

# Handbok för *therascreen*<sup>®</sup> EGFR RGQ PCR Kit

version 1

Σ 24

**IVD**

För in vitro-diagnostisk användning

För användning med instrumentet Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM



**REF** 870111



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House, Lloyd Street

North, Manchester, M15 6SH, UK

**R4** **MAT** 1063321SV



## **QIAGEN provtagnings- och analysmetoder**

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analysmetoder som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla typer av biologiska prover. Våra avancerade, högkvalitativa produkter och tjänster säkerställer framgång från prov till resultat.

### **QIAGEN sätter standarden för:**

- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vi strävar efter att göra det möjligt för dig att nå stor framgång med din verksamhet. Besök oss gärna på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Innehåll

<b>Avsedd användning</b>	<b>5</b>
<b>Sammanfattning och förklaring</b>	<b>5</b>
<b>Användningsprinciper</b>	<b>6</b>
<b>Material som medföljer</b>	<b>9</b>
Kitets innehåll	9
<b>Material som behövs men inte medföljer</b>	<b>10</b>
<b>Varningar och säkerhetsåtgärder</b>	<b>11</b>
Säkerhetsinformation	11
Allmänna säkerhetsåtgärder	11
<b>Förvaring och hantering av reagenser</b>	<b>12</b>
<b>Förvaring och hantering av prover</b>	<b>12</b>
<b>Procedur</b>	<b>13</b>
Bestämning av vilken nivå av tumörceller som krävs för EGFR-analys	13
DNA-isolering	13
Protokoll	
■ Provbedömning	15
■ Detektion av EGFR-mutationer	17
■ Rotor-Gene Q EGFR-konfiguration	20
<b>Tolkning av resultat</b>	<b>29</b>
Analys av provbedömningsdata	29
Analys av EGFR-mutationsdata	32
Felsökningsguide	43
<b>Kvalitetskontroll</b>	<b>44</b>
<b>Begränsningar</b>	<b>44</b>
<b>Testets egenskaper</b>	<b>45</b>
Cutoff-värden	45
Detektionsgräns (LOD)	45
Precision	46
Reproducerbarhet	46
Effekt av input-DNA-koncentration	46
Interfererande substanser	47

<b>Referenser</b>	<b>47</b>
<b>Symboler</b>	<b>48</b>
<b>Kontaktinformation</b>	<b>48</b>
<b>Bilaga: Information om mutationer</b>	<b>49</b>
<b>Beställningsinformation</b>	<b>51</b>

## Avsedd användning

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är ett in vitro-diagnostiskt test för detektion av 29 somatiska mutationer i den cancerrelaterade EGFR-genen och ger en kvalitativ bedömning av mutationsstatusen.

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ska användas av utbildad personal i en professionell laboratoriemiljö med DNA-prover som har extraherats från formalinfixerad och paraffininbäddad vävnad från icke-småcellig lungcancer (NSCLC). Resultaten ska hjälpa läkarna att identifiera patienter med NSCLC som är sannolikt lämpade för behandling med tyrosinkinashämmare.

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

## Sammanfattning och förklaring

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är ett kit färdigt för användning för detektion av 29 somatiska mutationer i den cancerrelaterade EGFR-genen med PCR-teknik (polymerase chain reaction) på instrumentet Rotor-Gene Q.

Tack vare Scorpions<sup>®</sup>- och ARMS<sup>®</sup>-teknik kan *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit möjliggöra detektion av följande mutationer mot en bakgrund av vildtyp-genomiskt DNA.

- 19 borttagningar i exon 19 (detekterar närvaron av vilken som helst av de 19 borttagningarna men särskiljer dem inte)
- T790M
- L858R
- L861Q
- G719X (detekterar närvaron av G719S, G719A eller G719C men särskiljer dem inte)
- S768I
- 3 tillägg i exon 20 (detekterar närvaron av vilket som helst av de 3 tilläggen men särskiljer dem inte)

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

# Användningsprinciper

I *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit används två typer av teknik – ARMS och Scorpions – för detektion av mutationer i realtids-PCR.

## ARMS

Allel- eller mutationsspecifik amplifiering uppnås genom att använda ARMS (Amplification Refractory Mutation System). *Taq* DNA polymeras (*Taq*) är effektivt när det gäller att skilja på en matchning och en felmatchning vid 3'-ändan 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 den här proben samverkar med en quencher, även den integrerad i proben, som minskar fluorescensen. Medan PCR pågår, när proben binds till amplikon, separeras fluoroforen och quenchern. Detta leder till en ökning av fluorescens från reaktionsröret.

## 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 FAM™, och en intern kontrollanalys som är märkt med HEX™. Den interna kontrollanalysen kan detektera förekomsten av hämmare som 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.

## Procedur

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

## **Analyser:**

### **Kontrollanalys**

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

Vi uppmanar dig att använda kontrollreaktionsmixen (Ctrl) som medföljer *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit för att bedöma den totala mängden 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-positiv kontroll (PC) som en positiv kontroll och nukleasfritt vatten (H<sub>2</sub>O) som kontroll utan mall.

**Obs:** DNA-bedömningar bör baseras på PCR och kan variera i kvantifiering beroende på avläsningar av absorbans. Extra kontrollreaktionsmix (Ctrl) medföljer för bedömning av kvalitet och kvantitet av DNA i prover innan analysen med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

### **Mutationsanalys**

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

### **Kontroller**

**Obs:** Alla experimentkörningar måste innehålla följande kontroller.

#### **Positiv kontroll**

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1–8. *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit innehåller EGFR-positiv kontroll (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", NTC) i rör 9–16. NTC består av nukleasfritt vatten (H<sub>2</sub>O) som ska användas som "mall" för 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 utöver målreaktionen. Ett misslyckande indikerar antingen förekomst av hämmare som kan leda till falskt negativa resultat eller en felaktig hantering av det röret vid förberedelsen.

Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämmarna, men det leder även till spädning av mål-DNA. FAM-amplifiering kan konkurrera ut internkontrollamplifieringen så att det genererade IC  $C_T$  (HEX)-värdet kan hamna utanför angivet intervall. FAM-resultaten är fortfarande giltiga för dessa prover.



# Material som medföljer

## Kitets innehåll

<b><i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>Katalognr</b>			<b>870111</b>
<b>Antal reaktioner</b>			<b>24</b>
Röd	Control Reaction Mix (Kontrollreaktionsmix)	Ctrl	2 x 600 µl
Lila	T790M Reaction Mix (T790M-reaktionsmix)	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (Reaktionsmix för borttagningar)	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R-reaktionsmix)	L858R	600 µl
Grön	L861Q Reaction Mix (L861Q-reaktionsmix)	L861Q	600 µl
Gul	G719X Reaction Mix (G719X-reaktionsmix)	G719X	600 µl
Grå	S768I Reaction Mix (S768I-reaktionsmix)	S768I	600 µl
Blå	Insertions Reaction Mix (Reaktionsmix för tillägg)	Ins	600 µl
Brun	EGFR Positive Control (EGFR-positiv kontroll)	PC	300 µl
Turkos	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeras)	Taq	138 µl
Vit	Nuclease-Free Water (Nukleasfritt vatten)	H <sub>2</sub> O	2 x 1,9 ml
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit Handbook (handbok på engelska)			1

## Material som behövs men inte medföljer

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

- DNA-isoleringskit (se "DNA-isolering", sidan 13)
- Xylen
- Etanol (96–100 %)\*
- 1,5 ml eller 2 ml mikrocentrifugrör (för lyseringssteg)
- 1,5 ml mikrocentrifugrör (för elueringssteg) (kan beställas från Brinkmann [Safe-Lock, kat.nr 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat.nr 0030 120.086], eller Sarstedt [Safety Cap, kat.nr 72.690])†
- Särskilda pipetter‡ (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 rekommenderar vi pipettspetsar med aerosolbarriär)
- Termomixer, uppvärmd skakinkubator, värmeblock eller vattenbad som klarar inkubation på 90 °C†
- Bänkcentrifug‡ med rotor för 2 ml-reaktionsrör
- Vortex
- Instrumentet Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM‡§ med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Yellow (detektion av FAM respektive HEX)
- Programmet Rotor-Gene Q, version 2.0.2 eller högre
- Remsa för rör med lock, 0,1 ml, för användning med rotor med 72 brunnar (kat.nr 981103 eller 981106)
- DNase-, RNase- och DNA-fria mikrocentrifugrör för beredning av huvudmixar
- Laddningsblock för 72 x 0,1 ml-rör, aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett (QIAGEN, kat.nr 9018901)

\* Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

† Detta är inte en fullständig lista över leverantörer.

‡ Se till att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

§ Instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM om tillämpligt.

Kallas även Rotor-Gene Q MDx i vissa länder.

# Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

## Säkerhetsinformation

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

## Information dygnet runt vid nödsituation

Information om kemikalier och assistans vid olycka kan fås akut dygnet runt från:

CHEMTREC

**USA och Kanada** ■ Tel: 1-800-424-9300

**Utanför USA och Kanada** ■ Tel: +1-703-527-3887 (mottagaren betalar samtalet)

## Allmänna säkerhetsåtgärder

Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- Använd DNase-, RNase- och DNA-fria pipettspetsar med filter och kontrollera att pipetterna har kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.
- Förvara och extrahera positivt material (prover och positiva kontroller) separerat från alla andra reagenser, och addera dem till reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Tina alla komponenter omsorgsfullt i rumstemperatur (15–25 °C) innan analysen påbörjas.
- När komponenterna tinats ska de blandas genom att vända varje rör 10 gånger och centrifugeras en kort stund.

**Obs:** Iakttag 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.

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

**Obs:** Alla reagenser i *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit har utformats särskilt för att användas med de angivna testerna. Alla reagenser som medföljer *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser i samma *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit. För att bästa effekt ska kunna garanteras får kitets reagenser inte bytas ut mot något annat reagens.

**Obs:** Använd endast det *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) som medföljer i kitet. Byt inte ut mot *Taq* DNA-polymeras från andra kit av samma typ eller annan typ, och byt inte heller ut mot *Taq* DNA-polymeras från en annan leverantör.

**Obs:** Reagenser till *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit har späts ut optimalt. Vi rekommenderar inte ytterligare spädning av reagenser då det kan resultera i förlorad prestanda. Vi rekommenderar inte användning av reaktionsvolymer på mindre än 25 µl då det ökar risken för falskt negativa resultat.

## Förvaring och hantering av reagenser

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit levereras på torris och måste vara fruset 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 någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ska vid mottagandet omedelbart förvaras i –15 °C till –25 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus. Vid korrekt förvaring i originalförpackningen enligt rekommendationerna är kitet hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Vi rekommenderar att kitet tinas högst 7 gånger.

**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.

## Förvaring och hantering av prover

**Obs:** Alla prover ska betraktas som potentiellt smittbärande material.

Provmaterialet måste vara mänskligt, genomiskt DNA taget från formalinfixerade och paraffinbäddade (FFPE) icke-småcelliga

lungtumörprover. 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 EGFR-mutationer som detekteras av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

## Procedur

### Bestämning av vilken nivå av tumörceller som krävs för EGFR-analys

Den vävnad som används för EGFR-analys är formalinfixerade och paraffinbäddade (FFPE) vävnadsprover från icke-småcellig lungcancer (NSCLC). DNA som extraherats från celler i denna tumörvävnad kan vara vildtyp avseende EGFR-mutationer eller kan bära på en eller flera mutationer.

Den FFPE NSCLC-vävnad som används för extraheringen kan också innehålla normal, tumörfri vävnad, vilken kommer att vara vildtyp avseende EGFR-mutationer. Vildtyps-DNA från denna vävnad kan späda mutant-DNA, potentiellt till en nivå som kitet inte kan detektera. Det rekommenderas dock att även prover med låga tumörnivåer testas eftersom det finns chans att högnivåmutationer detekteras och ett beslut om behandling för patienten då kan tas.

Maximera chansen att detektera mutationer genom att göra på följande sätt.

- Hematoxylin-eosin-färgning (H&E) på minst ett objektglas från varje patientprov.
- Säkerställ att en patolog granskar det färgade objektglaset för närvaro av tumör.
- Om möjligt bör patologen granska flera objektglas från FFPE-blocket.
- Alla prover med närvaro av tumör kan testas med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.

### DNA-isolering

DNA-isolering måste utföras med hjälp av QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit.

Utför DNA-reningen enligt instruktionerna i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) med följande ändringar.

- Samla FFPE-sektioner på objektglas.
- Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnadssektionerna med en ny, steril skalpell.

- Skrapa ned vävnadssektionerna i mikrocentrifugrör med hjälp av en ny skalpell för varje prov som ska extraheras.
- Nedbrytning av proteinas K ska utföras i 1 timme.
- Renat genomiskt DNA måste elueras i 200  $\mu$ l ATE-buffert (medföljer i QIAamp DNA FFPE Tissue Kit).
- Förvara renat genomiskt DNA i  $-15^{\circ}\text{C}$  till  $-30^{\circ}\text{C}$ .
- Där information finns tillgänglig ska objektglas som angränsar till det H&E-färgade objektglaset med det största tumörinnehållet användas.

**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.

## Protokoll: Provbedömning

Det här protokollet ska användas vid bedömning av den totala mängden amplifierbart DNA i prover.

### Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar proceduren ska du läsa "Allmänna säkerhetsåtgärder", sidan 11.
- Ta dig tid att bekanta dig med Rotor-Gene Q innan du startar protokollet. Se användarhandboken till instrumentet.
- Vortexa inte *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) eller någon mix som innehåller *Taq* DNA-polymeras (*Taq*), eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) genom att placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.

### Saker som ska göras före start

- Före varje användning måste alla reagenser tinas helt 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.
- Låt *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) uppnå rumstemperatur (15–25 °C) före varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

### Procedur

1. **Tina kontrollreaktionsmix (Ctrl), nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (NTC) och EGFR-positiv kontroll (PC) i rumstemperatur (15–25 °C).** 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.
2. **Bered tillräckligt med huvudmixar för DNA-proverna, en positiv kontrollreaktion och en kontrollreaktion utan mall enligt volymerna i Tabell 1. Inkludera reagenser för 1 extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.**

Huvudmixen innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

**Tabell 1. Beredning av huvudmix för kontrollanalys\***

Komponent	Volym/reaktion (µl)
Kontrollreaktionsmix (Ctrl)	19,5
Taq DNA-polymeras (Taq)	0,5
<b>Total volym</b>	<b>20,0</b>

\* Vid beredning av huvudmixen ska du bereda tillräckligt för ett extra prov.

- 3. Blanda huvudmixen noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i PCR-rör (medföljer ej).**

**Obs:** För provbedömning ska huvudmix för kontrollanalys tillsättas i en positiv kontrollbrunn, en negativ kontrollbrunn och en brunn för varje prov.

- 4. Tillsätt omedelbart 5 µl prov med nukleasfritt vatten (H<sub>2</sub>O) i röret med kontroll utan mall (PCR-rör nummer 9) och förslut röret. Tillsätt 5 µl prov-DNA i provrören och förslut rören. Tillsätt 5 µl EGFR-positiv kontroll (PC) i röret med positiv kontroll (PCR-rör 1) och förslut röret.**
- 5. Placera PCR-rören i sina korrekta positioner i rotorn och kontrollera visuellt att alla rör innehåller samma volym.**

**Obs:** Säkerställ att rören inte förväxlas när de överförs till rotorn.

- 6. Om rotorn inte fylls ska tomrummen fyllas med förslutna tomma rör.**
- 7. Placera omedelbart rotorn med 72 brunnar i instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM. Se till att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.**
- 8. I avsnittet om konfiguration av Rotor-Gene Q (se "Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-konfiguration", sidan 20) finns information om hur du skapar en temperaturprofil och startar körningen.**

**Tabell 2. Cykelparametrar**

Cykler	Temperatur	Tid	Datahämtning
1	95 °C	15 minuter	Inget
40	95 °C	30 sekunder	Inget
	60 °C	60 sekunder	Grön och gul

- 9. När körningen är avslutad analyserar du data enligt "Analys av provbedömningsdata", sidan 29.**



## Protokoll: Detektion av EGFR-mutationer

Detta protokoll är avsett för detektion av EGFR-mutationer. När ett prov har klarat provbedömningen kan det testas med EGFR-mutationsanalys.

### Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar proceduren ska du läsa "Allmänna säkerhetsåtgärder", sidan 11.
- Ta dig tid att bekanta dig med Rotor-Gene Q innan du startar protokollet. Se användarhandboken till instrumentet.
- Vortexa inte *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) eller någon mix som innehåller *Taq* DNA-polymeras, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- För effektiv användning av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit måste prover grupperas i en batchstorlek på 7 för att fylla rotorn med 72 brunnar. Mindre batchstorlekar innebär att färre prover kan testas med *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit.
- Pipettera *Taq* genom att placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.
- För varje DNA-prov måste kontroll- och mutationsanalyserna analyseras i samma PCR-körning för att undvika variationer mellan körningarna.

### Saker som ska göras före start

- Före varje användning måste alla reagenser tinas helt 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.

### Procedur

1. Tina reaktionsmix, nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (NTC) och EGFR-positiv kontroll (PC) i rumstemperatur (15–25 °C). 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.

2. **Bered tillräckligt med huvudmixar för DNA-proverna, en positiv kontrollreaktion och en kontrollreaktion utan mall enligt volymerna i Tabell 3. Inkludera reagenser för 1 extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.**

Huvudmixen innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

**Tabell 3. Beredning av huvudmix\***

Komponent	Volym/reaktion (µl)
Reaktionsmix	19,5
<i>Taq</i> DNA-polymeras ( <i>Taq</i> )	0,5
<b>Total volym</b>	<b>20,0</b>

\* Vid beredning av huvudmixen ska du bereda tillräckligt för ett extra prov.

3. **Blanda varje huvudmix noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje PCR-rör (medföljer ej).**
4. **Tillsätt omedelbart 5 µl nukleasfritt vatten (H<sub>2</sub>O) i PCR-rören med kontroll utan mall (PCR-rör 9–16) och förslut rören. Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (PCR-rör 17–72) och förslut rören. Tillsätt 5 µl EGFR-positiv kontroll (PC) i rören med positiv kontroll (PCR-rör 1–8). Varje DNA-prov måste testas med både kontrollen och alla mutationsanalyser. Layouten visas i Tabell 4.**

**Tabell 4. Layout för kontroll- och mutationsanalyser**

Analys	Kontroller		Provnummer						
	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
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

5. Placera PCR-rören i sina korrekta positioner i rotorn och kontrollera visuellt att alla rör innehåller samma volym.  
**Obs:** Säkerställ att rören inte förväxlas när de överförs till rotorn.
6. Om rotorn inte fylls ska tomrummen fyllas med förslutna tomma rör.
7. Placera omedelbart rotorn i instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM. Se till att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.
8. I avsnittet om konfiguration av Rotor-Gene Q (se "Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-konfiguration", sidan 20) finns information om hur du skapar en temperaturprofil och startar körningen.

**Tabell 5. Cykelparametrar**

Cykler	Temperatur	Tid	Datahämtning
1	95 °C	15 minuter	Inget
40	95 °C	30 sekunder	Inget
	60 °C	60 sekunder	Grön och gul

9. När körningen är avslutad analyserar du data enligt "Analys av EGFR-mutationsdata", sidan 32. ■

## Protokoll: Rotor-Gene Q EGFR-konfiguration

Det här protokollet beskrivs i "Protokoll: Provbedömning", sidan 15 och "Protokoll: Detektion av EGFR-mutationer", sidan 17.

### Procedur

#### 1. Skapa en temperaturprofil enligt följande steg.

Ställa in allmänna analysparametrar	Bild 1–3
Initial aktivering av hot-start-enzym	Bild 4
Amplifiering av DNA	Bild 5–7
Justera fluorescenskanalerna	Bild 8–12
Starta körningen	Bild 13

En sammanfattning av cykelparametrarna finns nedan.

**Tabell 6. Cykelparametrar**

Cykler	Temperatur	Tid	Datahämtning
1	95 °C	15 minuter	Inget
40	95 °C	30 sekunder	Inget
	60 °C	60 sekunder	Grön och gul

Alla specifikationer refererar till programmet Rotor-Gene Q version 2.0.2. Mer information om programmering av Rotor-Gene-instrument finns i användarhandboken till respektive instrument. I bilderna har dessa inställningar ramats in i svart.

- Dubbelklicka på programikonen för Rotor-Gene Q-programmet 2.0.2 på skrivbordet på den dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM. Välj fliken "Advanced" [Avancerat] i dialogrutan "New Run" [Ny körning] som visas.**
- 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].**

4. 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] (Bild 1).

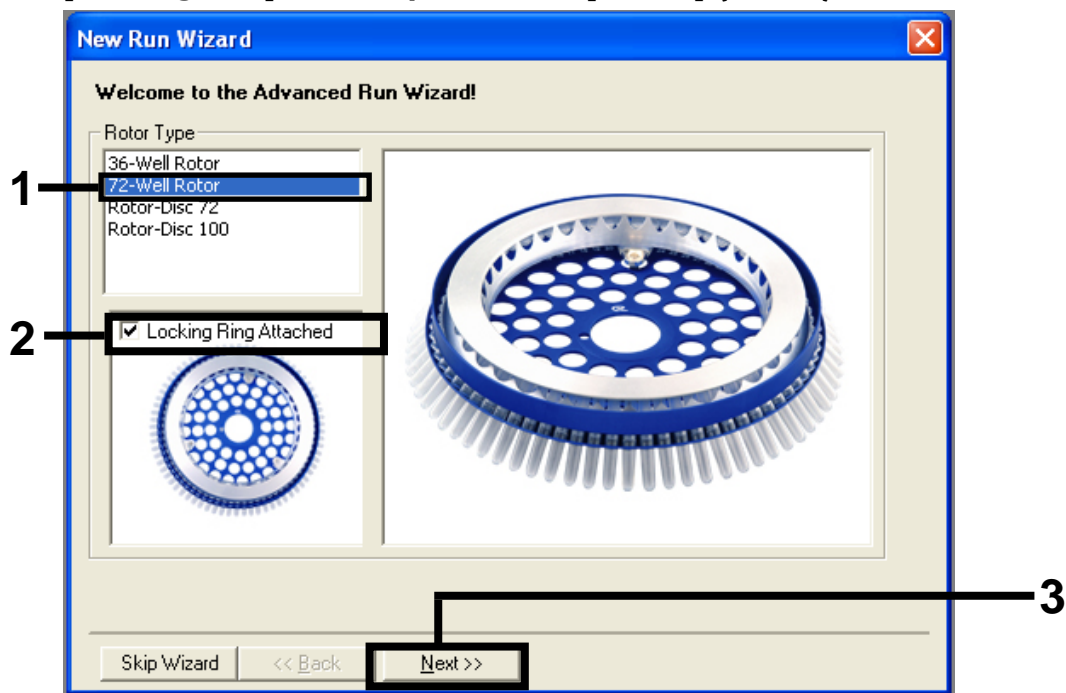


Bild 1. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning].

5. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och ange reaktionsvolymen 25. Kontrollera att det i rutan "Sample Layout" [Provlayout] står "1,2,3...". Klicka på "Next" [Nästa] (Bild 2).

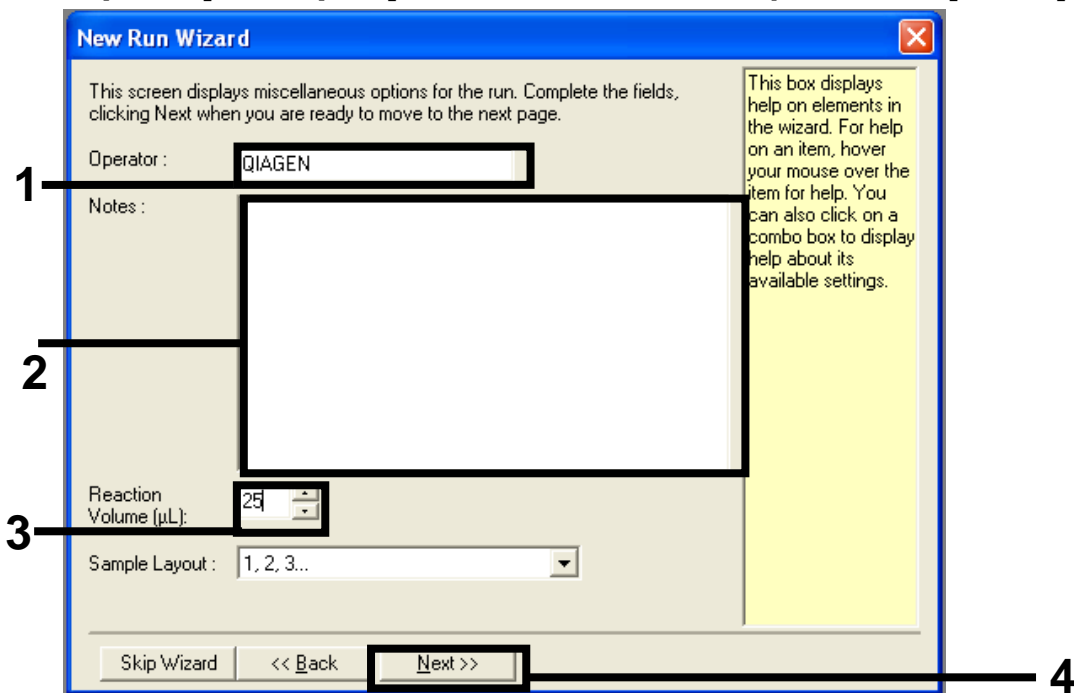


Bild 2. Ställa in allmänna analysparametrar.

6. Klicka på knappen "Edit Profile" [Ändra profil] i nästa dialogruta i "New Run Wizard" [Guide för ny körning] (Bild 3) och programmera temperaturprofilen enligt informationen i följande steg.



Bild 3. Ändra profilen.

7. Klicka på knappen "Insert after" [Sätt in efter] och välj *New Hold at Temperature* [Ny bibehållning vid temperatur] (Bild 4).

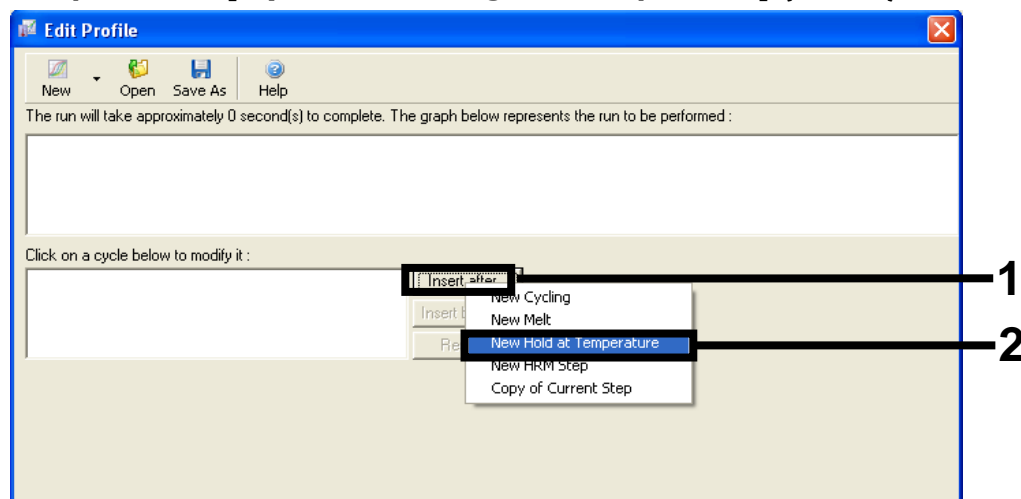


Bild 4. Initialt inkubationssteg vid 95 °C.

8. Ändra "Hold Temperature" [Bibehållen temperatur] till 95 °C och "Hold Time" [Bibehållen tid] till 15 minuter. Klicka på knappen "Insert after" [Sätt in efter] och välj New Cycling [Ny cykling] (Bild 5).

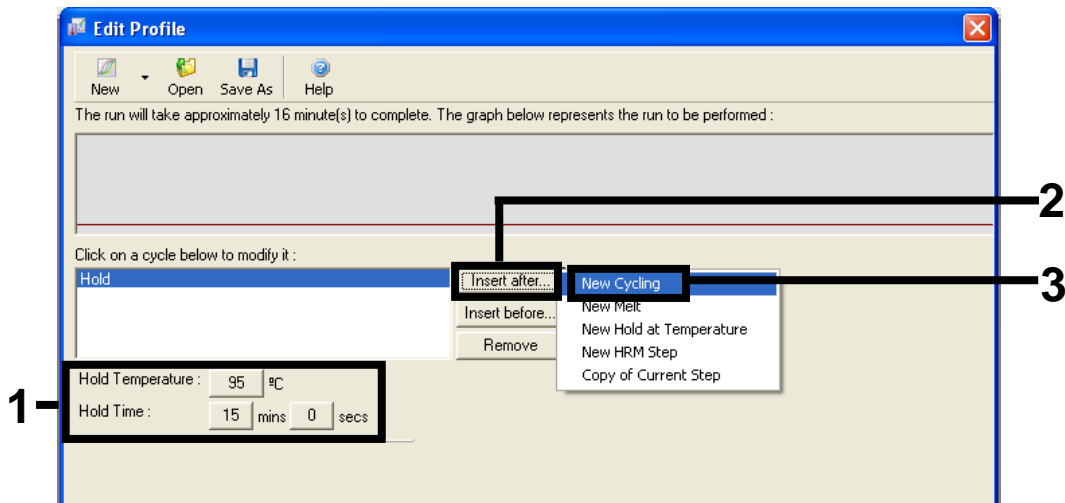


Bild 5. Initialt inkubationssteg vid 95 °C.

9. Ändra antalet cykelrepetitioner till 40. Välj det första steget och ställ in på 95°C for 30 secs [95 °C i 30 sekunder] (Bild 6).

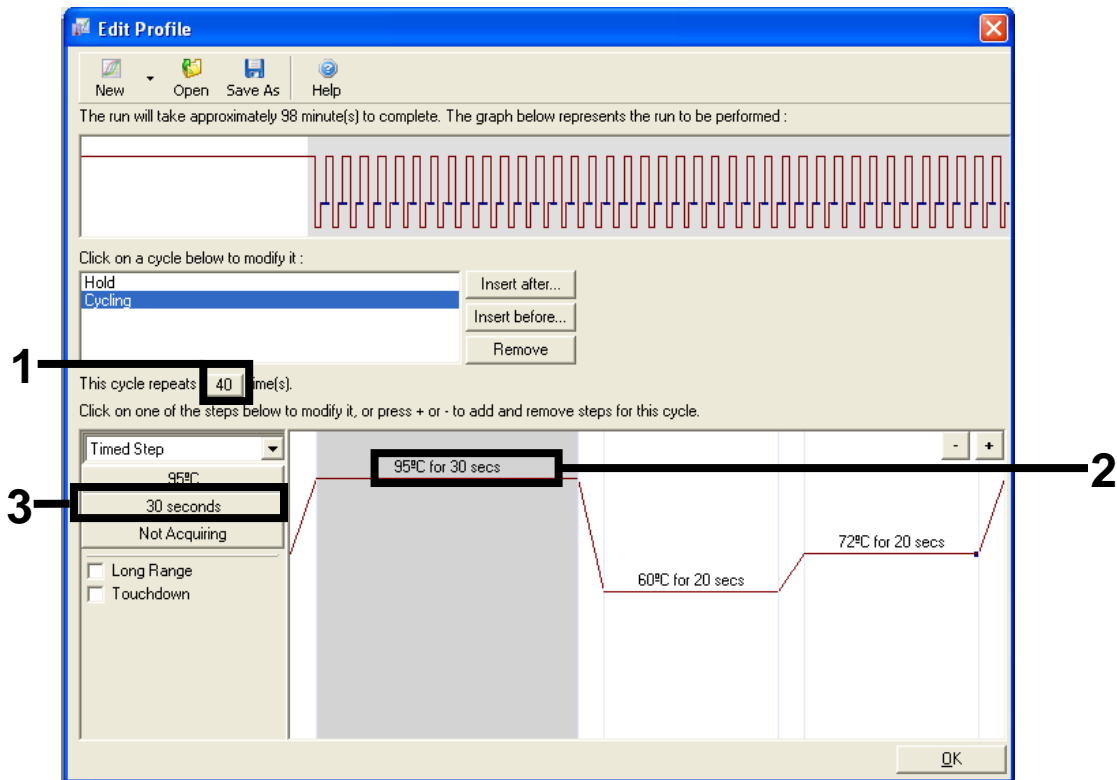


Bild 6. Cyklingssteg vid 95 °C.

10. Markera det andra steget och ställ in på 60°C for 60 secs [60 °C i 60 sekunder]. Aktivera datahämtning under det här steget genom att välja knappen "Not Acquiring" [Hämtar inte] (Bild 7).

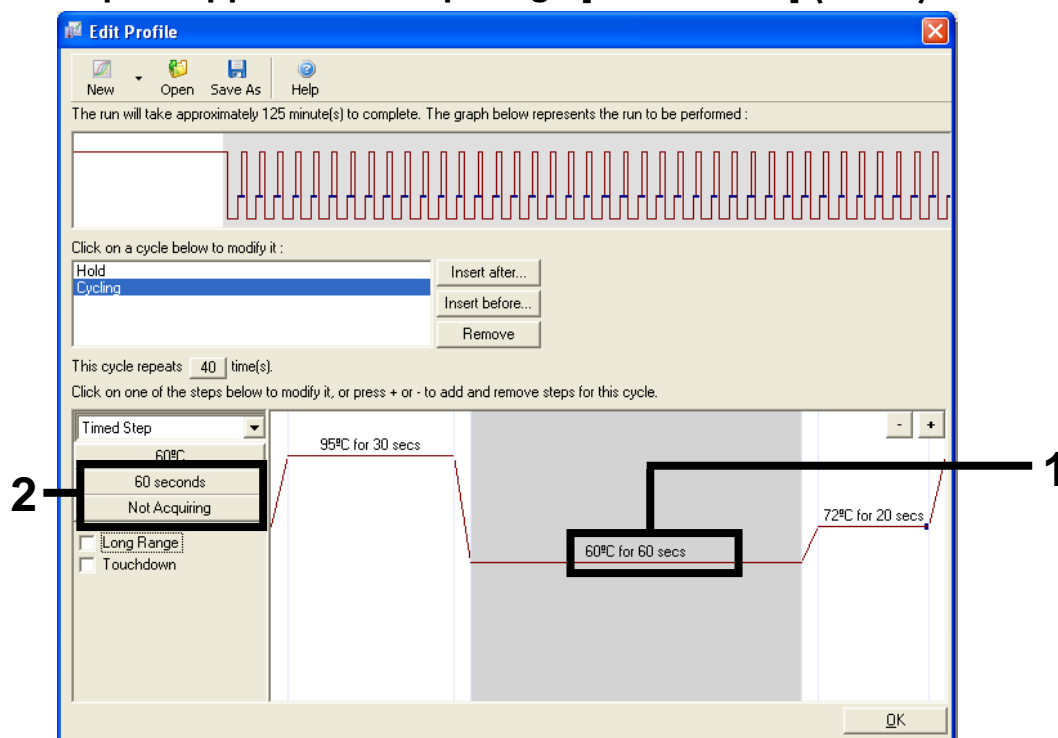


Bild 7. Cyklingssteg vid 60 °C.

11. Ange Green [Grön] och Yellow [Gul] som hämtningskanaler genom att välja knappen ">" för att överföra dem från listan "Available Channels" [Tillgängliga kanaler]. Klicka på "OK" (Bild 8).

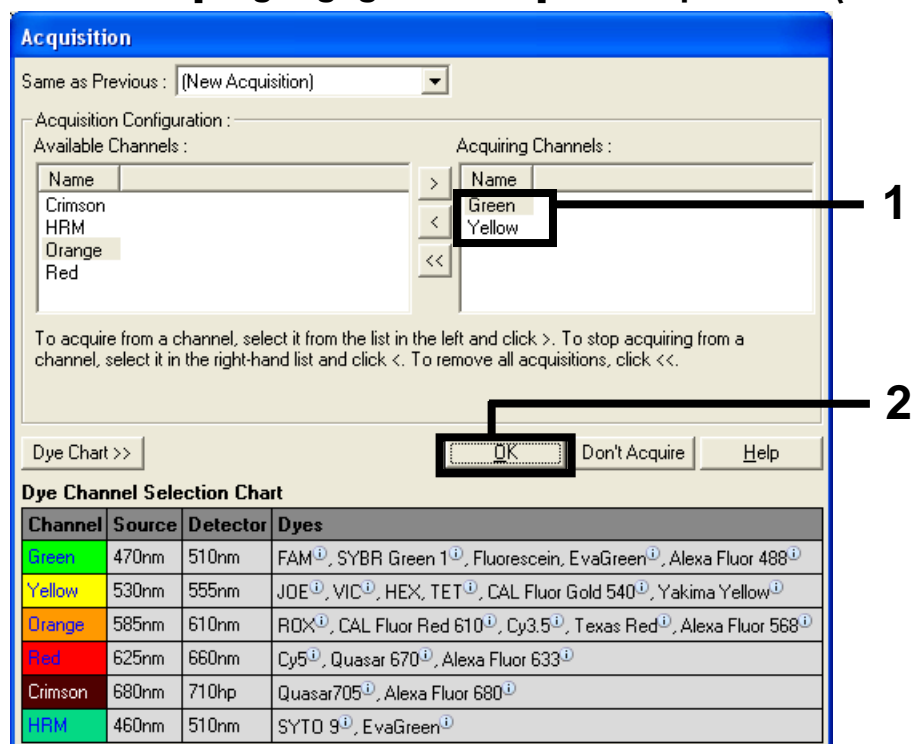


Bild 8. Hämtning vid cyklingssteg vid 60 °C.



12. Markera det tredje steget och ta bort det genom att klicka på knappen "-". Klicka på "OK" (Bild 9).

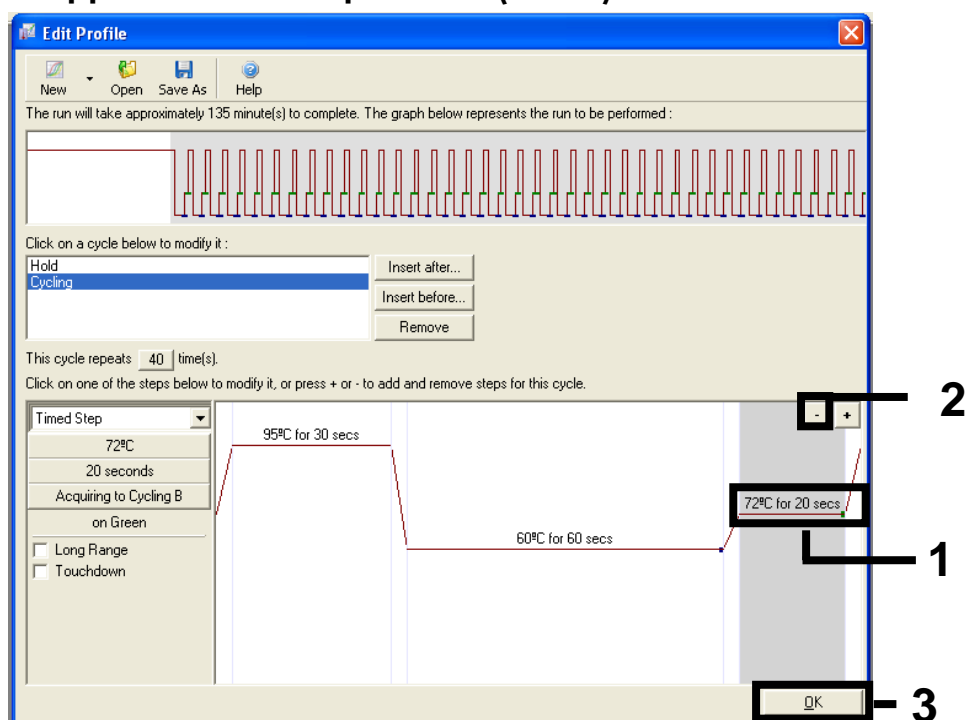


Bild 9. Ta bort förlängningssteg.

13. I nästa dialogruta klickar du på knappen "Gain Optimisation" [Optimering av förstärkning] (Bild 10).

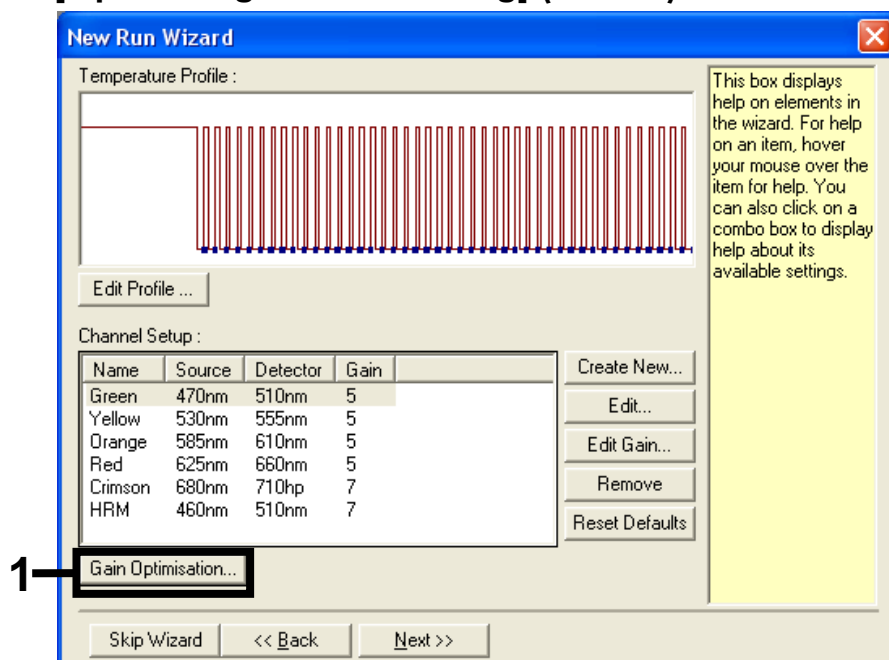


Bild 10. Optimering av förstärkning.

14. Klicka på knappen "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning]. Kanalinställningarna för varje kanal visas. Godkänn dessa standardvärden genom att klicka på "OK" för båda kanalerna (Bild 11).

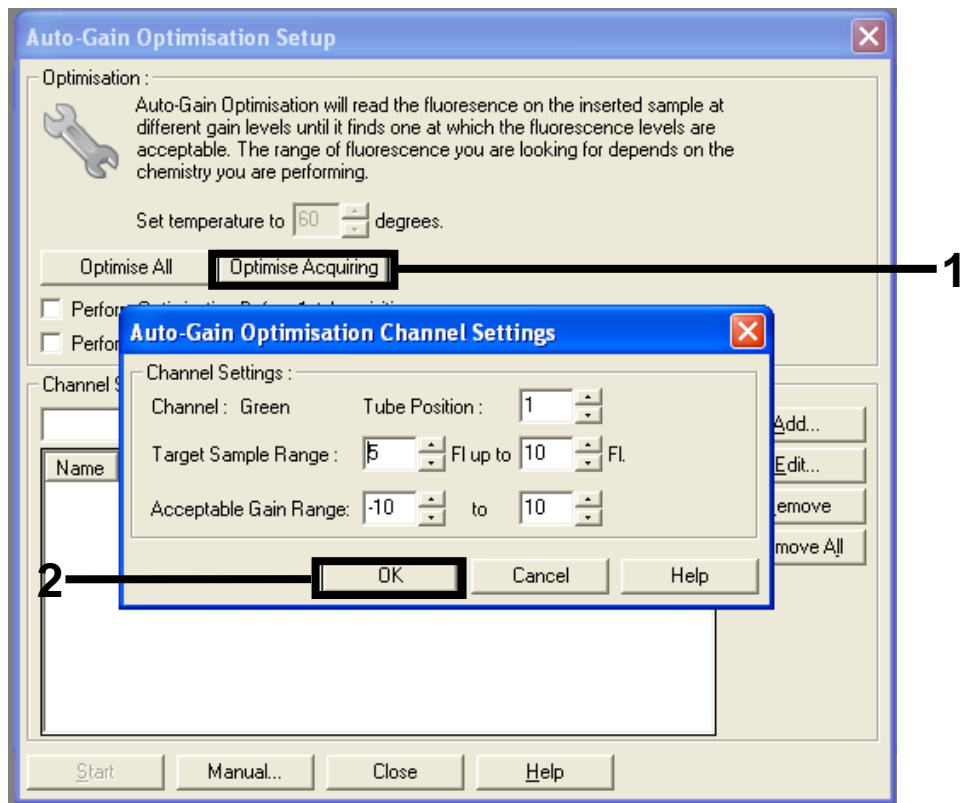


Bild 11. Automatisk nivåoptimering för den gröna kanalen.

15. Markera kryssrutan "Perform Optimisation before 1st Acquisition" [Utför optimering före första hämtning] och klicka på knappen "Close" [Stäng] för att återgå till guiden (Bild 12).

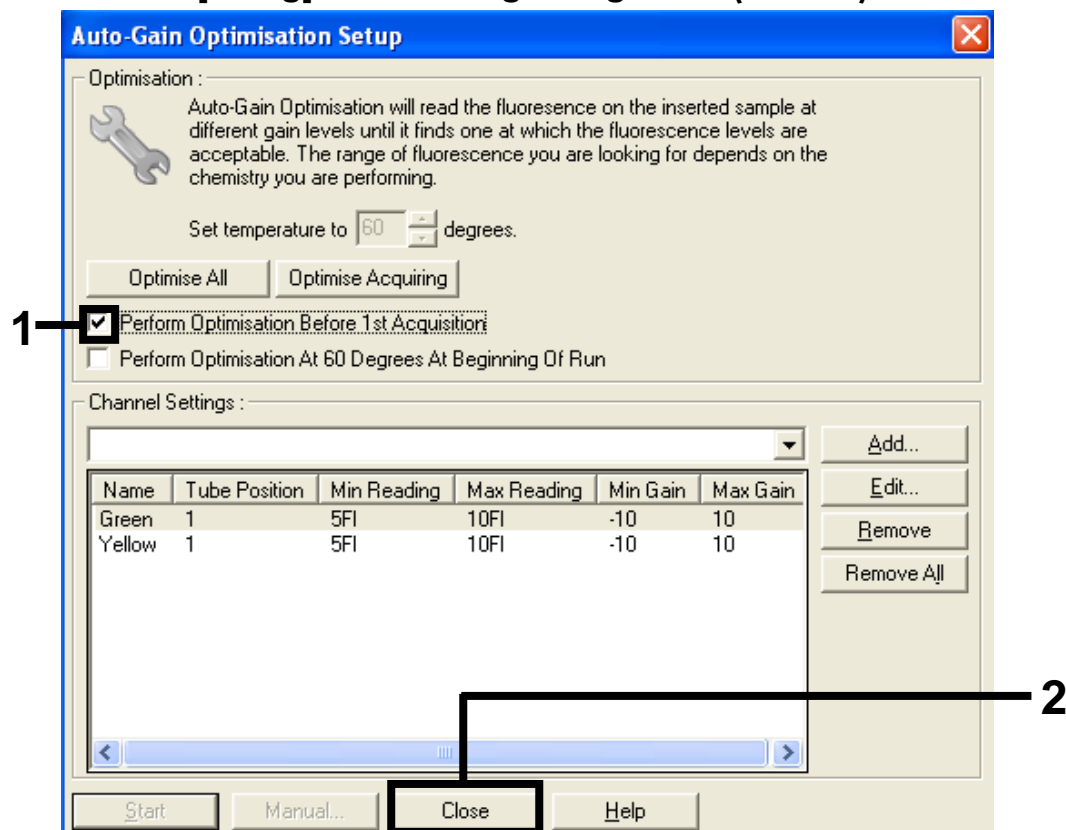


Bild 12. Val av gröna och gula kanaler.

16. Klicka på "Next" [Nästa] för att spara mallen på en lämplig plats genom att välja "Save Template" [Spara mall].

17. Kontrollera sammanfattningen och klicka på "Start Run" [Starta körning] för att spara körningsfilen och starta körningen (Bild 13).

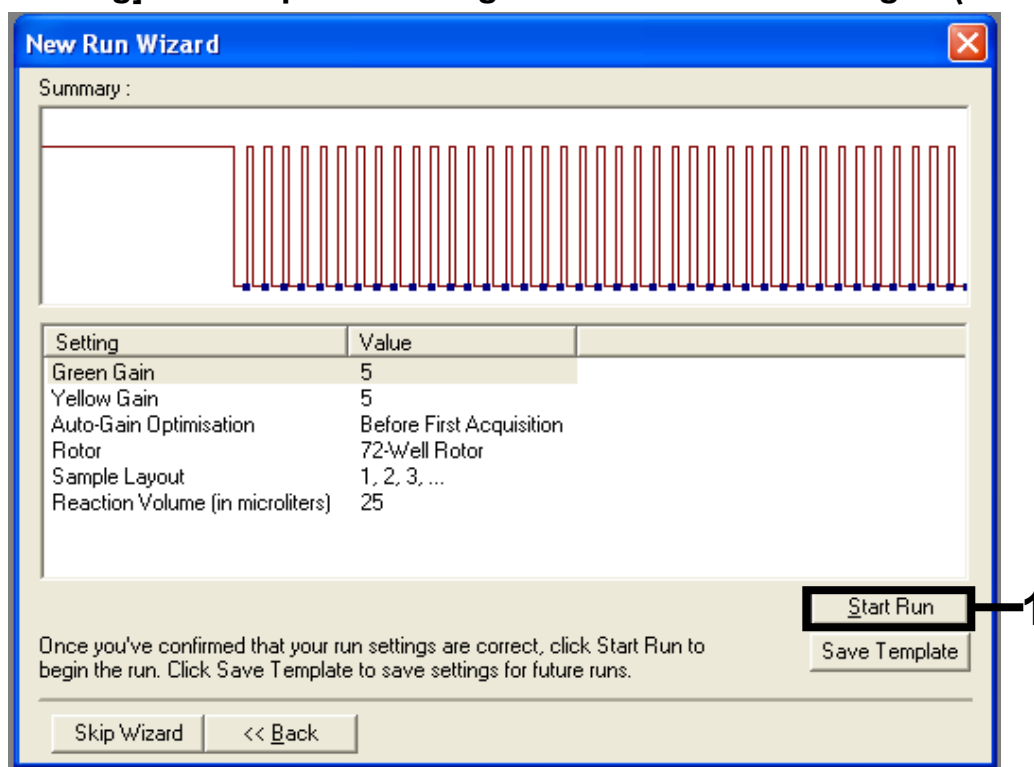


Bild 13. Starta körningen.

18. När körningen har startats visas ett nytt fönster där du antingen kan ange provnamn nu eller klicka på "Finish" [Avsluta] och ange namnen senare genom att välja knappen "Sample" [Prov] under körningen eller när körningen är avslutad.
19. När körningen är avslutad analyserar du data enligt motsvarande protokoll:
- För provbedömning, se "Analys av provbedömningsdata", sidan 29.
  - För mutationsanalys, se "Analys av EGFR-mutationsdata", sidan 32.

# Tolkning av resultat

## $\Delta C_T$ -analysmetod

Scorpions realtids-analyser använder det antal PCR-cykler som krävs för att detektera en fluorescenssignal över en bakgrundssignal som ett mått på de målmolekyler som förekommer i början av reaktionen. Den punkt där signalen upptäcks över bakgrundsfluorescensen kallas "cykeltröskelvärde" (Cycle threshold,  $C_T$ ).

Provets  $\Delta C_T$ -värde beräknas som differensen mellan mutationsanalysens  $C_T$  och kontrollanalysens  $C_T$  från samma prov:

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

**Obs:** Prover klassas som mutationspositiva om de ger ett  $\Delta C_T$ -värde lägre än  $\Delta C_T$ -gränsvärdet för den analysen. Över det här värdet kan provet antingen innehålla mindre än den procentandel mutation som kan detekteras av kitet (bortom gränsen för analyserna) eller vara mutationsnegativt.

**Obs:** Mutation med  $C_T$ -värden på 40 eller mer klassas som negativa eller bortom kitets gränser.

Om ARMS-primers används kan ineffektiv priming ske, vilket ger ett väldigt sent bakgrunds- $C_T$  från DNA som inte innehåller mutation. Alla  $\Delta C_T$ -värden som är beräknade genom bakgrundsamplifiering kommer att vara större än  $\Delta C_T$ -gränsvärdena och provet kommer att klassas som mutationsnegativt.

## Analys av provbedömningsdata

När körningen är avslutad analyserar du data enligt följande procedur.

### Programinställningar för analys

1. Öppna aktuell fil med Rotor-Gene Q-programversion (2.0.2) eller senare.
2. Kontrollera att proverna är märkta.
3. På sidan med rådata för fluorescens för varje detektor/kanal klickar du på "Options" [Alternativ] och anger *Crop start cycles* [Ta bort startcykler]. På sidan med "Remove data before cycle" [Ta bort data innan cykel] skriver du 15 och klickar på "OK".
4. Klicka på "Analysis" [Analys]. På analysidan klickar du på "Cycling A (from 15), Yellow" [Cykling A (från 15), gul] för att bekräfta HEX-kanalen.
5. Kontrollera att "dynamic tube" [dynamiskt rör] är markerat. Klicka på "Slope correct" [Lutning korrekt] och "Linear scale" [Linjär skala].
6. Ställ in tröskeln på 0,02 och bekräfta HEX  $C_T$ -värdena.

7. På analysidan klickar du på "Cycling A (from 15), Green" [Cykling A (från 15), grön] för att visa FAM-kanalen.
8. Det dynamiska röret ska vara markerat. Klicka på "Slope correct" [Lutning korrekt] och "Linear scale" [Linjär skala].
9. Ställ in tröskeln på 0,075 och bekräfta FAM C<sub>T</sub>-värdena.

När körningen har avslutats ska data analyseras enligt nedan.

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får NTC inte generera ett C<sub>T</sub>-värde i den gröna kanalen (FAM) under 40. Se "Kommentar om tolkning av data" på sidan 38 för viktig information om hur diagram över kontroll utan mall (NTC) analyseras. För att garantera att körningen konfigurerades korrekt måste NTC visa amplifiering i intervallet 31–37 i den gula kanalen (HEX).  
Om det finns en positiv amplifiering i den gröna kanalen och/eller amplifiering utanför intervallet 31–37 i den gula signalen måste provresultaten kasseras.
- **Positiv kontroll:** Den EGFR-positiva kontrollen (PC) måste ge ett kontrollanalys-C<sub>T</sub> (FAM-kanal) på 26,26–30,95. En körning med ett C<sub>T</sub>-värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och ska anses som misslyckad. Om det positiva kontrollanalys-C<sub>T</sub> är 26,26–30,95 (exon 2, FAM) men internkontrollens C<sub>T</sub> (HEX) ligger utanför intervallet 31–37 fortsätter du med analysen.

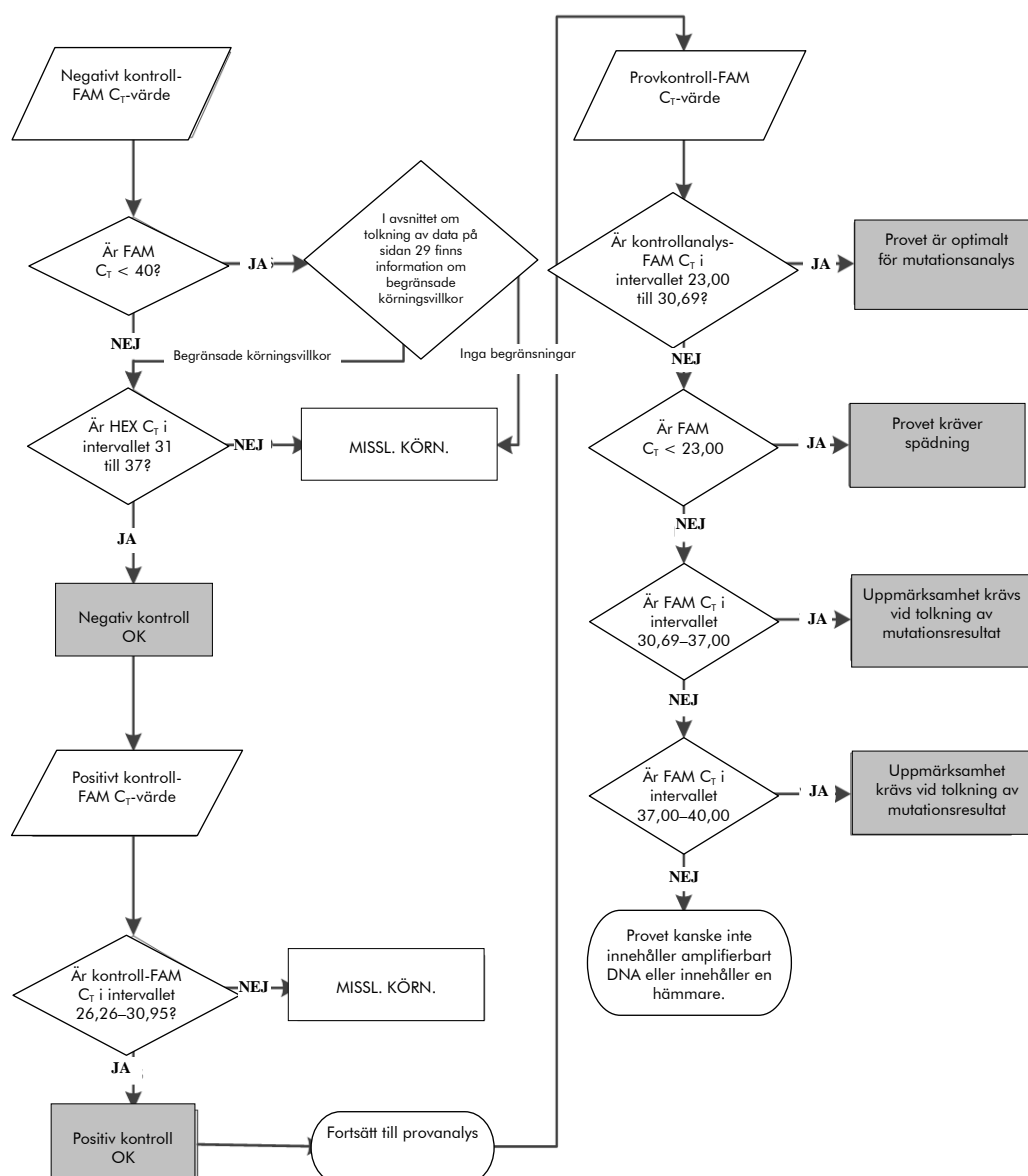
**Obs:** Om någon av de här två körningskontrollerna har misslyckats bör provdata inte användas.

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga måste varje prov-C<sub>T</sub>-värde ligga inom intervallet 23–30,69 i den gröna kanalen (FAM). Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

- **Provkontrollanalysens C<sub>T</sub> är < 23:** Prover med ett kontroll-C<sub>T</sub> på < 23 skulle överbelasta mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom intervallet ovan baserat på att spädning till hälften kommer att öka C<sub>T</sub> med 1.
- **Provkontrollanalysens C<sub>T</sub> är 30,69–37:** Gör försiktiga tolkningar, eftersom mutationer med väldigt låg nivå inte kan upptäckas.
- **Provkontrollanalysens C<sub>T</sub> är 37–40:** Gör försiktiga tolkningar, eftersom endast mutationer med väldigt hög nivå upptäcks.
- **Provkontrollanalysens C<sub>T</sub> är > 40:** Provet innehåller inte tillräckligt med DNA för att kunna analyseras.

**Obs:** Om ett prov inte genererar ett  $C_T$  (dvs.  $C_T > 40$ ) kan det bero på förekomst av hämmare, ett fel i analyskonfigurationen eller att det inte finns något amplifierbart EGFR DNA.

- **Internkontrollens  $C_T$ -värde är 31–37:** Det finns inget amplifierbart EGFR DNA.
- **Internkontrollens  $C_T$ -värde ligger inte inom intervallet 31–37:** Det kan bero på ett fel i analyskonfigurationen eller på förekomst av hämmare. Det är möjligt att minska effekten av en hämmare genom att späda provet, även om detta också leder till spädning av DNA.



**Bild 14. Analys av provbedömningsdata.**

## Analys av EGFR-mutationsdata

När körningen är avslutad analyserar du data enligt följande procedur.

### Programinställningar för analys

1. Öppna aktuell fil med Rotor-Gene Q-programversion (2.0.2) eller senare.
2. Kontrollera att proverna är märkta.
3. På sidan med rådata för fluorescens för varje detektor/kanal klickar du på "Options" [Alternativ] och anger *Crop start cycles* [Ta bort startcykler]. På sidan med "Remove data before cycle" [Ta bort data innan cykel] skriver du 15 och klickar på "OK".
4. Klicka på "Analysis" [Analys]. På analysidan klickar du på "Cycling A (from 15), Yellow" [Cykling A (från 15), gul] för att visa HEX-kanalen.
5. Kontrollera att "dynamic tube" [dynamiskt rör] är markerat. Klicka på "Slope correct" [Lutning korrekt] och "Linear scale" [Linjär skala].
6. Ställ in tröskeln på 0,02 och bekräfta HEX  $C_T$ -värdena.
7. På analysidan klickar du på "Cycling A (from 15), Green" [Cykling A (från 15), grön] för att visa FAM-kanalen.
8. Kontrollera att "dynamic tube" [dynamiskt rör] är markerat. Klicka på "Slope correct" [Lutning korrekt] och "Linear scale" [Linjär skala].
9. Ställ in tröskeln på 0,075 och bekräfta FAM  $C_T$ -värdena.

### Kör kontrollanalys:

Se flödesdiagrammet "Run Control Analysis" [Kör kontrollanalys] i Bild 15.

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får NTC inte generera ett  $C_T$ -värde i den gröna kanalen (FAM) under 40. Se "Kommentar om tolkning av data" på sidan 38 för viktig information om hur diagram över kontroll utan mall (NTC) analyseras. För att garantera att körningen konfigurerades korrekt måste NTC visa amplifiering för  $C_T$  31–37 i den gula kanalen (HEX).

Om det finns en positiv amplifiering i den gröna kanalen och/eller amplifiering utanför intervallet 31–37 i den gula signalen måste provresultaten kasseras.

- **Positiv kontroll:** Den EGFR-positiva kontrollen (PC) måste ge ett kontrollanalys- $C_T$  på 26,26–30,95 i den gröna kanalen. En körning med ett  $C_T$ -värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och ska anses som misslyckad. Om det positiva kontrollanalys- $C_T$  är 26,26–30,95 (exon 2, FAM) men internkontrollens  $C_T$  (HEX) ligger utanför intervallet 31–37 fortsätter du med analysen.



Beräkna  $\Delta C_T$ -värdet för varje mutationsanalys enligt nedan, för att garantera att mutations- och kontroll- $C_T$ -värdena kommer från den positiva kontrollen.

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

$\Delta C_T$ -värdena för EGFR-positiv kontroll (PC) ska hamna inom de värden som anges i Tabell 7.

**Tabell 7. Förväntade  $\Delta C_T$ -värden för positiv kontroll\***

<b>Analys</b>	<b><math>\Delta C_T</math>-värde för positiv kontroll</b>
T790M	–2,88 till 3,01
Borttagningar	–6,71 till 4,16
L858R	–2,41 till 0,90
L861Q	–4,61 till 1,48
G719X	–2,89 till 1,03
S768I	–3,37 till 2,31
Tillägg	–2,93 till 1,28

\* Programmet Rotor-Gene Q (2.0.2)

**Obs:** Om antingen den negativa eller den positiva körningskontrollen har misslyckats bör provdata inte användas.

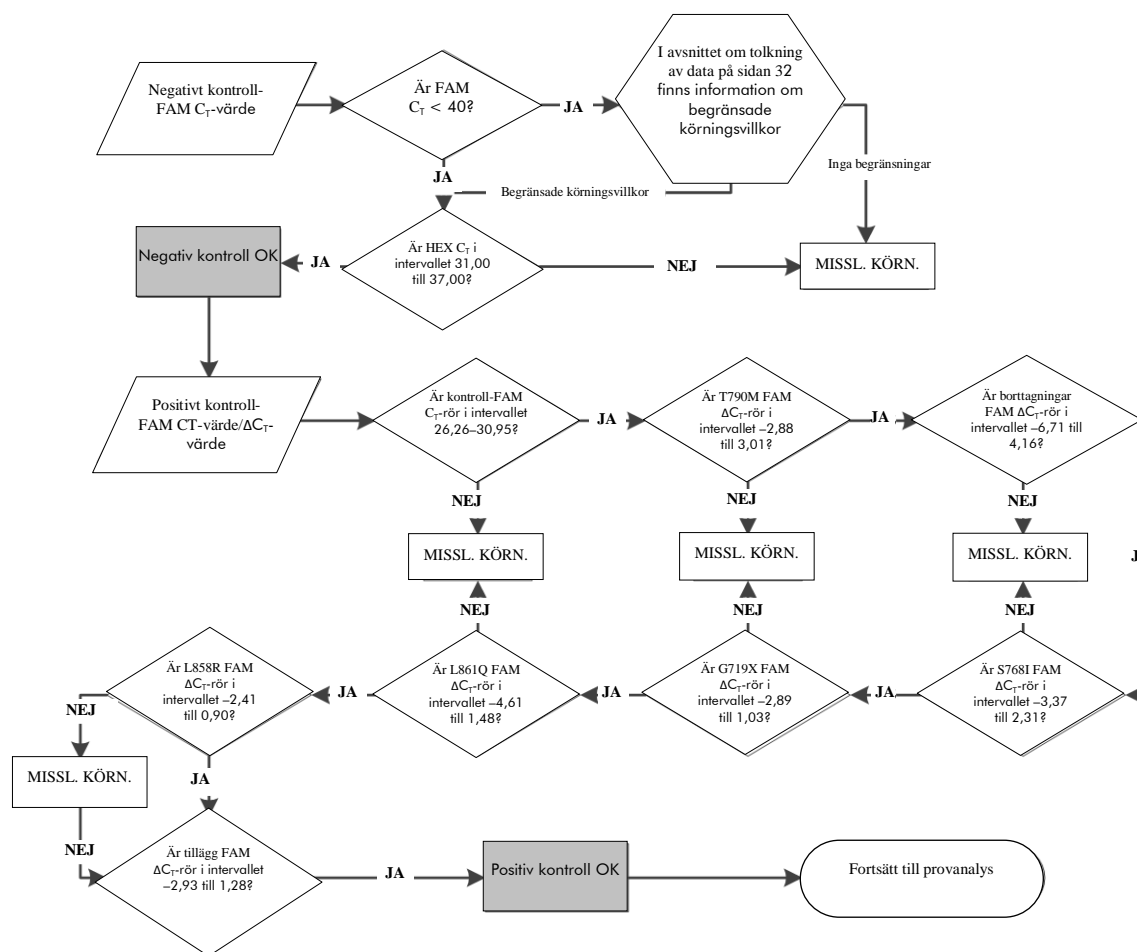


Bild 15. Arbetsflöde för körning av kontrollanalys.

## Provanalys:

### Provkontroll-FAM C<sub>T</sub>-värde

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga måste varje provkontroll-C<sub>T</sub>-värde ligga inom intervallet 23–30,69 i den gröna kanalen. Se flödesdiagrammet "Sample Analysis" [Provanalys] i Bild 16.

- **Provkontrollanalysens C<sub>T</sub> är < 23:** Prover med ett kontroll-C<sub>T</sub> på < 23 skulle överbelasta mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom intervallet ovan baserat på att spädning till hälften kommer att öka C<sub>T</sub> med 1.
- **Provkontrollanalysens C<sub>T</sub> är i intervallet 30,69–37:** Gör försiktiga tolkningar, eftersom mutationer med väldigt låg nivå inte kan upptäckas.
- **Provkontrollanalysens C<sub>T</sub> är i intervallet 37–40:** Gör försiktiga tolkningar, eftersom endast mutationer med väldigt hög nivå upptäcks.

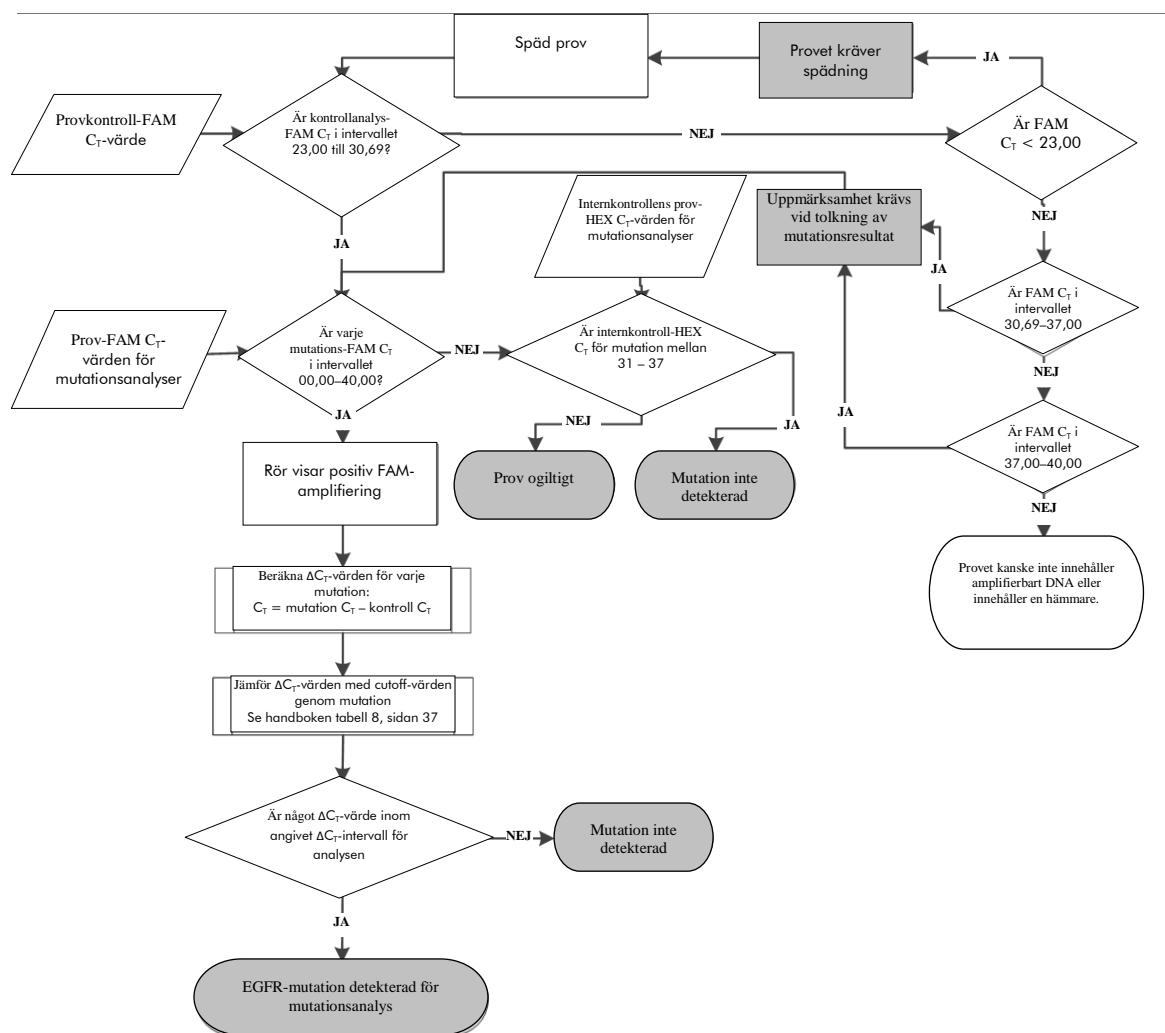
- **Provkontrollanalysens  $C_T$  är  $> 40$ :** Provet innehåller inte tillräckligt med DNA för att kunna analyseras.

**Obs:** Om prov-FAM  $C_T$ -värdet är mellan 23 och  $< 37$  behöver inte internkontrollen utvärderas.

**Obs:** Om ett prov inte genererar ett  $C_T$  (dvs.  $C_T > 40$ ) kan det bero på förekomst av hämmare, ett fel i analyskonfigurationen eller att det inte finns något amplifierbart EGFR DNA.

- **Internkontrollens  $C_T$ -värde är 31–37:** Analysen fungerar korrekt, men det finns inget amplifierbart EGFR DNA.
- **Internkontrollens  $C_T$ -värde ligger inte inom intervallet 31–37:** Det kan bero på ett fel i analyskonfigurationen eller på förekomst av hämmare. Det är möjligt att minska effekten av en hämmare genom att späda provet, även om detta också leder till spädning av DNA.

**Obs:** Om mutationsanalysens FAM-reaktion inte genererar ett  $C_T$ -värde och internkontrollreaktionerna genererar ett  $C_T$ -värde utanför intervallet 31–37 måste data kasseras eftersom det finns risk för förekomst av hämmare som kan leda till falskt negativa resultat. Spädning av provet kan minska effekten hos hämmarna men leder även till spädning av DNA.



**Bild 16. Flödesdiagram för mutationsanalys.**

## Prov-FAM C<sub>T</sub>-värde för mutationsanalys

FAM-värdena för alla sju reaktionsmixarna ska kontrolleras mot värdena som finns angivna i Tabell 8.

**Tabell 8. Acceptabla provvärden för mutationsreaktion (FAM)\***

Analys	Acceptabelt C <sub>T</sub> -intervall	Cutoff-ΔC <sub>T</sub> -värde
T790M	15,00–40,00	6,38
Borttagningar	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
Tillägg	15,00–40,00	7,91

\* Acceptabla värden är inom och inklusive de värden som visas.

- Om FAM C<sub>T</sub> hamnar inom det angivna intervallet 15,00–40,00 är FAM-amplifieringen positiv.
- Om FAM C<sub>T</sub> hamnar ovanför angivet intervall eller om amplifiering saknas är FAM-amplifieringen negativ.

Beräkna ΔC<sub>T</sub>-värdet för varje mutationsprov som visar positiv amplifiering enligt nedan, för att garantera att mutations- och kontroll-C<sub>T</sub>-värdena kommer från samma prov.

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

Jämför provets ΔC<sub>T</sub>-värde med cutoff-punkten för den aktuella analysen (Tabell 8) och se till att korrekt cutoff-punkt tillämpas för varje analys.

Cutoff-punkten är den punkt ovanför vilken en positiv signal kan vara orsak till bakgrundssignal för ARMS-primern i vildtyps-DNA. Om provets ΔC<sub>T</sub>-värde är högre än cutoff-punkten klassas det som mutation inte detekterad eller som liggande utanför kitets detektionsgräns. Om provets värde är vid eller under cutoff-punkten bedöms provet som positivt för en mutation som detekterats av den aktuella analysen.

**Obs:** För prover som inte visar någon FAM-mutation-C<sub>T</sub> krävs en utvärdering av internkontrollens (HEX) C<sub>T</sub> för att avgöra om mutationen inte är detekterad

eller om analysen är ogiltig. Om HEX  $C_T$ -värdet är mellan 31 och 37 är mutationen inte detekterad. Om HEX  $C_T$ -värdet är utanför intervallet 31–37 är provet ogiltigt.

Sammanfattningsvis för alla prover kommer varje mutationsreaktion att tilldelas statusen mutation detekterad, mutation inte detekterad eller ogiltig med hjälp av kriterierna nedan.

- **Mutation detekterad:** FAM-amplifiering positiv och  $\Delta C_T$  vid eller under cutoff-värdet. Om flera mutationer detekteras kan alla rapporteras.
- **Mutation inte detekterad:**  
FAM-amplifiering positiv och  $\Delta C_T$  ovanför cutoff-värdet.  
FAM-amplifiering negativ och HEX-amplifiering (internkontroll) positiv.
- **Ogiltig:**  
FAM-amplifiering negativ och HEX-amplifiering utanför specifikationerna.

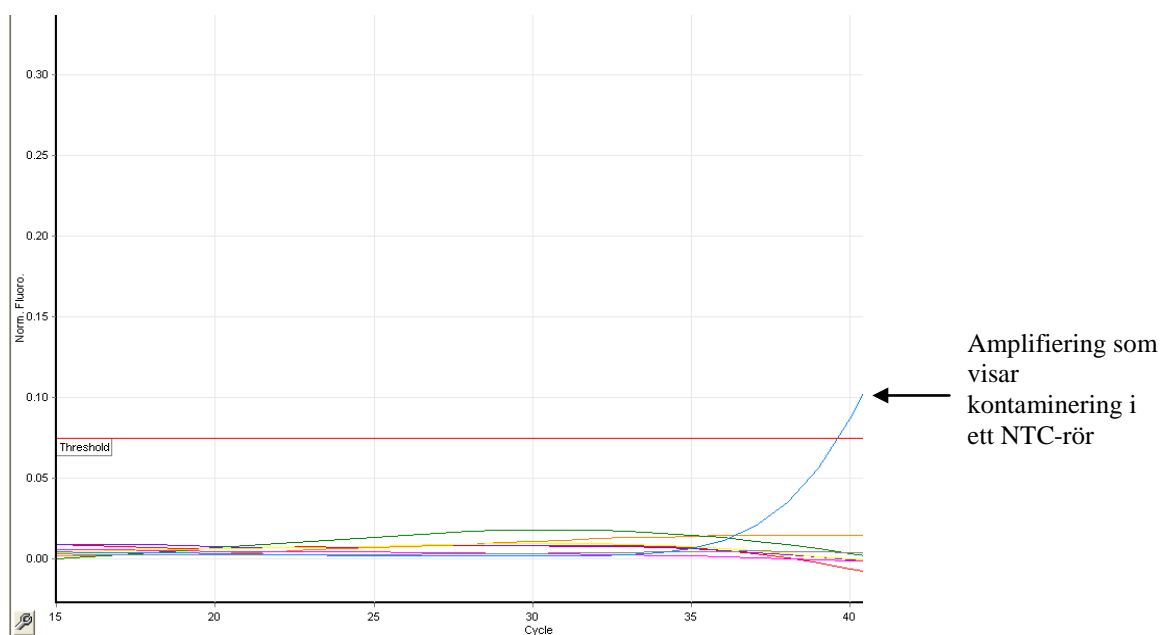
## Kommentar om tolkning av data

### Linjär amplifiering

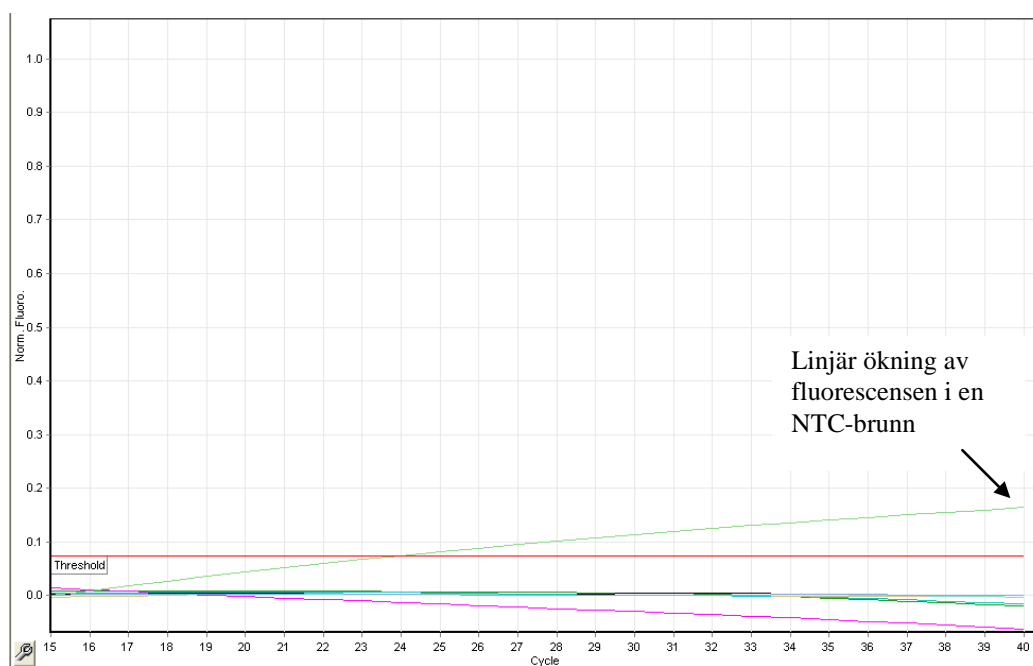
Rotor-Gene Q-diagram från alla reaktioner ska kontrolleras. Ibland ses en ökning av fluorescenssignalen i NTC och i negativa prover. Om detta är fallet och ett  $C_T$ -värde erhålls måste användaren skilja mellan en äkta amplifiering, vilken skulle indikera kontaminering i NTC, och en linjär ökning av fluorescensen, vilken kan vara en falsk ökning.

### Analys av NTC

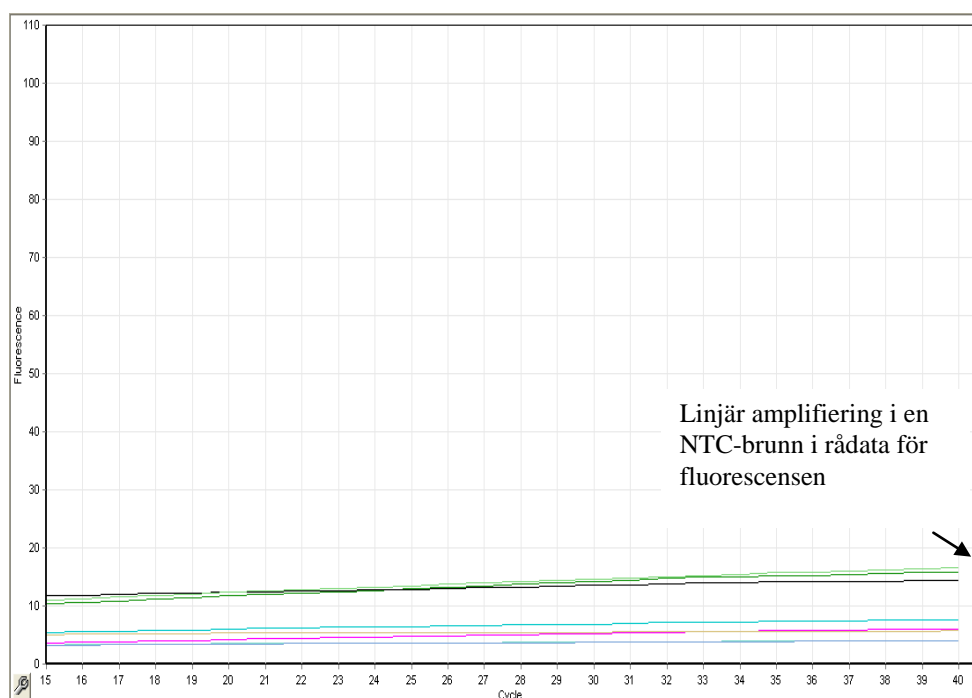
Bilderna 17 och 18 visar två exempel på beteende för NTC-prover. I Bild 17 visas icke-linjär (äkta amplifiering), orsakad av provkontaminering. Den här körningen ska kasseras och proverna ska testas om. I Bild 18 visas linjär amplifiering i en NTC. Under de här förutsättningarna ska rådata för fluorescensen granskas. Motsvarande diagram med rådata för fluorescensen visas i Bild 19, och indikerar en linjär ökning av fluorescensen snarare än en äkta amplifiering. Data från den här körningen kan användas, under förutsättning att positiva kontroller och internkontroller har godkänts. För jämförelse med Bild 19 visar Bild 20 rådata för fluorescensen där äkta amplifiering har ägt rum. Under de här förutsättningarna ska data kasseras och proverna testas om, eftersom det indikerar att kontaminering förekommer.



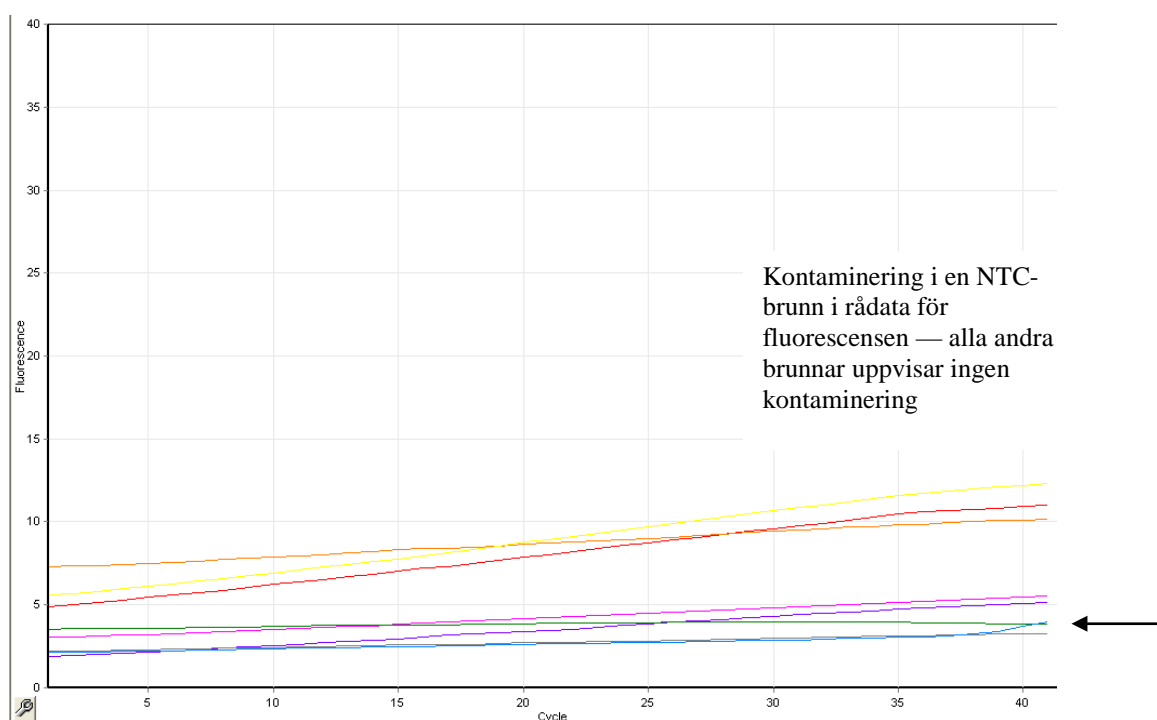
**Bild 17. Kontaminering i en NTC för en analys i en analyserad körning.**



**Bild 18. Exempel på linjär ökning av fluorescensen i en NTC-brunn.**



**Bild 19. Rådata för fluorescensen i Bild 18.**

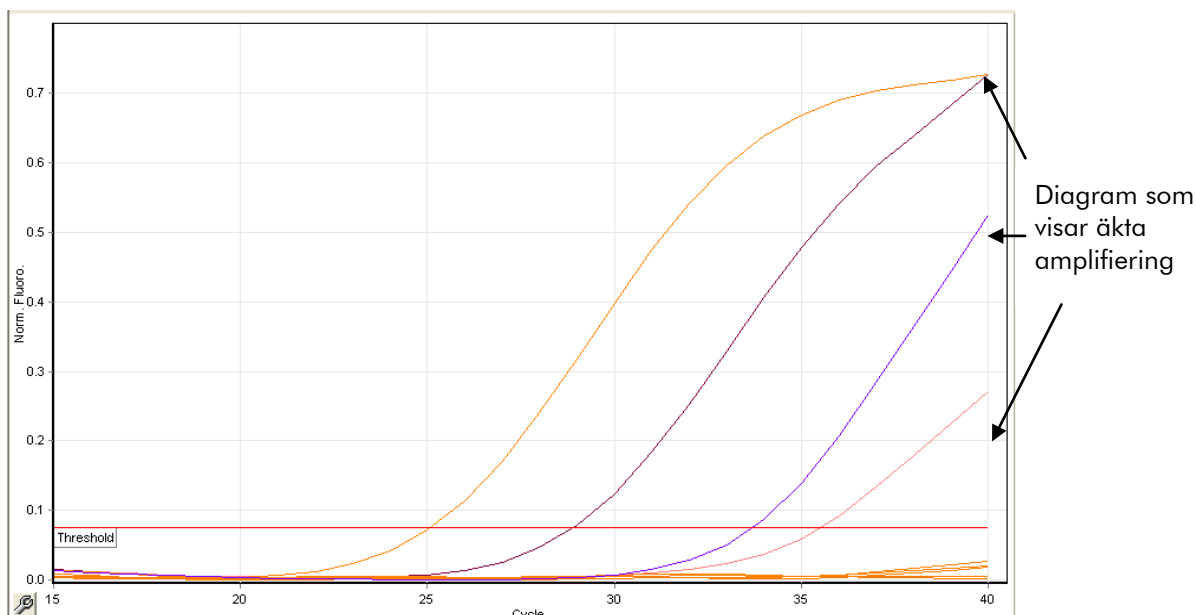


**Bild 20. Rådata för fluorescensen visar en NTC-brunn med en äkta amplifiering.**



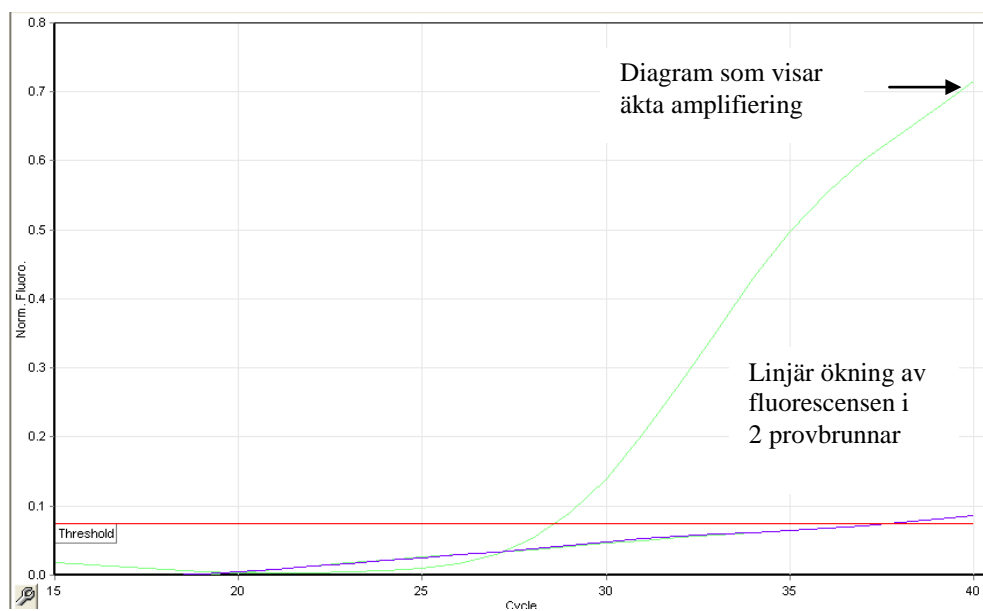
## Analys av prover

Bilderna 21 och 22 visar två exempel på amplifiering i provreaktioner. I Bild 21 visas äkta amplifiering i en provbrunn i en analyserad körning. Om en körning uppvisar den här typen av sigmoidal amplifieringskurva är det fråga om en äkta amplifiering och data från den här körningen kan användas, under förutsättning att positiva kontroller och internkontroller har godkänts.

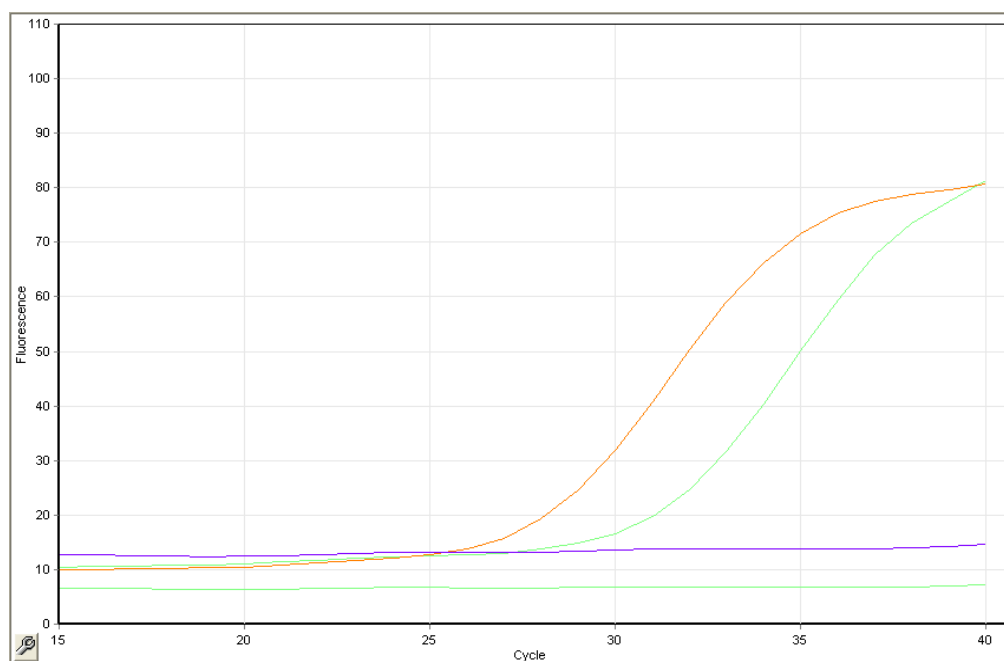


**Bild 21. Äkta amplifiering i en provbrunn i en analyserad körning.**

Ett exempel på linjär amplifiering i en provreaktion visas i Bild 22. Under de här förutsättningarna ska rådata för fluorescensen granskas. Motsvarande diagram med rådata för fluorescensen (Bild 23) indikerar att den linjära ökningen i Bild 22 motsvarar en linjär ökning av rådata för fluorescensen och är inte en äkta amplifiering. Under förutsättning att positiva kontroller och internkontroller har godkänts kan provresultat från de här körningarna användas med försiktighet, som att linjär amplifiering kallas "inget  $C_T$ ".



**Bild 22. Exempel på linjär ökning av fluorescensen i två provbrunnar.**



**Bild 23. Rådata för fluorescensen i Bild 22.**

## Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vetenskapsmännen på QIAGENs tekniska service svarar gärna på dina frågor om informationen och protokollen i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation finns på baksidan eller på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Kommentarer och förslag

---

#### Ingen signal med EGFR-positiv kontroll (PC) i fluorescenskanalen Cycling Green

- |  |  |
|--|--|
| 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-instrumentet  | Jämför temperaturprofilen med protokollet och upprepa körningen vid felaktighet.   |
| 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 överensstämmer inte med instruktionerna i "Förvaring och hantering av reagenser" (sidan 12) | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs.                      |
| e) Utgångsdatum för <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit har passerats  | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs.                      |

### Signaler med de negativa kontrollerna i fluorescenskanalen Cycling Green för analytisk PCR

- |  |  |
|--|--|
| a) Kontaminering har uppstått vid beredning av PCR | Upprepa PCR med nya reagenser i replikat.<br>Om det är möjligt, förslut PCR-rören direkt efter att det prov som ska testas har tillsatts.<br><br>Kontrollera att arbetsytorna och instrumenten dekontamineras regelbundet. |
| b) Kontaminering som har uppstått vid extraktion   | Upprepa extraktion och PCR för det prov som ska testas med nya reagenser.<br><br>Kontrollera att arbetsytorna och instrumenten dekontamineras regelbundet.   |

## Kvalitetskontroll

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 vitro-diagnostiska procedurer och Rotor-Gene Q.

Analytiska valideringsstudier inkluderade humant DNA som extraherats från formalinfixerade paraffinbäddade tumörprover.

Produkten är endast avsedd för användning på realtids-PCR-instrumentet Rotor-Gene Q, 5plex HRM-serien.

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 (Ctrl) 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.

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

## Testets egenskaper

### Cutoff-värden

171 FFPE-prover testades med en metod enligt instruktionerna i NCCLS EP17-A (2004). Data från 159 prover användes för att fastställa cutoff-värden för kitet. Kontrollreaktionens  $C_T$ -intervall fastställdes från 23,00 till 30,69  $C_T$ . Cutoff-värdena fastställdes och presenteras i tabell 8.

### Detektionsgräns (LOD)

För att avgöra LOD för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit utvecklades en provuppställning genom att mixa syntetiskt mutant-DNA med vildtyp-genomiskt DNA för att simulera ett intervall av mutationsprocentvärden för var och en av de 29 mutationerna. LOD för varje analys definieras som procentandelen mutation där 95 % av replikaten fastställdes som positiva av *therascreen* EGFR PCR RGQ Kit. LOD-värdena anges i Tabell 9. För multiplex-analyserna som detekterar flera mutationer (G719X, borttagningar och tillägg) anges värdet för den reaktion som gav högst LOD.

**Tabell 9. LOD för var och en av de sju EGFR-mutationsanalyserna.**

Mutation	Procentandel detekterbar mutation (%)
T790M	7,02
Borttagningar	1,64
L858R	1,26
L861Q	0,50
G719X	5,43
S768I	1,37
Tillägg	2,03

## Precision

För att avgöra precision för *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit utvecklades en provuppställning genom att mixa syntetiskt mutant-DNA med vildtyp-genomiskt DNA för att simulera en låg procentandel mutation för var och en av de sju mutationsanalyserna. Precision uppnåddes genom att testa prover på en plats med flera kitbatchar, användare och körningar på olika dagar, med två replikat av varje prov. Variationen som kunde observeras, gällande beräknad standardavvikelse från varianskomponentanalysen, var mindre än 1  $\Delta C_T$  och kan användas som en uppskattning av precision (Tabell 10).

**Tabell 10. Resultat av tester inom laboratoriet\***

Analys	Procentandel positiv testning av mutation	Uppskattad standardavvikelse ( $\Delta C_T$ )
T790M	100%	0,33
Borttagningar	100%	0,40
L858R	100%	0,45
L861Q	100%	0,49
G719X	97,9%	0,59
S768I	97,9%	0,31
Tillägg	97,9%	0,38

\* 93 replikat testades för varje mutation.

## Reproducerbarhet

Reproducerbarhet uppnåddes genom att testa prover med hög mutationsnivå i en bakgrund med vildtyp-genomiskt DNA på tre platser med flera kitbatchar, användare och körningar på olika dagar, med två replikat av varje prov. För alla sju mutationsanalyserna testades 96,1–100 % av mutant-DNA-proverna som mutationspositiva. Vildtyps-proverna testades som mutationsnegativa i alla analyser på alla platser.

## Effekt av input-DNA-koncentration

För att bestämma effekten av att ändra input-DNA-koncentrationen på resultaten som producerats av *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit nära LOD, utvecklades en provuppställning för de 29 mutationerna genom att mixa

syntetiskt mutant-DNA med vildtyp-genomiskt DNA för att producera prover med låga, medel och höga totala input-DNA-nivåer.

De höga och låga nivåerna av input-DNA skulle representera kontrollanalys- $C_T$ -värdets intervall (23,50 till 29,50).

En bedömning av input-DNA-datamängden (29 mutationer med koncentrationer nära LOD och vid tre olika input-DNA-nivåer) uppvisade en andel på 95,44 % positiv mutation.

Dessa data indikerar att variationer av input-DNA-nivån, inom analysens arbetsintervall, inte påverkar  $\Delta C_T$  eller mutationsklassificering för ett prov.

## Interfererande substanser

Effekten på kitets prestanda om komponenter potentiellt överförs från QIAGEN® QIAamp DNA FFPE Tissue Kit under bearbetningen av FFPE-prover bedömdes.

Formalin, paraffinvax, xylol, etanol, buffert ATL, proteinas K, buffert AL, tvättbuffert AW1 och tvättbuffert AW2 användes med högsta ("i värsta fall") förväntade koncentrationer (med antagandet att varje tvätt- eller reningssteg i extraktionskitprotokollet resulterade i en reduktion av koncentrationskomponenten med 1 log).

I studien användes tredubbla LOD-prover snarare än en mycket högre nivå av mutation för att säkerställa att potentiell interferens kunde detekteras.

En differens i  $\Delta C_T$  i  $\geq 3$  standardavvikelser (hämtade från precisionsstudien) mellan "test" och "kontroll" (dvs. ingen interfererande substans) bedömdes indikera en potentiell interferens.

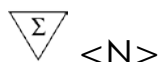
Ingen av de potentiella interfererande substanserna som utvärderades hade en  $\Delta C_T$ -ändring i  $\geq 1$  standardavvikelse vid jämförelse med kontroller.

## Referenser

QIAGEN upprätthåller en stor, uppdaterad databas online med vetenskapliga publikationer där QIAGEN-produkter avhandlas. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelordssökning eller genom att specificera applikation, forskningsområde, titel, etc.

En fullständig lista med referenser finns i QIAGENS referensdatabas online på [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) eller hos QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

## Symboler



Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> test



Används senast



Medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



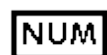
Materialnummer



Komponenter



Innehåller



Antal



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen

## Kontaktinformation

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



## Bilaga: Information om mutationer

COSMIC-ID har hämtats från databasen *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

**Tabell 11. Lista med mutationer och COSMIC-ID.**

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

**Tabell 11. Lista med mutationer och COSMIC-ID (forts.)**

<b>Mutation</b>	<b>Exon</b>	<b>Basskifte</b>	<b>COSMIC-ID</b>
<b>Borttagningar</b>	19	2239_2256del18	6255
		2239_2248TTAAGAGAAG>C (complex)	12382
		2239_2258>CA (complex)	12387
		2240_2251del12	6210
		2240_2257del18	12370
		2240_2254del15	12369
		2239_2251>C (complex)	12383

## Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: 1 kontrollanalys, 7 mutationsanalyser, positiv kontroll, Taq DNA-polymeras	870111
<b>Rotor-Gene Q med tillbehör</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtids-PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002033
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtids-PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9002032
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Realtids-PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9001650
Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument	Realtids-PCR-cykler och HRM-analysinstrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9001580
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett i 72 x 0,1 ml-rör	9018901

Produkt	Innehåll	Kat.nr
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor för 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor för 4 rör med 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-kiten finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Köpet av den här produkten ger användaren rätt att utföra diagnostiska analyser för human in vitro-diagnostik. Inget allmänt patent eller licens av något slag förutom den här specifika rättigheten ingår i köpet.

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

*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit är en CE-märkt diagnosutrustning som uppfyller kraven i Europeiska unionens direktiv 98/79/EC om medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik. Den är inte tillgänglig i alla länder.

#### **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:

1. 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 kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på [www.qiagen.com](http://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 detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kitet godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser kitet och/eller någon av dess komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2012–2013 QIAGEN, med ensamrätt.

---

**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

