under den nedre gränsen för ΔC_T -cutoff-intervallet kan detta potentiellt bero på en fluorescensartefakt.

Varje mutationsreaktion för alla prover kommer att ha en av följande statusar:

- Mutation detekterad
- Mutation inte detekterad
- Ogiltig

Mutation detekterad

FAM-amplifieringen (Green kanal) är positiv och ΔC_T -värdet ligger inom ΔC_T -cutoff-intervallet. Om flera mutationer detekteras för ett prov kan alla rapporteras.

Mutation inte detekterad

FAM-amplifieringen (Green kanal) är positiv och ΔC_T -värdet ligger över ΔC_T -cutoff-intervallet.

FAM-amplifieringen (Green kanal) är negativ och HEX-amplifieringen (Yellow kanal, internkontroll) är positiv.

Ogiltig

HEX-amplifieringen (Yellow kanal, internkontroll) är ogiltig.

FAM-amplifieringen (Green kanal) är negativ och HEX-amplifieringen (Yellow kanal, internkontroll) är negativ.

Obs! Ett prov kan visa negativ HEX-amplifiering (Yellow kanal) i ett rör, och positiv FAM-amplifiering (Green kanal) i ett annat rör. I det fallet kan resultatet "mutation detected" [mutation detekterad] i det andra röret betraktas som giltigt, men den särskilda mutation som identifierats kanske inte är den enda möjliga mutationen i provet.

Det beräknade ΔC_T -värdet ligger under ΔC_T -cutoff-intervallet och HEX-amplifieringen (Yellow kanal, intern kontroll) ligger inom det förväntade intervallet.

Bilaga B: Installation av *therascreen* EGFR CE Assay Package

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är avsett för användning med instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM med en rotor med 72 brunnar. *therascreen* EGFR CE Assay Package finns tillgängligt för nedladdning på produktwebbsidan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit på www.qiagen.com. Navigera till Product Resources [Produktresurser] > Supplementary Protocols [Tilläggsprotokoll] om du vill ladda ner analyspaketet. I analyspaketet ingår "*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" och "*therascreen* EGFR CE Locked Template".

Obs! *therascreen* EGFR CE Assay Package är endast kompatibelt med programmet Rotor-Gene Q, version 2.3.5 eller senare. Se till att rätt version av programmet Rotor-Gene Q är installerat innan du fortsätter med installationen av *therascreen* EGFR CE Assay Package. Om ditt Rotor-Gene Q MDx-instrument levererades med en tidigare programversion kan du uppgradera genom att ladda ned version 2.3.5 eller senare av programmet Rotor-Gene Q från produktsidan för Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (i avsnittet "Product Resources" [Produktresurser] under "Operating Software" [Operativ programvara] på www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources).

Procedur

 Ladda ner therascreen EGFR CE Assay Package från www.qiagen.com och överför det till en virusfri USB-lagringsenhet.

Obs! Analyspaketet är tillgängligt på produktwebbsidan för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit Version 2. Gå till Product Resources [Produktresurser] > Supplementary Protocols [Tilläggsprotokoll] om du vill ladda ner analyspaketet.

- 2. Sätt in USB-lagringsenheten i den dator som är ansluten till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet.
- 3. Lokalisera therascreen EGFR CE Assay Package-filen.

- 4. Högerklicka på *therascreen* EGFR CE Assay Package, välj sedan Extract all [Extrahera alla] för att packa upp filen.
- 5. Dubbelklicka på therascreen_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.6.exe för att starta installationen.

Du kan också leta upp och starta filen i filhanteraren på den anslutna datorn.

Installationsguiden till therascreen EGFR CE Assay Package öppnas.

6. Klicka på Next [nästa] för att fortsätta (Figur 41).



Figur 41. Dialogrutan "Setup Wizard" [Installationsguiden] (1 = "Next" [Nästa]).

7. Läs licensavtalet i dialogrutan och godkänn avtalet genom att markera "I accept the agreement" [Jag godkänner avtalet]. Klicka på Next [Nästa] för att fortsätta (Figur 42). Installationen startar automatiskt.

Please read the following important i	information before continuing.
Please read the following License A	greement. You must accept the terms of this
Licence Agreement 1. In the following "Qiagen" refers t "Software" means the programs an ROM) or over the Internet with these this agreement or have any questio support@qiagen.com.) The Softwa been developed entirely at private to "commercial computer software".	to Glagen GmbH and its affiliated companies and d data supplied on this physical medium (eg. CD- se conditions. (f you are unsure of any aspect of ns they should be emailed to re and any accompanying documentation have expense. They are delivered and licensed as
2. Licence	-
I accent the agreement	

Figur 42. Dialogrutan "License Agreement" [Licensavtal]. 1 = "I accept the agreement" [Jag godkänner avtalet], 2 = "Next" [Nästa].

8. Efter att installationen slutförts klickar du på Finish [Avsluta] i den slutliga Setup [installationsguidens] dialogruta (Figur 43).



Figur 43. Slutföra installationsguiden (1 = "Finish" [Slutför]).

9. Starta om datorn.

Genvägar till både *"therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template" [therascreen EGFR CE kontrollkörning låst mall] och *"therascreen* EGFR CE Locked Template" [therascreen EGFR CE låst mall] skapas automatiskt på skrivbordet (Figur 44).



therascreen EGFR CE Control Run Locked Template



therascreen EGFR CE Locked Template

Figur 44. Ikonerna EGFR CE Control Run Locked Template [EGFR CE kontrollkörning låst mall] och EGFR CE Locked Template [EGFR CE låst mall].

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800-22-44-6000 eller kontakta någon av QIAGEN:s tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat. nr,
therascreen EGFR RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: Kontrollanalys, 7 mutationsanalyser, positiv kontroll, <i>Taq</i> DNA-polymeras, vatten för NTC och vatten för spädning av prov	874111
therascreen EGFR Assay Package	Programprotokollpaket för användning med <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit och QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrumentet	Nedladdning
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA förberedelser: QIAamp MinElute [®] -kolumner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 beredningar: 50 QIAamp MinElute-kolumner, proteinas K, buffertar och Collection Tubes (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	och tillbehör	
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cykler och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033

Produkt	Innehåll	Kat. nr,
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cykler och analysator med högupplösningssmältning och 5 kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör: inkluderar 1 års garanti på reservdelar och arbete, men installation och utbildning ingår inte	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminiumblock för manuell reaktionsinställning med en enkanals-pipett i 72 x 0,1 ml rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör och lock för 10 000 reaktioner	981106

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska support eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

Datum	Ändringar
R5, januari 2019	Tillägg av auktoriserad representant (framsida).
	Uppdaterade avsnittet "Symboler".
R6, oktober 2019	Ändring av juridisk tillverkare (framsida)
	Anpassning av instrumentets namn från Rotor-Gene Q MDx till Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM för att stämma med instrumentetiketten
	Lade till förhållande för förvaring av reagens i avsnittet Förvaring och hantering av reagenser
	Uppdaterade tabell 1 och lade till en anteckning om borttagning av COSM6254 från COSMIC-databasen
	Uppdaterade avsnittet Begränsningar med information om exon 19- borttagningsanalysen och L858R-analysen
	Tog bort EC + REP-symbolen från omslagssidan och avsnittet Symboler
R7, juni 2020	Uppdaterade versionsnumret för EGFR Assay Package från 3.0.5 till 3.0.6
	Uppdaterade referenserna till RGQ-programversion från 2.3 till 2.3.5 eller senare
	Uppdaterade tabell 9 och 17 för att implementera de nya cutoff-intervallen och justerade alla relevanta beskrivningar i handboken i enlighet med detta
	Uppdaterade alla Protokoll-kapitel för att inkludera information om vikten av blandning i avsnitten Viktigt att tänka på före start, markerade blandningsinformationen för alla blandningssteg, lade till blandningssteg där sådana krävdes
	Lade till flaggan MUTATION_EARLY_CT flag in tabell 8
	Tog bort alla referenser till CD och ersatte dessa med nedladdningsinformation

Avtal om begränsad licens för therascreen EGFR RGQ PCR Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

- Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i panelen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i denna panel med komponenter som inte ingår i denna panel förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
- 2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna panel och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
- 3. Panelen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
- 4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
- 5. Köparen och användaren av panelen godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIACEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.giagen.com.

Varumärken: QIAGEN[®], Sample to Insigh[®], QIAamp[®], MinElute[®], Rotor-Gene[®], Scorpions[®], therascreen[®] (QIAGEN-gruppen); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GIOTRIF[®] (Behringer Ingelheim), IRESSA[®] (AstraZeneccygruppen). Registrerade namn, varumärken med mera som används i det här dokumentet ska inte anses som askyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

therascreen EGFR RGQ PCR Kit är en CE-märkt diagnosutrustning som uppfyller kraven i Europaparlamentets och Rådets direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik. Ej tillgängligt i alla länder.

1121935 06-2020 HB-1909-007 © 2020 QIAGEN, med ensamrätt.
Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com