

Håndbok for *therascreen*[®] EGFR RGQ PCR-settet

Versjon 1

Σ 24

IVD

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Til bruk sammen med Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM-instrumentet



REF 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

R4 **MAT** 1063321NO



QIAGEN prøve- og analyseteknologier

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi og gjør det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og tjenester sikrer suksess fra prøve til resultat.

QIAGEN setter standardene innen:

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Målet er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Se www.qiagen.com for mer informasjon.

Innhold

Tiltenkt bruk	5
Sammendrag og forklaring	5
Prosedyreprinsipper	6
Materialer som medfølger	9
Settets innhold	9
Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger	10
Advarsler og forholdsregler	11
Sikkerhetsinformasjon	11
Generelle forholdsregler	11
Oppbevaring og håndtering av reagenser	12
Oppbevaring og håndtering av prøver	13
Prosedyre	13
Bestemmelse av nivå på tumorceller som er påkrevd for EGFR-analyse	13
Isolering av DNA	14
Protokoller	
■ Prøvevurdering	15
■ Deteksjon av EGFR-mutasjoner	18
■ Rotor-Gene Q EGFR-oppsett	21
Tolkning av resultater	30
Dataanalyse av prøvevurdering	30
Analyse av EGFR-mutasjonsdata	33
Feilsøkingeveiledning	44
Kvalitetskontroll	45
Begrensninger	45
Ytelseskarakteristikker	46
Cut-off-verdier	46
Deteksjonsgrense (LOD)	46
Presisjon	47
Reproduserbarhet	47
Effekt av input DNA-konsentrasjon	47
Interfererende substanser	48

Referanser	48
Symboler	49
Kontaktinformasjon	49
Vedlegg: Mutasjonsdetaljer	50
Bestillingsinformasjon	52

Tiltenkt bruk

therascreen EGFR RGQ PCR-settet er en test til bruk i in vitro-diagnostikk til påvisning av 29 somatiske mutasjoner i det kreftrelaterte genet EGFR, og gir kvalitativ vurdering av mutasjonsstatus.

therascreen EGFR RGQ PCR-settet skal brukes av øvet personale i et profesjonelt laboratoriemiljø med DNA-prøver ekstrahert fra formalinfiksert parafinlagret vev fra ikke-småcellet lungekreft (NSCLC). Resultatene skal hjelpe legen å identifisere pasienter med NSCLC som kan ha utbytte av behandling med tyrosinkinasehemmere.

therascreen EGFR RGQ PCR-settet er beregnet på bruk i in vitro-diagnostikk.

Sammendrag og forklaring

therascreen EGFR RGQ PCR-settet er klart til bruk til deteksjon av 29 somatiske mutasjoner i det kreftrelaterte genet EGFR ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR) i Rotor-Gene Q-instrumentet.

Ved hjelp av Scorpions[®]- og ARMS[®]-teknologier gjør *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet det mulig å detektere følgende mutasjoner mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA.

- 19 delesjoner i ekson 19 (detekterer tilstedeværelsen av 19 delesjoner, men skiller ikke mellom dem)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (detekterer tilstedeværelse av G719S, G719A eller G719C, men skiller ikke mellom dem)
- S768I
- 3 insersjoner i ekson 20 (detekterer tilstedeværelsen av 3 insersjoner, men skiller ikke mellom dem)

Metodene i dette settet er svært selektive, og avhengig av total mengde DNA som er til stede, kan en lav prosent mutant detekteres mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA. Disse selektivitets- og deteksjonsgrensene er bedre enn teknologier som f.eks. fluoroforterminatorsekvensering.

Prosedyreprinsipper

therascreen EGFR RGQ PCR-settet benytter to teknologier — ARMS og Scorpions — til påvisning av mutasjoner i PCR i sanntid.

ARMS

Allel- eller mutasjonsspesifikk amplifikasjon oppnås ved bruk av ARMS (Amplification Refractory Mutation System). *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) er effektiv til å skille mellom en match og en mismatch ved 3'-enden av en PCR-primer. Spesifikt muterte sekvenser kan også amplifiseres selektivt, også i prøver der hoveddelen av sekvensene ikke bærer mutasjonen. Når primeren har full match, utføres amplifikasjonen med full effektivitet. Når 3'-basen mismatcher, oppstår kun et lavt nivå bakgrunnsamplifikasjon.

Scorpions

Deteksjon av amplifikasjon utføres med Scorpions. Scorpions er bifunksjonelle molekyler som inneholder en PCR-primer kovalent bundet til en probe. Fluoroforen i denne proben interagerer med en slukker som også er innlemmet i proben, og som reduserer fluorescens. Under polymerasekjedereaksjonen separeres fluoroforen og slukkeren når proben bindes til amplikonet. Dette fører til en økning i fluorescens fra reaksjonsrøret.

Settformat

Åtte analyser leveres med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet:

- Én kontrollanalyse (Ctrl)
- Syv mutasjonsanalyser

Alle reaksjonsblandinger inneholder reagenser for å oppdage mål som er merket med FAM™, og en intern kontrollanalyse som er merket med HEX™. Disse internkontrollanalysene kan påvise tilstedeværelse av hemmere som kan føre til falske negative resultater. FAM-amplifisering kan utkonkurrere den interne kontrollamplifiseringen, og formålet med internkontroll er helt enkelt å vise at i tilfeller der det ikke forekommer FAM-amplifisering er dette et sant negativt resultat og ikke en mislykket PCR-reaksjon.

Prosedyre

therascreen EGFR RGQ PCR-settet omfatter en prosedyre på to trinn. I det første trinnet blir kontrollanalysen utført for å bestemme den totale mengden DNA i en prøve. I det andre trinnet blir både mutasjons- og kontrollanalyser utført for å fastslå om mutert DNA er til stede eller ikke.

Analyser:

Kontrollanalyse

Kontrollanalysen merket med FAM brukes til å bestemme den totale mengden DNA i en prøve. Denne analysen amplifiserer et område av ekson 2 på EGFR-genet. Primeren og proben er utformet for å unngå kjente EGFR-polymorfismer.

Vi anbefaler på det sterkeste å bruke kontrollreaksjonsblandingen (Ctrl) som leveres med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet til bestemmelse av den totale mengden DNA i en prøve. Denne kontrollanalysen amplifiserer et område av ekson 2 på EGFR-genet. Vi anbefaler at det settes opp prøver der kontrollanalysen bruker EGFR positiv kontroll (PC) som positiv kontroll og nukleasefritt vann (H₂O) som ikke-templatkontroll.

Merk: DNA-vurderinger må baseres på polymerasekjedereaksjon (PCR) og kan variere fra kvantifisering basert på absorbansavlesninger. Ekstra kontrollreaksjonsblanding (Ctrl) følger med for å muliggjøre vurdering av kvaliteten og mengden av DNA i prøvene før analyse med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet.

Mutasjonsanalyser

Hver mutasjonsanalyse inneholder en FAM-merket Scorpion-probe og en ARMS-primer for å skille mellom villtype-DNA og spesifikt mutant DNA.

Kontroller

Merk: Alle forsøksanalyseringer må inneholde følgende kontroller.

Positiv kontroll

Hver analyseserie må inneholde en positiv kontroll i rør 1–8. *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet inneholder EGFR positiv kontroll (PC) som skal brukes som templat i reaksjonen for positiv kontroll. Resultatene for positiv kontroll vil bli vurdert for å sikre at settet fungerer i henhold til angitte akseptkriterier.

Negativ kontroll

Hver analyseserie må inneholde en negativ kontroll ("ikke-templatkontroll", NTC) i rør 9–16. NTC består av nukleasefritt vann (H₂O) som skal brukes som "templat" for ikke-templatkontrollen. Ikke-templatkontrollen brukes for å vurdere potensiell kontaminering i løpet av analyseringen, og for å vurdere ytelsen til internkontrollreaksjonen.

Vurdering av internkontrollreaksjon

Hver reaksjonsblanding inneholder en intern kontroll i tillegg til målreaksjonen. Hvis det oppstår feil, kan dette innebære at det enten finnes hemmere som kan føre til falske negative resultater, eller at det har oppstått en operatørfeil i oppsettet for det aktuelle røret.

Hvis det oppstår feil ved bruk av intern kontroll pga. PCR-hemming, kan en fortynning av prøven redusere effekten av hemmerne, men det er viktig å merke seg at dette også vil fortynne mål-DNA-et. FAM-amplifisering kan utkonkurrere intern kontrollamplifisering slik at IC C_T (HEX)-verdien som genereres kan falle utenfor det spesifiserte området. FAM-resultatene er fremdeles gyldige for disse prøvene.

Materialer som medfølger

Settets innhold

<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR-settet			(24)
Katalognr.			870111
Antall reaksjoner			24
Rød	Control Reaction Mix (Kontrollreaksjonsblanding)	Ctrl	2 x 600 µl
Lilla	T790M Reaction Mix (T790M reaksjonsblanding)	T790M	600 µl
Oransje	Deletions Reaction Mix (Delesjonreaksjonsblanding)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R reaksjonsblanding)	L858R	600 µl
Grønn	L861Q Reaction Mix (L861Q reaksjonsblanding)	L861Q	600 µl
Gul	G719X Reaction Mix (G719X reaksjonsblanding)	G719X	600 µl
Grå	S768I Reaction Mix (S768I reaksjonsblanding)	S768I	600 µl
Blå	Insertions Reaction Mix (Innersjonsreaksjonsblanding)	Ins	600 µl
Brun	EGFR Positive Control (EGFR positiv kontroll)	PC	300 µl
Turkis	Taq DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA-polymerase)	<i>Taq</i>	138 µl
Hvit	Nuclease-Free Water (Nukleasefritt vann)	H ₂ O	2 x 1,9 ml
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Handbook (engelsk håndbok)			1

Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

- DNA-isoleringssett (se "Isolering av DNA" på side 14)
- Xylen
- Etanol (96–100 %)*
- 1,5 ml eller 2 ml mikrosentrifugerør (for lyseringstrinn)
- 1,5 ml mikrosentrifugerør (for fortynningstrinn) (tilgjengelig fra Brinkmann [Safe-Lock, kat.nr. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat.nr. 0030 120.086] eller Sarstedt [Safety Cap, kat.nr. 72.690])[†]
- Tilpassede pipetter (justerbare) til prøveklargjøring[‡]
- Tilpassede pipetter[‡] (justerbare) til klargjøring av PCR Master Mix
- Tilpassede pipetter[‡] (justerbare) for pipettering av DNA-templat*
- DNase-, RNase- og DNA-frie pipettespisser med filtre (vi anbefaler pipettespisser med aerosolbarriere for å unngå krysskontaminering)
- Termomikser, oppvarmet orbitalinkubator, varmeblokk eller vannbad egnet til inkubering ved 90 °C[†]
- Bordsentrifuge[‡] med rotor for 2 ml reaksjonsrør
- Vorteksmikser
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument[§] med fluorescenskanaler for Cycling Green og Cycling Yellow (henholdsvis påvisning av FAM og HEX)
- Rotor-Gene Q-programvare, versjon 2.0.2 eller nyere
- Remser med mikrorør og korker, 0,1 ml, til bruk sammen med 72-brønners rotor (kat.nr. 981103 eller 981106)
- DNase, RNase og DNA-frie mikrosentrifugerør til fremstilling av Master Mix
- Lasteblokk for 72 x 0,1 ml rør, aluminumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med en pipette med enkeltkanal (QIAGEN, kat.nr. 9018901)

* Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

[†] Dette er ikke en fullstendig liste over leverandører.

[‡] Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

[§] Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumentet, hvis aktuelt.
Også kjent som Rotor-Gene Q MDx i enkelte land.

Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) dersom du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

24-timers direktelinje

Medisinsk informasjon om kjemiske stoffer eller assistanse ved ulykker er tilgjengelig 24 timer i døgnet fra:

CHEMTREC

USA og Canada ■ Tlf.: 1-800-424-9300

Utenfor USA og Canada ■ Tlf.: +1-703-527-3887 (noteringsoverføring aksepteres)

Generelle forholdsregler

Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Bruk DNase-, RNase- og DNA-frie pipettespisser med filter, og pass på at pipettene er kalibrert i henhold til produsentens anvisninger.
- Positivt materiell (prøver og positive kontroller) skal oppbevares og ekstraheres separat i forhold til alle andre reagenser og tilsettes reaksjonsblandingen i et eget avgrenset område.
- Alle komponenter tines grundig opp ved romtemperatur (15–25 °C) før analysering.
- Når komponentene er tint, kan de blandes (ved å snu hvert rør 10 ganger) og sentrifugeres en kort stund.

Merk: Vær svært forsiktig med tanke på å forhindre kontaminering av polymerasekjedereaksjoner med syntetisk kontrollmateriale. Vi anbefaler at du bruker egne, tilpassede pipetter til å klargjøre reaksjonsblandinger og tilsette DNA-templat. Klargjøringen og pipetteringen av reaksjonsblandinger må utføres i et annet område enn der templat tilsettes. Rotor-Gene Q-rør må ikke åpnes etter at PCR-analyseringen er fullført. Dette for å forhindre laboratoriekontaminering med materiale etter PCR-analysen.

Merk: Reagensene valideres for manuelt oppsett. Dersom en automatisert metode brukes, kan det redusere antallet mulige reaksjoner grunnet reagens som er påkrevd for å fylle "dødvolum" på disse instrumentene.

Merk: Alle reagenser i *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet settes sammen spesifikt til bruk sammen med de bestemte testene. Alle reagenser som følger med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet skal bare brukes med de andre reagensene i det samme *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet. Reagensene i settet må ikke erstattes med andre produkter dersom optimal ytelse skal opprettholdes.

Merk: Kun *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) vedlagt i settet skal benyttes. Ikke erstatt med *Taq* DNA-polymerase fra andre sett av samme eller annen type, eller med *Taq* DNA-polymerase fra en annen leverandør.

Merk: Reagenser for *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet er optimalt fortynnet. Videre fortynninger av reagenser anbefales ikke, da dette vil påvirke ytelsen negativt. Det er ikke anbefalt å bruke mindre enn 25 µl reaksjonsvolum, da dette vil øke risikoen for falske negative resultater.

Oppbevaring og håndtering av reagenser

Innholdet i *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet sendes på tørris og må fortsatt være frosset ved ankomst. Dersom innholdet i *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet ikke er frosset ved ankomst, hvis den ytre pakningen er åpnet under frakt, hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkseddel, brukerhåndbok eller reagenser, må du kontakte QIAGENs tekniske tjeneste i ditt land eller den lokale distributøren (se baksiden eller www.qiagen.com).

therascreen EGFR RGQ PCR-settet må lagres umiddelbart etter mottak ved –15 °C til –25 °C i en mørk fryser med konstant temperatur. Settet er stabilt frem til utløpsdatoen når det oppbevares under anbefalte oppbevaringsbetingelser i originalemballasjen. Gjentatt frysing og tining bør unngås. Vi anbefaler maksimalt 7 fryse/tine-sykluser.

Merk: Scorpions (dette gjelder alle fluorescensmerkede molekyler) må beskyttes mot lys for å unngå fotobleking og for å sikre optimal aktivitet og ytelse.

Merk: Prøvene må samles for å oppnå optimal bruk av reagensene i *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet. Hvis prøver testes individuelt, vil flere reagenser bli brukt, og antall prøver som kan testes med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet, vil bli redusert.

Oppbevaring og håndtering av prøver

Merk: Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

Prøvematerialet må være humant genomisk DNA, ekstrahert fra formalinfikserte parafinlagrede (FFPE) tumorprøver av ikke-småcellet lungekreft. Prøvene må transporteres i henhold til standard patologimetodologi for å sikre prøvekvalitet.

Tumorprøver er ikke-homogene, og data fra en tumorprøve stemmer kanskje ikke overens med andre snitt fra samme tumor. Tumorprøver kan også inneholde vev som ikke stammer fra tumoren. DNA fra vev som ikke stammer fra tumoren, antas å ikke inneholde EGFR-mutasjoner detektert med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet.

Prosedyre

Bestemmelse av nivå på tumorceller som er påkrevd for EGFR-analyse

Vev som brukes til EGFR-analyse er formalinfiksert parafinlagret (FFPE) vev fra ikke-småcellet lungekreft (NSCLC). DNA ekstrahert fra celler i dette vevet som stammer fra tumoren kan være villtype i forhold til EGFR-mutasjoner eller det kan inneholde én eller flere mutasjoner.

FFPE NSCLC-vevet brukt til ekstraheringen kan også inneholde normalt vev som ikke stammer fra tumoren, som er villtype i forhold til EGFR-mutasjoner.

Villtype-DNA fra dette vevet kan fortynne mutant DNA, potensielt til et nivå der det ikke lenger kan påvises av settet. Det anbefales imidlertid at til og med prøver med lave tumornivåer testes, da det er et potensiale for at mutasjoner med høyt nivå kan påvises og at en behandlingsavgjørelse kan foretas for pasienten.

For å maksimere sjansene for påvisning av mutasjoner gå frem på følgende måte:

- Hematoksylin og eosin (H og E) farger minst ett objektglass fra hver pasientprøve.
- Sørg for at en patolog kontrollerer det fargede objektglasset for tumor.
- Dersom det er mulig bør patologen kontrollere flere objektglass fra hele FFPE-snittet.
- Alle prøver med påvist tumor kan testes med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet.

Isolering av DNA

DNA-isolering må utføres med QIAamp[®] DNA FFPE-vevssettet.

DNA-rensingen må utføres i henhold til instruksjonene angitt i håndboken for QIAamp DNA FFPE Tissue-settet (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) med følgende endringer.

- FFPE-snitt må legges på glassplater.
- Overflødig parafin må skrapes vekk rundt vevssnitt med en ny, steril skalpell.
- Skrap vevssnitt inn i mikrosentrifugerør ved hjelp av en ny skalpell for hver prøve som skal ekstraheres.
- Proteinase K-nedbrytning bør pågå i 1 time.
- Renset genomisk DNA skal elueres i 200 µl ATE-buffer (følger med QIAamp DNA FFPE-vevssettet).
- Genomisk DNA skal oppbevares ved –15 °C til –30 °C.
- Objektglass med tilgrensende prøvemateriale til objektglasset med det hematoksylin- og eosinfargede materialet med mest tumorinnhold bør brukes i tilfeller der informasjon er tilgjengelig.

Merk: Alle analyser i *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet genererer korte PCR-produkter. *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet vil imidlertid ikke virke på kraftig fragmentert DNA.

Protokoll: Prøvevurdering

Denne protokollen brukes for å vurdere totalt amplifiserbart DNA i prøver.

Viktige poeng før du starter

- Les "Generelle forholdsregler" på side 11 før du starter prosedyren.
- Ta deg god tid til å bli kjent med Rotor-Gene Q før du starter protokollen. Les instrumentets bruksanvisning.
- Ikke vorteks *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) eller andre blandinger som inneholder *Taq* DNA-polymerase (*Taq*), da dette kan forårsake inaktivering av enzymet.
- Pipetter *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) ved å plassere pipettespissen rett under væskeoverflaten for å unngå at spissen dekkes av overskytende enzym.

Dette må du gjøre før du starter:

- Før bruk må alle reagenser tines helt i romtemperatur (15–25 °C), blandes ved å snu rørene 10 ganger, og sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.
- Vent til *Taq* DNA-polymerasen (*Taq*) oppnår romtemperatur (15–25 °C) før hver bruk. Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet nederst i røret.

Prosedyre

1. **Tin kontrollreaksjonsblandingen (Ctrl), nukleasefritt vann for ikke-templatkontroll (NTC) og EGFR positiv kontroll (PC) ved romtemperatur (15–25 °C). Når reagensene er tint, skal de blandes ved å vende hvert rør 10 ganger for å unngå lokale konsentrasjoner av salter. Sentrifuger deretter rørene en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.**
2. **Klargjør tilstrekkelig mengde Master Mix for DNA-prøvene, en positiv kontrollreaksjon og en ikke-templatkontrollreaksjon i samsvar med volumene i Tabell 1. Inkluder reagenser for 1 prøve, slik at det vil være nok til PCR-oppsettet.**

Master Mix inneholder alle komponentene som er nødvendige for PCR, unntatt prøven.

Tabell 1. Klargjøring av Master Mix* for kontrollanalyse

Komponent	Volum/reaksjon (µl)
Kontrollreaksjonsblanding (Ctrl)	19,5
Taq DNA-polymerase (Taq)	0,5
Totalt volum	20,0

* Når Master Mix skal klargjøres, må du klargjøre nok til én ekstra prøve.

- 3. Bland Master Mix grundig (ved å pipettere forsiktig opp og ned 10 ganger). Tilsett 20 µl Master Mix umiddelbart til PCR-røret (følger ikke med).**

Merk: Ved prøvevurdering bør Master Mix for kontrollanalyse tilsettes i én positiv kontrollbrønn, én negativ kontrollbrønn og én brønn for hver prøve.

- 4. Tilsett umiddelbart 5 µl prøve av nukleasefritt vann (H₂O) til ikke-templatkontrollrøret (PCR-rør nr. 9), og sett lokk på røret. Tilsett 5 µl av prøve-DNA til prøverørene, og sett lokk på rørene. Tilsett 5 µl EGFR positiv kontroll (PC) til det positive kontrollrøret (PCR-rør 1), og sett lokk på røret.**
- 5. Plasser PCR-rør i riktige posisjoner i rotoren og kontroller visuelt at alle rørene inneholder likt volum.**

Merk: Forsikre deg om at rørremmene ikke har omvendt rekkefølge når du overfører dem til rotoren.
- 6. Dersom rotoren ikke er full, fyll gjenværende ledige plasser med tomme rør med påsatt lokk.**
- 7. Sett umiddelbart rotoren med 72 brønner inn i Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumentet. Se til at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) er plassert øverst på rotoren for å sikre rørene under analyseringen.**
- 8. Henvis til instrumentoppsettet for Rotor-Gene Q (se "Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett", side 21) for å opprette en temperaturprofil og begynne analysen.**

Tabell 2. Syklusparametere

Sykluser	Temperatur	Klokkeslett	Dataavlesning
1	95 °C	15 minutter	Ingen
40	95 °C	30 sekunder	Ingen
	60 °C	60 sekunder	Grønn og gul

9. Når analyseserien er fullført, kan dataene analyseres i henhold til "Dataanalyse av prøvevurdering" på side 30.

Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner

Denne protokollen gjelder deteksjon av EGFR-mutasjoner. Så snart en prøve har bestått prøvevurderingen, kan den testes med EGFR-mutasjonsanalyse.

Viktige poeng før du starter

- Les "Generelle forholdsregler" på side 11 før du starter prosedyren.
- Ta deg god tid til å bli kjent med Rotor-Gene Q før du starter protokollen. Les instrumentets bruksanvisning.
- Ikke vorteks *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) eller andre blandinger som inneholder *Taq* DNA-polymerase, da dette kan forårsake inaktivering av enzymet.
- For å få en effektiv bruk av *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet, må prøvene deles inn i batcher på 7 for å fylle 72-brønnersrotoren. Mindre batch-størrelser innebærer at færre prøver kan testes med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet.
- Pipetter *Taq* ved å plassere pipettespissen rett under væskeoverflaten for å unngå at spissen dekkes av overskytende enzym.
- For hver DNA-prøve må kontroll og mutasjonsanalyser analyseres i samme PCR-serie for å unngå variasjoner i de ulike analyseseriene.

Dette må du gjøre før du starter:

- Før bruk må alle reagenser tines helt i romtemperatur (15–25 °C), blandes ved å snu rørene 10 ganger, og sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.
- Se til at *Taq* holder romtemperatur (15–25 °C) før hver bruk. Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet nederst i røret.

Prosedyre

1. **Tin kontrollreaksjonsblandingen (Ctrl), nukleasefritt vann for ikke-templatkontroll (NTC) og EGFR positiv kontroll (PC) ved romtemperatur (15–25 °C). Når reagensene er tint, skal de blandes ved å vende hvert rør 10 ganger for å unngå lokale konsentrasjoner av salter. Sentrifuger deretter rørene en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.**

2. **Klargjør tilstrekkelig mengde Master Mix for DNA-prøvene, en positiv kontrollreaksjon og en ikke-templatkontrollreaksjon i samsvar med volumene i Tabell 3. Inkluder reagenser for 1 prøve, slik at det vil være nok til PCR-oppsettet.**

Master Mix inneholder alle komponentene som er nødvendige for PCR, unntatt prøven.

Tabell 3. Klargjøring av Master Mix*

Komponent	Volum/reaksjon (µl)
Reaksjonsblanding	19,5
Taq DNA-polymerase (Taq)	0,5
Totalt volum	20,0

* Når Master Mix skal klargjøres, må du klargjøre nok til én ekstra prøve.

3. **Bland hver Master Mix grundig (ved å pipettere forsiktig opp og ned 10 ganger). Tilsett 20 µl Master Mix umiddelbart til hvert PCR-rør (følger ikke med).**
4. **Tilsett 5 µl nukleasefritt vann (H₂O) umiddelbart til ikke-templatkontrollens PCR-rør (PCR-rør nr. 9–16), og sett lokk på rørene. Tilsett 5 µl av hver prøve til prøverørene (PCR-rør 17–72), og sett lokk på rørene. Tilsett 5 µl EGFR positiv kontroll (PC) til de positive kontrollrørene (PCR-rør nr. 1–8). Hver DNA-prøve må kontrolleres med både kontrollen og alle mutasjonsanalysene. Dette oppsettet er vist i Tabell 4.**

Tabell 4. Oppsett for kontroll- og mutasjonsanalyser

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

5. Plasser PCR-rør i riktige posisjoner i rotoren og kontroller visuelt at alle rørene inneholder likt volum.
Merk: Forsikre deg om at rørremmene ikke har omvendt rekkefølge når du overfører dem til rotoren.
6. Dersom rotoren ikke er full, fyll gjenværende ledige plasser med tomme rør med påsatt lokk.
7. Sett umiddelbart rotoren inn i Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumentet. Se til at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) er plassert øverst på rotoren for å sikre rørene under analyseringen.
8. Henvis til instrumentoppsettet for Rotor-Gene Q (se "Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett", side 21) for å opprette en temperaturprofil og begynne analysen.

Tabell 5. Syklusparametere

Sykluser	Temperatur	Klokkeslett	Dataavlesning
1	95°C	15 minutter	Ingen
40	95°C	30 sekunder	Ingen
	60°C	60 sekunder	Grønn og gul

9. Når analyseserien er fullført, kan dataene analyseres i henhold til "Analyse av EGFR-mutasjonsdata" på side 33.■

Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-oppsett

Du finner denne protokollen under "Protokoll: Prøvevurdering" (side 15) og "Protokoll: Deteksjon av EGFR-mutasjoner" (side 18).

Prosedyre

1. Opprett en temperaturprofil i henhold til følgende trinn:

Innstilling av generelle analyseparametere	Figur 1–3
Innledende aktivering av hot-start-enzymet	Figur 4
Amplifikasjon av DNA	Figur 5–7
Justering av fluorescenskanaler	Figur 8–12
Analysstart	Figur 13

Oppsummert er syklusparameterne som følger:

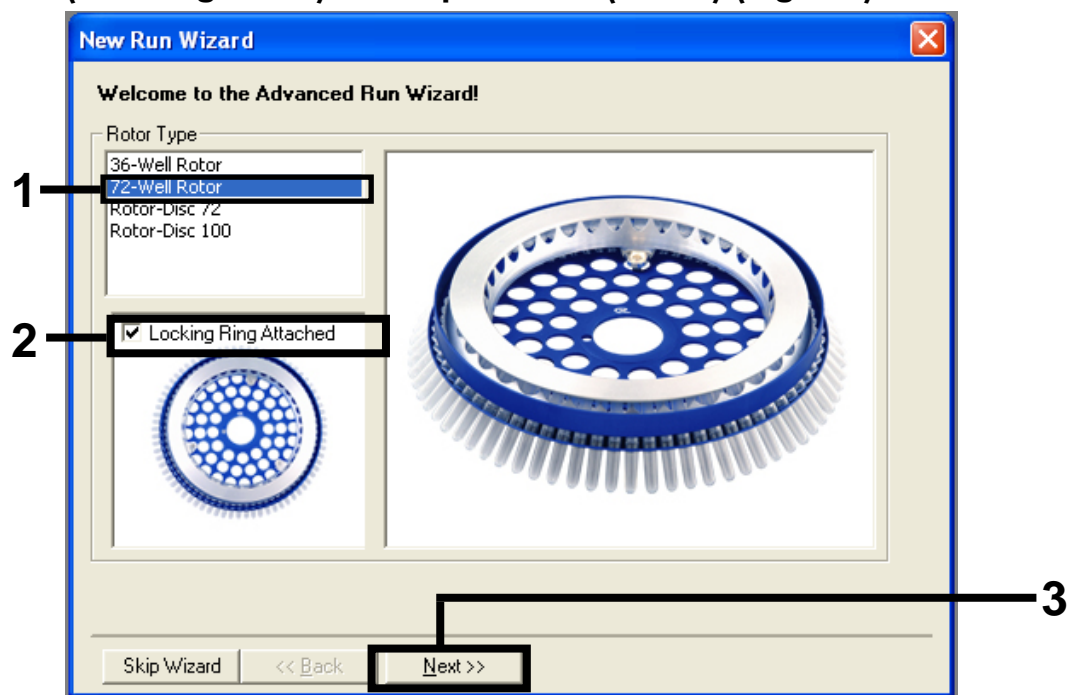
Tabell 6. Syklusparametere

Sykluser	Temperatur	Klokkeslett	Dataavlesning
1	95 °C	15 minutter	Ingen
40	95 °C	30 sekunder	Ingen
	60 °C	60 sekunder	Grønn og gul

Alle spesifikasjoner henviser til Rotor-Gene Q, programvareversjon 2.0.2. Du finner mer informasjon om programmering av Rotor-Gene Q-instrumenter i instrumentets bruksanvisning. På illustrasjonene har disse innstillingene en uthevet svart ramme rundt.

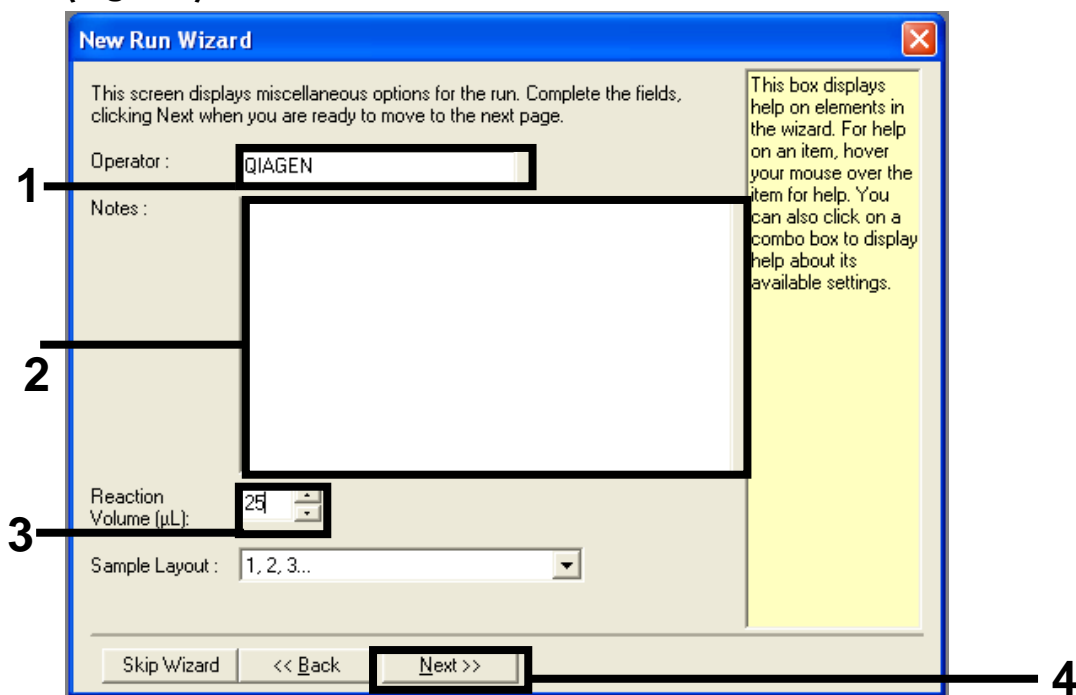
- Dobbelklikk på programvareikonet til Rotor-Gene Q-seriens programvareversjon 2.0.2 på skrivebordet til datamaskinen som er tilkoblet Rotor-Gene Q 5plex HRM -instrumentet. Velg fanen "Advanced" (Avansert) i dialogboksen "New Run" (Ny analyse) som vises.**
- Opprett et nytt templat ved å velge "Empty Run" (Nullstill analyse), og klikk deretter på "New" (Ny) for å gå inn i "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse).**

4. Velg **72-Well Rotor** (72 brønners rotor) som rotortype. Kontroller at låseringen er festet, og merk av i boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet). Klikk på "Next" (Neste) (Figur 1).



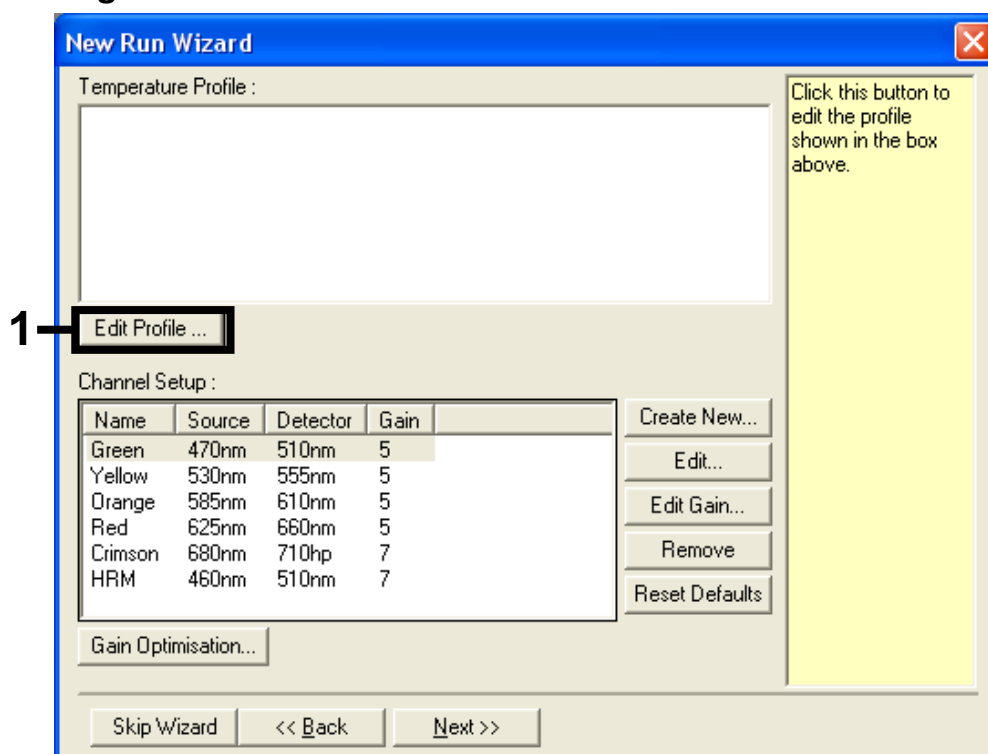
Figur 1. Dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse).

5. Skriv inn navnet på operatøren. Legg til merknader, og legg inn reaksjonsvolumet som 25. Kontroller at det ved siden av "Sample Layout" (Prøveoppsett) står "1, 2, 3...". Klikk på "Next" (Neste) (Figur 2).



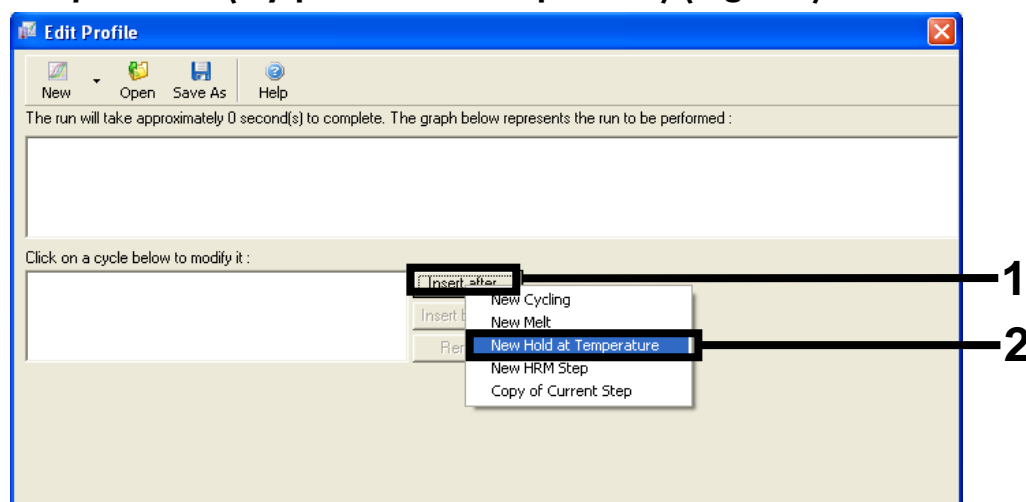
Figur 2. Innstilling av generelle analyseparametere.

6. Klikk på knappen "Edit Profile" (Rediger profil) i den neste dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse) (Figur 3), og programmer temperaturprofilen i henhold til informasjonen i de følgende trinnene.



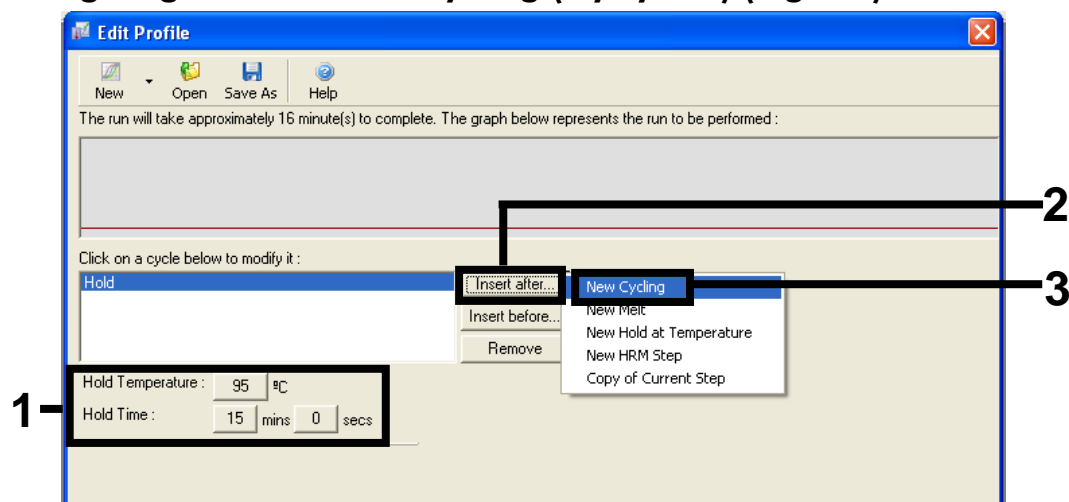
Figur 3. Redigering av profil.

7. Klikk på knappen "Insert after" (Sett inn etter) og velg *New Hold at Temperature* (Ny pause ved temperatur) (Figur 4).



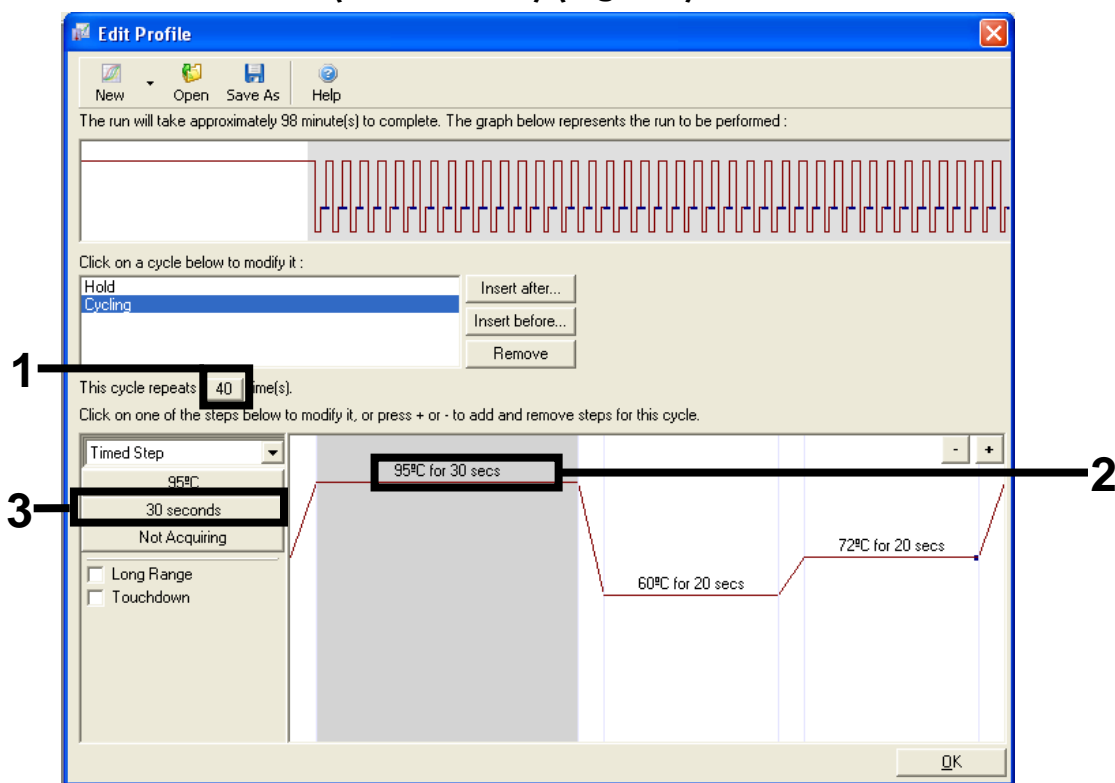
Figur 4. Innledende inkubasjonstrinn ved 95 °C.

8. Endre "Hold Temperature" (Pausetemperatur) til 95 °C og "Hold Time" (Pausetid) til 15 min. Klikk på knappen "Insert after" (Sett inn etter) og velg deretter New Cycling (Ny syklus) (Figur 5).



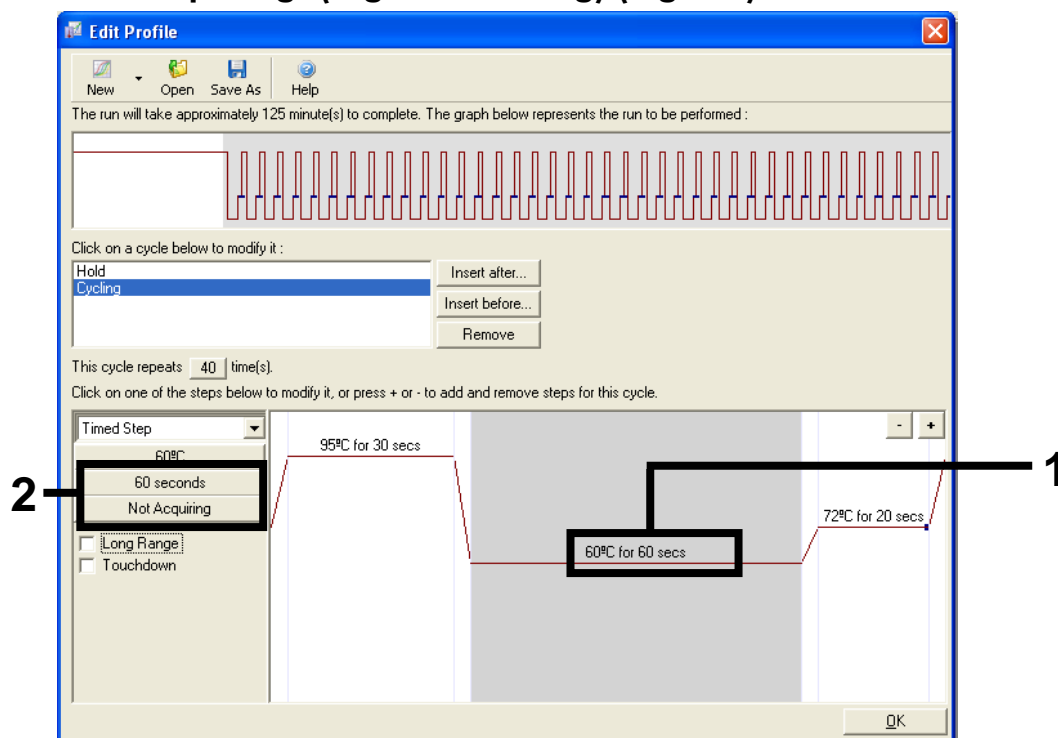
Figur 5. Innledende inkubasjonstrinn ved 95 °C.

9. Endre antall syklusrepetisjoner til 40. Velg det første trinnet og angi 95°C for 30 secs (95 °C i 30 s) (Figur 6).



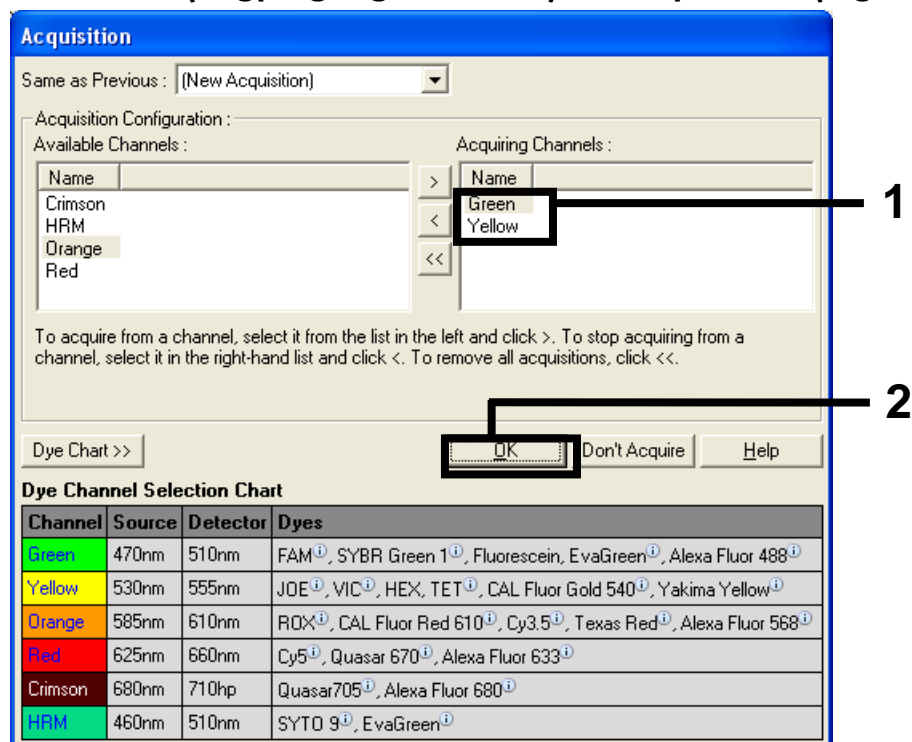
Figur 6. Syklustrinn ved 95 °C.

10. Marker det andre trinnet og angi 60°C for 60 secs (60 °C i 60 s). I dette trinnet kan du aktivere dataavlesning ved å velge knappen "Not Acquiring" (Ingen avlesning) (Figur 7).



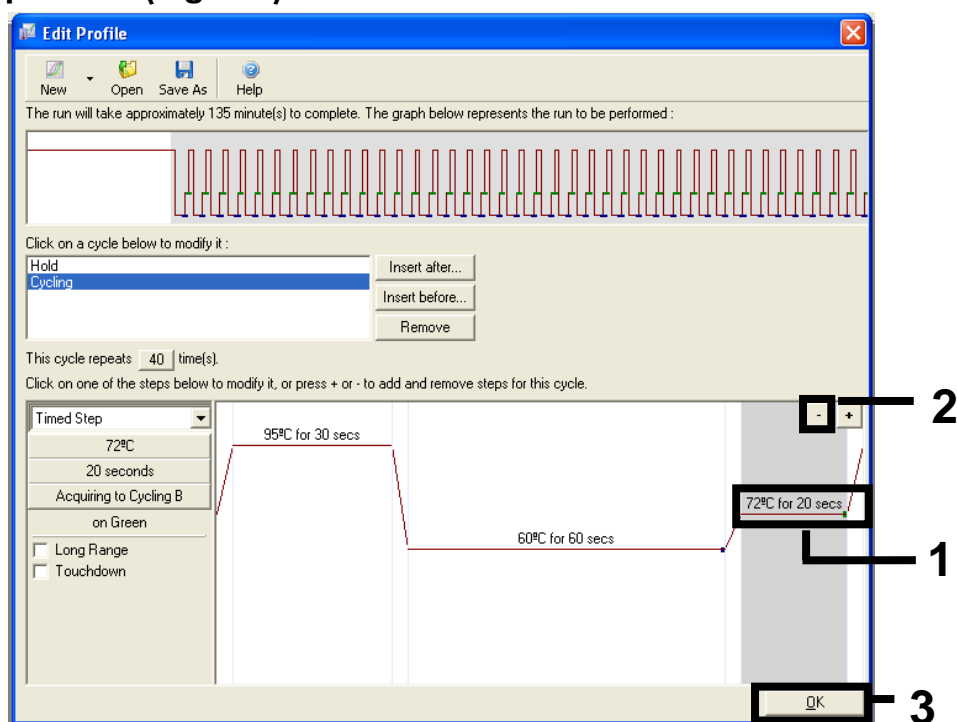
Figur 7. Syklustrinn ved 60 °C.

11. Angi Green (Grønn) og Yellow (Gul) som kanaler som skal avleses, ved å velge ">"-knappen for å overføre dem fra listen "Available Channels" (Tilgjengelige kanaler). Klikk på "OK" (Figur 8).



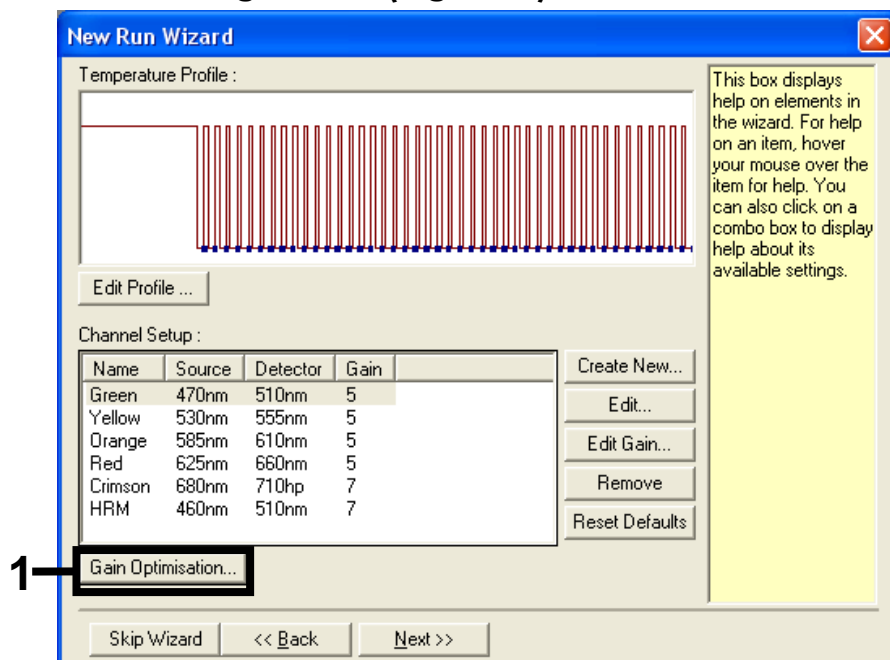
Figur 8. Avlesning ved syklustrinn på 60 °C.

12. Marker det tredje trinnet og slett ved å klikke på "-"-knappen. Klikk på "OK" (Figur 9).



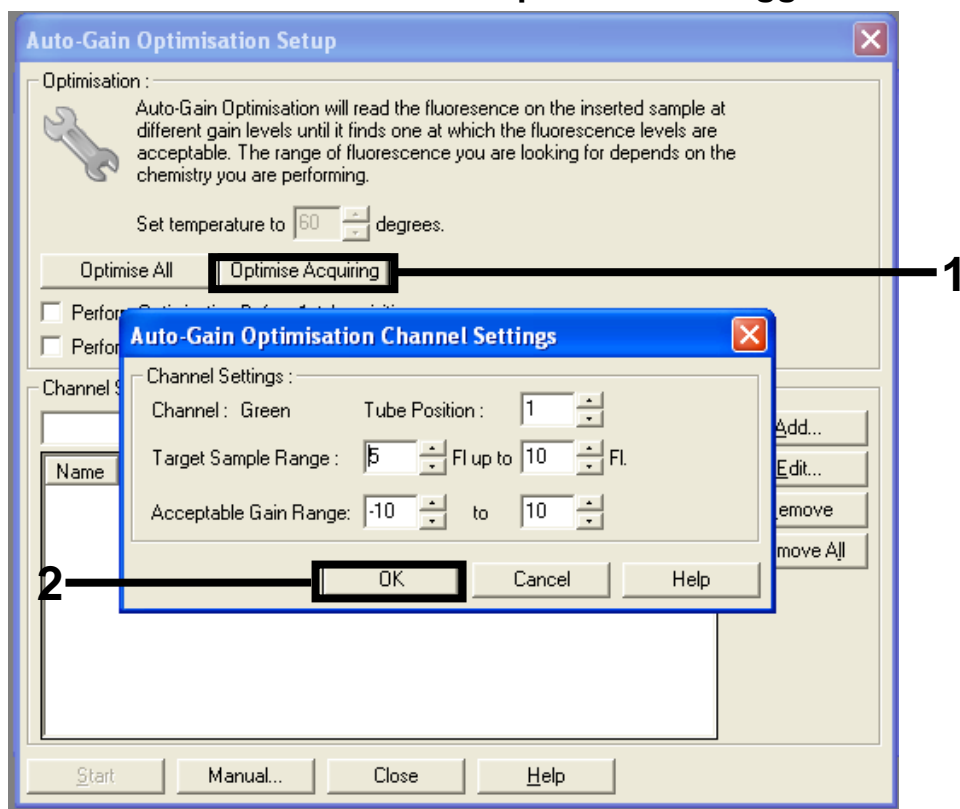
Figur 9. Fjerning av forlengelsestrinn.

13. Klikk på knappen "Gain Optimisation" (Optimal forsterkning) i den neste dialogboksen (Figur 10).



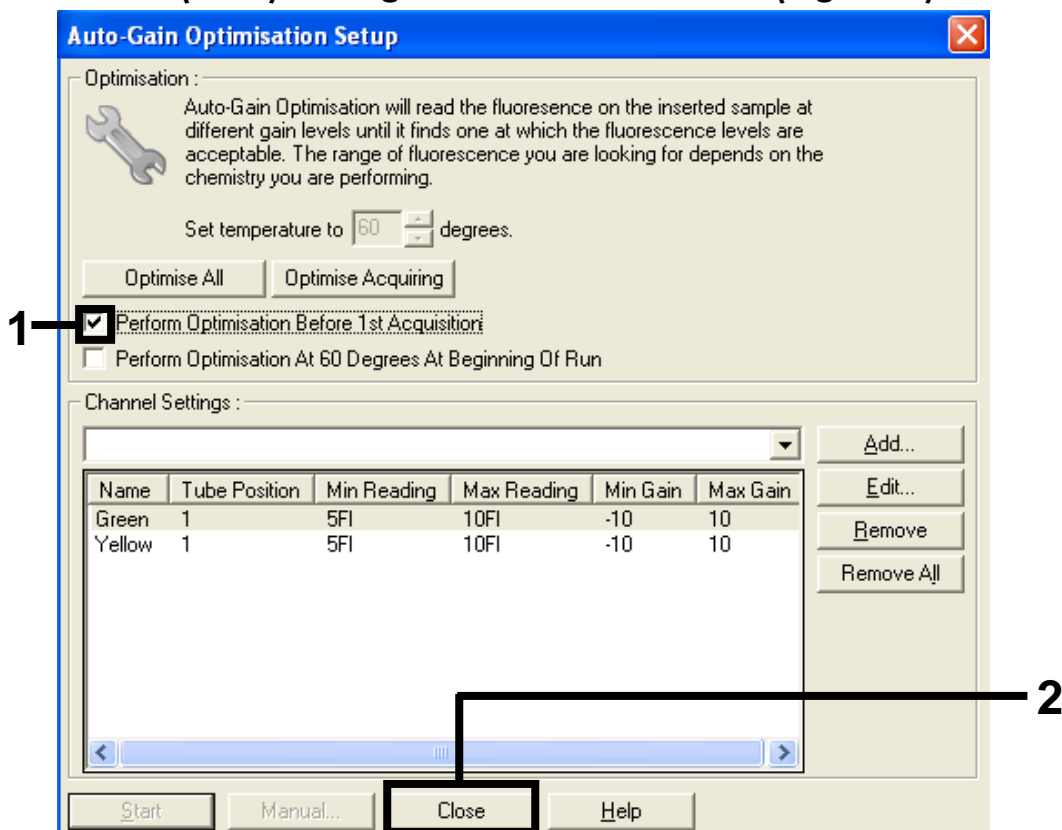
Figur 10. Gain optimization (optimal forsterkning).

14. Klikk på knappen "Optimise Acquiring" (Optimaliser avlesning). Kanalinnstillinger vises deretter for hver kanal. Godta disse standardverdiene ved å klikke på "OK" for begge kanaler (Figur 11).



Figur 11. Automatisk optimal forsterkning for den grønne kanalen.

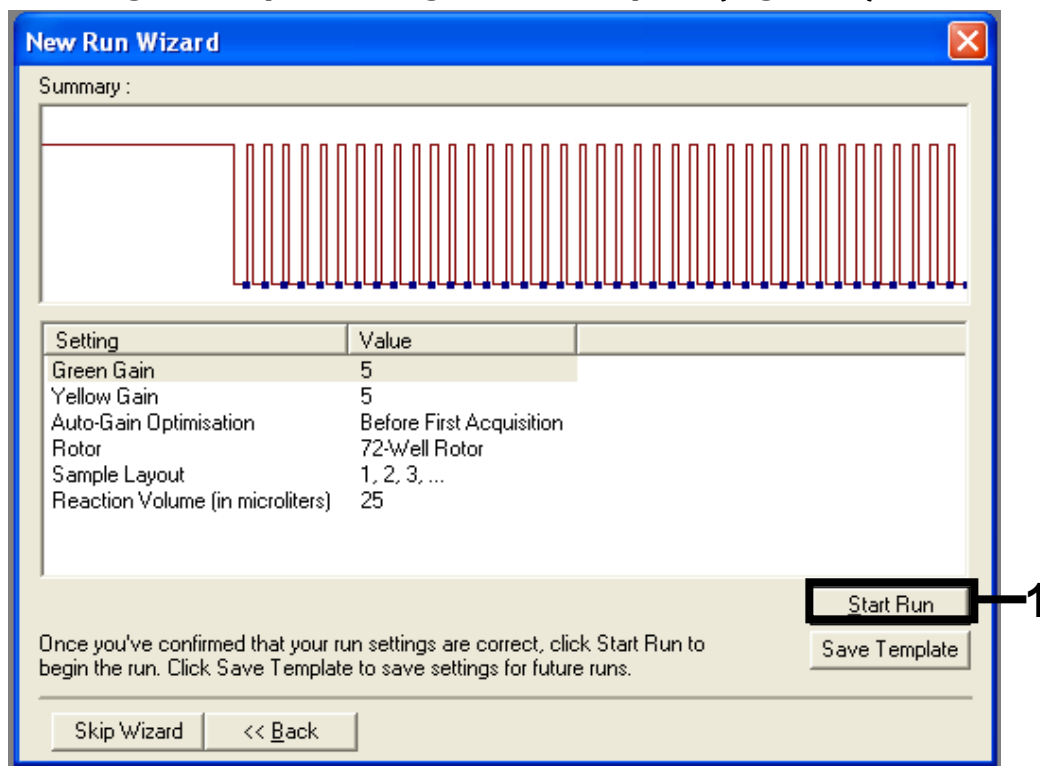
15. Merk av for "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Utfør optimalisering før første avlesning), og klikk deretter på knappen "Close" (Lukk) for å gå tilbake til veiviseren (Figur 12).



Figur 12. Valg av grønne og gule kanaler.

16. Klikk på "Next" (Neste) for å lagre templatet på et passende sted ved å velge "Save Template" (Lagre templat).

- 17. Kontroller oppsummeringen og klikk på "Start Run" (Start analyse) for å lagre analysefilen og starte analysen (Figur 13).**



Figur 13. Analysestart.

- 18. Etter at analyseserien er startet, vises et nytt vindu der du enten kan legge inn prøvenavn med det samme, eller klikke på "Finish" (Fullfør) og skrive dem inn senere ved å velge knappen "Sample" (Prøve) i løpet av analyseserien, eller så snart serien er fullført.**
- 19. Når analyseserien er fullført, må dataene analyseres i henhold til korrekt protokoll.**
- Se "Dataanalyse av prøvevurdering" på side 30 for informasjon om prøvevurdering.
 - Se "Analyse av EGFR-mutasjonsdata" på side 33 for informasjon om mutasjonsanalyse.

Tolkning av resultater

ΔC_T analysemetode

Scorpions sanntidsanalyser bruker det antallet PCR-sykluser som er nødvendig for å detektere fluorescenssignalet over et bakgrunnssignal. Dette blir en måling av målmolekylene som er til stede ved begynnelsen av reaksjonen. Punktet der signalet detekteres over bakgrunnsfluorescensen, kalles "syklusterskel" (C_T).

ΔC_T -verdier for prøven kalkuleres som differansen mellom mutasjonsanalyse- C_T og kontrollanalyse- C_T fra den samme prøven:

$$\Delta C_T = \text{mutasjon } C_T - \text{kontroll } C_T$$

Merk: Prøver klassifiseres som mutasjonspositive dersom de gir en ΔC_T som er mindre enn cut-off- ΔC_T -verdien for prøven. Over denne verdien kan prøven enten inneholde mindre enn prosenten av mutasjon som kan påvises av settet (under grensen for analysen), eller prøven er negativ for mutasjon.

Merk: Mutasjons- C_T -verdier på 40 eller mer vil gi et negativt resultat eller utenfor grensene til settet.

Med ARMS-primere kan det oppstå noe ineffektiv priming, noe som gir en svært sen bakgrunns- C_T fra DNA som ikke inneholder en mutasjon. Alle ΔC_T -verdier beregnet fra bakgrunnsamplifikasjon vil være større enn cut-off- ΔC_T -verdiene, og prøven vil klassifiseres som negativ for mutasjon.

Dataanalyse av prøvevurdering

Når analyseserien er fullført, må dataene analyseres i henhold til følgende prosedyre.

Analyseinnstillinger i programvaren

1. Åpne den riktige filen ved hjelp av programvare for Rotor-Gene Q-serien, versjon (2.0.2) og nyere.
2. Kontroller at prøvene er merket.
3. Når du er på råkanalsiden for hver detektor/kanal, klikker du på "Options" (Alternativer) og skriver inn *Crop start cycles* (Kutt startsykluser). Skriv inn 15 og klikk på "OK" på siden med "Remove data before cycle" (Fjern data før syklus).
4. Klikk på "Analysis" (Analyse). Klikk på "Cycling A (from 15), Yellow" (Syklus A (fra 15), gul) på analysesiden for å merke av HEX-kanalen.
5. Kontroller at "dynamic tube" (dynamisk rør) er merket. Klikk på "Slope correct" (Riktig helning) og "Linear scale" (Lineær skala).
6. Angi terskelen til 0,02 og kontroller HEX C_T -verdiene.
7. Klikk på "Cycling A (from 15), Green" (Syklus A (fra 15), grønn) for å se FAM-kanalen.

8. **Det dynamiske røret merkes. Klikk på "Slope correct" (Riktig helning) og "Linear scale" (Lineær skala).**
9. **Angi terskelen til 0,075 og kontroller FAM C_T-verdiene.**

Når analyseringen er fullført, kan dataene analyseres på følgende måte.

- **Negativ kontroll:** For å sikre at det ikke er noen templatkontaminering, må ikke NTC generere en C_T-verdi i den grønne (FAM)-kanalen som er under 40. Henvis til "Merknader for fortolkning av data" på side 39 for viktig informasjon om analyse av ikke-templat-kontrollpunkter (NTC-punkter). NTC må vise amplifikasjon på 31–37 i den gule (HEX)-kanalen for å sikre at analyseserien er satt opp korrekt.

Hvis det er positiv amplifikasjon i den grønne kanalen og/eller amplifikasjon utenfor området 31–37 i det gule signalet, må prøveresultatet forkastes.

- **Positiv kontroll:** EGFR positiv kontroll (PC) må gi en kontrollanalyse-C_T (FAM-kanal) på 26,26–30,95. En analyseserie med C_T-verdi utenfor dette området indikerer et analyseoppsettproblem og analyseserien bør betegnes som mislykket. Dersom den positive kontrollanalysen C_T er på 26,26–30,95 (ekson 2, FAM), men den interne kontrollen C_T (HEX) er utenfor området 31–37, fortsett med analysen.

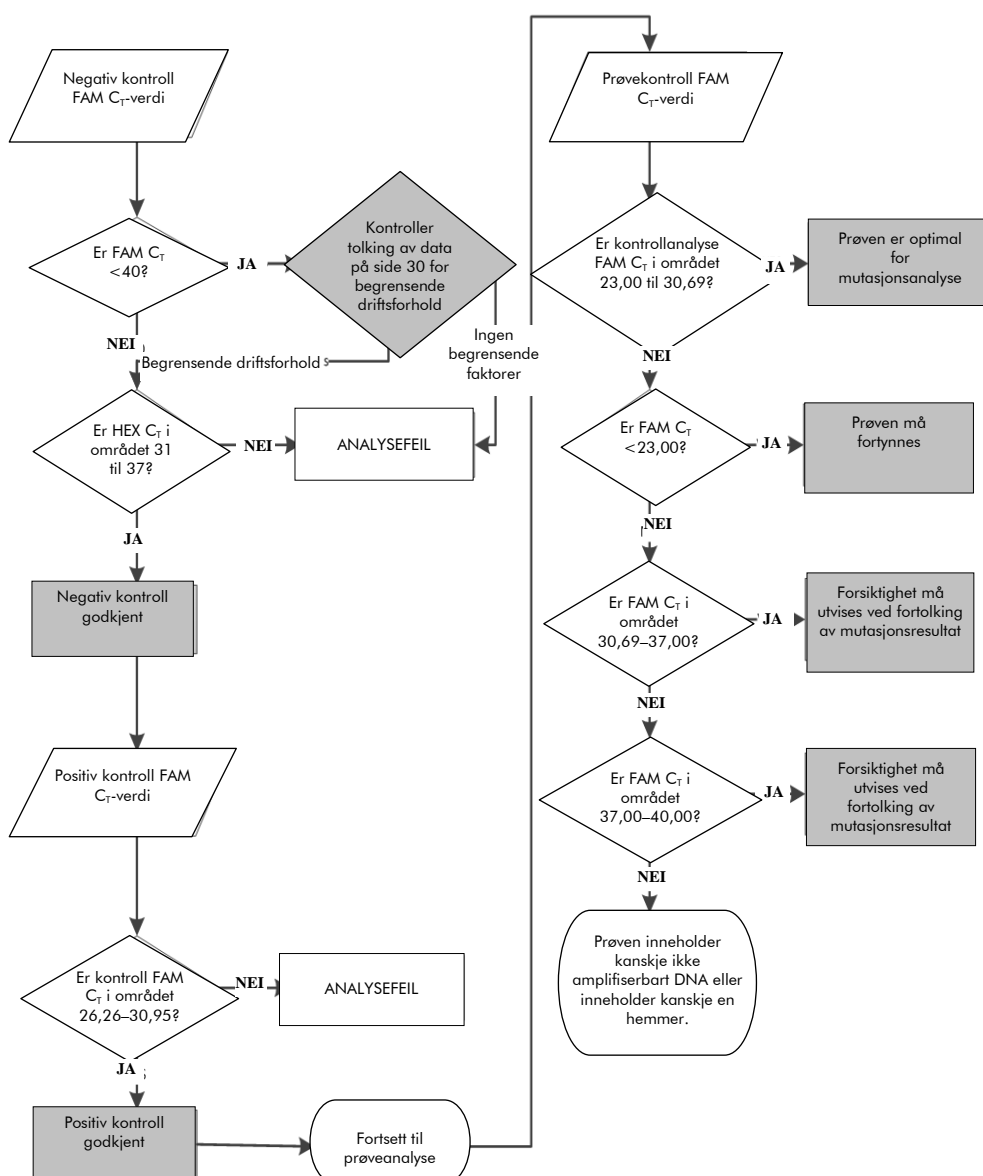
Merk: Prøvedata må ikke brukes hvis en av disse to analysekontrollene mislykkes.

Forutsatt at begge analysekontrollene er gyldige, må hver prøve C_T-verdi ligge innenfor et område på 23–30,69 i den grønne (FAM)-kanalen. Hvis prøven ligger utenfor dette området, gis følgende råd.

- **Prøvekontrollanalyse-C_T på <23:** Prøver med en kontroll-C_T på <23 vil overbelaste mutasjonsanalysene og må fortynnes. For å kunne se hver mutasjon på et lavt nivå, må de overkonsentrerte prøvene fortynnes til å falle innenfor området ovenfor med utgangspunkt i at en fortynning med en halv vil øke C_T med 1.
- **Prøvekontrollanalyse-C_T på 30,69-37:** Vær forsiktig ved tolkning av resultatene, da veldig lave mutasjonsnivåer ikke kan detekteres.
- **Prøvekontrollanalyse-C_T på 37–40:** Vær forsiktig ved tolkning av resultatene, da kun veldig høye mutasjonsnivåer kan detekteres.
- **Prøvekontrollanalyse-C_T på >40:** Prøven inneholder ikke tilstrekkelig DNA for at analysen skal kunne utføres.

Merk: Dersom en prøve ikke genererer en C_T (f.eks., $C_T > 40$), kan grunnen være tilstedeværelsen av en hemmer, en feil i analyseoppsettet eller at det ikke fins noen amplifiserbar EGFR DNA.

- **Internkontroll- C_T -verdi på 31–37:** Det fins ingen amplifiserbar EGFR DNA.
- **Internkontroll- C_T -verdien er ikke innenfor området 31–37:** Dette kan indikere en feil i analyseoppsettet eller tilstedeværelsen av en hemmer. Det er mulig å redusere effekten av en hemmer ved å fortynne prøven, selv om dette også vil fortynne DNA-et.



Figur 14. Arbeidsgangen for analyse av prøvevurdering.

Analyse av EGFR-mutasjonsdata

Når analyseserien er fullført, må dataene analyseres i henhold til følgende prosedyre.

Analyseinnstillinger i programvaren

1. Åpne den riktige filen ved hjelp av programvare for Rotor-Gene Q-serien, versjon (2.0.2) og nyere.
2. Kontroller at prøvene er merket.
3. Når du er på råkanalsiden for hver detektor/kanal, klikker du på "Options" (Alternativer) og skriver inn *Crop start cycles* (Kutt startsykluser). Skriv inn 15 og klikk på "OK" på siden med "Remove data before cycle" (Fjern data før syklus).
4. Klikk på "Analysis" (Analyse). Klikk på "Cycling A (from 15), Yellow" (Syklus A (fra 15), gul) på analysesiden for å se HEX-kanalen.
5. Kontroller at "dynamic tube" (dynamisk rør) er merket. Klikk på "Slope correct" (Riktig helning) og "Linear scale" (Lineær skala).
6. Angi terskelen til 0,02 og kontroller HEX C_T-verdiene.
7. Klikk på "Cycling A (from 15), Green" (Syklus A (fra 15), grønn) for å se FAM-kanalen.
8. Kontroller at "dynamic tube" (dynamisk rør) er merket. Klikk på "Slope correct" (Riktig helning) og "Linear scale" (Lineær skala).
9. Angi terskelen til 0,075 og kontroller FAM C_T-verdiene.

Seriekontrollanalyse:

Se flytskjemaet "Seriekontrollanalyse" i Figur 15.

- **Negativ kontroll:** For å sikre at det ikke er noen templatkontaminering, må ikke NTC generere en C_T-verdi i den grønne (FAM)-kanalen som er under 40. Henvis til "Merknader for fortolkning av data" på side 39 for viktig informasjon om analyse av ikke-templat-kontrollpunkter (NTC-punkter). NTC må vise amplifikasjon på C_T 31–37 i den gule (HEX)-kanalen for å sikre at analyseserien er satt opp korrekt.

Hvis det er positiv amplifikasjon i den grønne kanalen og/eller amplifikasjon utenfor området 31–37 i det gule signalet, må prøveresultatet forkastes.

- **Positiv kontroll:** EGFR positiv kontroll (PC) må gi en kontrollanalyse-C_T på 26,26–30,95 i den grønne kanalen. En analyseserie med C_T-verdi utenfor dette området indikerer et analyseoppsettproblem og analyseserien bør betegnes som mislykket. Dersom den positive kontrollanalysen C_T er på 26,26–30,95 (ekson 2, FAM), men den interne kontrollen C_T (HEX) er utenfor området 31–37, fortsett med analysen.

Beregn ΔC_T -verdi for hver mutasjonsanalyse som følger, og forsikre deg om at mutasjons- og kontroll- C_T -verdiene er fra den positive kontrollen.

$$\Delta C_T = \text{mutasjon } C_T - \text{kontroll } C_T$$

EGFR positiv kontroll (PC) ΔC_T -verdiene må falle inn under verdiene angitt i Tabell 7.

Tabell 7. Forventede ΔC_T -verdier for positiv kontroll*

Analyse	Positiv kontroll ΔC_T -verdi
T790M	-2,88 til 3,01
Delesjoner	-6,71 til 4,16
L858R	-2,41 til 0,90
L861Q	-4,61 til 1,48
G719X	-2,89 til 1,03
S768I	-3,37 til 2,31
Inersjoner	-2,93 til 1,28

* Rotor-Gene Q-programvare (2.0.2)

Merk: Prøvedata må ikke brukes hvis de negative eller positive analysekontrollene mislykkes.

- **Prøvekontrollanalyse- C_T på >40 :** Prøven inneholder ikke tilstrekkelig DNA for at analysen skal kunne utføres.

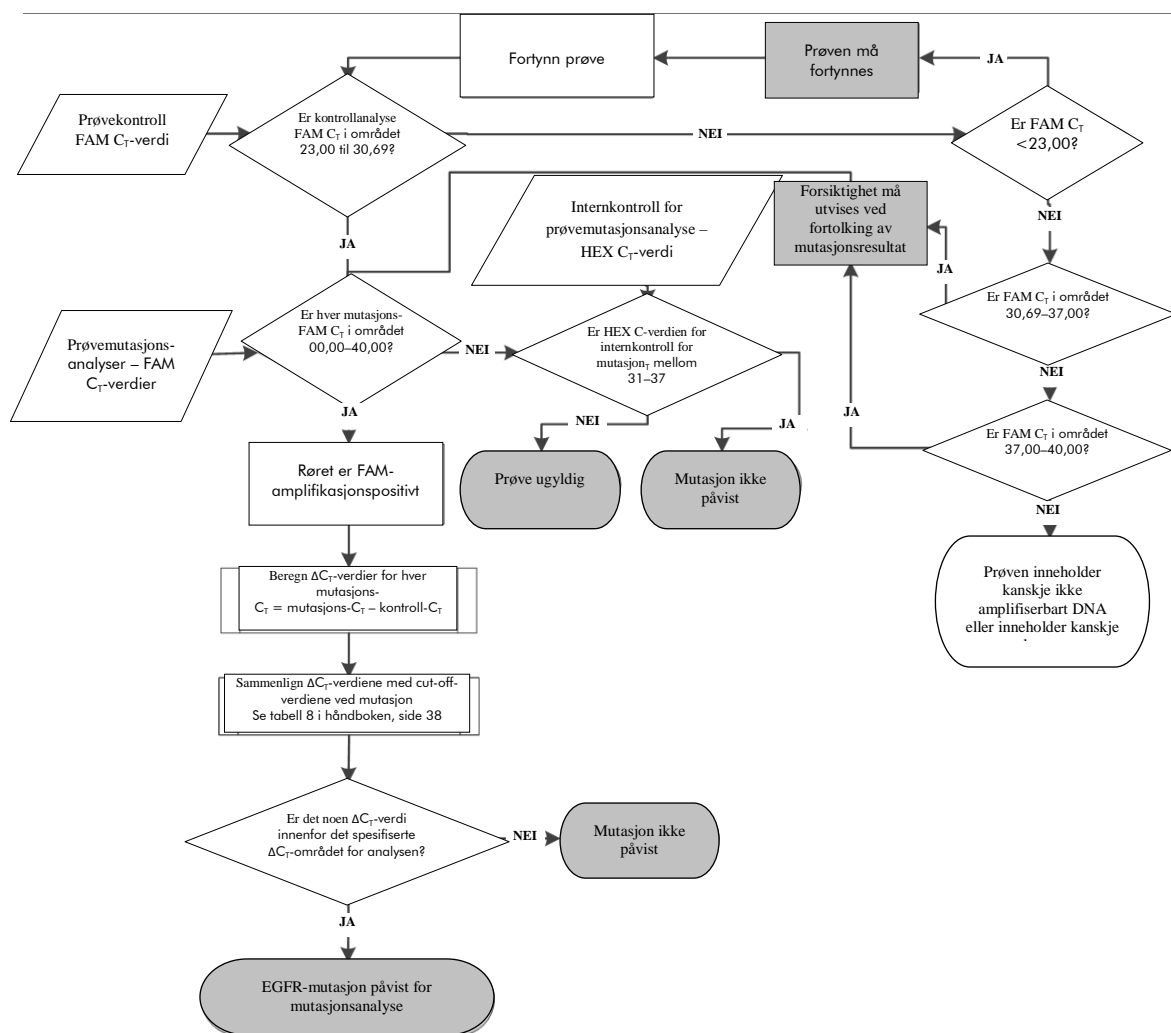
Merk: Dersom FAM C_T -prøveverdi er mellom 23 og <37 , er det ikke behov for å evaluere den interne kontrollen.

Merk: Dersom en prøve ikke genererer en C_T (f.eks., $C_T >40$), kan grunnen være tilstedeværelsen av en hemmer, en feil i analyseoppsettet eller at det ikke fins noen amplifiserbar EGFR DNA.

- **Internkontroll- C_T -verdi på 31–37:** Analysen fungerer korrekt, men det fins ikke amplifiserbar EGFR DNA.

- **Internkontroll- C_T -verdien er ikke innenfor området 31–37:** Dette kan indikere en feil i analyseoppsettet eller tilstedeværelsen av en hemmer. Det er mulig å redusere effekten av en hemmer ved å fortynne prøven, selv om dette også vil fortynne DNA-et.

Merk: Dersom FAM-reaksjonen for mutasjonsanalyse ikke genererer en C_T -verdi og de interne kontrollreaksjonene genererer en C_T -verdi utenfor området 31–37, må dataene forkastes, da det kan være hemmere til stede som kan føre til falske negative resultater. Fortynning av prøven kan redusere effekten av hemmere, men det er viktig å merke seg at dette også vil fortynne DNA-et.



Figur 16. Flytskjema for mutasjonsanalyse.

Prøvemutasjonsanalyser – FAM C_T-verdier

FAM-verdier for alle sju mutasjonsblandinger må kontrolleres opp mot verdiene angitt i Tabell 8.

Tabell 8. Godkjente reaksjonsverdier for prøvemutasjon (FAM)*

Analyse	Godkjent C _T -område	Cut-off-ΔC _T -verdi
T790M	15,00–40,00	6,38
Delesjoner	15,00–40,00	9,06
L858R	15,00–40,00	8,58
L861Q	15,00–40,00	9,26
G719X	15,00–40,00	9,31
S768I	15,00–40,00	9,26
Insersjoner	15,00–40,00	7,91

* Godkjente verdier ligger innenfor og inkluderer verdiene som er angitt i tabellen.

- Hvis FAM C_T ligger innenfor det angitte området på 15,00–40,00, er den FAM-amplifikasjonspositiv.
- Hvis FAM C_T ligger over det angitte området, er det ingen amplifikasjon, og den er FAM-amplifikasjonsnegativ.

Beregn ΔC_T-verdien for hver mutasjonsprøve der positiv amplifikasjon vises på følgende måte, og kontroller at mutasjons- og kontroll-C_T-verdiene er fra samme prøve.

$$\Delta C_T = \text{mutasjon } C_T - \text{kontroll } C_T$$

Sammenlign ΔC_T-verdien for prøven med cut-off-punkt for den aktuelle analysen (Tabell 8) som sikrer at riktig cut-off-punkt brukes til hver analyse.

Cut-off-punktet er punktet over der et positivt signal potensielt kan forekomme på grunn av bakgrunnssignalet til ARMS-primeren på villtype-DNA. Hvis prøve ΔC_T-verdien er høyere enn cut-off-punktet, er den klassifisert som "ingen mutasjon påvist" eller utenfor settets deteksjonsgrense. Hvis prøveverdien er på cut-off-punktet eller lavere, anses prøven som positiv for en mutasjon detektert av denne analysen.

Merk: For prøver som ikke viser noen FAM-mutasjons-C_T, er det påkrevd med en evaluering av den interne kontroll-(HEX)-C_T for å avgjøre om det ikke er påvist mutasjon eller om analysen er ugyldig. Hvis HEX C_T-verdien er mellom

31 og 37, er det ikke påvist mutasjon. Hvis HEX C_T -verdien er utenfor området 31–37, er prøven ugyldig.

Som en helhet gjelder det for hver prøve at hver mutasjonsreaksjon få statusen mutasjon påvist, mutasjon ikke påvist eller ugyldig i henhold til følgende kriterier.

- **Mutasjon påvist:** FAM-amplifikasjonspositiv og ΔC_T er ved eller under cut-off-verdien. Dersom flere mutasjoner påvises, kan alle rapporteres.
- **Mutasjon ikke påvist:**
FAM-amplifikasjonspositiv og ΔC_T er over cut-off-verdien.
FAM-amplifikasjonsnegativ og HEX (intern kontroll)-amplifikasjonspositiv.
- **Ugyldig:**
FAM-amplifikasjonsnegativ og HEX-amplifikasjon utenfor det angitte området.

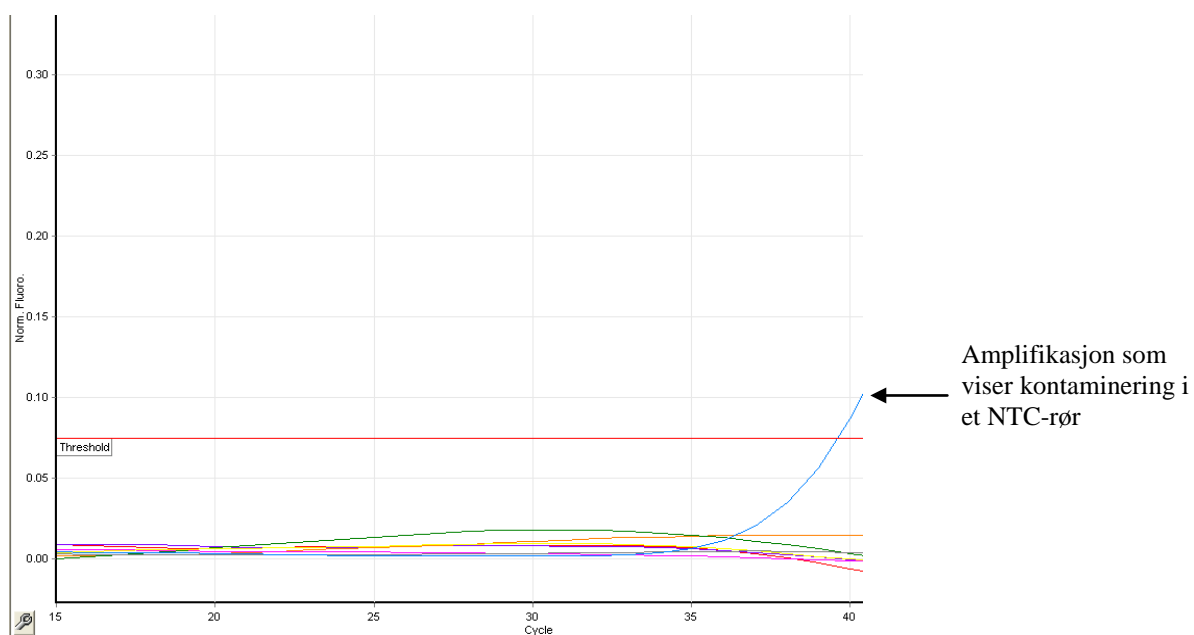
Merknader for fortolkning av data

Lineær amplifikasjon

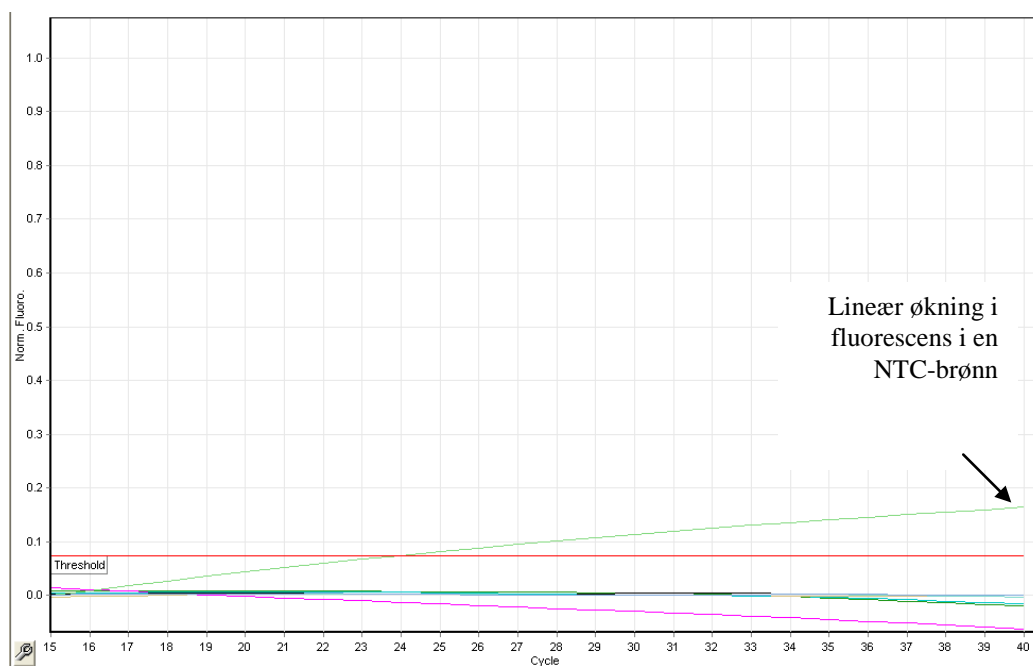
Rotor-Gene Q-punkter fra alle reaksjoner bør kontrolleres. Av og til kan man se en økning i fluorescenssignal i NTC og negative prøver. Hvis dette er tilfellet og en C_T -verdi oppnås, må brukeren skille mellom en sann amplifikasjonshendelse, noe som kan indikere kontaminering i NTC, og en lineær økning i fluorescens, som kan ha oppstått på grunn av fluorescensartefakt.

Analysering av NTC

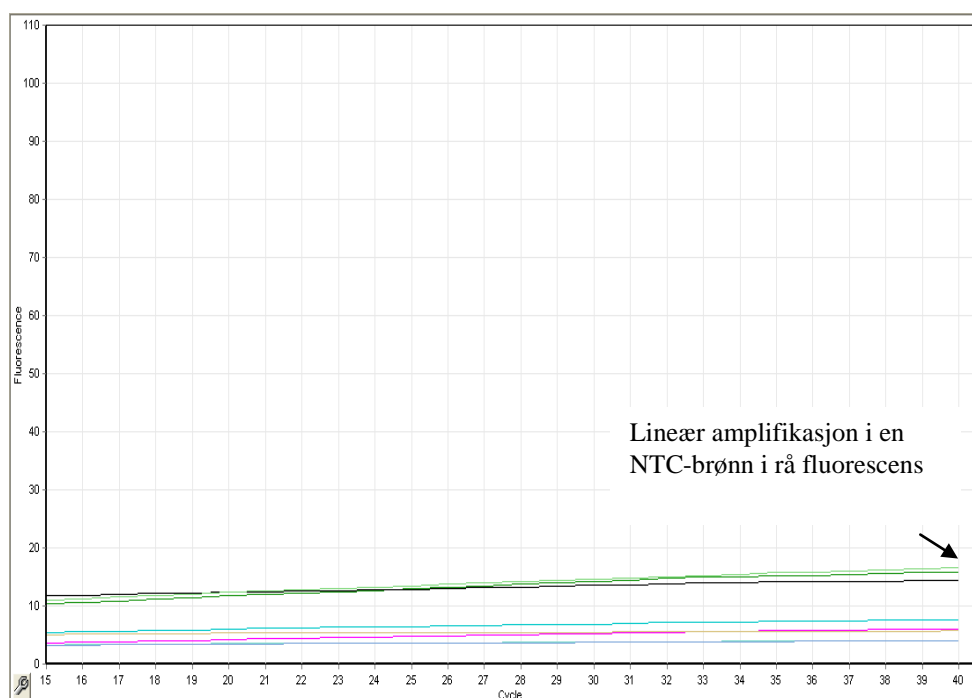
Figur 17–18 viser to eksempler på atferden til NTC-prøver. I Figur 17, kan ikke-lineær (sann amplifikasjon) grunnet prøvekontaminering sees. Denne analysen bør forkastes og prøvene testes på nytt. I Figur 18 ser vi lineær amplifikasjon i en NTC. I slike situasjoner bør rå fluorescens undersøkes. Den tilsvarende skisseringen for rå fluorescens er vist i Figur 19 og indikerer en lineær økning i fluorescens, mer enn en sann amplifikasjonshendelse. Data fra denne analysen kan brukes dersom de positive og interne kontrollene er godkjent. Til sammenligning med Figur 19 viser Figur 20 rå fluorescensdata der det har skjedd sann amplifikasjon. I slike situasjoner skal data forkastes og prøvene testes på nytt, da dette indikerer en aktiv kontaminering.



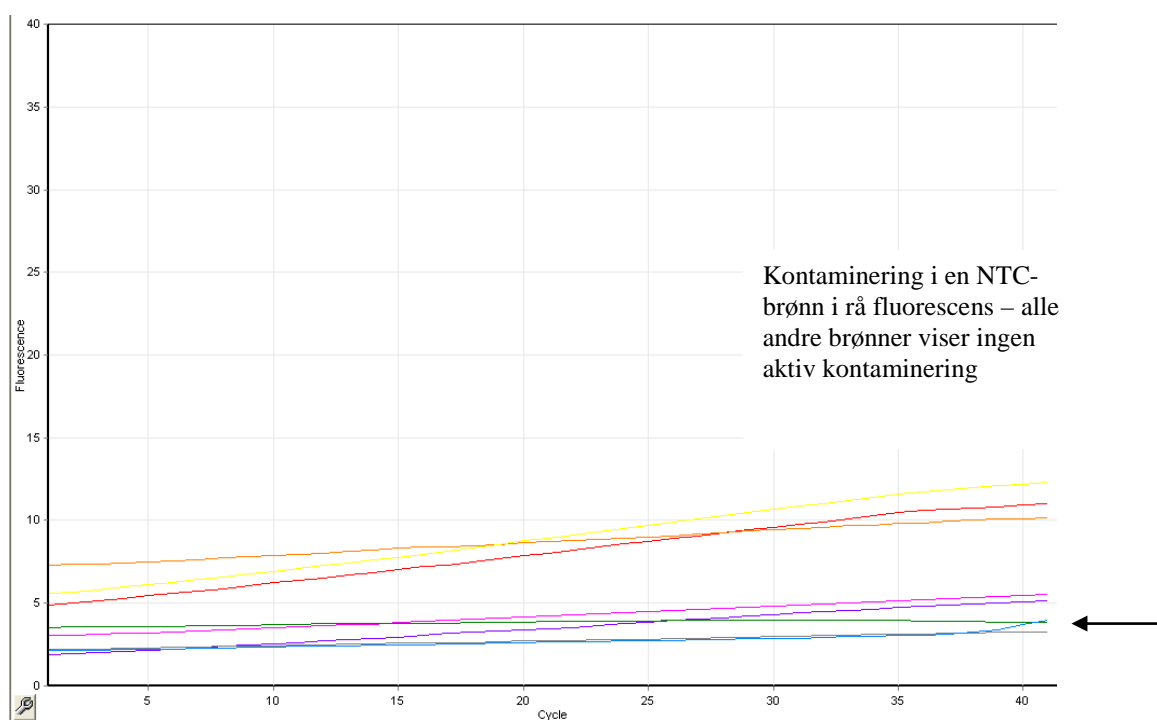
Figur 17. Kontaminering i en NTC i en ferdig analysert prøve.



Figur 18. Eksempel på en lineær økning i fluorescens i en NTC-brønn.



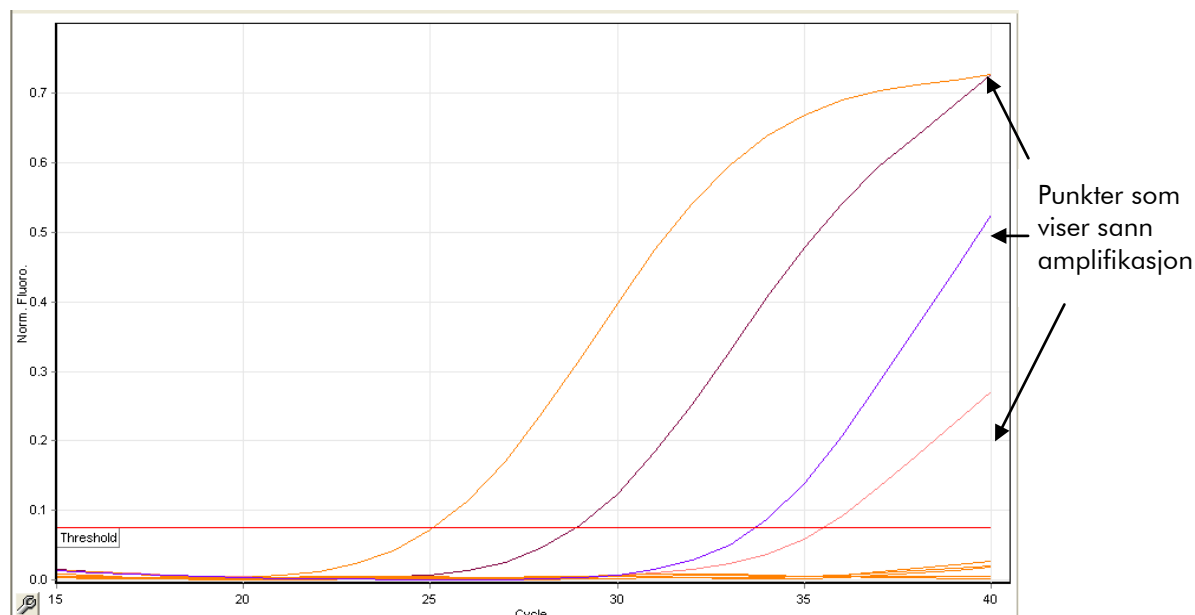
Figur 19. Rå fluorescens for Figur 18.



Figur 20. Rå fluorescens-data viser en NTC-brønn med en sann amplifikasjonshendelse.

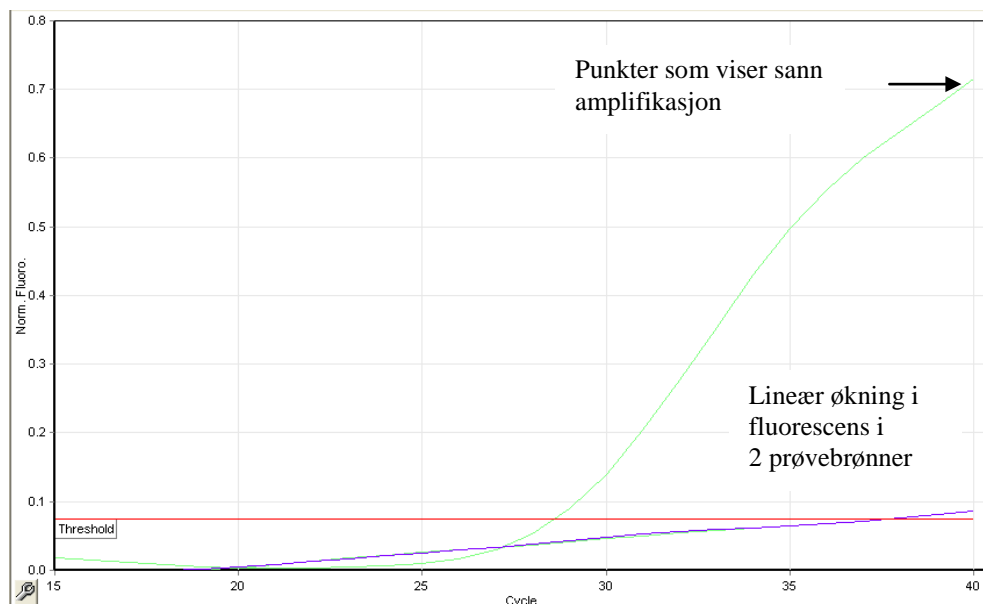
Prøveanalyse

Figur 21–22 viser to eksempler på amplifikasjon i prøvereksjoner. I Figur 21 ser vi et eksempel på sann amplifikasjon i en prøvebrønn i en analysert serie. Hvis en analyseserie viser denne typen sigmoidal amplifikasjonskurve, er dette en sann amplifikasjon, og data fra denne analysen kan benyttes, forutsatt at positive og interne kontrollen er godkjent.

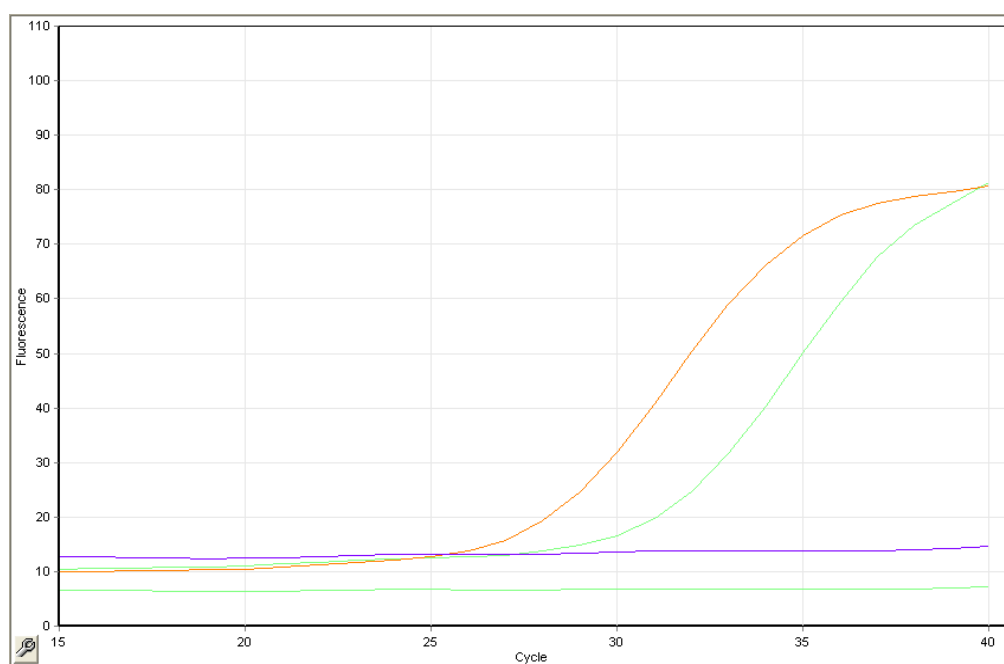


Figur 21. Sann amplifikasjon i en prøvebrønn i en analysert serie.

Et eksempel på lineær amplifikasjon i en prøvereksjon er vist i Figur 22. I slike situasjoner bør rå fluorescens-data undersøkes. Den tilsvarende skisseringen for rå fluorescens (Figur 23) indikerer at den lineære økningen observert i Figur 22 tilsvarer en lineær økning i rå fluorescens og ikke er en sann amplifikasjon. Gitt at de positive og interne kontrollsjekker er godkjent, kan prøveresultater fra disse seriene brukes med forsiktighet, slik at lineær amplifikasjon kalles for "ikke- C_T ".



Figur 22. Eksempel på en lineær økning i fluorescens i to prøvebrønner.



Figur 23. Rå fluorescens for Figur 22.

Feilsøkingeveiledning

Denne feilsøkingeveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportsenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske tjenester er alltid klare til å besvare alle spørsmål du måtte ha, enten om informasjon og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Ingen signal med EGFR positiv kontroll (PC) i fluorescenskanal for Cycling Green

- | | |
|---|--|
| a) Den valgte fluorescenskanalen for PCR-dataanalyse stemmer ikke overens med protokollen | Ved dataanalyse må du velge fluorescenskanalen Cycling Green for analytisk EGFR PCR og fluorescenskanalen Cycling Yellow for internkontroll-PCR. |
| b) Feil programmering av temperaturprofil for Rotor-Gene-instrumentet | Sammenlign temperaturprofilen med protokollen, og gjenta analyseringen hvis dette ikke er riktig. |
| c) Feil konfigurering av PCR | Kontroller arbeidstrinn ved hjelp av pipetteringsskjema, og gjenta PCR om nødvendig. |
| d) Oppbevaringsbetingelsene for en eller flere settkomponenter stemte ikke overens med instruksjonene angitt i "Oppbevaring og håndtering av reagenser" (side 12) | Kontroller oppbevaringsbetingelsene og utløpsdatoen (se merking av settet) til reagensene, og bruk et nytt sett om nødvendig. |
| e) <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR-settet er utløpt på dato | Kontroller oppbevaringsbetingelsene og utløpsdatoen (se merking av settet) til reagensene, og bruk et nytt sett om nødvendig. |

Signaler med de negative kontrollene i fluorescenskanalen Cycling Green for analytisk PCR

- | | |
|--|--|
| a) Kontamineringen oppsto under klargjøring av PCR | Gjenta PCR med nye reagenser i replikater.
Hvis det er mulig, må du lukke PCR-rørene direkte etter at prøven som skal testes er lagt til.

Se til at arbeidsområdet og instrumenter dekontamineres regelmessig. |
| b) Kontamineringen oppsto under ekstraksjon | Gjenta ekstraksjonen og PCR for prøven som skal testes, ved hjelp av nye reagenser.

Se til at arbeidsområdet og instrumenter dekontamineres regelmessig. |

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med *therascreen* EGFR RGQ PCR-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Resultatene fra dette produktet må tolkes i sammenheng med alle relevante kliniske og laboratoriemessige funn og ikke brukes som eneste grunnlag for diagnose.

Produktet skal bare brukes av personell som har mottatt spesialopplæring i in vitro-diagnostiske prosedyrer og Rotor-Gene Q.

Analytiske valideringsstudier omfattet humant DNA ekstrahert fra formalinfikserte og parafinlagrede tumorprøver.

Produktet skal bare brukes sammen med Rotor-Gene Q PCR-sentrifuge i sanntid, 5plex HRM-serie.

Håndboken til *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet må følges nøyaktig for å få mest mulig optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.

Det er viktig av prøvens DNA-mengde og DNA-kvalitet vurderes før prøven analyseres med *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet. Ekstra kontrollreaksjonsblanding (Ctrl) følger med, slik at du kan vurdere om C_T-verdien kan godkjennes for analysen. Absorbansavlesninger må ikke brukes, da de ikke samsvarer med C_T-verdier i fragmenterte DNA-prøver.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoer og oppbevaringsbetingelser angitt på esken og merkinger til alle komponenter. Komponenter som er oppbevart på feil måte eller som har utløpt holdbarhetsdato, må ikke brukes.

Ytelseskarakteristikker

Cut-off-verdier

Ett hundre og syttien (171) FFPE-prøver ble testet ved hjelp av en metode angitt i NCCLS EP17-A (2004). Data fra 159 prøver ble brukt til å fastsette cut-off-verdier for settet. Området for kontrollreaksjon C_T ble satt til 23,00 til 30,69 C_T . Cut-off-verdiene ble etablert og er vist i tabell 8.

Deteksjonsgrense (LOD)

Med et formål om å fastsette LOD for *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet, ble et prøvesett utviklet ved å mikse syntetisk mutant-DNA med villtype av genomisk DNA for å simulere et område for mutasjonsprosentandeler for hver av de 29 mutasjonene. LOD for hver analyse defineres som mutasjonsprosentandel der 95 % av replikatene ble påvist som positive *therascreen* EGFR PCR RGQ-settet. LOD-verdiene er angitt i Tabell 9. Når det gjelder multiplex-analysene, som påviser flere mutasjoner (G719X, delesjonene og insersjonene), er verdien for reaksjonen som ga den høyeste LOD-verdien gitt.

Tabell 9. LOD-verdiene for hver av de syv EGFR-mutasjonsanalysene

Mutasjon	Prosentandel påviselig mutasjon (%)
T790M	7,02
Delesjoner	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Insertjoner	2,03

Presisjon

Med et formål om å bestemme presisjonen til *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet, ble et prøvesett utviklet ved å mikse syntetisk mutant-DNA med villtype av genomisk DNA for å simulere et lavt nivå av mutasjonsprosentandel for hver av de syv mutasjonsanalysene. Presisjon ble vurdert ved å teste prøver på ett sted, ved bruk av flere settbatcher, operatører og serier over ulike dager, med to replikater av hver prøve. Den observerte variasjonen var, med hensyn til standardavvik fra varianskomponentanalysen, mindre enn 1 ΔC_T , og kan brukes som et estimat for presisjon (Tabell 10).

Tabell 10. Resultater av laboratorieinterne tester*

Analyse	Prosentandel med testresultat mutasjonspositiv	Estimat for standardavvik (ΔC_T)
T790M	100 %	0,33
Delesjoner	100 %	0,40
L858R	100 %	0,45
L861Q	100 %	0,49
G719X	97,9 %	0,59
S768I	97,9 %	0,31
Insertjoner	97,9 %	0,38

* 93 replikater ble testet for hver mutasjon.

Reproduserbarhet

Reproduserbarhet ble vurdert ved å teste prøver med høyt mutasjonsnivå mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA ved tre teststeder, ved bruk av flere kitbatcher, operatører og serier over ulike dager, med to replikater av hver prøve. Testresultatene for 96,1–100 % av de mutante DNA-prøvene var mutasjonspositive for alle de syv mutasjonsanalysene. Testresultatene for villtypeprøver var mutasjonsnegative for alle analysene på alle teststedene.

Effekt av input DNA-konsentrasjon

Effekten av å endre input-DNA-konsentrasjon på resultatene produsert av *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet nært opp mot LOD ble bestemt ved å utvikle et prøvesett for alle de 29 mutasjonene ved å blande syntetisk mutant-DNA

med villtype av genomisk DNA for å produsere prøver på lave, middels og høye nivåer av total input-DNA.

De høye og lave nivåene av input-DNA ble valgt for å representere kontrollanalyse- C_T -verdiområdet (23,50 til 29,50).

En vurdering av input-DNA-datasettet (29 mutasjoner med konsentrasjoner nært opp mot LOD og på tre ulike input-DNA-nivåer) ga en mutasjonspositiv andel på 95,44 %.

Disse dataene indikerer at variasjon av nivået av input-DNA innen arbeidsområdet for analysen ikke påvirker ΔC_T eller mutasjonsfunnet for en prøve.

Interfererende substanser

Effekten av komponenter som potensielt kunne overføres fra QIAGEN® QIAamp DNA FFPE-vevssettet på settytelsen under behandling av FFPE-prøver ble vurdert.

Formalin, parafinvoks, xylen, etanol, buffer ATL, proteinase K, buffer AL, vaskebuffer AW1, og vaskebuffer AW2 ble brukt med de verst mulige forventede konsentrasjonene ("verste fall") (antatt at hvert vaske- eller rengjøringstrinn i ekstraheringssettprotokollen resulterte i en reduksjon av konsentrasjonskomponentet med 1 log).

I studien ble det brukt tre ganger LOD-prøver istedenfor et mye høyere mutasjonsnivå for å sikre at potensiell interferens ville bli oppdaget.

En forskjell i ΔC_T av ≥ 3 standardavvik (tatt fra presisjonsstudien) mellom "testen" og "kontrollen" (f.eks., interfererende substans) ble ansett som en indikasjon på potensiell interferens.

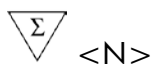
Ingen av de potensielt interfererende substansene som ble evaluert hadde en ΔC_T endring på ≥ 1 standardavvik sammenlignet med kontrollene.

Referanser

QIAGEN opprettholder en stor, oppdatert elektronisk database med vitenskapelige publikasjoner ved bruk av QIAGEN-produkter. Omfattende søkealternativer gjør at du kan finne de artiklene du har behov for, enten med et enkelt nøkkelordsøk eller ved å spesifisere applikasjonen, forskningsområdet, tittelen, osv.

Du finner en fullstendig liste over referanser i QIAGENs referansedatabase på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller ved å ta kontakt med QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Symboler



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> tester



Skal brukes innen



Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partinummer (lot)



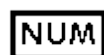
Materialnummer



Komponenter



Innhold



Nummer



Temperaturbegrensninger



Produsent



Se informasjonen som gis i håndboken

Kontaktinformasjon

Hvis du ønsker teknisk assistanse eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportsenter på www.qiagen.com/Support eller ringe 00800-22-44-6000 eller en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller www.qiagen.com).

Vedlegg: Mutasjonsdetaljer

COSMIC ID-er er hentet fra *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft) (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

Tabell 11. Liste over mutasjoner og COSMIC ID-er.

Mutasjon	Ekson	Base-endring	COSMIC-ID
T790M	20	2369C>T	6240
L858R	21	2573T>G	6224
L861Q	21	2582T>A	6213
S768I	20	2303G>T	6241
G719A	18	2156G>C	6239
G719S	18	2155G>A	6252
G719C	18	2155G>T	6253
Insertsjoner	20	2307_2308ins9	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
Delesjoner	19	2235_2249del15	6223
		2235_2252>AAT (kompleks)	13551
		2236_2253del18	12728
		2237_2251del15	12678
		2237_2254del18	12367
		2237_2255>T (kompleks)	12384
		2236_2250del15	6225
		2238_2255del18	6220
		2238_2248>GC (kompleks)	12422
		2238_2252>GCA (kompleks)	12419
		2239_2247del9	6218
		2239_2253del15	6254

Tabell 11. Liste over mutasjoner og COSMIC-ID-er (forts.)

Mutasjon	Ekson	Base-endring	COSMIC-ID
Delesjoner	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (kompleks)	12382
		2239_2258>CA (kompleks)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (kompleks)	12383

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaksjoner: 1 kontrollanalyse, 7 mutasjonsanalyser, positiv kontroll, Taq DNA-polymerase	870111
Rotor-Gene Q og tilbehør		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid. Installering og opplæring er ikke inkludert.	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid, installering og opplæring	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid. Installering og opplæring er ikke inkludert.	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid, installering og opplæring	9001580
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminumsblokk til manuelt reaksjonsoppsett med en pipette med enkeltkanal i rør på 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103

Produkt	Innhold	Katalognr.
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og lokk til 10 000 reaksjoner	981106

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfrasingelser, kan du se i den aktuelle håndboken for QIAGEN-settet eller i bruksanvisningen. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-settet er tilgjengelig på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren.

Denne siden skal være tom

Kjøp av dette produktet gjør det mulig for brukeren å utføre human in vitro-diagnostikk. Det gis ingen generelle patent- eller andre lisensrettigheter i forbindelse med kjøpet bortsett fra bruksretten.

Varemerker: QIAGEN®, QIAamp®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); ARMS® (AstraZeneca Limited); FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.).

therascreen EGFR RGQ PCR-settet er et CE-merket diagnostisk sett i samsvar med EU-direktiv 98/79/EF om medisinsk utstyr til bruk i in vitro-diagnostikk. Ikke tilgjengelig i alle land.

Begrenset lisensavtale for *therascreen* EGFR RGQ PCR-settet

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse andre kontrollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem, og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garantier for at dette settet og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
3. Dette settet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydning, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i ikke å gjøre noe eller tillate noen andre å gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

© 2012–2013 QIAGEN. Med enerett.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

