

# Handbok för *therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR-kitet



Version 1

**IVD**

Kvalitativ in vitro-diagnostik

För användning med Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx



**REF**

874011



QIAGEN Manchester Ltd, Skelton House,  
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SH, Storbritannien

**EC REP**

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,  
40724 Hilden, TYSKLAND

**R4 MAT**

1116068SV



## **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

Avsedd användning	5
Sammanfattning och förklaring	5
Användningsprinciper	7
Material som medföljer	10
Kitets innehåll	10
Material som behövs men inte medföljer	11
Varningar och säkerhetsåtgärder	12
Säkerhetsinformation	12
Allmänna säkerhetsåtgärder	12
Förvaring och hantering av reagenser	13
Provtagning, förberedelse för analys och förvaring	13
Procedur	15
DNA-extraktion	15
Protokoll: Bedömning av DNA-prover	16
Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer	29
Tolkning av resultat	38
Felsökningsguide	39
Flaggor som genereras av <i>therascreen</i> KRAS Assay Package	40
Kvalitetskontroll	46
Begränsningar	47
Testets egenskaper	48
Analytisk prestanda	48
Detektionsgräns (LOD)	53
DNA-input och linjäritet	54
Interfererande substanser	59
Korskontaminering	59
Exklusivitet/korsreaktivitet	60
Repeterbarhet och reproducerbarhet	62
Variabilitet vid provhantering	65

<b>Motsvarighet mellan provtagningsmetoder (endast NSCLC)</b>	<b>66</b>
<b>Referenser</b>	<b>67</b>
<b>Symboler</b>	<b>70</b>
<b>Kontaktinformation</b>	<b>71</b>
<b>Bilaga 1: Manuellt protokoll för <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR-kitet</b>	<b>72</b>
<b>Tolkning av resultat (manuellt)</b>	<b>86</b>
<b>Programinställningar för analys</b>	<b>86</b>
<b>Analys av provbedömningsdata</b>	<b>86</b>
<b>Analys av KRAS-mutationsdetektion</b>	<b>87</b>
<b>Provanalys</b>	<b>90</b>
<b>Bilaga 2: Installation av <i>therascreen</i> KRAS Assay Package</b>	<b>95</b>
<b>Beställningsinformation</b>	<b>98</b>
<b>Revisionshistorik</b>	<b>99</b>

## Avsedd användning

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är en kvalitativ realtids-PCR-analys för detektion av 7 somatiska mutationer i kodonerna 12 och 13 i den mänskliga KRAS-onkogenen med instrumentet Rotor-Gene Q MDx. Kitet är avsett för användning med DNA som extraherats från formalinfixerad och paraffin-inbäddad (FFPE) vävnad från kolorektal cancer (CRC) eller icke-småcellig lungcancer (NSCLC) som tagits med resektion, nålbiopsi (CNB) eller fin nålspunktion (FNA).

Somatiska mutationer i KRAS-genen är potentiella prediktiva biomarkörer för resistens mot behandlingar inriktade på mänsklig epidermal tillväxtfaktor (EGFR) som panitumumab och cetuximab för behandling av CRC. Somatiska mutationer i KRAS-genen kan också användas som en potentiell prediktiv biomarkör för att fatta beslut om vissa typer av behandling av NSCLC.

Patientens mutationsstatus, liksom även andra sjukdomsfaktorer, kommer att bedömas av en läkare för att man ska kunna välja rätt behandling. Beslut om behandling för cancerpatienter får inte enbart baseras på KRAS-mutationsstatus.

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är inte avsett för att diagnostisera CRC, NSCLC eller någon annan sjukdom.

## Sammanfattning och förklaring

Mutationer i KRAS-onkogenen förekommer ofta i cancerformer hos människor (1–4). Med teknikerna Scorpions® och ARMS® (Amplification Refractory Mutation System) (5, 6) kan *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet möjliggöra detektion av 7 mutationer i kodonerna 12 och 13 i KRAS-onkogenen mot en bakgrund av genomiskt vildtyps-DNA (tabell 1). Baserat på data i databasen COSMIC (2015 v72) svarar de 7 mutationerna som detekteras av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet för > 95 % av alla rapporterade KRAS-mutationer hos CRC-patienter och för > 88 % av alla rapporterade mutationer hos NSCLC-patienter (7).

**Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-identiteter**

<b>Mutation</b>	<b>Basskifte</b>	<b>COSMIC-ID*</b>
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC	532

\* COSMIC ID har hämtats från databasen *Catalog of Somatic Mutations in Cancer* (7) ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

Testet är mycket specifikt och känsligt och kan detektera en låg procentandel mutant-DNA i en bakgrund av vildtyps-DNA. Förutsatt att det finns tillräckligt med DNA-kopior är detektion av ca 0,8 % mutant i en bakgrund med vildtyp-genomiskt DNA möjlig (se "Testets egenskaper" på sidan 48 för information om detektionsgräns för varje mutation).

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet används med en PCR-procedur (polymerase chain reaction). Fördelarna med detta kit är att det är mycket specifikt för målet och att det är snabbt och effektivt och inte har någon subjektivitet vid bestämning av resultaten.

# Användningsprinciper

I *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet används 2 typer av teknik – ARMS och Scorpions – för detektion av mutationer i realtids-PCR.

## Mutationsreaktionsmixar

Varje reaktionsmix använder en mutationsspecifik ARMS-primer för att amplifiera det muterade DNA:t selektivt och sedan en Scorpions-primer för att detektera amplifieringsprodukten.

## ARMS

Allelspecifik amplifiering uppnås med ARMS som utnyttjar förmågan hos *Taq* DNA-polymeras att särskilja en matchad och en felmatchad bas vid 3'-änden av en PCR-primer. När primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3'-basen inte matchar sker eventuellt endast bakgrundsamplifiering på låg nivå. Därför amplifieras en muterad sekvens selektivt även i prover där majoriteten av DNA:t inte bär på mutationen.

## Scorpions

Detektion av amplifiering utförs genom att använda Scorpions. Scorpions är bifunktionella molekyler med en PCR-primer som är kovalent bunden till en prob. Proben innehåller fluoroforen karboxyfluorescein (FAM™) och en quencher. Den senare dämpar fluorescensen hos fluoroforen. När proben binder till ARMS-amplikonet under PCR separeras fluoroforen och quenchern, vilket leder till en detekterbar ökning av fluorescensen.

## Kitets format

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet innehåller 8 analyser:

- 1 kontrollanalys (kontrollreaktionsmix; CTRL)
- 7 mutationsanalyser (12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 12ASP)

Reaktionsmixarna är dubbla och innehåller FAM-märkta reagenser för att detektera mål och en HEX™-märkt internkontroll. Reaktionsmixarna och positiv kontroll-reagenserna innehåller Tris EDTA-buffert, och den positiva kontrollen innehåller bärar-Poly A RNA.

## **Analyser**

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet består av en procedur i 2 steg. I det första steget utförs kontrollanalysen för att bedöma den totala mängden amplifierbart KRAS DNA i ett prov. I det andra steget utförs både mutations- och kontroll-analyser för att bestämma förekomst eller frånvaro av mutant-DNA.

### **Kontrollreaktion**

Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL) använder en Scorpions-primer och en omärkt primer för att amplifiera en kort sekvens av exon 4 i KRAS-genen. Kontrollreaktionen används för att bestämma om en lämplig nivå amplifierbart DNA finns i provet och är en faktor som används vid analytiska beräkningar för att bestämma mutationsstatus.

### **Kontrollanalys**

Kontrollanalysen, märkt med FAM, används för att bedöma den totala mängden amplifierbart KRAS DNA i ett prov. Kontrollanalysen amplifierar ett område av exon 4 i KRAS-genen. Primrarna och Scorpions-proben är utformade för att amplifiera oberoende av alla kända KRAS-polymorfismer.

### **Mutationsanalys**

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

### **Kontroller**

**Obs:** Alla experimentkörningar måste innehålla positiva och negativa kontroller.

### **Internkontroll**

Varje reaktionsmix innehåller en internkontroll utöver målreaktionen. Ett misslyckande indikerar antingen förekomst av hämmare som kan leda till ett felaktigt resultat eller en felaktig hantering av det aktuella röret vid förberedelsen. Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämmarna. Observera dock att detta även leder till spädning av mål-DNA. Ett rör med vatten för spädning av prov (Dil.) ingår i kitet. Spädning av prover måste utföras med vattnet för spädning av prov (Dil.).



## Positiv kontroll

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1–5. *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet innehåller KRAS-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") i rör 9–13. *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet innehåller vatten för NTC (NTC) som ska användas som "mall" i kontrollen utan mall. Kontrollen utan mall används för att bedöma potentiell kontaminering under körningskonfigurationen samt för att bedöma effekten hos internkontrollreaktionen.

## Provbedömning

Kontrollreaktionsmixen (CTRL) som medföljer *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet används för att bedöma den totala mängden amplifierbart KRAS DNA i ett prov. Kontrollanalysen amplifierar ett område av exon 4 i KRAS-genen. Vi rekommenderar iordningställande av prover med endast kontrollanalysen och att använda KRAS-positiv kontroll (PC) som en positiv kontroll och vatten för NTC som kontroll utan mall.

## Plattform och programvara

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är särskilt utformat för att användas med instrumentet Rotor-Gene Q MDx. Programmet Rotor-Gene Q och *therascreen* KRAS Assay Package kan laddas ned från webben och finns även på CD-skiva.

Rotor-Gene Q MDx-instrumenten måste underhållas enligt instruktionerna i användarhandboken till instrumentet. I användarhandboken finns information som rör instrumentet.

Instruktioner för installation finns i "Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package", sidan 95.

# Material som medföljer

## Kitets innehåll

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit				(24)
Katalognr				874011
Antal beredningar				24
Färg	Identitet	Röridentifiering		Volym
Röd	Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix)	1	CTRL	2 × 600 µl
Lila	12ALA Reaction Mix (12ALA-reaktionsmix)	2	12ALA	600 µl
Orange	12ASP Reaction Mix (12ASP-reaktionsmix)	3	12ASP	600 µl
Rosa	12ARG Reaction Mix (12ARG-reaktionsmix)	4	12ARG	600 µl
Grön	12CYS Reaction Mix (12CYS-reaktionsmix)	5	12CYS	600 µl
Gul	12SER Reaction Mix (12SER-reaktionsmix)	6	12SER	600 µl
Grå	12VAL Reaction Mix (12VAL-reaktionsmix)	7	12VAL	600 µl
Blå	13ASP Reaction Mix (13ASP-reaktionsmix)	8	13ASP	600 µl
Beige	KRAS Positive Control (KRAS-positiv kontroll)	9	PC	250 µl
Mint	<i>Taq</i> DNA Polymerase ( <i>Taq</i> DNA-polymeras)		<i>Taq</i>	80 µl
Vit	Water for NTC (vatten för NTC)		NTC	1,9 ml
Vit	Water for Sample Dilution (vatten för spädning av prov)		Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> KRAS 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.

### Reagenser

- QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 56404; se "DNA-extraktion" på sidan 15)
- Xylen
- Etanol (96–100 %) \*

### Förbrukningsartiklar

- Sterila pipettspetsar med filter (för att undvika korskontaminering rekommenderar vi pipettspetsar med aerosolbarriär)
- Sterila mikrocentrifugrör för beredning av huvudmixar
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (0,1 ml-rör med lock på remsa), för användning med rotor med 72 brunnar (kat.nr 981103 eller 981106)

### Utrustning

- Instrumentet Rotor-Gene Q MDx med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Yellow (detektion av FAM respektive HEX)
- Programmet Rotor-Gene Q version 2.3 med KRAS Assay Package (version 3.1.1) installerat för automatisk mutationsdetektion (se "Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package", sidan 95)

**Obs:** Programmet Rotor-Gene Q kan användas utan KRAS Assay Package för manuell mutationsdetektion. Se "Bilaga 1: Manuellt protokoll för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet", sidan 72.

- Termomixer<sup>†</sup>, uppvärmd skakinkubator, värmeblock eller vattenbad som klarar inkubering på 56 °C och 90 °C
- Bänkcentrifug<sup>†</sup> med rotor för 1,5 ml-rör
- Bänkstående vortexblandare<sup>†</sup>

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

† Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

- Särskilda pipetter (justerbara) för provberedning \*
- Särskilda pipetter (justerbara) för beredning av PCR-huvudmix \*
- Särskilda pipetter (justerbara) för dosering av DNA-mall \*

## 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.

### Allmänna säkerhetsåtgärder

Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- Förvara och extrahera positivt material (prover och positiva kontroller) separerat från alla andra reagenser, och addera dem till reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- 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.
- Reagenserna till *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet har späts ut optimalt. Vi rekommenderar inte ytterligare spädning av reagenser då det kan resultera i förlorad prestanda. Vi rekommenderar inte användning av reaktionsvolymmer mindre än 25 µl då det ökar risken för falskt negativa resultat.
- Alla reagenser i *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet har utformats särskilt för optimal effekt. Alla reagenser som medföljer kitet är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser i samma *therascreen* KRAS RGQ PCR-kit. För att bästa effekt ska kunna garanteras får kitets reagenser inte bytas ut mot något annat reagens.

\* Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

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

## Förvaring och hantering av reagenser

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet levereras på torris. Om någon komponent i *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet inte är frusen 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* KRAS RGQ PCR-kitet ska vid mottagandet omedelbart förvaras i  $-30$  till  $-15$  °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus. Liksom alla fluorescensmärkta molekyler måste Scorpions skyddas mot ljus för att undvika fotoblekning och förlorad prestanda.

Vid förvaring under de rekommenderade förvaringsvillkoren i originalförpackningen är *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte 6 frys-/upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna.

## Provtagning, förberedelse för analys och förvaring

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

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

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

### Beredning av vävnadsprover

**Obs:** Använd torra skalpeller. Utför inte det här steget i en huv för laminärt flöde eller i ett dragskåp.

- Skrapa ned tumörvävnaden från snitten i märkta mikrocentrifugrör med hjälp av en ny skalpell för varje prov.

## **Beredning av vävnadsprover för DNA-extraktion (CRC)**

- Använd standardmaterial och -metoder och fixera vävnadsprovet i 10 % neutralbuffrat formalin (NBF) och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- En utbildad person (t.ex. en patolog) ska bedöma tumörinnehåll och utbredning på ett H&E-färgat (Hematoxilyn & Eosin) snitt. Markera det färgade objektglaset för att kunna skilja tumörvävnad från normal vävnad. Använd seriesnitt för DNA-extraktion.
- Använd snitt med > 20 % tumörinnehåll för bearbetning utan makrodissektion (se nedan).
- För snitt med < 20 % tumörinnehåll: Makrodissekera ett eller flera snitt. Kassera tumörfri vävnad.
- För snitt med en yta < 4 mm<sup>2</sup>: Bearbeta två eller fler snitt för att öka den totala tumörytan till minst 4 mm<sup>2</sup> (gäller prover både med och utan makrodissektion). Kassera tumörfri vävnad.
- Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnaden med en ny, steril skalpell.

## **Beredning av vävnadsprover för DNA-extraktion (NSCLC)**

- Använd standardmaterial och -metoder och fixera vävnadsprovet i 10 % NBF och bädda in vävnadsprovet i paraffin. Skär med hjälp av mikrotom ut 5 µm tjocka seriesnitt från paraffinblocket och placera dem på objektglas.
- En utbildad person (t.ex. en patolog) ska bedöma förekomst av tumör på ett H&E-färgat snitt. Använd seriesnitt för DNA-extraktion.
- Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnaden med en ny, steril skalpell.

## **Förvaring**

Förvara FFPE-block och objektglas i rumstemperatur. Objektglas kan förvaras i rumstemperatur i upp till 4 veckor innan DNA-extraktion.

Genomiskt DNA kan förvaras i 2–8 °C i 1 vecka efter extraktion, och sedan i –25 till –15 °C i upp till 8 veckor innan användning.

# Procedur

## DNA-extraktion

Testegenskaper för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet togs fram med hjälp av DNA som extraherats med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (kat.nr 56404). Om du använder QIAamp DNA FFPE Tissue Kit utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande.

### DNA-extraktion (CRC-prover)

- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit får endast användas manuellt.
- Använd inte RNase-steget som beskrivs i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).
- Använd inte QIAGENs deparaffiniseringslösning. Använd endast xylén-/etanolmetoden för deparaffinisering enligt beskrivningen i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 11 i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) måste utföras i 1 timme.
- Proverna måste elueras med hjälp av 200 µl elueringsbuffert (ATE-buffert) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.

### DNA-extraktion (NSCLC-prover)

- Använd 2 × 5 µm-snitt per extraktion.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit får endast användas manuellt.
- Använd inte RNase-steget som beskrivs i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*).
- Använd inte QIAGENs deparaffiniseringslösning som medföljer i QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Använd endast xylén-/etanolmetoden för deparaffinisering enligt beskrivningen i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit.
- Nedbrytning av proteinas K (steg 11 i handboken till QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) måste utföras i 1 timme.
- Tillsätt 60 µl elueringsbuffert (ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit och inkubera i 2,5 minuter i rumstemperatur.
- Centrifugera i full hastighet i 1 minut.

- Tillsätt ytterligare 60 µl elueringsbuffert (ATE) från QIAamp DNA FFPE Tissue Kit och inkubera i 2,5 minuter i rumstemperatur.
- Centrifugera i full hastighet i 1 minut.

## Protokoll: Bedömning av DNA-prover

Det här protokollet ska användas vid bedömning av den totala mängden amplifierbart DNA i prover med KRAS CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) för automatisk provanalys.

**Obs:** Information om manuell bedömning av prover finns i "Bilaga 1: Manuellt protokoll för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet", sidan 72.

### Viktigt att tänka på före start

- Upp till 24 prover kan bedömas med tillgänglig Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL).
- Använd Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL) för att bedöma DNA innan testning.
- **Obs:** Det är viktigt att använda Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL) enligt beskrivningen nedan för den här bedömningen och inte spektrofotometri eller någon annan metod. Kraftigt nedbrutet DNA kanske inte amplifieras fastän primrarna genererar korta DNA-fragment.
- För effektiv användning av reagenserna i *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet ska DNA-proverna indelas i batchar i så stor utsträckning som möjligt för att skapa fullständiga körningar. Testning av enskilda prover eller ett mindre antal prover ökar förbrukningen av reagenser och minskar det totala antal prover som kan testas med ett enda *therascreen* KRAS RGQ PCR-kit.
- Kontrollera att rätt version av programmet *therascreen* KRAS Assay Package som motsvarar versionen på programmet Rotor-Gene Q är installerat innan instrumentet Rotor-Gene Q MDx används första gången (se "Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package" på sidan 95).

### Procedur

1. **Tina Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL), nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (NTC) och KRAS-positiv kontroll (PC) i rumstemperatur (15–30 °C) fullständigt i minst 1 timme.**



- **Obs:** Se till att *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) har rumstemperatur (15–30 °C) samtidigt som de andra reagenserna (se "Förvaring och hantering av reagenser" på sidan 13). Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

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

**Obs:** Utför PCR-konfiguration i rumstemperatur.

**Tabell 2. Upptiningstid, tider för PCR-konfiguration och förvarings-temperaturer**

Upptiningstid		Förvarings-temperatur* efter PCR-konfiguration	Maximal tid för PCR-konfiguration och förvaring
Min.	Max		
1 timme	4,5 timmar	Rumstemperatur (15–30 °C)	7 timmar
1 timme	4,5 timmar	2–8 °C	18 timmar

\* Termen "förvaring" avser tiden mellan slutförande av PCR-konfigurationen och start av PCR-körningen på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.

1. **Blanda de tinade reagenserna genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer, och centrifugera sedan en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.**

**Obs:** Vortexa inte *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) eller någon mix som innehåller *Taq*, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.

2. **Bered tillräckligt med huvudmixar (kontrollreaktionsmix [CTRL] plus *Taq* DNA-polymeras [*Taq*]) enligt volymerna som anges i Tabell 3 för följande:**

- alla DNA-proverna
- 1 KRAS-positiv kontrollreaktion (PC)
- 1 nukleasfritt vatten för kontroll utan mall-reaktion (NTC)
- 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 för kontrollanalys**

Komponent	Volym
Kontrollreaktionsmix (CTRL)	$19,76 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
<i>Taq</i> DNA-polymeras ( <i>Taq</i> )	$0,24 \mu\text{l} \times (n + 1)^*$
<b>Total volym</b>	<b>20 <math>\mu\text{l}</math>/reaktion</b>

\* n = antal reaktioner (prover plus kontroller).

Bered tillräckligt med huvudmix för ett extra prov (n+1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Värdet n ska inte överstiga 24 (plus kontroller) eftersom 24 är det maximala antalet prover som får plats i en körning.

**Obs:** Vid beredning av huvudmixen läggs den volym Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL) som krävs till i det aktuella röret först och *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) läggs till sist.

**Obs:** Pipettera *Taq* DNA-polymeras genom att försiktigt placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.

**3. Placera det korrekta antalet PCR 4-rör (varje remsa har 4 rör) i laddningsblocket enligt layouten i tabell 4. Förslut inte rören.**

**Obs:** Låt locken ligga kvar i plastbehållaren tills de behövs.

**Tabell 4. Körningslayout i laddningsblocket för bedömning av DNA-prover**

<b>Analys</b>									
Kontroll	1 (PC)	9	17	25	–	–	–	–	–
Kontroll	2 (NTC)	10	18	26	–	–	–	–	–
Kontroll	3	11	19	–	–	–	–	–	–
Kontroll	4	12	20	–	–	–	–	–	–
Kontroll	5	13	21	–	–	–	–	–	–
Kontroll	6	14	22	–	–	–	–	–	–
Kontroll	7	15	23	–	–	–	–	–	–
Kontroll	8	16	24	–	–	–	–	–	–

\* Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

4. Ställ in en pipett på en volym som är lägre än den totala volymen för reaktionshuvudmixen och blanda noga genom att aspirera upp och ned fullständigt 10 gånger.
5. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje PCR-rör.  
**Obs:** I tabell 4 anges layouten för röret. För bedömning av DNA-prover ska huvudmix för kontrollanalys tillsättas i ett PC-rör, ett NTC-rör och i ett rör för varje DNA-prov.
6. Tillsätt omedelbart 5 µl nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (NTC) i NTC-röret (rörposition 2) och förslut röret.
7. Tillsätt 5 µl av varje DNA-prov i provrören (rörpositionerna 3–26) och förslut rören.
8. Tillsätt 5 µl KRAS-positiv kontroll (PC) i PC-röret (rörposition 1) och förslut röret.  
Varje rör ska innehålla en total reaktionsvolym på 25 µl (20 µl huvudmix som har beretts enligt tabell 3, plus 5 µl NTC/prov/PC).
9. Använd en spritpenna och markera locken till de första rören i den lägsta numeriska positionen i varje PCR 4-rör (t.ex. positionerna 1, 5 och 9 etc.) för att visa i vilken riktning rören ska laddas i rotorn med 72 brunnar på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
10. Vänd de förslutna rören 4 gånger för att blanda provet och reaktionsmixen.

11. Placera alla PCR 4-rören på rätt position i rotorn med 72 brunnar enligt körningslayouten (tabell 4) med hjälp av riktningsmarkeringarna.

**Obs:** Om rotorn inte är fullbelagd måste alla oanvända positioner på rotorn fyllas med ett förslutet, tomt rör. Detta gör att den termiska effektiviteten på instrumentet Rotor-Gene Q MDx säkerställs.

12. Placera rotorn med 72 brunnar i instrumentet Rotor-Gene Q MDx. Kontrollera att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q MDx) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.
13. Starta programmet Rotor-Gene Q och öppna samtidigt mallen genom att dubbelklicka på ikonen "therascreen KRAS QC Locked Template" på skrivbordet till den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx (bild 1).



Bild 1. Ikonen "therascreen KRAS QC Locked Template".

14. Fliken "Setup" [Konfiguration] visas som standard (bild 2). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.

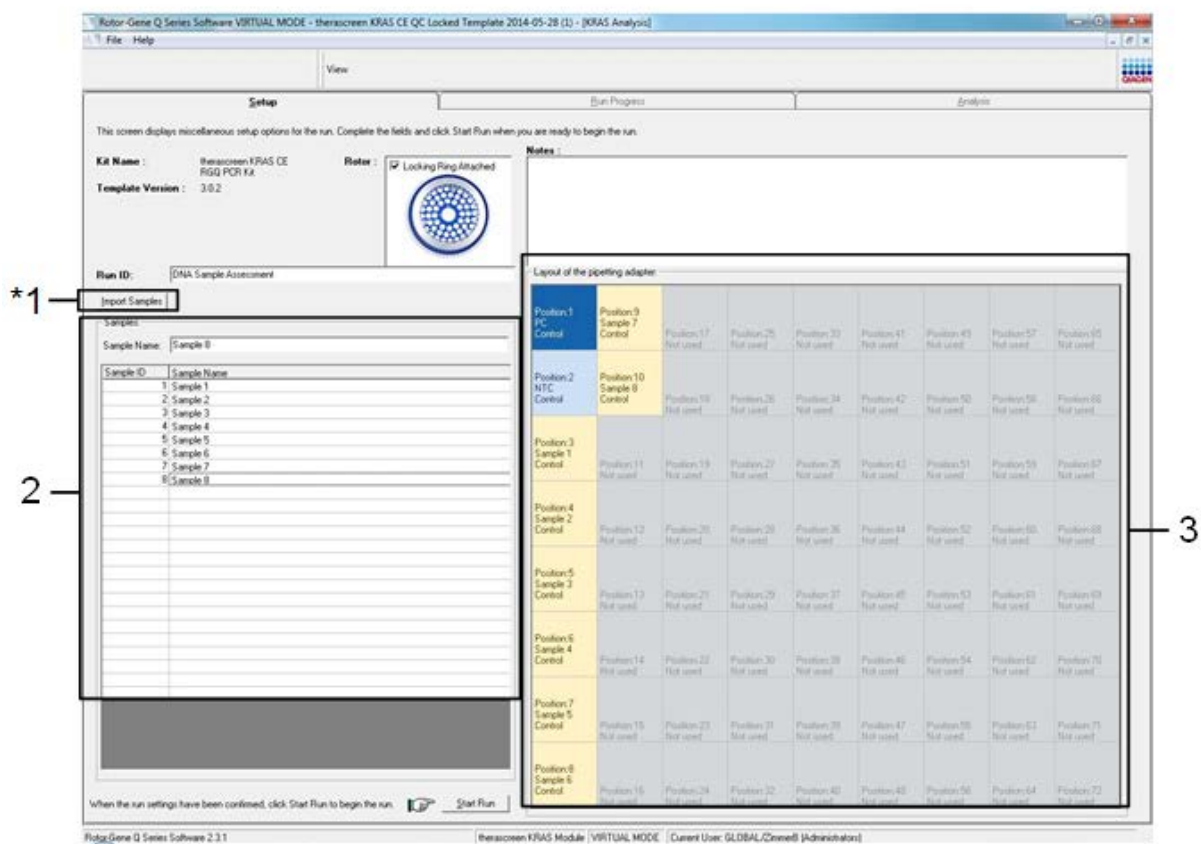


Bild 2. Fliken "Setup" [Konfiguration] och rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast].  
1 = fliken "Setup" [Konfiguration], 2 = rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast].

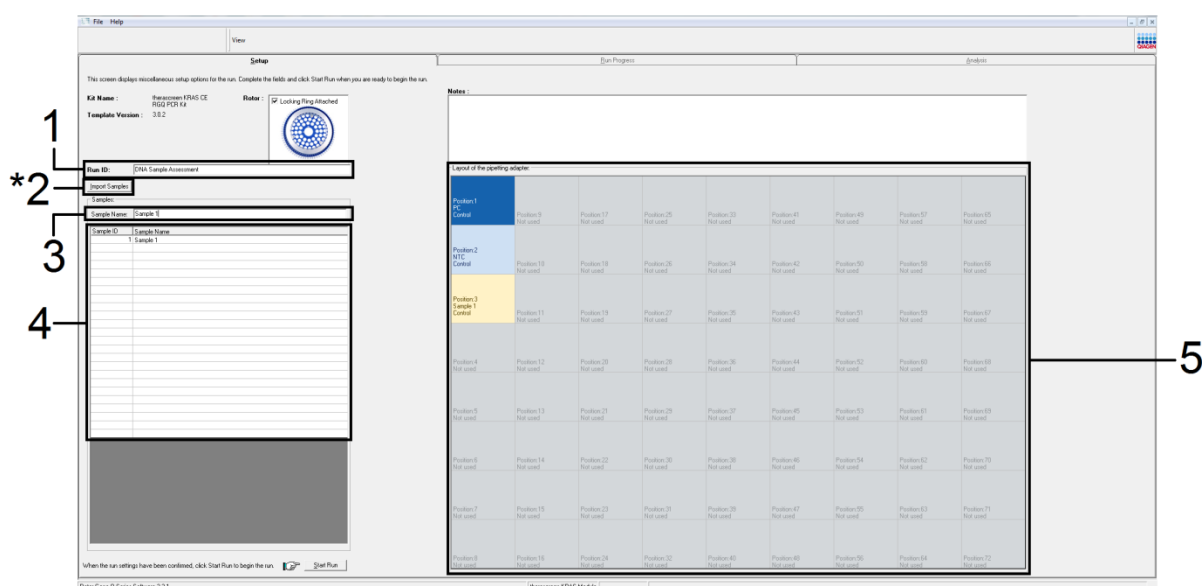
**15. Skriv in körnings-ID i fältet "Run ID" [Körnings-ID] enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i fältet "Sample Name" [Provnamn] enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten.**

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

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

**Obs:** Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] att provnamnet som har lagts till är markerat genom en ändring av färgen och att provnamnet är i provpositionen (bild 3).

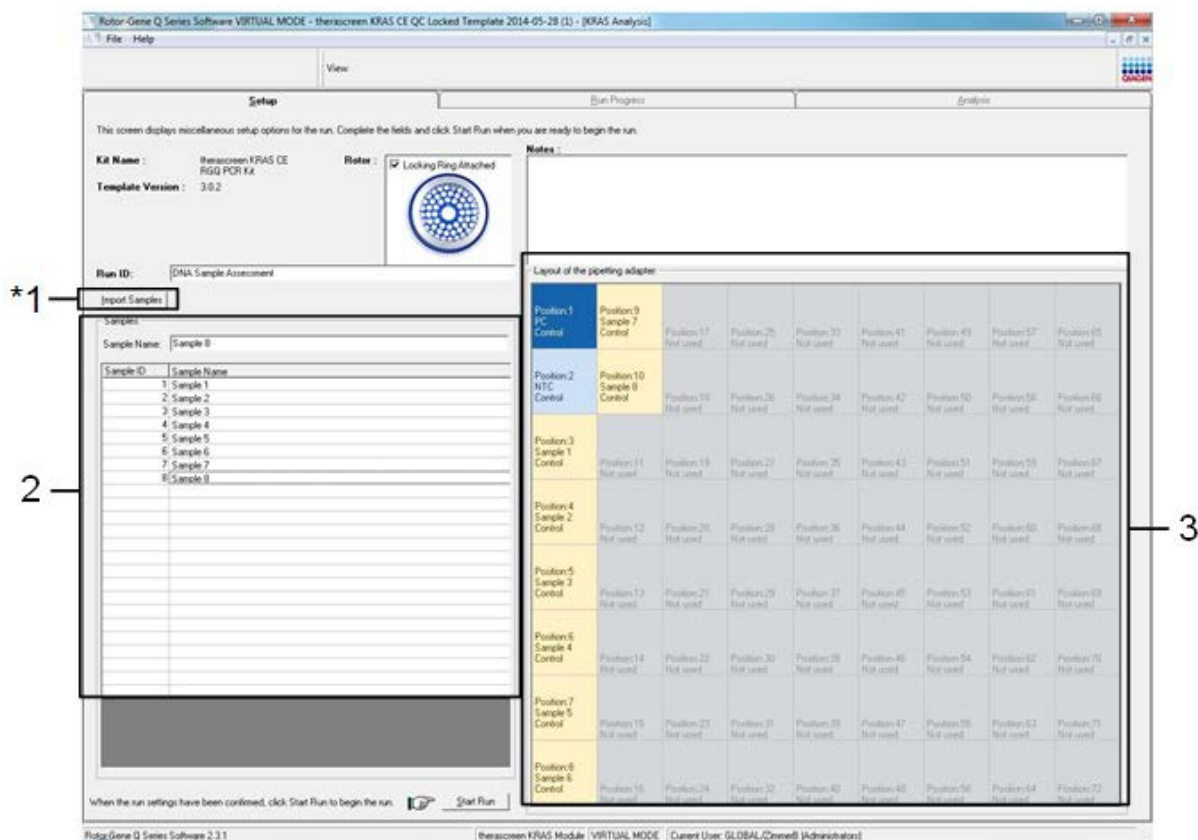
**Obs:** Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].



**Bild 3. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn].** 1 = fältet "Run ID" [Körnings-ID], 2 = knappen "Import Samples" [Importera prover], 3 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 4 = provlista, 5 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].

## 16. Upprepa steg 16 för att ange namnen på alla ytterligare prover (bild 4).

**Obs:** Om du vill redigera ett provnamn klickar du på "Sample Name" [Provnamn] i provlistan så visas det valda provet i fältet "Sample Name" [Provnamn] ovanför. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten för att uppdatera namnet.



**Bild 4. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" [Provnamn].** \*1 = knappen "Import Samples" [Importera prover], 2 = fältet "Sample Name" [Provnamn] och provlista, 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] med ytterligare provnamn.

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

**Obs:** Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (bild 5 och bild 6) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med ett förslutet, tomt rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med ett förslutet, tomt rör och klicka på "OK" för att fortsätta.

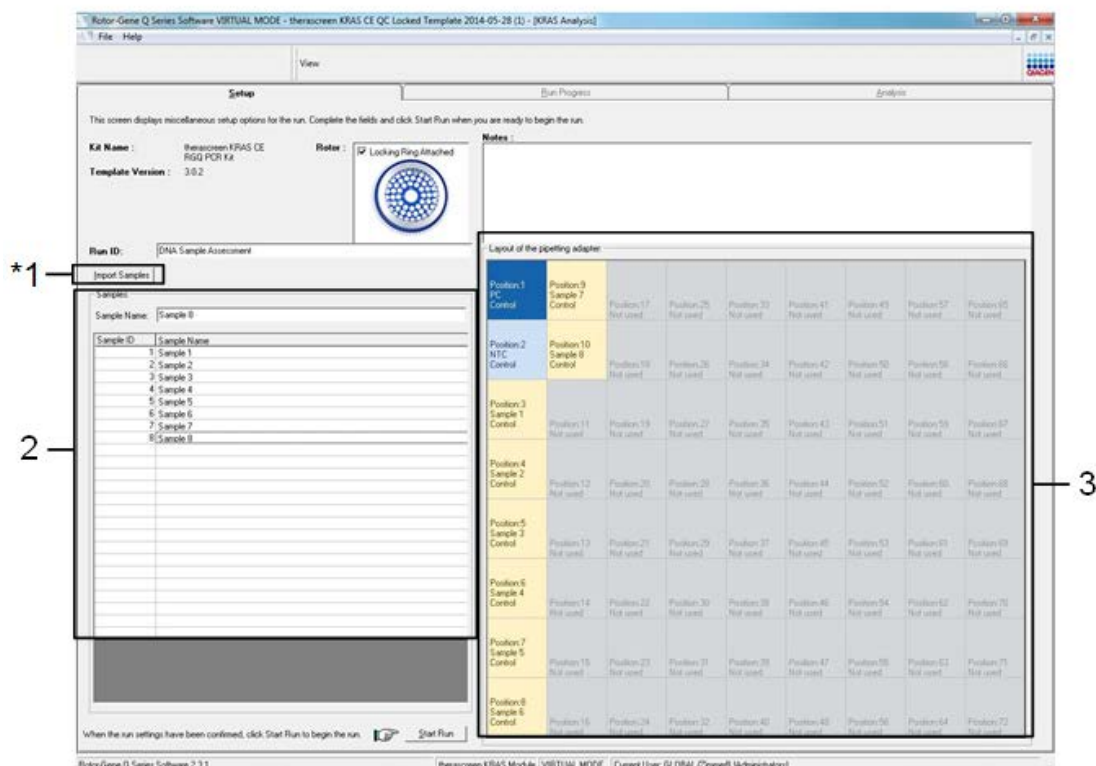


Bild 5. Fältet "Notes" [Anteckningar], "Start Run" [Starta körning] och "Warning" [Varning] för oanvända rotorpositioner.

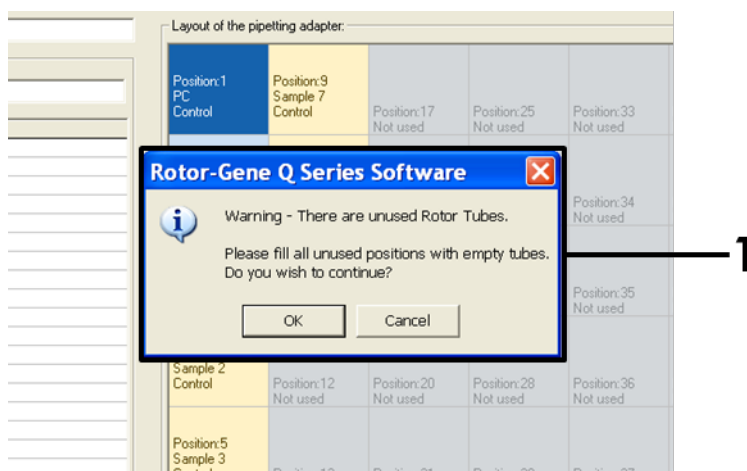
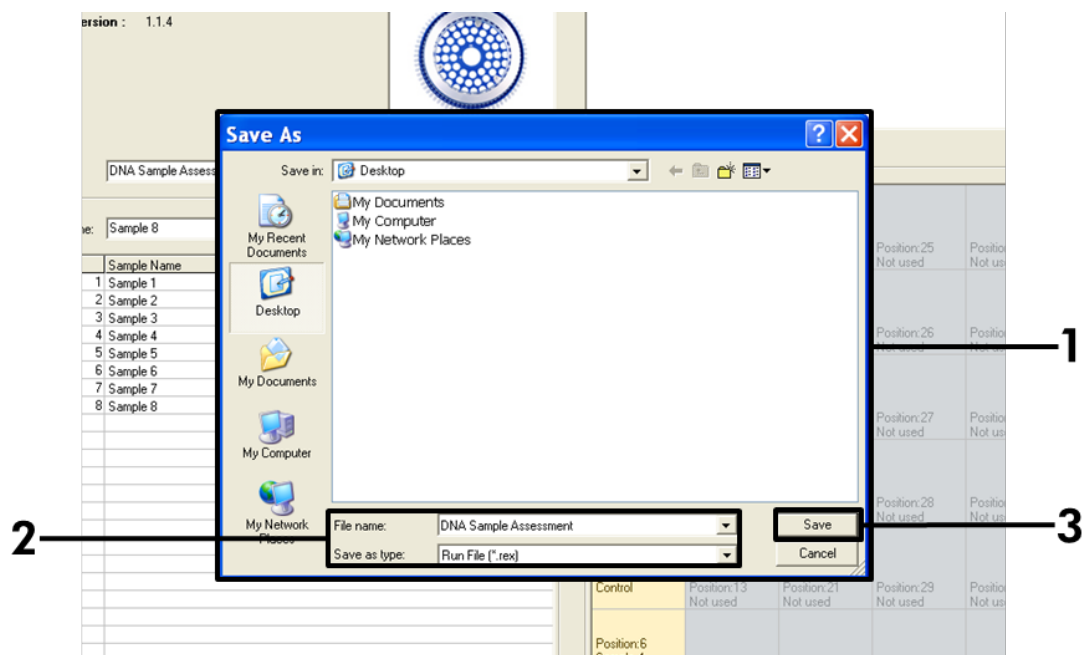


Bild 6. 1 = "Warning" [Varning] för oanvända rotorpositioner.



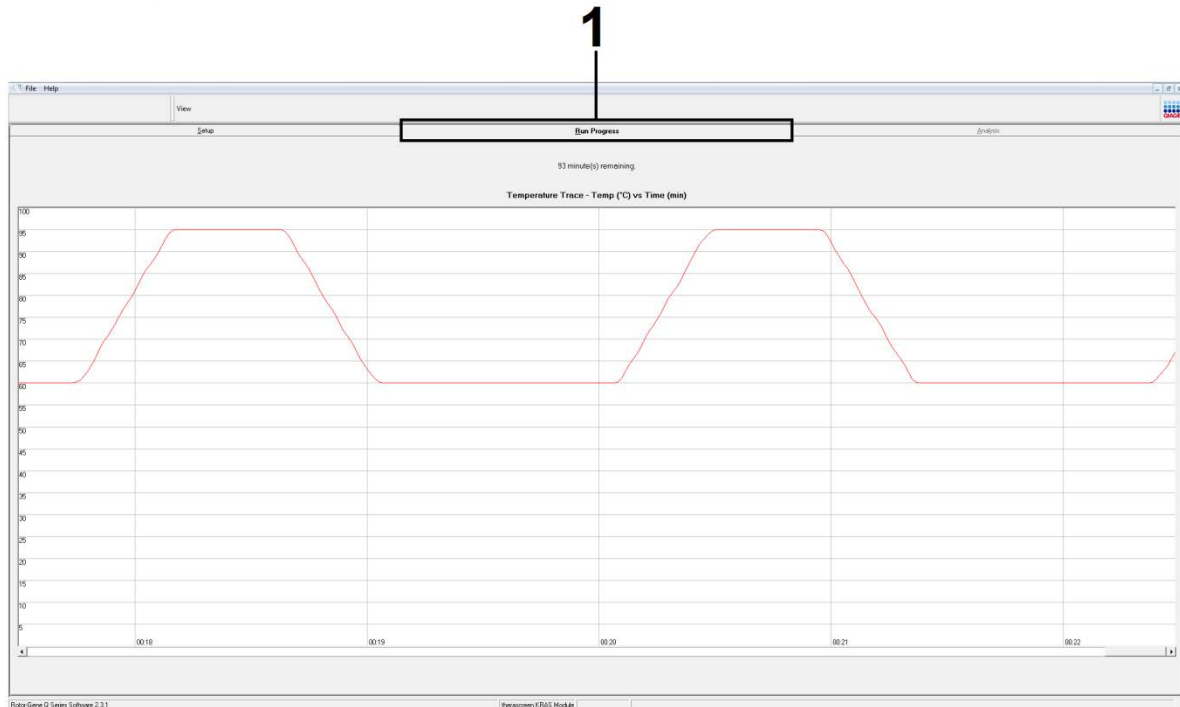
18. Ett "Save As"-fönster [Spara som] visas. Välj ett lämpligt filnamn och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen \*.rex på den valda platsen. Klicka på "Save" [Spara] (bild 7).



**Bild 7. Spara körningsfilen.** 1 = fönstret "Save As" [Spara som], 2 = fälten "File name" [Filnamn] och "Save as type" [Spara som typ] (\*.rex-fil), 3 = knappen "Save" [Spara].

## 19. PCR-körningen startar.

**Obs:** När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] automatiskt för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (bild 8).



**Bild 8. Fliken "Run Progress" [Körningsförlopp].**

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

**Obs:** Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på fliken "Analysis" [Analys] (bild 9).

**Obs:** En förklaring av beräkningsmetoden ges i "Tolkning av resultat" på sidan 38.

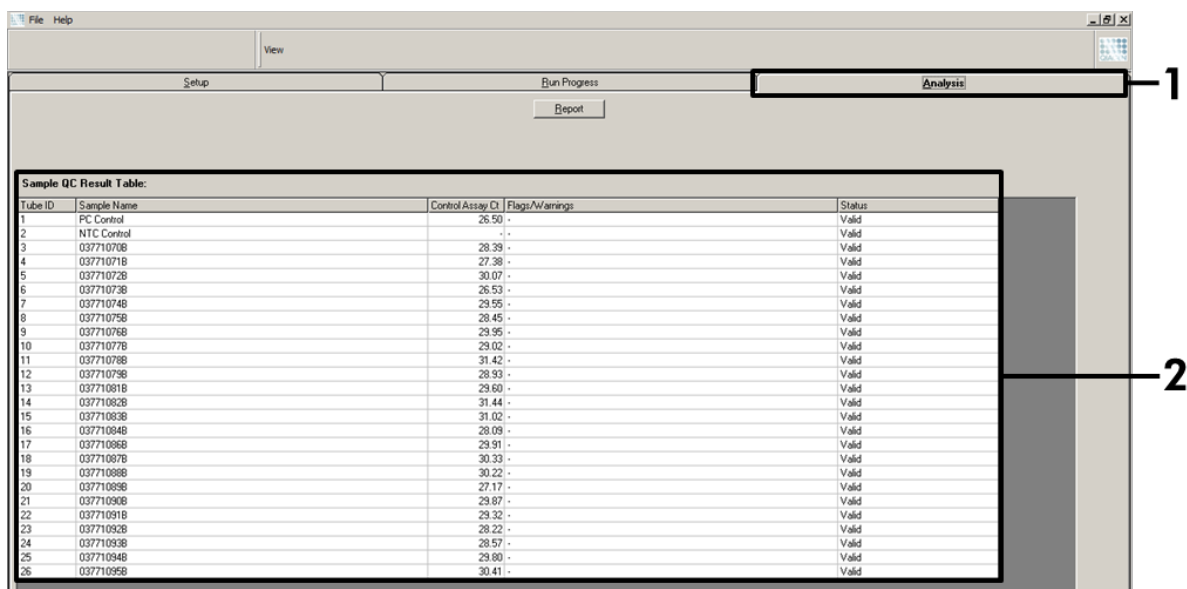


Bild 9. Fliken "Analysis" [Analys] och rapportering av resultat. 1 = fliken "Analysis" [Analys], 2 = "QC Sample Result Table" [Tabell med QC-provresultat].

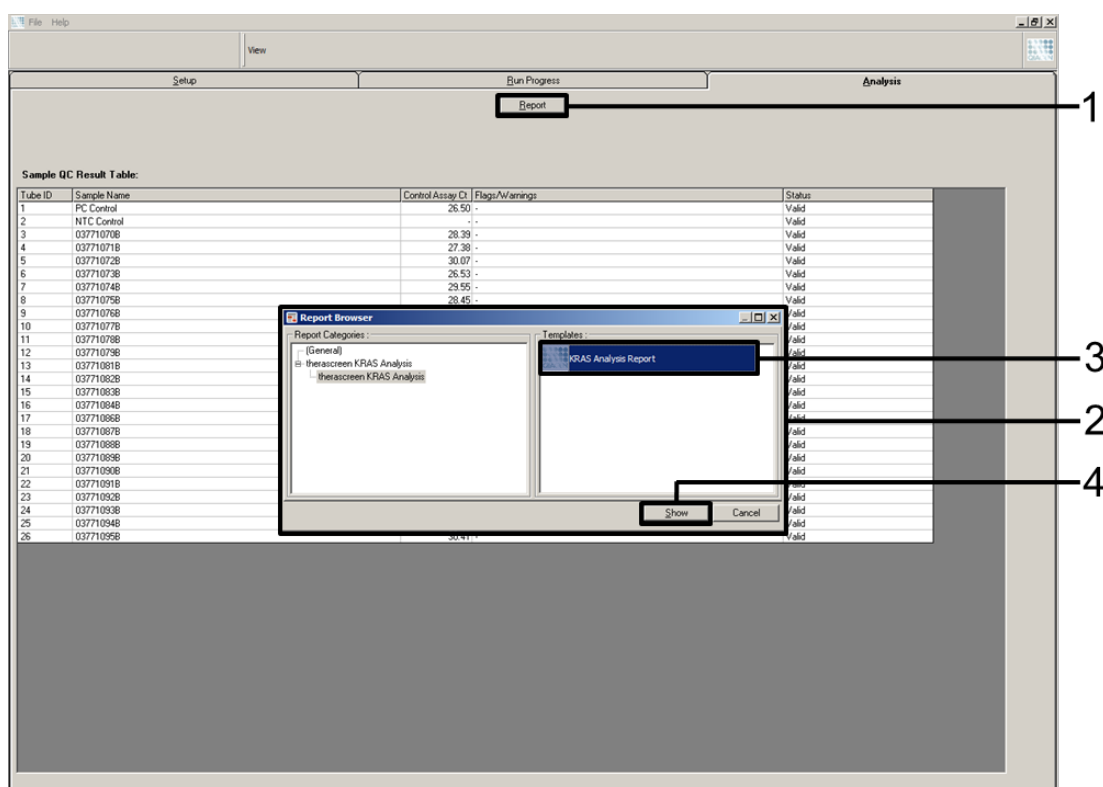
21. Kontrollresultat rapporteras på följande sätt i "Sample QC Result Table" [Tabell med QC-provresultat] (2 i bild 9).

- **Körningskontroller** (PC och NTC, rörpositioner 1 respektive 2): Om resultaten ligger inom acceptabla intervaller visas "Valid" [Giltigt]. Annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].
- **C<sub>T</sub>-värde för provets kontrollreaktion > 32,00:** "Invalid" [Ogiltigt] visas. Mängden DNA är inte tillräcklig för mutationsanalys. Testa om provet. Om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du mer tumörvävnad om det finns tillgängligt (se "Felsökningsguide" på sidan 39).
- **C<sub>T</sub>-värde för provets kontrollreaktion < 21,92:** "Invalid" [Ogiltigt] visas. DNA-koncentrationen är för hög för mutationsanalys. Späd med nukleasfritt vatten för spädning (Dil.) och gör om testet. Späd till ett C<sub>T</sub>-värde på 21,92–32,00. En 1:1-spädning ökar C<sub>T</sub>-värdet med ca 1,0.
- **Ett C<sub>T</sub>-värde för provets kontrollreaktion på 21,92–32,00** (21,92 ≤ kontroll-C<sub>T</sub> ≤ 32,00): "Valid" [Giltigt] visas, DNA-koncentrationen är lämplig för mutationsanalys.

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

- 22. Rapportfiler kan skapas genom att klicka på "Report" [Rapport]. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] visas. Välj "KRAS Analysis Report" [KRAS-analysrapport] under "Templates" [Mallar] och klicka sedan på "Show" [Visa] (bild 10).**

**Obs:** Du kan spara rapporter på en annan plats i formatet Web Archives genom att klicka på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



**Bild 10. Välj "KRAS Analysis Report" [KRAS-analysrapport]. 1 = "Report" [Rapport], 2 = fönstret "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = alternativet "KRAS Analysis Report" [KRAS-analysrapport], 4 = "Show" [Visa].**

## Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer

Detta protokoll är avsett för detektion av KRAS-mutationer.

### Viktigt att tänka på före start

- Ett prov kan testas med KRAS-mutationsanalyserna när det har klarat provbedömningen.
- För effektiv användning av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet 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* KRAS RGQ PCR-kitet.
- Kontrollera att rätt version av programmet *therascreen* KRAS Assay Package som motsvarar versionen på programmet Rotor-Gene Q är installerat innan instrumentet Rotor-Gene Q MDx används första gången (se "Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package" på sidan 95).

### Procedur

1. **Blanda de tinade reagenserna genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer. Centrifugera en kort stund för att samla upp innehållet i botten av röret.**
2. **Ställ in en pipett på en volym som är lägre än den totala volymen för reaktionsmixen och blanda huvudmixarna noga genom att aspirera upp och ned fullständigt 10 gånger.**
3. **Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje aktuellt PCR-rör.**  
**Obs:** I tabell 5 finns layouten för röret vid konfigurering av reaktionsmixarna. För detektion av KRAS-mutationerna ska huvudmixarna läggas till i 8 PC-rör, 8 NTC-rör och 8 rör för varje DNA-prov.

**Tabell 5. Körningslayout i laddningsblocket för detektion av KRAS-mutationer**

Analys	Kontroller		Provnummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
<b>CTRL</b>	1 *	9	17	25	33	41	49	57	65
<b>12ALA</b>	2	10	18	26	34	42	50	58	66
<b>12ASP</b>	3	11	19	27	35	43	51	59	67
<b>12ARG</b>	4	12	20	28	36	44	52	60	68
<b>12CYS</b>	5	13	21	29	37	45	53	61	69
<b>12SER</b>	6	14	22	30	38	46	54	62	70
<b>12VAL</b>	7	15	23	31	39	47	55	63	71
<b>13ASP</b>	8	16	24	32	40	48	56	64	72

\* Siffrorna markerar positioner i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

4. Tillsätt omedelbart 5 µl nukleasfritt vatten för kontroll utan mall (NTC) i NTC-rören (rörposition 9–16) och förslut rören.
5. Tillsätt 5 µl av varje DNA-prov i provrören (rörpositionerna 17–72) och förslut rören.
6. Tillsätt 5 µl KRAS-positiv kontroll (PC) i PC-rören (rörpositionerna 1–8) och förslut rören.
7. Använd en spritpenna och markera locken till de första rören i den lägsta numeriska positionen i varje PCR 4-rör (t.ex. positionerna 1, 5 och 9 etc.) för att visa i vilken riktning rören ska laddas i rotorn med 72 brunnar på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
8. Vänd de förslutna rören 4 gånger för att blanda provet och reaktionsmixen.
9. Placera alla PCR 4-rören på rätt position i rotorn med 72 brunnar enligt körningslayouten (tabell 5) med hjälp av riktningsmarkeringarna.  
**Obs:** Maximalt 7 prover kan inkluderas i varje PCR-körning. Om rotorn inte är fullbelagd måste alla oanvända positioner på rotorn fyllas med ett förslutet, tomt rör. Detta gör att den termiska effektiviteten på instrumentet Rotor-Gene Q MDx säkerställs.
10. Placera rotorn med 72 brunnar i instrumentet Rotor-Gene Q MDx. Se till att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q MDx) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.

11. Starta programmet Rotor-Gene Q och öppna samtidigt mallen genom att dubbelklicka på ikonen "therascreen KRAS Locked Template" på skrivbordet till den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx (bild 11).

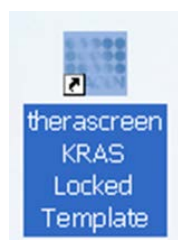


Bild 11. Ikonen "therascreen KRAS Locked Template".

12. Fliken "Setup" [Konfiguration] visas som standard (bild 12). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.

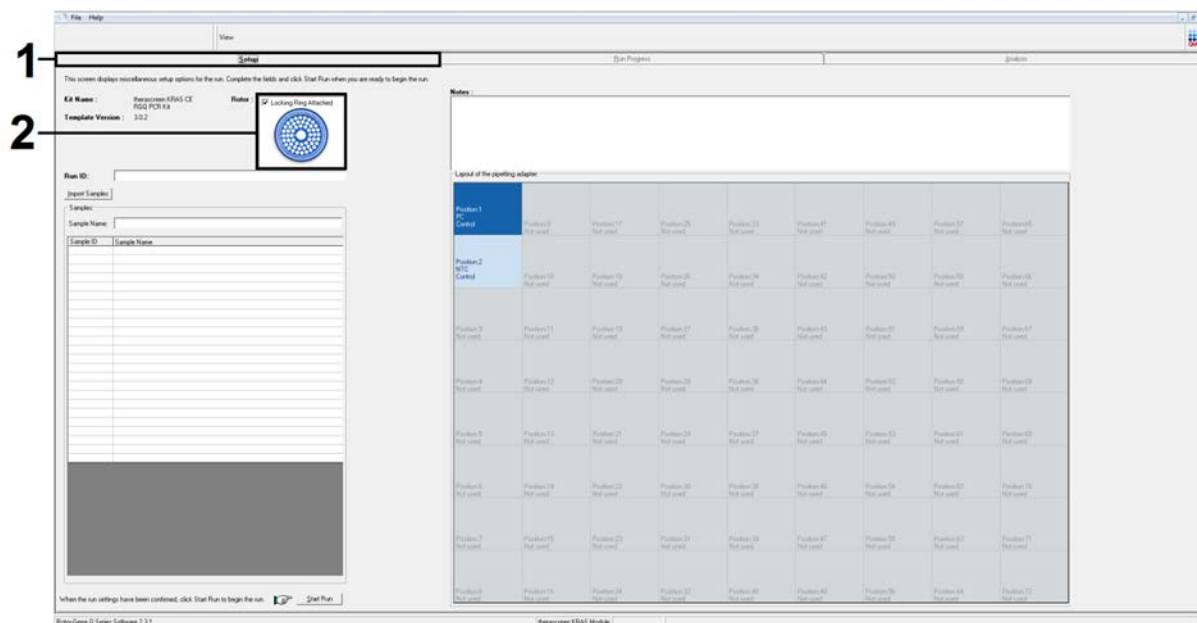


Bild 12. 1 = fliken "Setup" [Konfiguration], 2 = rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast].

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

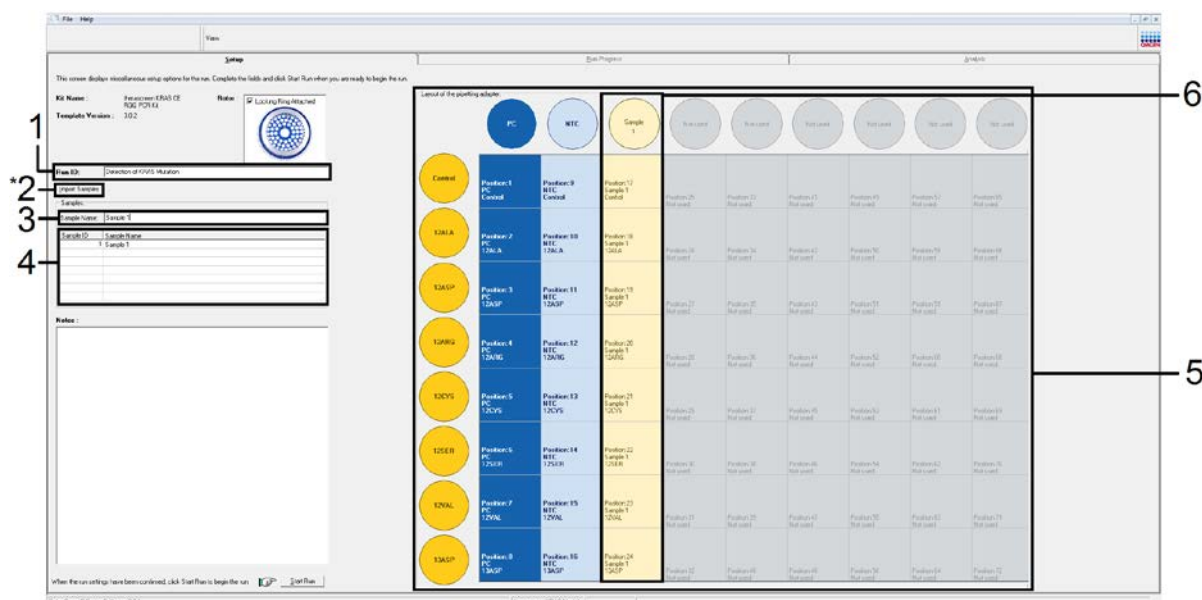
Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" [Prov-ID] (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] på höger sida med provnamnet (bild 13).

**Obs:** Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] att provnamnet som har lagts till är markerat genom en ändring av färgen och att alla 8 analyserna i kolumnen under provcirkeln är markerade (bild 13).

**Obs:** Maximalt 7 prover kan läggas till. Prov-ID (i provcirkeln) kommer automatiskt att tilldelas från 1 till 7.

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

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

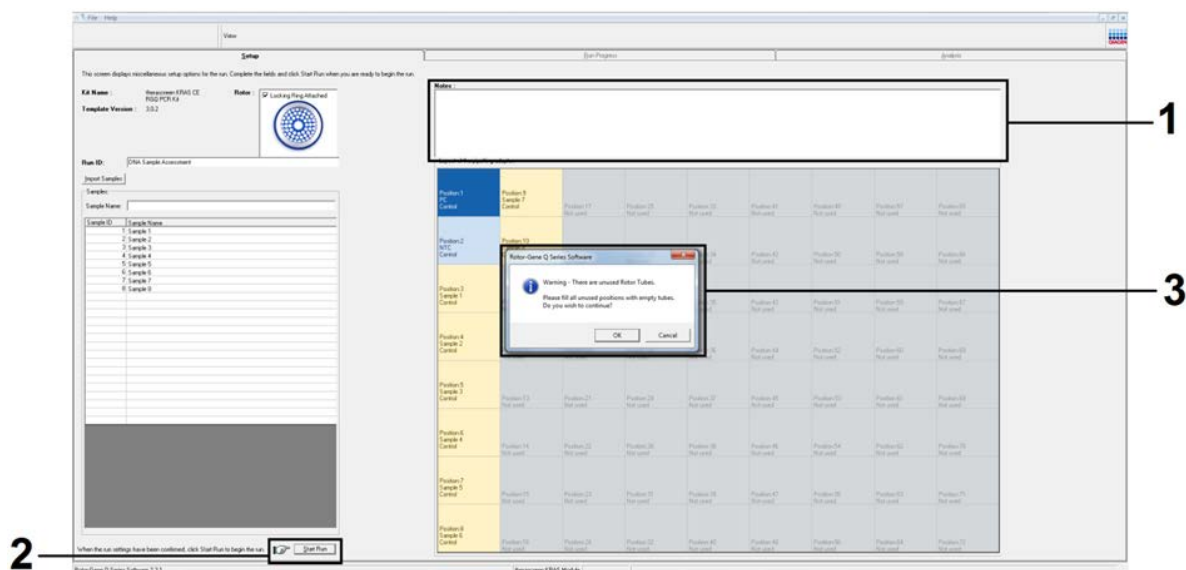


**Bild 13. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn].** 1 = fältet "Run ID" [Körnings-ID], 2 = "Import Sample" [Importera prover] (inte tillgängligt i programversion 2.1), 3 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 4 = provlista, 5 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn], 6 = markerad provcirkel och kolumn med 8 analyser nedanför.

## 15. Upprepa steg 14 för att ange namnen på alla ytterligare prover (bild 14).

**Obs:** Om du vill redigera ett provnamn klickar du på "Sample Name" [Provnamn] i provlistan så visas det valda provet i fältet "Sample Name" [Provnamn] ovanför. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten för att uppdatera namnet.





**Bild 14. Ange ytterligare provnamn i fältet "Sample Name" [Provnamn]. 1 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 2 = provlista, 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] med ytterligare provnamn.**

**16. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i fältet "Notes" [Anteckningar] om det behövs och klicka sedan på knappen "Start Run" [Starta körning] (bild 15).**

**Obs:** Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (bild 15 och bild 16) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med ett förslutet, tomt rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med ett förslutet, tomt rör och klicka på "OK" för att fortsätta.

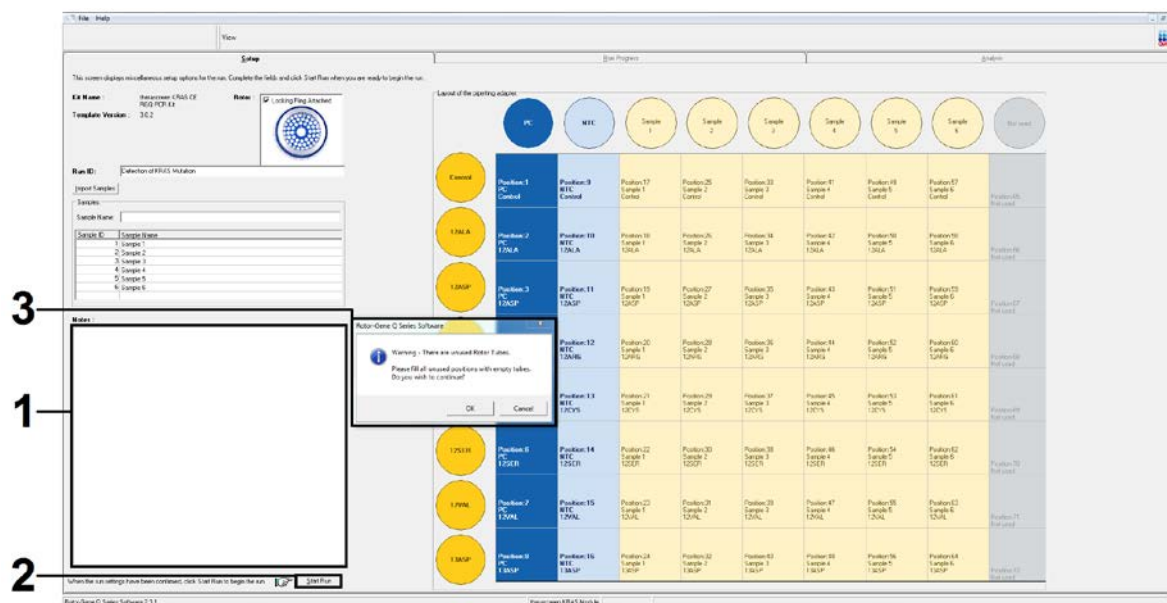


Bild 15. 1 = fältet "Notes" [Anteckningar], 2 = "Start Run" [Starta körning], 3 = "Warning" [Varning] för oanvända rotorpositioner.

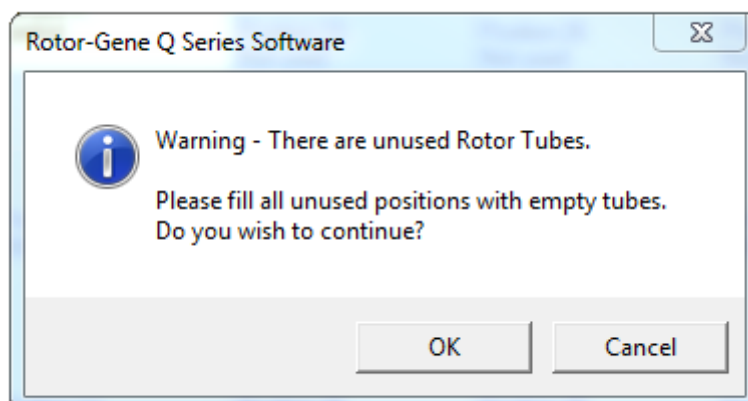


Bild 16. "Warning" [Varning] för oanvända rotorpositioner.

17. Ett "Save As"-fönster [Spara som] visas. Välj ett lämpligt filnamn och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen \*.rex på den valda platsen (bild 17).

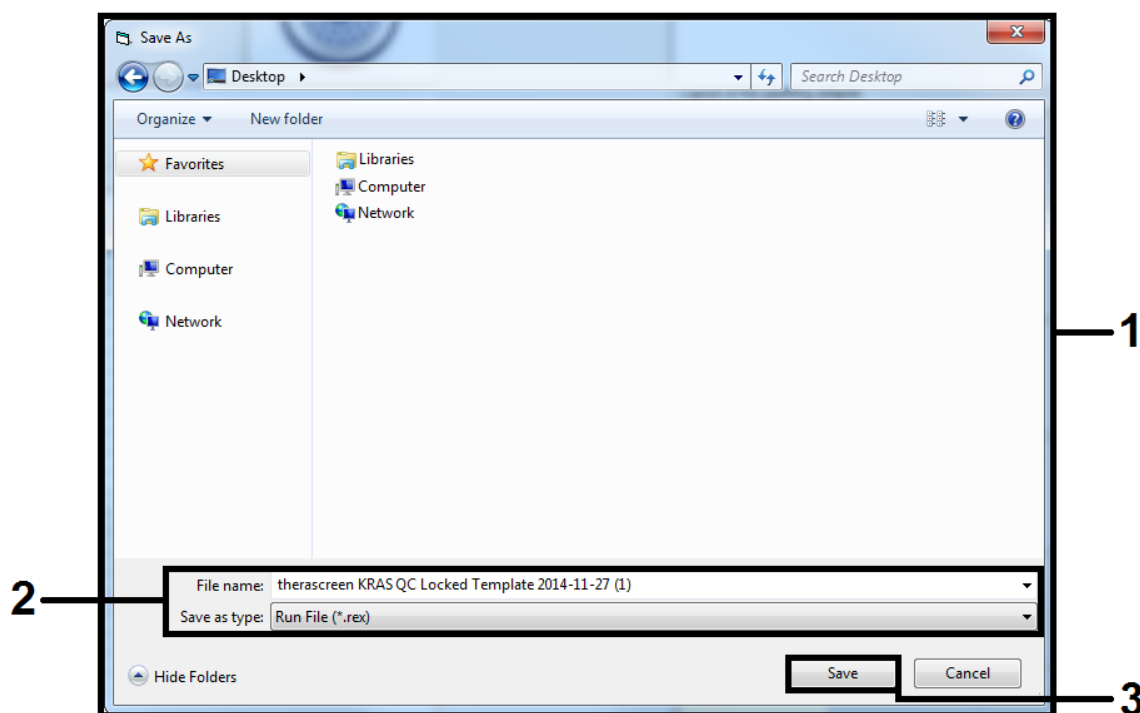


Bild 17. Spara körningsfilen.

18. PCR-körningen startar.

**Obs:** När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] automatiskt för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (bild 18).

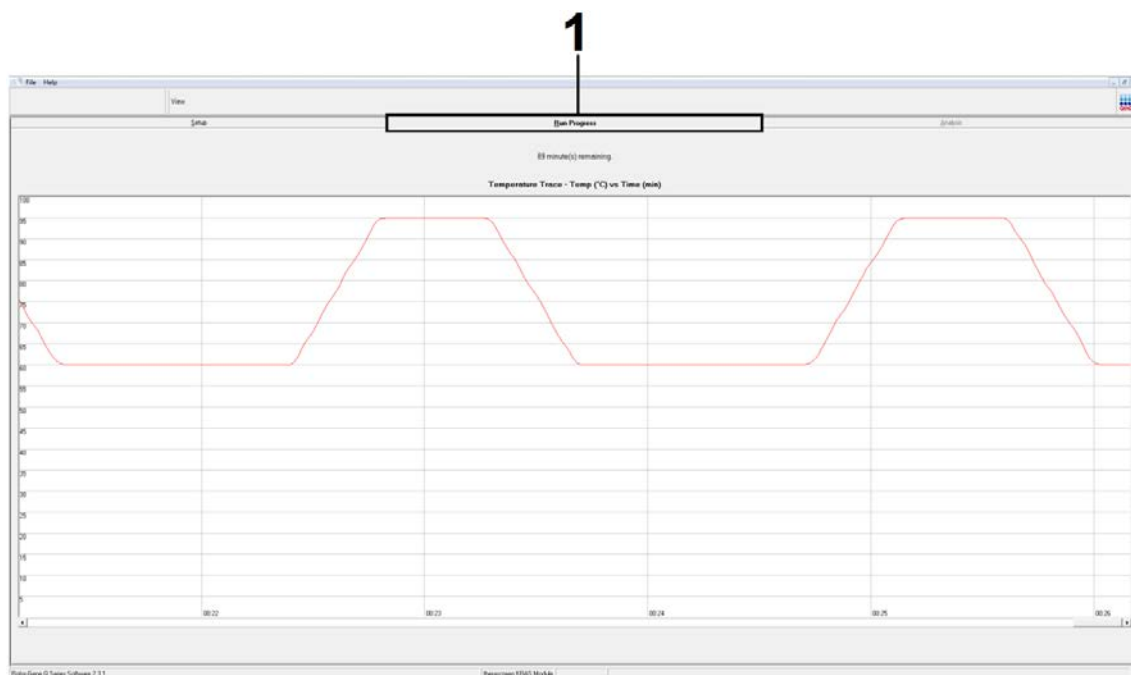


Bild 18. 1 = fliken "Run Progress" [Körningsförlöpp].

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

**Obs:** Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på fliken "Analysis" [Analys] (bild 19).

**Obs:** En förklaring av beräkningsmetoden ges i "Tolkning av resultat" på sidan 38.

**Run Controls, Positive Control:**

Rotor Position	Assay	Flags/Warnings	Positive Control Status
1	Control	-	Valid
2	12ALA	-	Valid
3	12ASP	-	Valid
4	12ARG	-	Valid
5	12CYS	-	Valid
6	12SER	-	Valid
7	12VAL	-	Valid
8	13ASP	-	Valid

**Run Controls, Negative Control:**

Rotor Position	Assay	NTC	Internal Control	Flags/Warnings	Negative Control Status
9	Control	Valid	Valid	-	Valid
10	12ALA	Valid	Valid	-	Valid
11	12ASP	Valid	Valid	-	Valid
12	12ARG	Valid	Valid	-	Valid
13	12CYS	Valid	Valid	-	Valid
14	12SER	Valid	Valid	-	Valid
15	12VAL	Valid	Valid	-	Valid
16	13ASP	Valid	Valid	-	Valid

**Sample Result Table:**

Sample ID	Sample Name	KRAS Status	Flags/Warnings	KRAS Mutation Status
1	03771070B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
2	03771071B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
3	03771072B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
4	03771073B	Mutation Positive	-	13ASP Detected
5	03771074B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
6	03771075B	No Mutation Detected	-	No Mutation Detected
7	03771076B	Mutation Positive	-	13ASP Detected

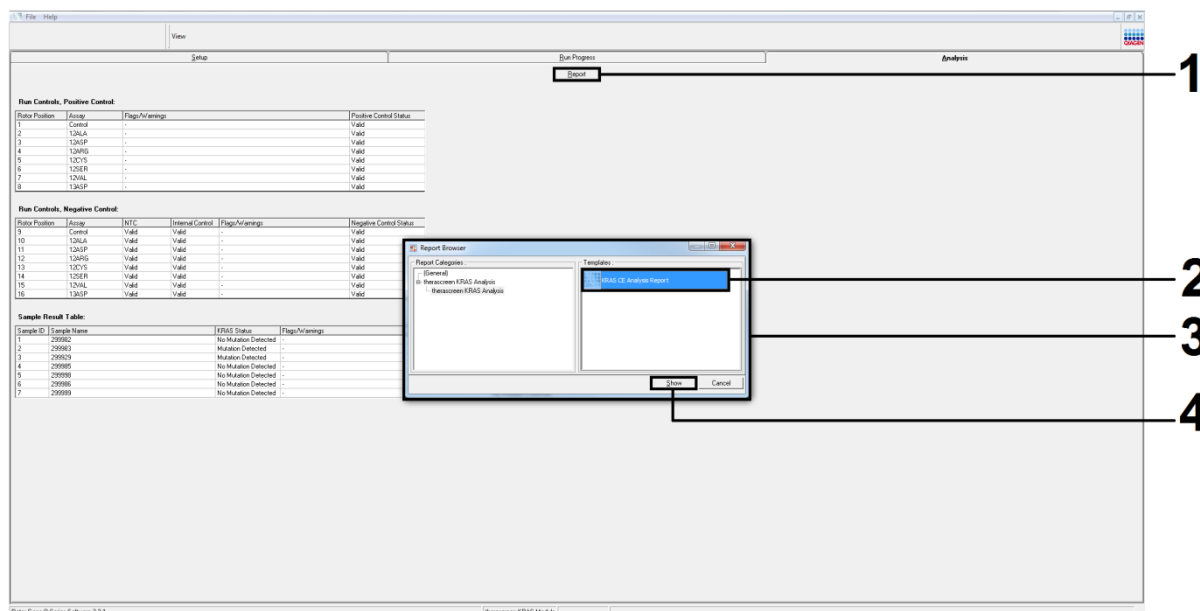
Bild 19. Fliken "Analysis" [Analys] och rapportering av resultat. 1 = fliken "Analysis" [Analys], 2 = panelen "Run Controls, Positive Control" [Körningskontroller, positiv kontroll], 3 = panelen "Run Controls, Negative Control" [Körningskontroller, negativ kontroll], 4 = "Sample Result Table" [Tabell med provresultat], 5 = kolumnen "KRAS Mutation Status" [KRAS-mutationsstatus].

## 20. Analysresultat rapporteras på följande sätt (bild 19):

- **Panelen "Run Controls, Positive Control" [Körningskontroller, positiv kontroll]:** Om resultaten ligger inom det acceptabla intervallet visas "Valid" [Giltigt] för "Positive Control Status" [Status för positiv kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].
- **Panelen "Run Controls, Negative Control" [Körningskontroller, negativ kontroll]:** Om både resultatet "NTC" och "Internal Control" [Internkontroll] ligger inom de acceptabla intervallen visas "Valid" [Giltigt] för "Negative Control Status" [Status för negativ kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].
- **Panelen "Sample Result Table" [Tabell med provresultat]:** Specifika mutationer rapporteras för de mutationspositiva proverna i kolumnen "KRAS Mutation Status" [KRAS-mutationsstatus].

## 21. Rapportfiler kan skapas genom att klicka på "Report" [Rapport]. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] visas. Välj "KRAS Analysis Report" [KRAS-analysrapport] under "Templates" [Mallar] och klicka sedan på "Show" [Visa] (bild 20).

**Obs:** Du kan spara rapporter på en annan plats i formatet Web Archives genom att klicka på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.



**Bild 20. Välj "KRAS Analysis Report" [KRAS-analysrapport].** 1 = "Report" [Rapport], 2 = fönstret "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = alternativet "KRAS Analysis Report" [KRAS-analysrapport], 4 = "Show" [Visa].

## Tolkning av resultat

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

**Obs:** Information om manuell analys finns i "Bilaga 1: Manuellt protokoll för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet", sidan 72.

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

Programmet Rotor-Gene Q interpolerar fluorescenssignaler mellan två registrerade värden (vilka som helst).  $C_T$ -värdena kan därför vara vilket reellt tal som helst (inte begränsat till heltal) i intervallet från 0 till 40.

För *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är tröskelvärdet inställt på 0,05 relativa fluorescensenheter. Det här värdet är konfigurerat i *therascreen* KRAS Assay Package för båda fluorescenskanalerna för Green och Yellow. Tröskelvärdet definierades under utvecklingen av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet.

En beräkning utförs för att bestämma  $\Delta C_T$ -värdet med hjälp av ekvationen:

$$\Delta C_T = [\text{mutationsanalysens } C_T\text{-värde}] - [\text{kontrollanalysens } C_T\text{-värde}]$$

Körningskontrollerna (positiv kontroll, NTC och internkontroller) bedöms för att säkerställa att acceptabla  $C_T$ -värden uppfylls och att reaktionerna utförs korrekt.

Provets  $\Delta C_T$ -värden beräknas som differensen mellan mutationsanalysens  $C_T$  och kontrollanalysens  $C_T$  från samma prov. Prover klassas som mutationspositiva om de ger ett  $\Delta C_T$ -värde lägre än eller lika med cutoff  $\Delta C_T$ -värdet för den analysen. Över det här värdet kan provet antingen innehålla mindre än den procentandel mutation som kan detekteras av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet (bortom gränsen för analyserna), eller så är provet mutationsnegativt vilket rapporteras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad].

Ingen amplifiering i mutationsreaktioner räknas som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad].  $\Delta C_T$ -värden som beräknas genom bakgrundsamplifiering förväntas vara större än cutoff  $\Delta C_T$ -värdena och provet kommer att klassificeras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad].

Analysresultaten visas som "Mutation Positive" [Mutationspositiva], "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad], "Invalid" [Ogiltig] eller, om en körningskontroll misslyckas, "Run Control Failed" [Körningskontrollen

misslyckades]. För de mutationspositiva proverna rapporteras specifika mutationer.

Andra möjliga resultat som kan visas behandlas i avsnitten "Protokoll: Bedömning av DNA-prover" på sidan 16 i den här handboken.

I sällsynta fall kan en tumör innehålla mer än en mutation. I sådana fall kommer mutationen som ger det lägsta  $\Delta C_T$ -värdet att identifieras.

## 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 på åtgärd

---

#### Ogiltiga resultat

- |  |   |
|--|---|
| a) Förvaringsvillkoren för en eller flera kitkomponenter överensstämmer inte med instruktionerna i "Förvaring och hantering av reagenser" (sidan 13) | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs. |
| b) Utgångsdatum för <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR-kitet har passerat   | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) för reagenserna och använd ett nytt kit om det behövs. |

#### NTC-proverna visar positiva resultat i FAM-kanalen

- |   |  |
|---|--|
| 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>Kontrollera att arbetsytorna och instrumenten dekontamineras regelbundet. |
|---|--|

## Flaggor som genereras av *therascreen* KRAS Assay Package

I tabell 6 listas de flaggor som kan genereras av *therascreen* KRAS Assay Package, deras betydelse och vilka åtgärder som kan vidtas.

**Tabell 6. *therascreen* KRAS Assay Package-flaggor**

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C <sub>T</sub> utanför intervallet för positiv kontroll i kontrollreaktionen.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C <sub>T</sub> utanför intervallet för en eller flera mutationskontrollreaktioner.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (Control Reaction Mix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (mutationsreaktionsmix) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen ovanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen är nedanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INVALID_CT	Ogiltig PCR-körning – ogiltigt FAM (mindre än gränsvärdet) för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.



Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
NTC_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i negativ kontroll kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltigt prov – fluorescensdata i provkontrollen kan inte tolkas.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa de relevanta proverna.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Ogiltigt prov – FAM C <sub>T</sub> är för lågt i provkontrollen.	Späd provet för att öka kontroll-C <sub>T</sub> -värdet. Den här spädningen ska beräknas baserat på antagandet att spädning 1:1 med vatten som medföljer kitet kommer att öka C <sub>T</sub> med 1,0. När provet har späts ut ska du konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Ogiltigt prov – FAM C <sub>T</sub> är för högt i provkontrollreaktionen.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämmd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C <sub>T</sub> för högt (eller inget C <sub>T</sub> ) för internkontroll (HEX), FAM-kanalen mutations-negativ.	<p>Om provet ges statusen giltig – ingen åtgärd.</p> <p>CRC-prover: Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_INT_CTRL _FAIL (forts.)		<p>NSCLC-prover:</p> <p>Om provet ges statusen ogiltigt, späd ut det återstående provet 1 till 8 med vatten från röret märkt med DIL och kontrollera att den slutliga volymen är större än 40 µl (t.ex. 10 µl DNA och 70 µl vatten från röret märkt med DIL). Konfigurera sedan en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet är ogiltigt, späd ut det återstående provet 1 till 8 med vatten från röret märkt med DIL och kontrollera att den slutliga volymen är större än 40 µl. Testa sedan den här spädningen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämmd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_INT _CTRL_EARLY _CT	Mutationsrör ogiltigt – C <sub>T</sub> HEX för lågt för provet (internkontroll).	<p>Om provet ges statusen giltigt – ingen åtgärd.</p> <p>Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet.</p> <p>Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurerar en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen.</p> <p>Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsrör ogiltigt – fluorescensdata i internkontroll kan inte tolkas.	<p>Om provet ges statusen giltigt – ingen åtgärd.</p> <p>Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
MUTATION _EARLY_CT	Mutationsrör ogiltigt – C <sub>T</sub> FAM för lågt för provet.	Om provet ges statusen giltigt – ingen åtgärd.  Om provet ges statusen ogiltigt konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
SAMPLE_POSITIVE _AND_INVALID	En eller flera mutationer för ett prov är giltiga och positiva, och samtidigt är en eller flera mutationer för samma prov ogiltig(a) (varning, inte ett fel).	Ingen.

## Kvalitetskontroll

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

## Begränsningar

Testet är utformat för att detektera 7 mutationer i kodonerna 12 och 13 i KRAS-genen. Prover med resultat som rapporteras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad] kan innehålla KRAS-mutationer som inte detekteras av analysen (t.ex. 13CYS).

Detektion av mutationer beror på provets integritet och på mängden amplifierbart DNA som finns i provet. Proceduren ska upprepas i händelse av att den initiala bedömningen av DNA:t i provet indikerar att mängden antingen inte är tillräcklig eller är för hög för mutationsanalys.

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet används med en PCR-procedur (polymerase chain reaction). Precis som vid alla PCR-procedurer kan prover kontamineras av externa DNA-källor i testmiljön och av DNA i den positiva kontrollen. Iaktta försiktighet för att förhindra att prover och reaktionsmixreagenser kontamineras.

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är endast avsett att användas för att skilja mellan vildtyp och mutant. Testet har utformats så att varje mutantreaktion är mest känslig för den specifika mutation som mäts. I prover där en mutation detekteras kan dock korsreaktivitet uppstå med andra mutationsreaktioner. Om mer än en mutantreaktion är positiv blir resultatet det som har lägst  $\Delta C_T$ -resultat.

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är endast validerat för FFPE CRC- och NSCLC-vävnad.

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är endast validerat för användning med QIAamp DNA FFPE Tissue Kit. Endast Rotor-Gene Q MDx har validerats för användning med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet.

## Testets egenskaper

### Analytisk prestanda

De specifika prestandaegenskaperna för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet fastställdes med hjälp av studier av FFPE-vävnadsprover tagna från CRC-patienter och NSCLC-patienter. Provtagningsmetoderna för NSCLC-proverna utgjordes av nålbiopsi (CNB), finnålspunktion (FNA) och resektion. För varje provtyp användes 8 mänskliga FFPE-cellinjer, av vilka 7 innehåller kända KRAS-mutationer som detekterats av analysen, och en KRAS-vildtyp (dvs. inga mutationer vid kodon 12 och 13). Mutationsstatusen för proverna bekräftades genom bidirektionell Sanger-sekvensering.

### Cutoff

225 FFPE-prover testades med en metod enligt instruktionerna i CLSI EP17-A (2004) (8) för att fastställa cutoff-värden för analysen. Kontrollreaktionens  $C_T$ -intervall fastställdes från 21,92 till 32,00. Cutoff-värdena, vilka baseras på  $C_T$  för kontrollreaktionen subtraherat från  $C_T$  för mutantreaktionerna ( $\Delta C_T$ ) visas i tabell 7.

**Tabell 7. Fastställda cutoff-värden för varje mutationsanalys**

	Mutationsanalys						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
<b>Cutoff (<math>\leq \Delta C_T</math>)</b>	8,0	6,6	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5

### LOB (limit of blank)

För att bedöma prestandan för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet vid frånvaro av mutant positiv mall och för att säkerställa att ett blankprov inte genererar en analytisk signal som kan indikera en låg koncentration av mutation utvärderades prover utan mall. Resultaten visade ingen detekterbar kontroll eller mutanta  $C_T$ -värden i någon av mutations- eller kontrollreaktionsrören (internkontrollens  $C_T$ -värden var samtliga giltiga).



## Jämförelse med analytisk referensmetod: CRC

Två studier utfördes för att visa överensstämmelse i mutationsstatus för de CRC-prover som testats med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet i relation till bidirektionell sekvensering. Totalt 137 av FFPE-proverna återgav giltiga resultat för både *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet och bidirektionell sekvensering.

De totala resultaten, förutom 6 misslyckade prover med bidirektionell Sanger-sekvensering, visas i tabell 8. Tabell 9 visar analysen av överensstämmelse mellan *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet och bidirektionell sekvensering.

**Tabell 8. *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering**

Mutationsbestämning med bidirektionell sekvensering									
	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Totalt
Negativt	80	–	–	1	–	–	–	1	82
Positiv 12ALA	–	3	–	–	–	–	–	–	3
Positiv 12ARG	–	–	–	1	–	–	–	–	1
Positiv 12ASP	–	–	–	20	–	–	–	–	20
Positiv 12CYS	–	–	–	–	3	–	–	–	3
Positiv 12SER	–	–	–	–	–	–	–	–	0
Positiv 12VAL	2	–	–	–	–	–	14	–	16
Positiv 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	11	12
Totalt	83	3	0	22	3	0	14	12	137

**Tabell 9. Analys av överensstämmelse**

Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)	95 % konfidensintervall (CI)
Total överensstämmelse (procent)	132/137 (96,35)	92,69–98,21
Positiv överensstämmelse (procent)	52/54 (96,30)	89,41–98,77
Negativ överensstämmelse (procent)	80/83 (96,39)	91,30–98,55

En andra uppsättning med unika prover utvärderades för att komplettera data från den första studien. En uppsättning med 271 CRC FFPE-prover togs fram; 250 hade okänd mutationsstatus och 21 prover hade känd mutationsstatus för detektion av sällsynta mutationer, och sedan gjordes en jämförelse med bidirektionell Sanger-sekvensering enligt beskrivningen ovan.

En analys av överensstämmelse utfördes på 247 prover med både giltiga resultat från bidirektionell sekvensering och *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet. Det fanns 9 diskordanta prover. Den totala överensstämmelsen var 96,4 %. Dessa data stöder att prestandan för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är korrekt (tabell 10 och tabell 11).

**Tabell 10. *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering (andra studien)**

Bestämning med <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR-kitet	Mutationsbestämning med bidirektionell sekvensering								Totalt
	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	
	Negativt	132	–	–	–	–	1	–	133
	Positiv 12ALA	–	10	–	–	–	–	–	10
	Positiv 12ARG	5	–	5	–	–	–	–	10
	Positiv 12ASP	–	–	–	31	–	–	–	31
	Positiv 12CYS	1	–	–	–	11	–	–	12
	Positiv 12SER	–	–	–	–	–	13	–	13
	Positiv 12VAL	2	–	–	–	–	–	25	27
	Positiv 13ASP	–	–	–	–	–	–	11	11
<b>Totalt</b>	<b>140</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>31</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>25</b>	<b>11</b>	<b>247</b>

**Tabell 11. Analys av överensstämmelse (andra studien)**

<b>Mått på överensstämmelse</b>	<b>Frekvens (%)</b>	<b>95 % konfidensintervall (CI)</b>
Total överensstämmelse (procent)	238/247 (96,36)	93,73–98,09
Positiv överensstämmelse (procent)	106/107 (99,07)	95,64–99,95
Negativ överensstämmelse (procent)	132/140 (94,29)	89,93–97,13

**Jämförelse med analytisk referensmetod: NSCLC**

För att visa överensstämmelse i mutationsstatus för de NSCLC-prover som testats med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet vid jämförelse med bidirektionell Sanger-sekvensering togs kliniska FFPE NSCLC-prover via resektion, CNB eller FNA. DNA extraherades från varje prov innan testning med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet. Resultaten från det här testet jämfördes med resultaten som erhöles med bidirektionell Sanger-sekvensering.

Totalt 360 prover återgav ett giltigt resultat med både *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet och bidirektionell Sanger-sekvensering, och 340 prover hade överensstämmande resultat.

Överensstämmelse mellan *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet och bidirektionell sekvensering visas i tabell 12. Två prover gav dubbla mutationsbestämningar med bidirektionell Sanger-sekvensering. Eftersom en mutation var samma som i resultatet från *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet klassificerades de här proverna som överensstämmande för analysen av total överensstämmelse, positiv överensstämmelse och negativ överensstämmelse (tabell 13).

**Tabell 12. *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering**

Mutationsbestämning med bidirektionell sekvensering	Bestämning med <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR-kitet									
	Neg.	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	Totalt	
	Negativt	261	1	–	4	6	2	5	1	280
	Positiv 12ALA	–	4	–	–	–	–	–	–	4
	Positiv 12ALA_ 12CYS	–	1	–	–	–	–	–	–	1
	Positiv 12ARG	–	–	3	–	–	–	–	–	3
	Positiv 12ASP	–	–	–	14	–	–	–	–	14
	Positiv 12CYS	–	–	–	–	35	–	–	–	35
	Positiv 12SER	–	–	–	–	–	–	1	–	1
	Positiv 12VAL	2	–	–	–	–	–	17	–	17
	Positiv 13ASP	1	–	–	–	–	–	–	4	5
<b>Totalt</b>	<b>262</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>18</b>	<b>41</b>	<b>2</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>360</b>	

**Tabell 13. Analys av överensstämmelse**

Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)	95 % konfidensintervall (CI)
Total överensstämmelse (procent)	340/360 (94,44)	92,03–96,29
Positiv överensstämmelse (procent)	79/80 (98,75)	94,21–99,94
Negativ överensstämmelse (procent)	261/280 (93,21)	90,20–95,51

## Detektionsgräns (LOD)

Arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är baserat på mängden amplifierbart DNA i provet enligt bestämningen av kontrollreaktionens  $C_T$ -värde. Det angivna input-intervallet för analysen definieras av det förspecificerade kontroll- $C_T$ -intervallet på 21,92 till 32,00. LOD är den minimi-procentandel mutant-DNA som kan detekteras i en vildtyp-bakgrund när den totala mängden amplifierbart DNA ligger inom det angivna intervallet men ändå under tröskelvärdet för cutoff  $\Delta C_T$ .

## CRC

En studie utfördes för att avgöra LOD för var och en av de 7 mutationsspecifika reaktionerna som innefattas i *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet. För *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet definieras gränsen för detektering av mutant-DNA i en bakgrund med vildtyp-DNA som den lägsta spädningsfaktorn där 95 % av testreplikaten för varje mutationspositivt prov bestämdes som positiva.

Logistiska regressionsmodeller tillämpades individuellt på varje analys för datauppsättningarna med låga och höga DNA-inputnivåer. I de här modellerna var responsvariabeln det binära resultatet av mutation detekterad (detektion = 1) och mutation inte detekterad (detektion = 0); den kontinuerliga förklarande variabeln var  $\log_2$  % mutationsspädning. LOD-värdena beräknades som procentandelen mutationsspädning som gav en förutspådd sannolikhet för detektion på 0,95 (tabell 14).

**Tabell 14. LOD-värden för varje mutationsanalys med FFPE-cellinjer**

Analys	LOD $C_{95}$
	(procent mutant-DNA i vildtyps-DNA)
12ALA	0,8
12ARG	2,6
12ASP	6,4
12CYS	1,5
12SER	5,6
12VAL	1,6
13ASP	6,4

## NSCLC

LOD för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kit-analyser bestämdes och verifierades med hjälp av CRC-vävnad. De här LOD-resultaten har verifierats på nytt för NSCLC-vävnad.

Studien utfördes i 2 delar. I del 1 spädades 60 replikat av 7 mutanta FFPE NSCLC-cellinjer som representerade varje mutation till LOD för den respektive analysen och testades. Ila 60 giltiga FFPE-cellinjereplikat för varje bedömt prov visade 100 % detektion för respektive mutationsreaktion vid den bedömda LOD:en.

I del 2 testades 96 replikat av kliniska FFPE NSCLC-prover (insamlade med de 3 provtagningsmetoderna resektion, CNB och FNA) som representerade varje mutation efter att de hade späts till LOD för den respektive analysen.

De 96 giltiga replikaten för 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL och 13ASP visade 100 % korrekt bestämning. Analyserna för 12CYS och 12SER visade 95,8 % detektion vid LOD.

Detta visar att det tidigare fastställda LOD-värdet är verifierat för alla mutationsanalyser vid bedömning av NSCLC-vävnadsprover och kliniska FFPE NSCLC-prover/FFPE-cellinjer/patientmatchade prover.

## DNA-input och linjäritet

### Effekt av DNA-inputnivå på $\Delta C_T$ -värden

När prover med olika nivåer totalt DNA innehåller samma andel mutant-DNA förväntas det att de uppmätta  $\Delta C_T$ -värdena förblir konsekventa. DNA som extraherats från 8 FFPE-cellinjer användes för att bereda pooler av DNA med det lägsta uppnåeliga  $C_T$ -värdet för kontrollreaktionen.

Spädningsintervallet för varje mutationsreaktion och  $\Delta C_T$ -medelvärde som erhöles från resultaten visas i tabell 15 och tabell 16. De totala  $\Delta C_T$ -värdena är konsekventa över hela arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet för alla analyser, vilket visar att DNA-nivån inte påverkar precisionen för mutationsbestämningen.

**Tabell 15. Effekten av DNA-input på  $\Delta C_T$ -värden över input-kontrollreaktion- $C_T$ -intervall (med CRC FFPE-cellinje-DNA)**

Analys	$\Delta C_T$				
	Spädning 1 ~20–21 $C_T$	Spädning 2 ~23–24 $C_T$	Spädning 3 ~26–27 $C_T$	Spädning 4 ~29–30 $C_T$	Spädning 5 ~32–33 $C_T$
<b>12ALA</b>	1,56	1,25	1,16	1,14	1,27
<b>12ASP*</b>	2,46	2,18	2,11	2,11	1,75
<b>12ARG</b>	1,18	0,63	1,08	0,94	1,06
<b>12VAL</b>	0,29	0,25	0,15	0,26	–0,1
<b>12SER</b>	2,91	2,21	2,15	2,15	2,08
<b>12CYS</b>	0,98	0,71	0,58	0,81	0,67
<b>13ASP</b>	3,57	2,84	2,54	2,46	2,62

\* Det totala antalet replikat för 12ASP var 27.

**Tabell 16. Effekten av DNA-input på  $\Delta C_T$ -värden över input-kontrollreaktion- $C_T$ -intervallet – NSCLC FFPE-prover**

Analys	$\Delta C_T$				
	Spädning 1 ~20–21 $C_T$	Spädning 2 ~23–24 $C_T$	Spädning 3 ~26–27 $C_T$	Spädning 4 ~29–30 $C_T$	Spädning 5 ~32–33 $C_T$
<b>12ALA</b>	3,40	3,25	3,11	2,90	3,31
<b>12ASP</b>	3,63	2,92	2,55	2,46	–*
<b>12ARG</b>	2,49	2,22	2,25	2,23	1,40
<b>12VAL</b>	1,34	1,23	1,18	1,13	0,97
<b>12SER</b>	5,34	4,50	4,30	3,92	–*
<b>12CYS</b>	1,70	1,71	1,70	1,77	1,01
<b>13ASP</b>	6,24	5,36	5,14	4,87	–*

\* Inget  $C_T$ -värde för mutationsreaktionen återgavs på grund av låg koncentration av DNA, och därför beräknades inget  $\Delta C_T$ -värde.

### **Linjäritet/amplifieringseffektivitet som en funktion av DNA-input**

Linjäriteten och amplifieringseffektiviteten för PCR för varje mutationsreaktion i relation till kontrollreaktionen över hela arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kit påvisades. Amplifieringseffektiviteten för varje mutationsreaktion och kontrollreaktionen beräknades som  $[2(-1/\text{slope})] - 1$ .

Amplifieringseffektiviteten för kontrollen jämfört med mutantreaktionen indikerar att  $\Delta C_T$ , och därmed även mutationsbestämningen, är konsekvent över hela arbetsintervallet för analysen. En sammanfattning av värdena visas i tabell 17 och tabell 18.

### **Linjäritet/amplifieringseffektivitet som en funktion av procentandelen mutation**

Syftet med den här studien var att utvärdera hur amplifieringseffektiviteten påverkas av seriellt utspädd mutant positivt prov över hela arbetsintervallet för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet, med början på input-nivåerna för  $C_T$  vid ungefär 22–23  $C_T$ .

DNA-extrakt från CRC FFPE-cellinjer och NSCLC-prover bedömdes först genom OD-avläsningar innan PCR utfördes med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet. DNA-stammar bereddes sedan till ett kontrollreaktions- $C_T$  motsvarande ungefär 23  $C_T$ . Stammarna späddes seriellt två gånger, båda gångerna med vildtyp-DNA, för att den totala mängden vildtyp-DNA skulle vara konstant medan procentandelen mutant-DNA i provet varierades.

Pooler av DNA som var tillräckligt för 6 replikat per mutation bereddes.  $C_T$ - och  $\Delta C_T$ -data för varje mutation vid varje spädningsspunkt beräknades. I en linjär regressionsmodell jämfördes mutationsreaktions- $C_T$  med  $\log_2$  DNA-input-spädning. Studien visade att spädning av mutationer i en bakgrund med konstant koncentration av vildtyp-DNA resulterade i amplifieringseffektiviteter som inte varierade signifikativt utanför värdena som bestämdes i linjäritetsstudien ovan.



**Tabell 17. Amplifieringseffektivitet i kontroll- och mutationsreaktioner: CRC-cellinj-DNA**

		Intercept	Standardfel för intercept	Beräknad lutning	Standardfel (lutning)	Nedre tvåsidig 95 % konfidens- gräns (lutning)	Övre tvåsidig 95 % konfidens- gräns (lutning)	Amplifierings- effektivitet	Skillnad i amplifierings- effektivitet
<b>12ALA</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	21,060	0,060	-1,008	0,007	-1,023	-0,993	<b>0,989</b>	0,03
	12ALA C <sub>T</sub>	22,476	0,103	-0,987	0,013	-1,013	-0,961	<b>1,019</b>	
<b>12ARG</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	20,825	0,083	-1,035	0,01	-1,056	-1,014	<b>0,954</b>	0,056
	12ARG C <sub>T</sub>	23,237	0,083	-0,993	0,011	-1,016	-0,97	<b>1,01</b>	
<b>12ASP</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	20,385	0,13	-1,013	0,16	-1,046	-0,98	<b>0,982</b>	-0,003
	12ASP C <sub>T</sub>	21,347	0,065	-1,015	0,008	-1,032	-0,999	<b>0,979</b>	
<b>12CYS</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	23,437	0,063	-0,981	0,01	-1,003	-0,96	<b>1,026</b>	0,032
	12CYS C <sub>T</sub>	24,289	0,039	-0,961	0,006	-0,974	-0,947	<b>1,058</b>	
<b>12SER</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	22,568	0,050	-1,003	0,008	-1,02	-0,986	<b>0,996</b>	0,105
	12SER C <sub>T</sub>	25,212	0,087	-0,934	0,014	-0,963	-0,904	<b>1,101</b>	
<b>12VAL</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	21,208	0,047	-0,995	0,006	-1,007	-0,983	<b>1,007</b>	0,033
	12VAL C <sub>T</sub>	21,532	0,043	-0,972	0,005	-0,983	-0,961	<b>1,04</b>	
<b>13ASP</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	23,207	0,056	-1,001	0,009	-1,02	-0,982	<b>0,999</b>	0,145
	13ASPC <sub>T</sub>	26,466	0,106	-0,909	0,017	-0,945	-0,873	<b>1,144</b>	

Prov

**Tabell 18. Amplifieringseffektivitet i kontroll- och mutationsreaktioner: NSCLC-prover**

		Intercept	Standardfel för intercept	Beräknad lutning	Standardfel (lutning)	Nedre tvåsidig 95 % konfidens- gräns (lutning)		Övre tvåsidig 95 % konfidens- gräns (lutning)		Skillnad i amplifierings- effektivitet
<b>12ALA</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	22,74	0,04	-0,15	0,02	-0,19	-0,11	0,94	0,069	
	12ALA C <sub>T</sub>	24,11	0,16	-1,06	0,07	-1,20	-0,93	1,01		
<b>12ARG</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	21,92	0,03	-0,07	0,01	-0,09	-0,05	0,94	0,093	
	12ARG C <sub>T</sub>	24,44	0,02	-0,98	0,01	-0,96	-0,96	1,04		
<b>12ASP</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	21,73	0,05	-0,13	-0,02	-0,17	-0,08	0,96	-0,001	
	12ASP C <sub>T</sub>	22,69	0,03	-0,97	0,01	-1,00	-0,95	0,96		
<b>12CYS</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	21,73	0,04	-0,11	0,01	-0,14	-0,08	0,98	0,019	
	12CYS C <sub>T</sub>	22,77	0,03	-1,01	0,01	-1,03	-0,99	1,00		
<b>12SER</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	22,03	0,05	-0,06	0,02	-0,10	-0,02	0,97	0,127	
	12SER C <sub>T</sub>	25,34	0,03	-0,97	0,01	-0,99	0,94	1,09		
<b>12VAL</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	22,13	0,04	-0,03	0,02	-0,07	0,01	0,92	0,011	
	12VAL C <sub>T</sub>	23,34	0,08	-0,95	0,03	-1,01	-0,88	0,91		
<b>13ASP</b>	Kontroll-C <sub>T</sub>	22,63	0,02	-0,02	0,01	0,001	-0,04	0,94	0,066	
	13ASPC <sub>T</sub>	25,14	0,07	-0,94	0,03	-1,00	-0,88	1,01		

Prov

## Interfererande substanser

Syftet med den här studien var att utvärdera huruvida potentiellt interfererande substanser påverkar effekten hos *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet. Detta gjordes genom att analysera hur varje substans påverkade (genom att addera substanserna till experiment vid olika koncentrationer)  $\Delta C_T$ -värden och mutationsstatus hos testproverna. Potentiellt interfererande substanser från DNA-extraktionsprocessen som testades var: buffert AL, buffert ATL, etanol, paraffin-vax, proteinas K, tvättbuffert AW1, tvättbuffert AW2 och xylene. Den slutliga elueringsbufferten i kitet, buffert ATE, testades också som blankkontroll.

Ingen av de potentiellt interfererande substanser som utvärderats vid koncentrationer som kan förväntas påträffas vid normal användning påverkar förmågan hos *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet att skilja mellan mutations-positiva och mutationsnegativa prover.

Förutom studien av interfererande substanser bedömdes den potentiella effekten av nekros i kliniska prover för att avgöra om höga nivåer av nekrotisk vävnad i tumörprover påverkar förmågan att generera giltiga data. Av totalt 421 prover som bedömdes som en del av studierna för jämförelse med analytisk referensmetod hade 29 prover nekros på en nivå > 50 % enligt den patologiska granskningen. Av de här 29 proverna gav 28 giltiga resultat som överensstämde med resultaten från bidirektionell Sanger-sekvensering. Ett resultat var ogiltigt på grund av otillräcklig mängd DNA.

## Korskontaminering

Syftet med den här studien var att bestämma förekomsten av korskontaminering mellan DNA-prover, vilket kan orsaka falskt positiva resultat, med hjälp av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet. Potentiella källor till korskontaminering inkluderar följande:

- Provextraktion (t.ex. skrapning av objektglas)
- Pipettering av prover
- Förslutning av provrör
- Kontaminering av kitreagenser under användning
- Laddning av analysrör på instrumentet Rotor-Gene Q MDx

Vid den här studien användes FFPE-standarder: vildtyp-standard och 12ALA-standard (eftersom 12ALA-reaktionen är den reaktion med lägst LOD i kitet).

Studien bestod av 10 PCR-körningar utformade för att undersöka risken för kontaminering både inom och mellan körningar på instrumentet Rotor-Gene Q

MDx. Vid dessa testkörningar användes rör innehållande vildtyp-DNA för att söka efter kontaminering från mutant-DNA.

I resultaten för studien påvisades ingen detekterbar kontaminering i något av de vildtyp-DNA-extrakt som var avsedda att detektera korskontaminering.

## **Exklusivitet/korsreaktivitet**

I *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet ingår 8 separata reaktioner. En enskild kontrollreaktion som detekterar ett icke-polymorft område av KRAS-genen och 7 mutationsspecifika reaktioner. Det finns ingen reaktion som specifikt mäter vildtyp-KRAS-sekvensen vid kodon 12 eller 13. KRAS-resultatet "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterades] (dvs. vildtyp) bestäms baserat på att någon av de 7 mutationerna saknas, vilket resulterar i ett positivt mutationsresultat.

Därför är det nödvändigt att påvisa storleken på den icke-specifika amplifieringen, eller korsreaktiviteten som uppstår i varje reaktion med för stora mängder KRAS vildtyp-DNA för att säkerställa att inga falskt positiva resultat uppstår. På samma sätt utvärderas icke-specifik amplifiering för KRAS-mutationer som inte är avsedda att detekteras av analysen. Detta visar att mängden korsreaktivitet mellan mutantreaktioner inte resulterar i felaktiga mutationsbestämningar vid förekomst av stora mängder mutant-DNA. Eftersom DNA-input för den här analysen är baserad på kontroll- $C_T$ -intervallet (21,92–32,00) är den högsta koncentrationen av DNA-input baserad på att den har ett kontroll- $C_T$ -värde på ungefär 22.

## **Icke-specifik amplifiering/korsreaktivitet: vildtyp-KRAS DNA**

Mängden icke-specifik amplifiering av vildtyp-DNA med reaktionsmixar utformade för amplifiering av specifika mutationer hanterades på följande sätt. Totalt 60 replikat av vildtyp-FFPE-cellinje-DNA och 60 NSCLC-prover utvärderades vid den högsta koncentrationen av amplifierbart input-DNA med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet.

Kontroll  $C_T$ -värdena var ungefär 22–23. Resultaten visade att  $\Delta C_T$ -värdena överskred de fastställda cutoff-värdena och minst 95 % av vildtyps-replikaten bestämdes korrekt.

## Icke-specifik amplifiering/korsreaktivitet/exklusivitet: mutationspositivt KRAS DNA

Mutanta prover med en hög koncentration av input-DNA testades mot alla reaktionsmixar. DNA-prover bereddes från var och en av CRC- och NSCLC FFPE-cellinjerna så att kontrollreaktionens  $C_T$ -värde motsvarade ungefär 23. Av de här spädningarna utvärderades 6 replikat för varje mutationsprov. Procentandelen mutation i provet styrdes av procentandelen mutant i cellinje-DNA:t.

$\Delta C_T$ -medelvärdena presenteras i tabell 19 och tabell 20 och visar att det finns korsreaktivitet mellan mutantreaktioner. I samtliga fall visade resultaten att den korrekta mutationen fastställdes med den matchade mutationsreaktionen (dvs. det minsta  $\Delta C_T$ -värdet var den korrekta mutationsbestämningen). Alla andra testfall detekterades inte eller låg utanför  $\Delta C_T$ -tröskeln.

**Tabell 19. Korsreaktivitet ( $\Delta C_T$ ) mellan mutationsreaktioner som använder CRC FFPE-cellinje-DNA i det högre input-intervallet**

Mutant-DNA	Cutoff	Analys- $\Delta C_T$						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
<b>12ALA</b>	8	<b>1,42*</b>	12,66	NA	<b>5,81†</b>	<b>2,78†</b>	<b>6,31†</b>	13,21
<b>12ASP</b>	6,6	12,56	<b>2,42*</b>	NA	NA	13,44	11,21	13,55
<b>12ARG</b>	8	13,12	11,56	<b>1,12*</b>	11,42	NA	13,43	12,66
<b>12CYS</b>	8	14,2	12,48	9,23	<b>0,98*</b>	NA	<b>7,96†</b>	12,88
<b>12SER</b>	8	NA	13,39	13,31	NA	<b>3,02*</b>	12,99	13,97
<b>12VAL</b>	7,5	<b>6,83†</b>	NA	NA	NA	13,38	<b>0,28*</b>	13,74
<b>13ASP</b>	7,5	NA	13,29	13,89	NA	NA	14,36	<b>4,5*</b>

NA: Ingen korsreaktion.

\*  $\Delta C_T$ -värden från matchade reaktioner.

†  $\Delta C_T$  från korsreaktiva reaktioner nedanför cutoff-värdet.

**Tabell 20. Korsreaktivitet ( $\Delta C_T$ ) mellan mutationsreaktioner som använder NSCLC FFPE-cellinje-DNA i det högre input-intervallet**

Mutant-DNA	Cutoff	Analys- $\Delta C_T$						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
<b>12ALA</b>	8	<b>1,31*</b>	12,8	NA	<b>5,01<sup>†</sup></b>	<b>2,26<sup>†</sup></b>	<b>5,57<sup>†</sup></b>	12,65
<b>12ASP</b>	6,6	12,61	<b>1,66*</b>	NA	NA	NA	10,3	12,60
<b>12ARG</b>	8	12,98	11,08	<b>0,81*</b>	11,24	NA	12,66	12,62
<b>12CYS</b>	8	NA	12,22	<b>7,84<sup>†</sup></b>	<b>0,56*</b>	NA	13,06	11,84
<b>12SER</b>	8	NA	12,87	13,21	NA	<b>1,93*</b>	13,25	12,93
<b>12VAL</b>	7,5	<b>5,93<sup>†</sup></b>	14,29	NA	NA	13,14	<b>0,45*</b>	12,39
<b>13ASP</b>	7,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<b>2,02*</b>

NA: Ingen korsreaktion.

\*  $\Delta C_T$ -värden från matchade reaktioner.

<sup>†</sup>  $\Delta C_T$  från korsreaktiva reaktioner nedanför cutoff-värdet.

## Repeterbarhet och reproducerbarhet

Syftet med den här studien var att påvisa precisionen hos *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet inom laboratoriet (repeterbarhet) och mellan laboratorier (reproducerbarhet). Både korrektheten hos resultaten från mutationsbestämningen och precisionen hos  $\Delta C_T$ -värdena (skillnaden i  $C_T$ -värden mellan en mutationsreaktion och kontrollreaktionen) rapporteras.

### CRC

Kliniska CRC-prover användes för den här utvärderingen. Ett vildtyp-prov och ett prov för varje mutation testades med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet, där 2 operatörer på var och en av 3 platser testade alla prover och kontroller på 3 loter av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet, varje dag i 5 dagar, med 2 körningar per dag och med 2 replikat av varje prov på varje körning. De  $C_T$ - och  $\Delta C_T$ -värden som erhöles för varje reaktion i varje prov analyserades också med en varianskomponentanalys.

Reproducerbarheten hos *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet påvisades för lågnivå-mutant ( $3 \times \text{LOD}$ ) och vildtyp-prover, med minst 39/40 korrekta mutationsbestämningar för alla analyser med flera loter, plattformar och

operatörer, både inom och mellan laboratorier. Den uppskattade andelen 3 × LOD-prover vid testning av mutantprover och vildtyp-prover rapporterades totalt och på var och en av testplatserna. För alla analyser och provkombinationer gav minst 79 av 80 replikat korrekt mutationsbestämning (tabell 21).

**Tabell 21. Totalt antal korrekta bestämningar**

Prov	Korrekta mutationsbestämningar						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
<b>Mutant 3 × LOD</b>	79/80	80/80	80/80	79/80	80/80	80/80	80/80
<b>Vildtyp (låg)</b>	80/80	79/80	80/80	80/80	79/80	79/80	80/80

## NSCLC

För var och en av de 7 KRAS NSCLC-mutationerna användes 3 prover som representerade var och en av de 3 provtagningsmetoderna (resektion, CNB och FNA). Ytterligare 6 kliniska vildtyp-prover, med 2 prover vardera som representerade de 3 provtagningsmetoderna, användes för att skapa spädningspooler med vildtyp-DNA.

De olika extrakten poolades för vart och ett av mutationsproverna för att skapa en enskild provpool per mutation. Varje mutationsprovpool späddes för att generera testprover vid mutationsnivåer på 1 × LOD och 3 × LOD.

Laboratorierna som användes i den här studien fanns på 3 olika platser. Arbetsförhållandena varierades på de olika laboratorierna genom att man använde 2 Rotor-Gene Q MDx-instrument, 2 operatörer, 2 loter av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet och gjorde 2 körningar per dag (per operatör) under 16 dagar (ej i följd).

För alla analyser och provkombinationer gav minst 284 av 288 replikat korrekt mutationsbestämning. Den totala andelen korrekta bestämningar vid alla analyskombinationer för 1 × LOD-gruppen var 100 %. Den totala andelen korrekta bestämningar vid alla analyskombinationer för 3 × LOD-gruppen var 99,6 %. Den totala andelen korrekta bestämningar för proverna där ingen mutation detekterades (vildtyp) var 100 % (tabell 22).

**Tabell 22. Korrekta bestämningar för 1 × LOD, 3 × LOD och vildtyp**

Mutationsnivå	Analys	Korrekta bestämningar	Korrekta bestämningar, %	Nedre tvåsidigt 90 % CI
<b>1 × LOD</b>	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/284	100	96,85
	12SER	284/284	100	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	288/288	100	98,97
<b>3 × LOD</b>	12ALA	288/288	100	98,97
	12ARG	288/288	100	98,97
	12ASP	288/288	100	98,97
	12CYS	284/288	98,61	96,85
	12SER	284/288	98,61	96,85
	12VAL	288/288	100	98,97
	13ASP	287/287	100	98,96
<b>Vildtyp</b>		285/285	100	98,95



## Variabilitet vid provhantering

Syftet med den här studien var att bedöma effekten vid variationer i provhanteringen (specifikt vid DNA-extraktion) för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet. Den här studien kompletterar studien av repeterbarhet och reproducerbarhet genom att analysera variationer i provhanteringen när samma kliniska FFPE-snitt och FFPE-cellinjesnitt bearbetades på 3 platser efter att ha testats med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet.

### CRC

Trettio sekventiella 5 µm-snitt togs ut från vart och ett av 10 FFPE CRC-prover (3 vildtyp och 1 per mutation). Snitten randomiserades till någon av de 3 testplatserna så att varje plats fick 10 snitt per FFPE-prov (totalt 100 snitt). Av 300 DNA-extraktioner som testades var 298 prover giltiga. Det fanns 99,33 % överensstämmelse avseende KRAS-mutationsbestämningar mellan de 3 testplatserna.

En jämförelse per plats av  $\Delta C_T$ -medelvärden för mutantprover och vildtyp-prover visade en mycket stor överensstämmelse för resultaten. Resultaten visade överensstämmelse för DNA-extraktionsproceduren och provbearbetningen tillsammans med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet.

### NSCLC

I den här studien användes 13 kliniska NSCLC-prover (3 × 12ASP, 3 × 12CYS, 4 × 12VAL och 3 vildtyp) och 4 FFPE-cellinjepröver (12ALA, 12ARG, 12SER och 13ASP). Proverna representerade de olika provtagningsmetoderna: kirurgisk resektion, FNA och CNB. Cellinjer användes för att representera sällsynta mutationer där klinisk NSCLC-vävnad inte var tillgänglig.

De 3 batcharna med 20 FFPE-snitt fördelades sedan slumpvis på de 3 platserna. DNA-extraktion utfördes på var och en av de 3 platserna på en batch med 20 FFPE-snitt (10 par) per mutation och vildtyp.

När alla provberedningar testades med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet på 3 enskilda testplatser identifierades var och en av de 7 mutationerna och vildtyp-proverna med korrekt mutationsbestämning. Den totala bestämningsandelen för var och en av de 7 mutationerna och vildtyp-proverna var 100 %, vilket visade på konsekvens mellan platser för DNA-extraktion och mutationsdetektion med *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet.

## Motsvarighet mellan provtagningsmetoder (endast NSCLC)

Syftet med den här studien var att bedöma om mutationsbestämningen för NSCLC-prover som fastställdes av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet påverkades av provtagningsmetoden. De 3 provtagningsmetoderna som bedömdes i den här studien var resektion, FNA och CNB.

För att samma tumör skulle samlas in med 3 olika provtagningsmetoder användes för den här studien "patientmatchade" CNB- och FNA-prover som erhöles från tumörprover tagna med kirurgisk resektion. Totalt 169 resektionsprover, 169 CNB-prover och 169 FNA-prover var tillgängliga för studien.

Varje prov extraherades och testades med KRAS-kontrollanalysen. Varje prov som gav ett giltigt resultat (169 resektioner, 169 CNB och 164 FNA) testades med alla 8 KRAS-analyser.

För vart och ett av de kliniska FFPE NSCLC-proverna bedömdes dessutom det extraherade DNA:t som användes för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kit-analysen med bidirektionell Sanger-sekvensering för att fastställa nivån på överensstämmelsen mellan *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet och bidirektionell Sanger-sekvensering. *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet bestämmer korrekt mutationsstatus jämfört med bidirektionell Sanger-sekvensering för alla provtyper med en total överensstämmelse i procent på 96,96 %.

Resultaten från den här studien visade att *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet ger likvärdiga resultat med de 3 studerade provtagningsmetoderna, vilket indikeras genom procentandelarna för den parvisa totala överensstämmelsen:

- CNB vs FNA 97,52 (konfidensgränser 94,41–99,15)
- CNB vs resektion 96,39 (konfidensgränser 92,99–98,41)
- FNA vs resektion 98,76 (konfidensgränser 96,14–99,78)

# Referenser

## Citerade referenser

1. Hilger, R.A., et al. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**, 511.
2. Bachireddy, P., et al. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4278.
3. Han, S.-W. et al. (2006) Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and AKT phosphorylation. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2538.
4. Pao, W. et al. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PloS Medicine* **2**, 57.
5. Newton, C.R. et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2503.
6. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* **17**, 804.
7. Catalog of Somatic Mutations in Cancer:  
**[www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)**.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline. CLSI Document EP17-A*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

## Användbara referenser

Amado, R.G. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1626.

Benvenuti, S. et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.

Bokemeyer, C. et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).

- Chaft, J.E. et al. (2013) Phase II trial of neoadjuvant bevacizumab plus chemotherapy and adjuvant bevacizumab in patients with resectable nonsquamous non-small-cell lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1084.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- De Roock, W. et al. (2007) KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.
- De Roock, W. et al. (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann. Oncol.* **19**, 508.
- Di Fiore, F. et al. (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.
- Dingemans, A.M. et al. (2013) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.* **3**, 743.
- Finocchiaro, G. et al. (2007) EGFR, HER2, and Kras as predictive factors for cetuximab sensitivity in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4021.
- Jänne, P.A. et al. (2013) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **1**, 38.
- Karapetis C. et al. (2008) KRAS mutation status is a predictive biomarker for cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer. Results from NCIC CTG CO.17: A phase III trial of cetuximab versus best supportive care. 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer: Abstract o-037. Presented June 27, 2008.
- Khambata-Ford, S. et al. (2007) Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3230.

Lièvre A. et al. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **26**, 374.

Lievre, A. et al. (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992.

Reckamp, K.L. et al. (2014) A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* **120**, 1145.

Tejpar, S. et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).

Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.

Van Cutsem, E. et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

## Symboler

Följande symboler kan finnas på förpackning och etiketter:



<N>

Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> reaktioner



Används senast



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lotnummer



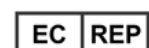
Materialnummer



Innehåller



Antal



Auktoriserad representant

Rn

R betyder revidering av handboken och n är revisionsnumret



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen



Varning

## 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 1: Manuellt protokoll för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet

I det här avsnittet finns instruktioner om användning av *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet med programmet RGQ version 2.3 i öppet läge (dvs. utan KRAS Assay Package).

## Allmän information

- Information om material som behövs finns i "Material som behövs men inte medföljer" på sidan 11.
- Fullständiga instruktioner om provberedning och provlayout finns i "Protokoll: Bedömning av DNA-prover", sidan 16, och "Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer", sidan 29.

## Protokoll: Skapa en temperaturprofil

Innan du börjar ska du skapa en temperaturprofil för KRAS-analysen. Cykelparametrarna är desamma för både provbedömning och mutationsbedömning.

## Procedur

Cykelparametrarna visas i tabell 23.

**Tabell 23. Cykelparametrar**

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

1. Dubbelklicka på programikonen för Rotor-Gene Q-programmet 2.3 på skrivbordet på den dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx. Välj fliken "Advanced" [Avancerat] i dialogrutan "New Run" [Ny körning] som visas.
2. 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].



3. 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 21).

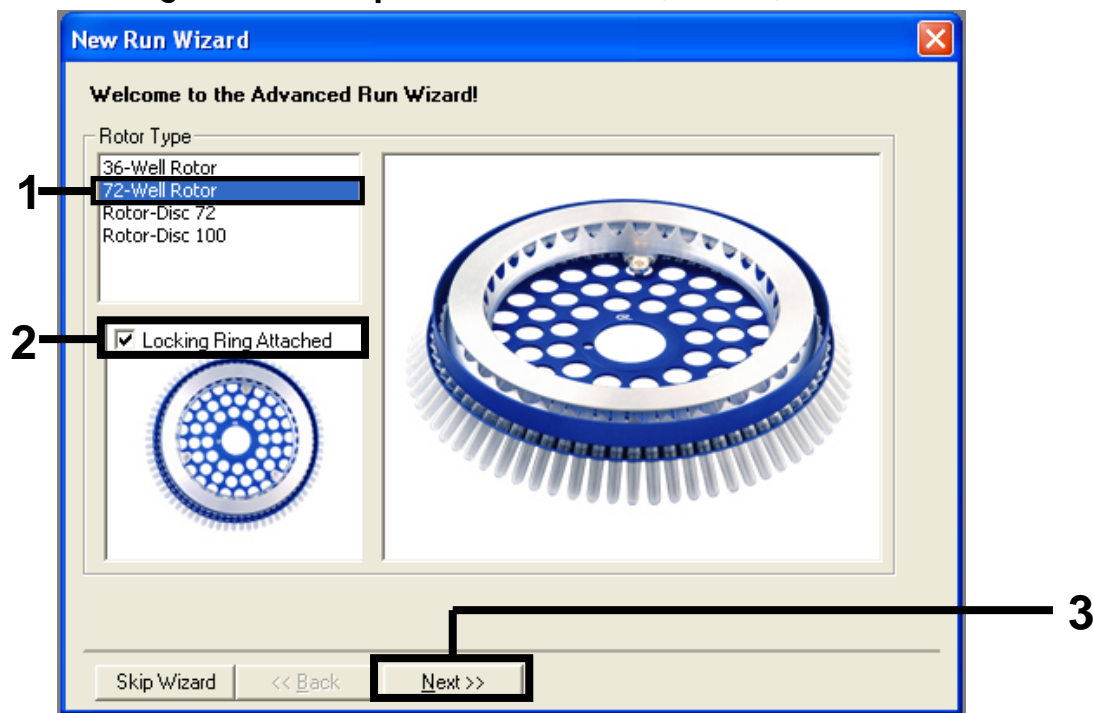
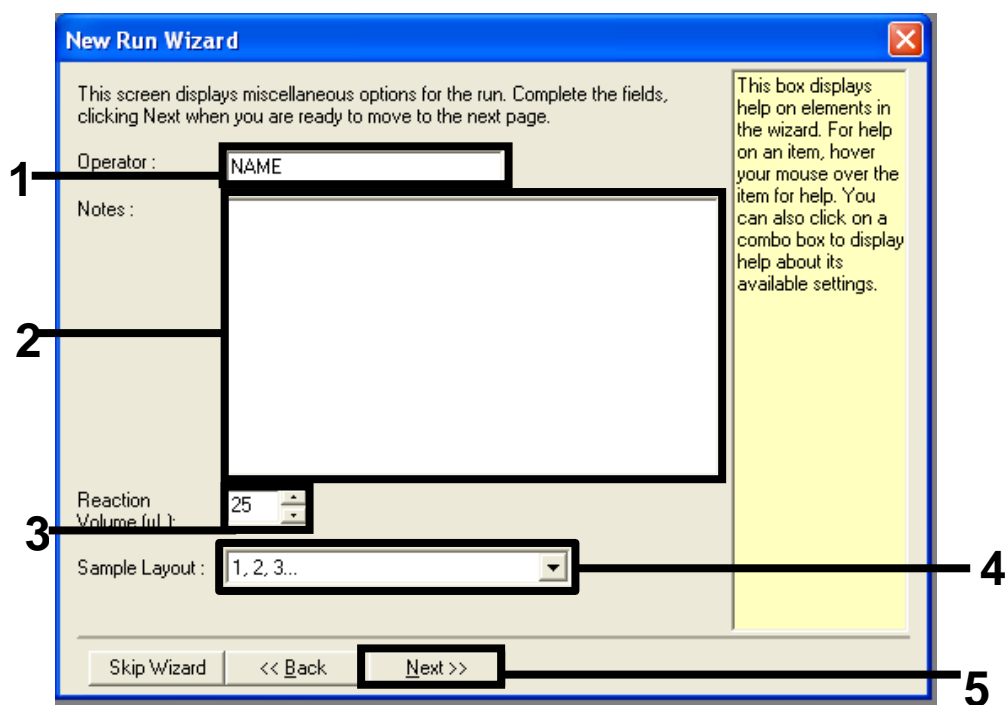


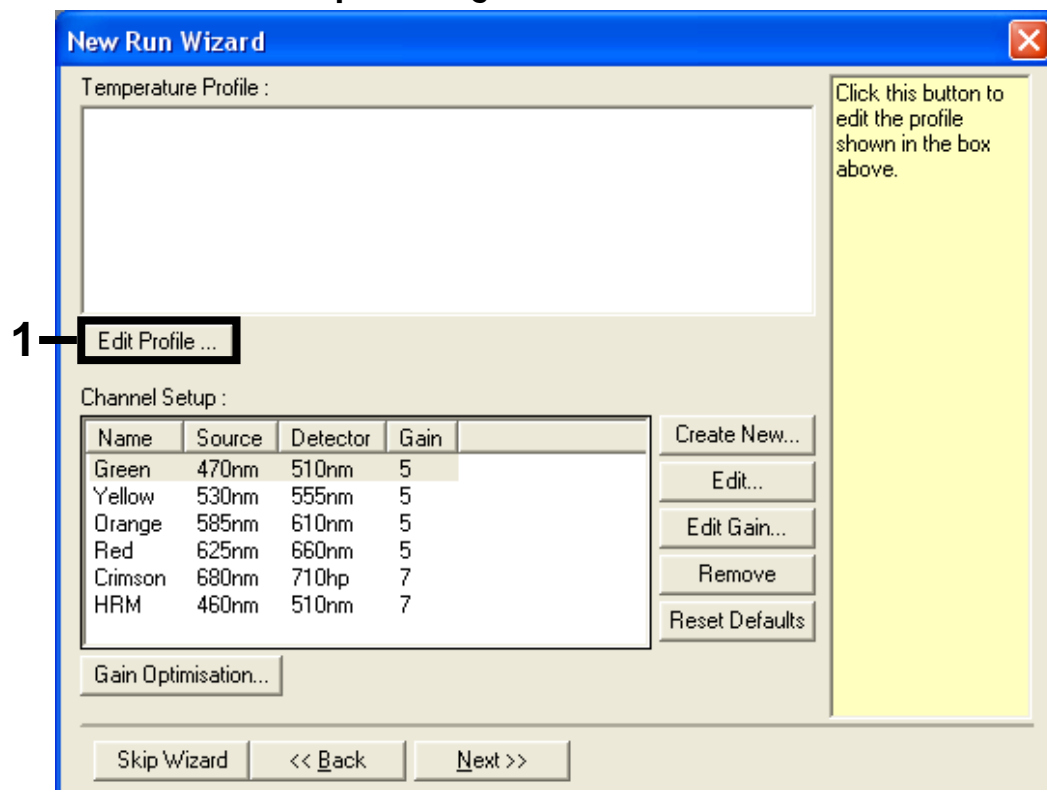
Bild 21. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning]. 1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = "Next" [Nästa].

4. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och ange reaktionsvolymen 25. Kontrollera att det står "1, 2, 3..." i rutan "Sample Layout" [Provlayout]. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 22).



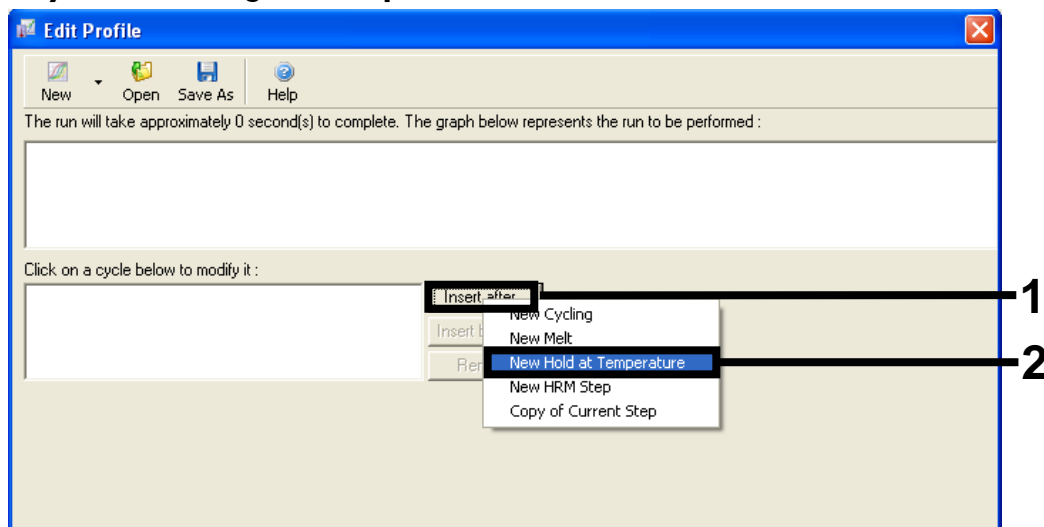
**Bild 22. Ange namn på operatör och reaktionsvolym.** 1 = fältet "Operator" [Användare], 2 = fältet "Notes" [Anteckningar], 3 = fältet "Reaction Volume" [Reaktionsvolym], 4 = "Sample Layout" [Provlayout], 5 = "Next" [Nästa].

5. Klicka på "Edit Profile" [Ändra profil] i dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] (bild 23) och programmera temperaturprofilen enligt informationen i följande steg.



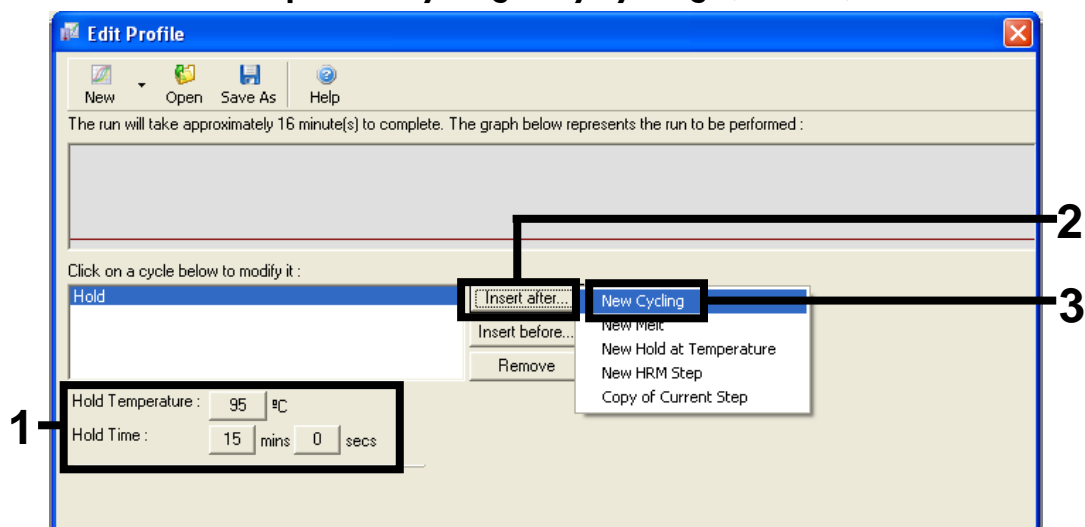
**Bild 23. Ändra profilen.**

6. Klicka på "Insert after" [Sätt in efter] och välj "New Hold at Temperature" [Ny bibehållning vid temperatur] (bild 24).



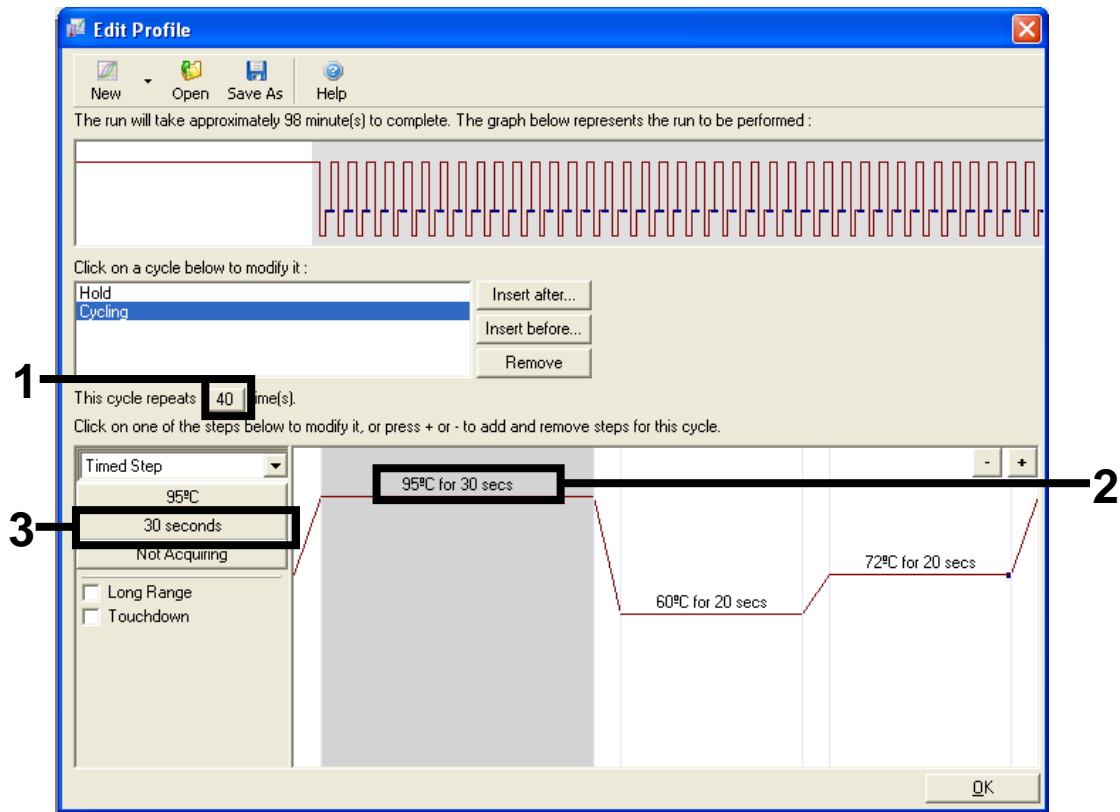
**Bild 24. Infoga ett initialt inkubationssteg.** 1 = "Insert after" [Sätt in efter], 2 = "New Hold at Temperature" [Ny bibehållning vid temperatur].

7. Ändra "Hold Temperature" [Bibehållen temperatur] till 95 °C och "Hold Time" [Bibehållen tid] till "15 mins 0 secs". Klicka på "Insert after" [Sätt in efter] och välj "New Cycling" [Ny cykling] (bild 25).



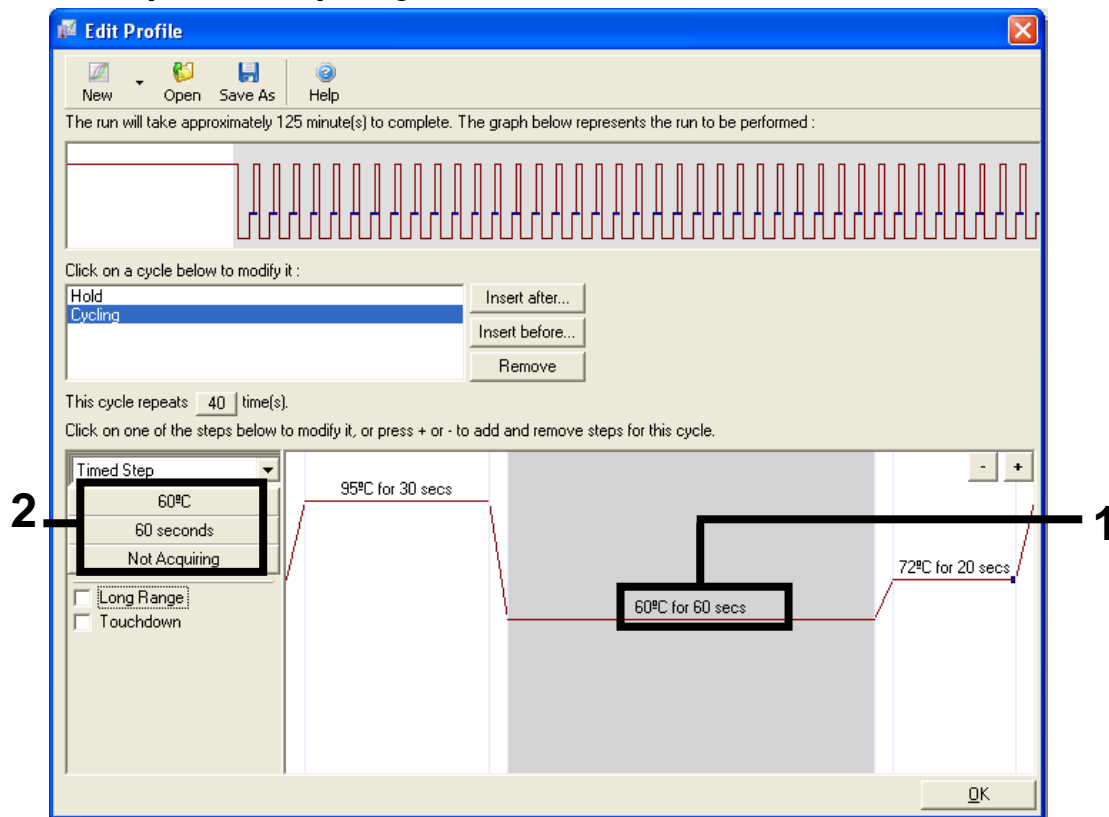
**Bild 25. Initialt inkubationssteg vid 95 °C.** 1 = "Hold Temperature" [Bibehållen temperatur] och "Hold Time" [Bibehållen tid], 2 = "Insert after" [Sätt in efter], 3 = "New Cycling" [Ny cykling].

8. Ändra antalet cykelrepetitioner till 40. Välj det första steget och ställ in på "95°C for 30 secs" [95 °C i 30 sekunder] (bild 26).



**Bild 26. Cyklingssteg vid 95 °C.** 1 = ruta för cykelrepetitioner, 2 = temperaturinställning för steg ett, 3 = tidsinställning för steg ett.

9. 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 "Not Acquiring" [Hämtar inte] (bild 27).



**Bild 27. Cyklingssteg vid 60 °C.** 1 = temperatur- och tidsinställning för andra steget, 2 = "Not Acquiring" [Hämtar inte].

Ange "Green" [Grön] och "Yellow" [Gul] som hämtningskanaler genom att välja ">" för att överföra dem från listan "Available Channels" [Tillgängliga kanaler]. Klicka på "OK" (bild 28).

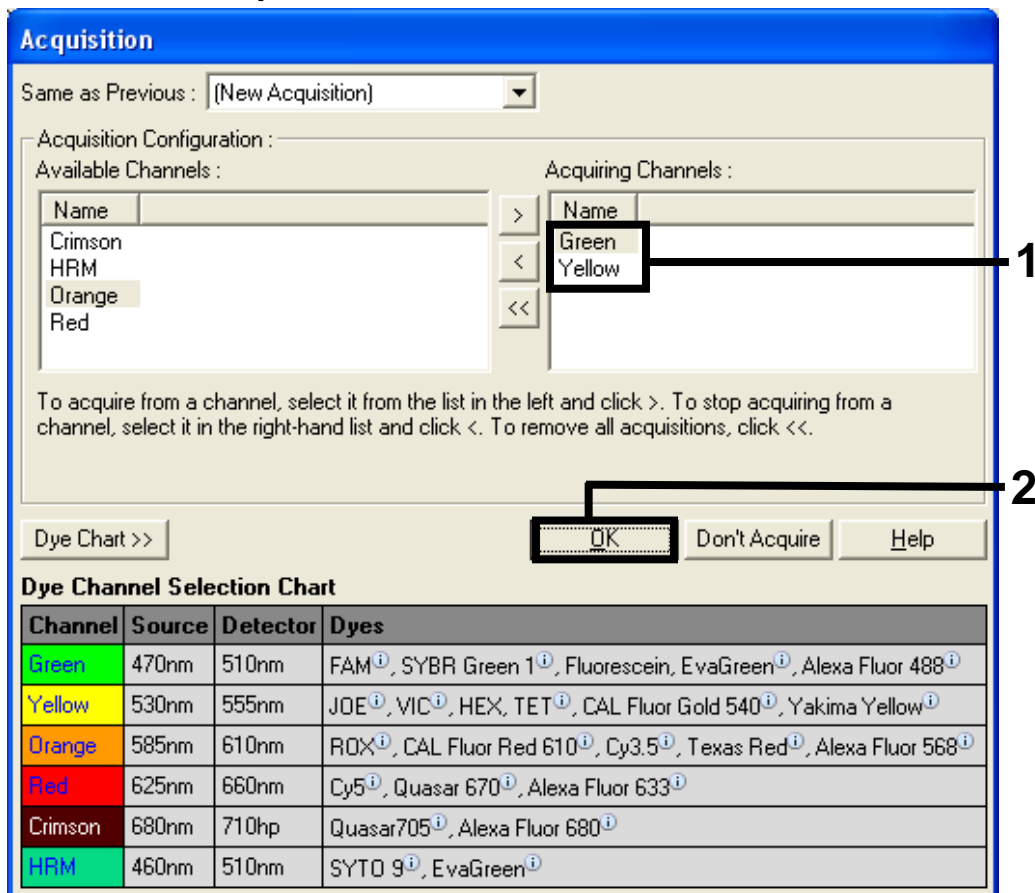


Bild 28. Hämtning vid cyklingssteg vid 60 °C.

10. Markera det tredje steget och ta bort det genom att klicka på "-". Klicka på "OK" (bild 29).

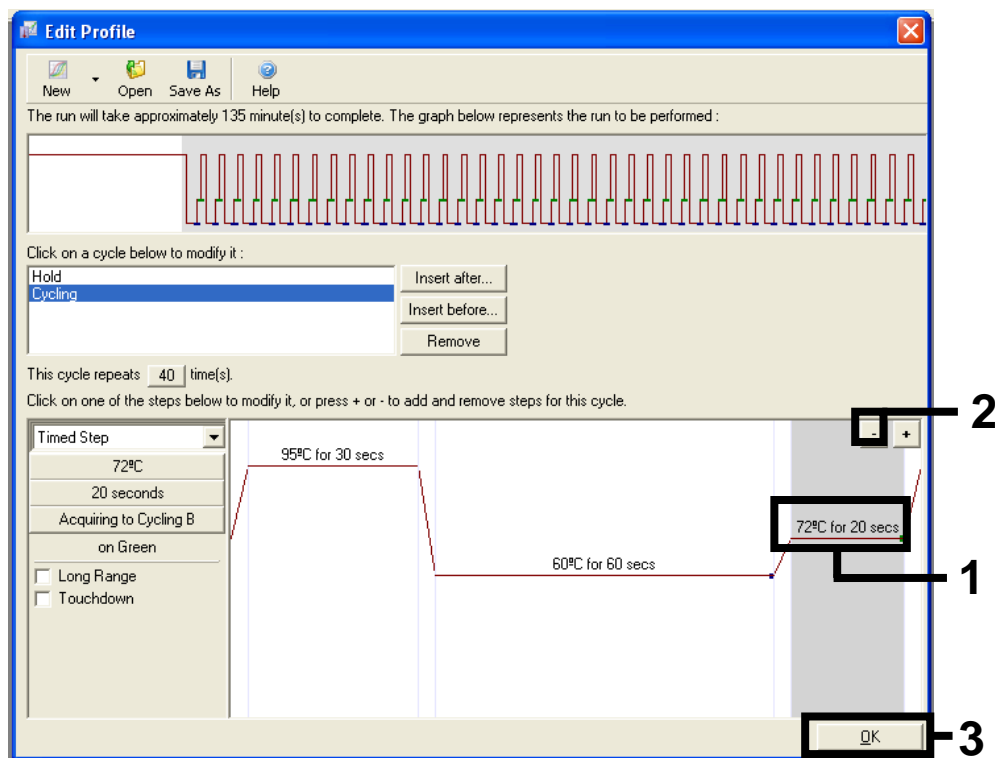


Bild 29. Ta bort förlängningssteg.

11. I nästa dialogruta klickar du på "Gain Optimisation" [Optimering av förstärkning] (bild 30).

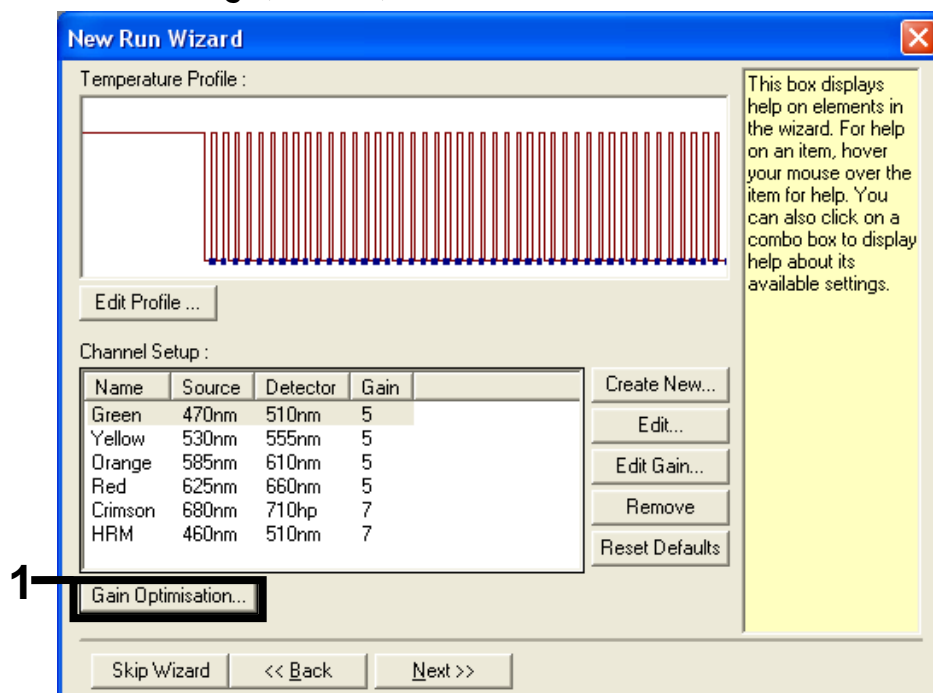


Bild 30. Optimering av förstärkning.

12. Klicka på "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning]. Kanalinställningarna för varje kanal visas. Godkänn dessa standardvärden genom att klicka på "OK" för båda kanalerna (bild 31).

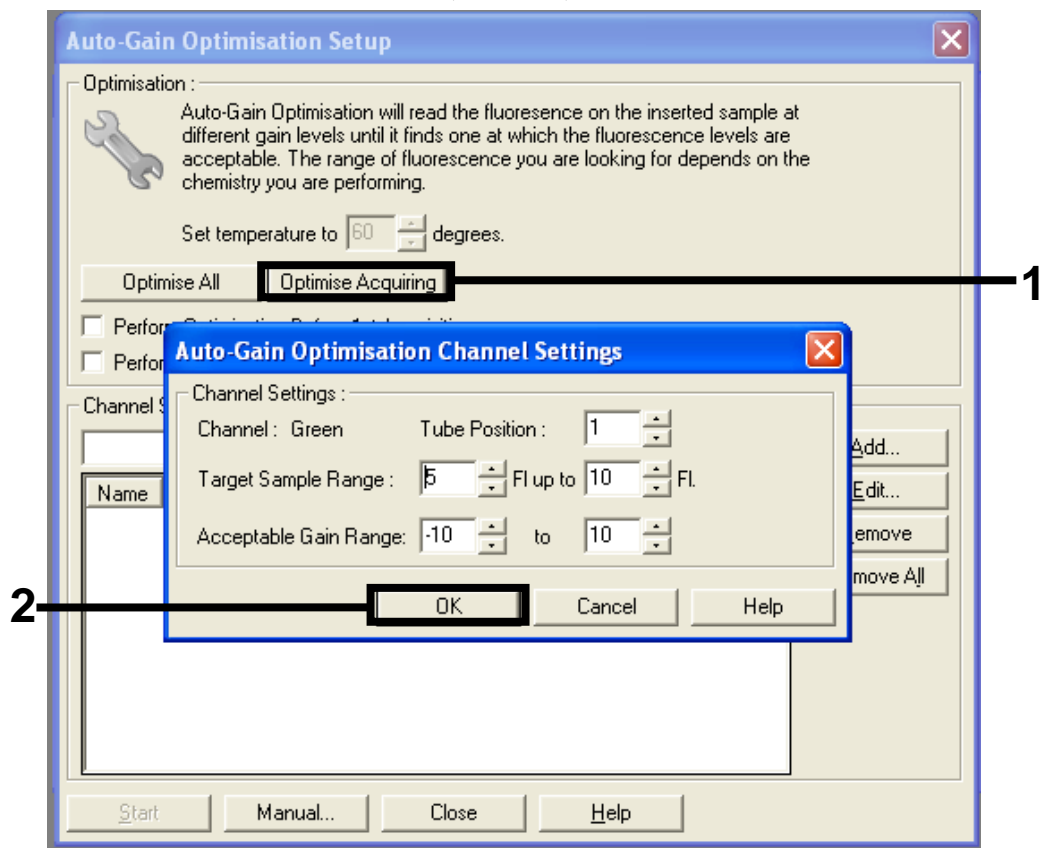


Bild 31. Automatisk nivåoptimering för den gröna kanalen.



13. Markera kryssrutan "Perform Optimisation before 1st Acquisition" [Utför optimering före första hämtning] och klicka på "Close" [Stäng] för att återgå till guiden (bild 32).

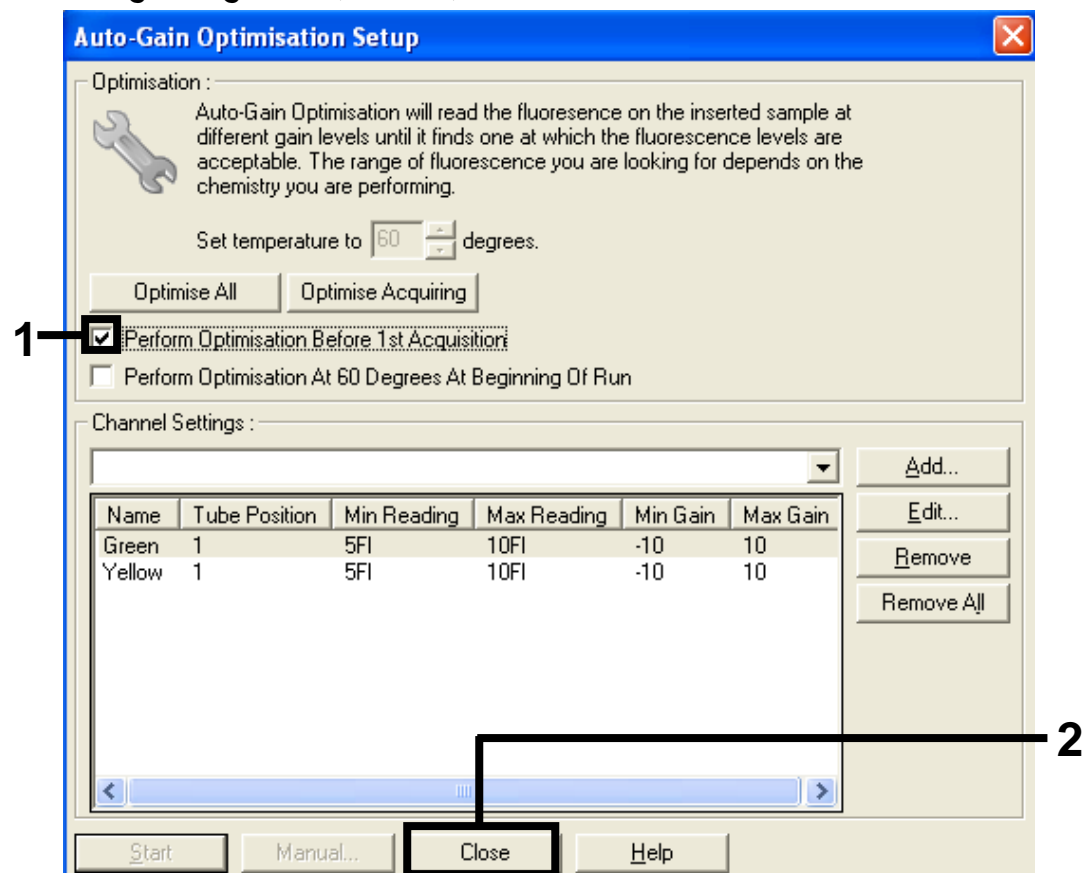


Bild 32. Val av gröna och gula kanaler.

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

### Protokoll: Provbedömning (manuell)

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

- Förbered proverna enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: Bedömning av DNA-prover" på sidan 16.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: Förberedelse av *therascreen* KRAS PCR RGQ" på sidan 82.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet "Analys av provbedömningsdata" på sidan 86.

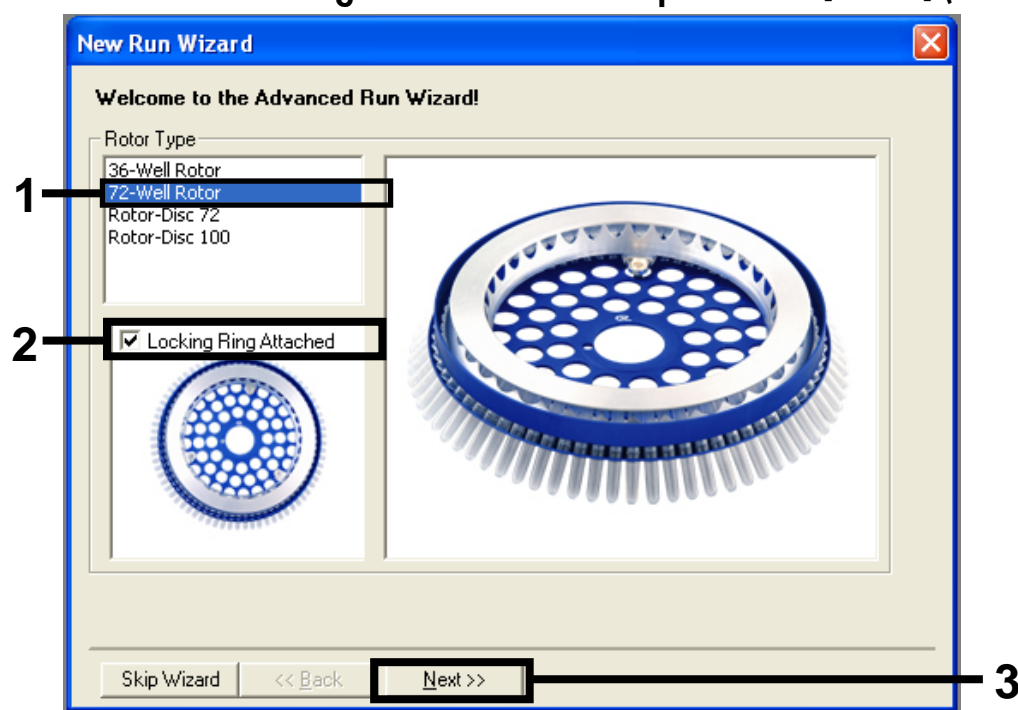
## Protokoll: KRAS-mutationsdetektion (manuell)

När ett prov har klarat provbedömningen kan det testas för att detektera KRAS-mutationer.

- Förbered proverna enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: Detektion av KRAS-mutationer" på sidan 29.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: Förberedelse av *therascreen* KRAS PCR RGQ" på sidan 82.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet "Analys av KRAS-mutationsdetektion" på sidan 87.

## Protokoll: Förberedelse av *therascreen* KRAS PCR RGQ

1. **Öppna Rotor-Gene Q-programmet 2.3 samt den motsvarande temperaturprofil som skapats.**  
Skapa temperaturprofilen enligt "Protokoll: Skapa en temperaturprofil", sidan 72.
2. **Kontrollera att korrekt rotor har valts och markera kryssrutan för att bekräfta att låsringen sitter fast. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 33).**



**Bild 33. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och välkomstfönstret.**

1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = "Next" [Nästa].

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

**New Run Wizard**

This screen displays miscellaneous options for the run. Complete the fields, clicking Next when you are ready to move to the next page.

Operator : NAME

Notes :

Reaction Volume (µL): 25

Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back **Next >>**

This box displays help on elements in the wizard. For help on an item, hover your mouse over the item for help. You can also click on a combo box to display help about its available settings.

**Bild 34. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning].** 1 = fälten "Operator" [Användare] och "Notes" [Anteckningar], 2 = fälten "Reaction Volume" [Reaktionsvolym] och "Sample Layout" [Provlayout], 3 = "Next" [Nästa].

4. I nästa fönster kan du redigera temperaturprofilen. Ingen redigering krävs om temperaturprofilen har skapats enligt instruktionerna i "Protokoll: Skapa en temperaturprofil", sidan 72. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 35).

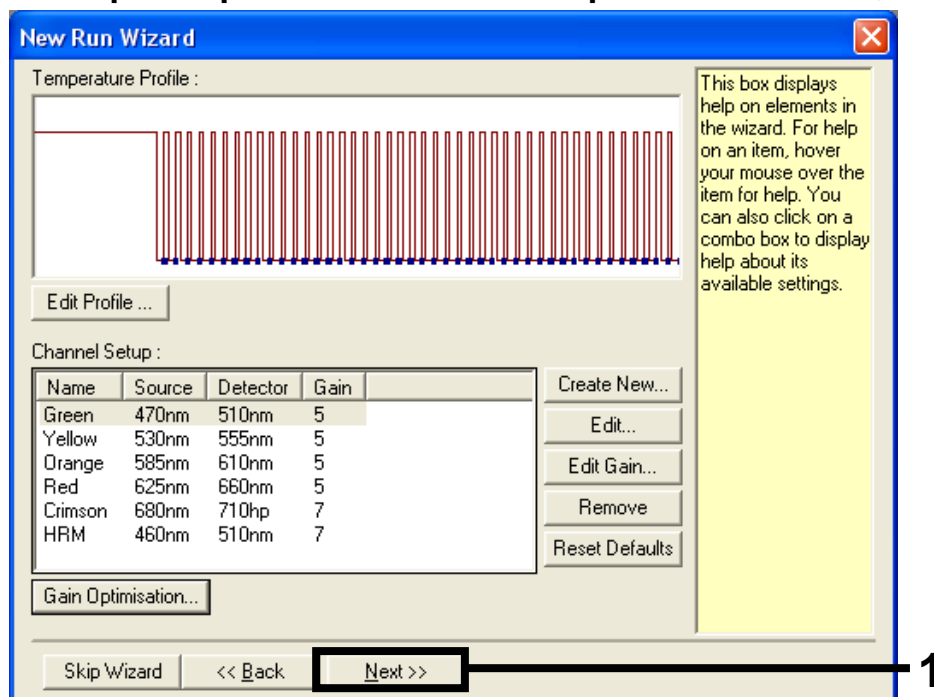


Bild 35. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och fönstret för temperaturredigering. 1 = "Next" [Nästa].

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

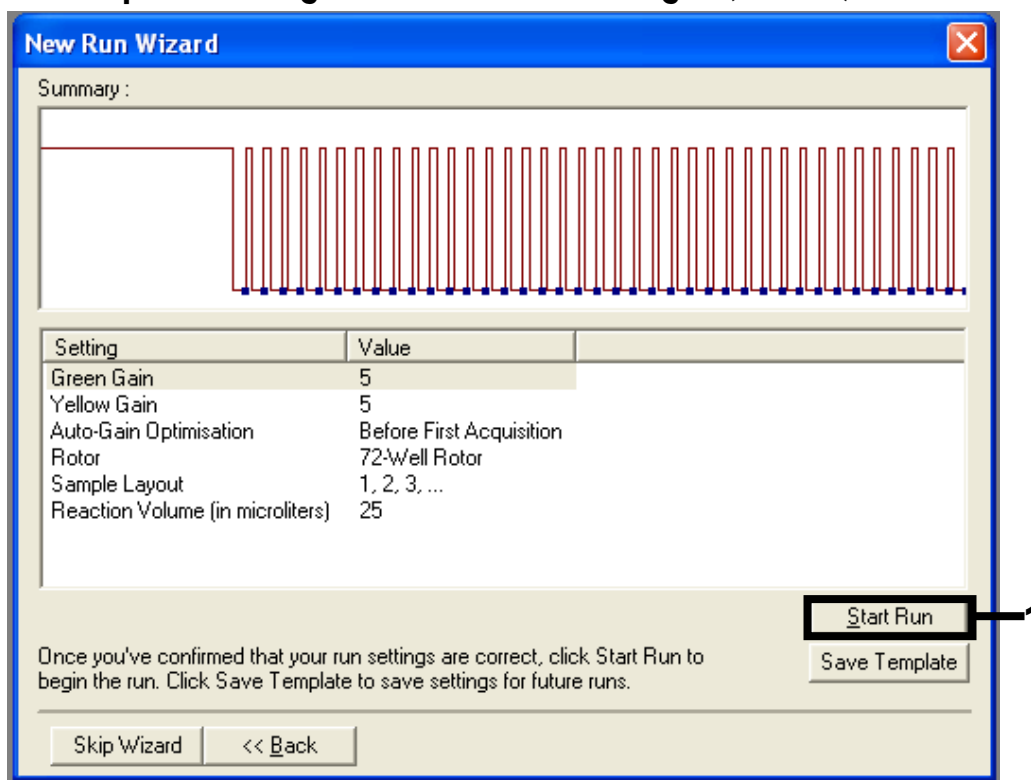


Bild 36. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning]. 1 = "Start Run" [Starta körning].

6. När körningen har startats visas ett nytt fönster där du antingen kan ange provnamn nu eller klicka på "Finish" [Slutföra] och ange namnen senare genom att välja knappen "Sample" [Prov] under körningen eller när körningen är avslutad.

Om du klickar på "Finish and Lock Samples" [Avsluta och lås prover] kan provnamnen inte redigeras. Iaktta särskild försiktighet när du anger provnamn för att säkerställa korrekt provtestning och analys.

**Obs:** Vid namngivning av prover ska kolumnen "Name" [Namn] lämnas tom för tomma brunnar.

7. När körningen är avslutad analyserar du data enligt avsnitten "Analys av provbedömningsdata", sidan 86 eller "Analys av KRAS-mutationsdetektion", sidan 87.
8. Om du behöver kvantifieringsrapporter klickar du på ikonen "Reports" [Rapporter] i verktygsfältet i Rotor-Gene Q-körningsfilen.

## Tolkning av resultat (manuellt)

När provbedömningskörningen eller mutationsanalysen är avslutad analyserar du data enligt följande procedur.

### Programinställningar för analys

1. Öppna aktuell fil med Rotor-Gene Q-programmet 2.3.
2. Om du inte har namngett proverna innan körningen ska utföras klickar du på "Edit Samples" [Redigera prover].
3. Skriv in namnen på proverna i kolumnen "Name" [Namn].
4. Klicka på "Analysis" [Analys]. På analysidan klickar du på "Cycling A. Yellow" [Cykling A gul] för att visa HEX-kanalen.
5. Klicka på "Named On" [Namngiven].  
**Obs:** Detta säkerställer att inga tomma brunnar ingår i analysen.
6. Välj "Dynamic Tube" [Dynamiskt rör].
7. Välj "Linear Scale" [Linjär skala].
8. Klicka på "Outlier Removal" [Ta bort extremvärde] och ange "10%" för "NTC Threshold" [NTC-tröskelvärde].
9. Ställ in tröskeln på 0,05 och bekräfta HEX  $C_T$ -värdena.
10. På analysidan klickar du på "Cycling A. Green" [Cykling A grön] för att visa FAM-kanalen.
11. Kontrollera att "Dynamic Tube" [Dynamiskt rör] är markerat. Klicka på "Linear Scale" [Linjär skala].
12. Klicka på "Outlier Removal" [Ta bort extremvärde] och ange "10%" för "NTC Threshold" [NTC-tröskelvärde].
13. Ställ in tröskeln på 0,05 och bekräfta FAM  $C_T$ -värdena.

## Analys av provbedömningsdata

### Kör kontrollanalys

Se flödesdiagrammet för körning av kontrollanalys i bild 37, sidan 89.

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen kontaminering av reaktionsmixarna förekommer får kontrollen utan mall inte generera ett  $C_T$ -värde i den gröna kanalen under 40. För att garantera att plattan konfigurerades korrekt måste kontrollen utan mall visa amplifiering mellan 31,91–35,16 i den gula kanalen. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.

- **Positiv kontroll:** Den KRAS-positiva kontrollen (PC) måste ge ett  $C_T$ -värde på 23,5–29,5 i den gröna kanalen i var och en av de 8 analyserna. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och anses därför som en misslyckad körning.

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

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga måste varje prov- $C_T$ -värde ligga inom intervallet 21,92–32,00 i den gröna kanalen. Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

### Provanalys – kontrollanalys

- **Provkontrollanalysens  $C_T$  är  $< 21,92$ :** Prover med ett kontroll- $C_T$  på  $< 21,92$  måste spädas eftersom detta representerar den lägsta nivån för det validerade analysintervallet. 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  $C_T$  med 1. Om provet ligger nära 21,92 rekommenderas spädning för att garantera att ett resultat erhålls från provtestkörningen (KRAS-mutationsdetektion). Prover ska spädas med det vatten som medföljer kitet (nukleasfritt vatten för spädning [Dil.]).
- **Provkontrollanalysens  $C_T$  är  $> 32$ :** Omextraktion av provet rekommenderas eftersom det inte kommer att finnas tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

## Analys av KRAS-mutationsdetektion

### Kör kontrollanalys

Se flödesdiagrammet för körning av kontrollanalys (bild 37, sidan 89).

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen kontaminering av reaktionsmixarna förekommer får kontrollen utan mall inte generera ett  $C_T$ -värde i den gröna kanalen under 40. För att garantera att plattan konfigurerades korrekt måste kontrollen utan mall visa amplifiering mellan 31,91–35,16 i den gula kanalen. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.
- **Positiv kontroll:** Den KRAS-positiva kontrollen (PC) måste ge ett  $C_T$ -värde på 23,5–29,5 i den gröna kanalen i var och en av de åtta analyserna. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden. Ett värde utanför

detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och anses därför som en misslyckad körning.

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





**Bild 37. Flödesschema för körning av kontrollanalys.**

## Provanalys

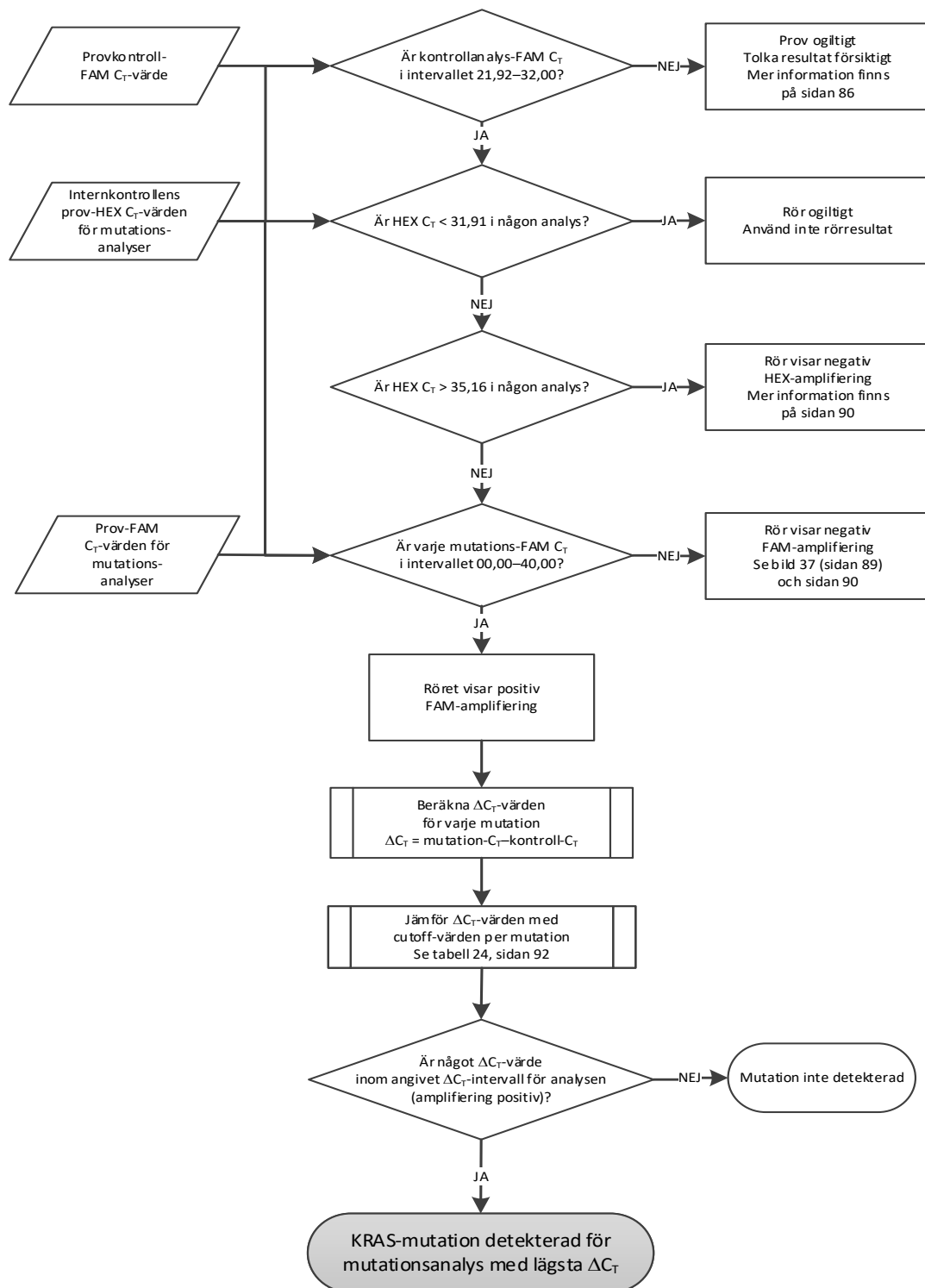
Se flödesdiagrammet för provanalys i bild 38, sidan 91.

### Provkontroll-FAM $C_T$ -värde

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga för kontrollanalysen måste  $C_T$ -värdet för varje provkontroll ligga inom intervallet 21,92–32,00 i den gröna kanalen.

Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

- **Provkontrollanalysens  $C_T < 21,92$ :** Prover med ett kontroll- $C_T$  på  $< 21,92$  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  $C_T$  med 1. Prover ska spädas med det vatten som medföljer kitet (nukleasfritt vatten för spädning [Dil.]).
- **Provkontrollanalysens  $C_T > 32$ :** Gör försiktiga tolkningar, eftersom mutationer med väldigt låg nivå inte kan upptäckas.



**Bild 38. Flödesschema för provanalys.**

### Internkontrollens prov-HEX C<sub>T</sub>-värde för mutationsanalyser

Se flödesdiagrammet för provanalys i bild 38, sidan 91.

Alla brunnar i varje prov måste analyseras. Kontrollera att varje brunn genererar en HEX-signal från internkontrollen. Det finns 3 möjliga slutresultat.

- Om internkontrollens C<sub>T</sub> hamnar inom angivet intervall (31,91–35,16) är HEX-amplifieringen positiv.
- Om internkontrollens C<sub>T</sub> hamnar ovanför angivet intervall (> 35,16) är HEX-amplifieringen negativ.
- Om internkontrollens C<sub>T</sub> hamnar under angivet intervall (< 31,91) är den ogiltig.

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. Ett rör med vatten för spädning av prov (Dil.) ingår i kitet.

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

FAM-värdena för alla 7 reaktionsmixarna ska kontrolleras mot värdena som finns angivna i tabell 24.

**Tabell 24. Acceptabla provvärden för mutationsreaktion (FAM)\***

Analys	Acceptabelt C <sub>T</sub> -intervall	ΔC <sub>T</sub> -intervall
12ALA	0,00-40,00	≤ 8,00
12ASP	0,00-40,00	≤ 6,60
12ARG	0,00-40,00	≤ 8,00
12CYS	0,00-40,00	≤ 8,00
12SER	0,00-40,00	≤ 8,00
12VAL	0,00-40,00	≤ 7,50
13ASP	0,00-40,00	≤ 7,50

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

- Om FAM C<sub>T</sub> hamnar inom angivet intervall är FAM-amplifieringen positiv.
- Om FAM C<sub>T</sub> hamnar ovanför angivet intervall eller om amplifiering saknas är FAM-amplifieringen negativ.

Beräkna  $\Delta C_T$ -värdet för varje mutationsrör med positiv FAM-amplifiering enligt nedan, för att garantera att mutations- och kontroll- $C_T$ -värdena kommer från samma prov.

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

Jämför provets  $\Delta C_T$ -värde med cutoff-punkten för den aktuella analysen (tabell 24) och se till att korrekt cutoff-punkt tillämpas för varje analys.

Cutoff-punkten är den punkt ovanför vilken en positiv signal eventuellt kan bero på bakgrundssignal för ARMS-primern i vildtyps-DNA. Om provets  $\Delta C_T$ -värde är högre än cutoff-punkten klassas det som negativt eller som liggande utanför kitets detektionsgräns.

För alla prover kommer varje mutationsreaktion att tilldelas statusen detekterad, 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 detekterats ska mutationen som rapporteras vara den med lägst  $\Delta C_T$ -värde.

Mutation inte detekterad:

- FAM-amplifiering positiv och  $\Delta C_T$  ovanför cutoff-värdet.
- FAM-amplifiering negativ och HEX-amplifiering (internkontroll) positiv.

Ogiltig:

- HEX (internkontroll) är ogiltig.
- FAM-amplifiering negativ och HEX-amplifiering negativ.

Om ett prov visar negativ HEX-amplifiering i ett rör men positiv FAM-amplifiering i ett annat rör kan resultatet "mutation detekterad" i det andra röret fortfarande betraktas som giltigt men den särskilda mutationen som identifierats kanske inte har tilldelats korrekt.

- Om ett prov visar negativ HEX-amplifiering och positiv FAM-amplifiering i samma rör ska resultatet "mutation detekterad" betraktas som giltigt.
- Om ett rör visar ogiltig HEX (internkontroll) får resultatet från det röret inte användas.

## Tilldela provmutationsstatus

När alla mutationsreaktionsrör har bedömts fastställs provets mutationsstatus enligt nedan.

- **Mutation detekterad:** En eller flera av de 7 mutationsreaktionerna är positiva. Om flera mutationer detekterats ska mutationen som rapporteras vara den med lägst  $\Delta C_T$ -värde.
- **Mutation inte detekterad:** Alla 7 mutationsreaktionerna är negativa.
- **Ogiltig:** Ingen mutationsreaktion är positiv och en eller flera mutationsreaktioner är ogiltiga.

**Obs:** *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är avsett att detektera mutationer i KRAS-genen i ett DNA-prov. Om ett prov är fastställt som "KRAS-mutation detekterad" ska endast en specifik mutation rapporteras. Om flera mutationer detekterats ska mutationen som rapporteras vara den med lägst  $\Delta C_T$ -värde.

Viss korsreaktivitet kan förekomma mellan mutationsreaktioner. Om till exempel en högnivå-1 2ALA-mutation observeras kan vissa av de andra mutationsreaktionerna också visa upp ett positivt resultat. Detta beror på att ARMS-primrar detekterar andra mutationer med liknande sekvens. Om en andra mutationsanalys ger ett positivt svar är detta troligen korsreaktivitet. Dubbla mutationer har observerats, men är ovanliga.

Om en eller flera av mutationsreaktionerna är ogiltiga men en eller flera är positiva kan provet fortfarande fastställas som "KRAS-mutation detekterad", eftersom en mutation förekommer. Den specifika mutation som rapporteras kan emellertid vara felaktig och kan vara ett resultat av korsreaktivitet. Därför bör provet endast fastställas som "KRAS-mutation detekterad".

## Bilaga 2: Installation av *therascreen* KRAS Assay Package

*therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet är avsett för användning med instrumentet Rotor-Gene Q MDx med en rotor med 72 brunnar. *therascreen* KRAS Assay Package är tillgängligt separat på CD (kat.nr 9022641).

*therascreen* KRAS Assay Package kan laddas ned från den motsvarande produktsidan för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet på adressen **www.qiagen.com**. Nedladdningsinformationen finns i sektionen "Product Resources" [Produktresurser] på fliken "Supplementary Protocols" [Tilläggsprotokoll]. Assay Package-programvaran kan även beställas på CD.

I paketet ingår "*therascreen* KRAS CE QC Locked Template" och "*therascreen* KRAS CE Locked Template".

**Obs:** *therascreen* KRAS Assay Package version 3.1.1 (QIAGEN, kat.nr 9023675) fungerar endast med motsvarande version 2.3 av programmet Rotor-Gene Q. Se till att rätt version av programmet Rotor-Gene Q är installerat innan du fortsätter med installationen av *therascreen* KRAS Assay Package.

### Procedur (nedladdning)

1. Ladda ned *therascreen* KRAS RGQ Assay Package från den motsvarande produktsidan för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet på adressen **www.qiagen.com**.
2. Öppna den nedladdade zip-filen genom att dubbelklicka på filen och packa upp den.
3. Starta installationen genom att dubbelklicka på den uppackade filen **therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.1.1.exe**.

### Procedur (CD)

1. Beställ *therascreen* KRAS RGQ Assay Package CE CD som är kompatibel med det installerade programmet Rotor-Gene Q (se ovan). Den beställs separat från QIAGEN.  
Version 3.1.1. Kat.nr 9023675.
2. Sätt in CD:n i CD-enheten på den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
3. Starta installationen genom att dubbelklicka på filen **therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.1.1.exe**  
**ELLER**  
**therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_1.0.12.exe**.

4. Installationsguiden startar. Klicka på "Next" [Nästa] för att fortsätta (bild 39).

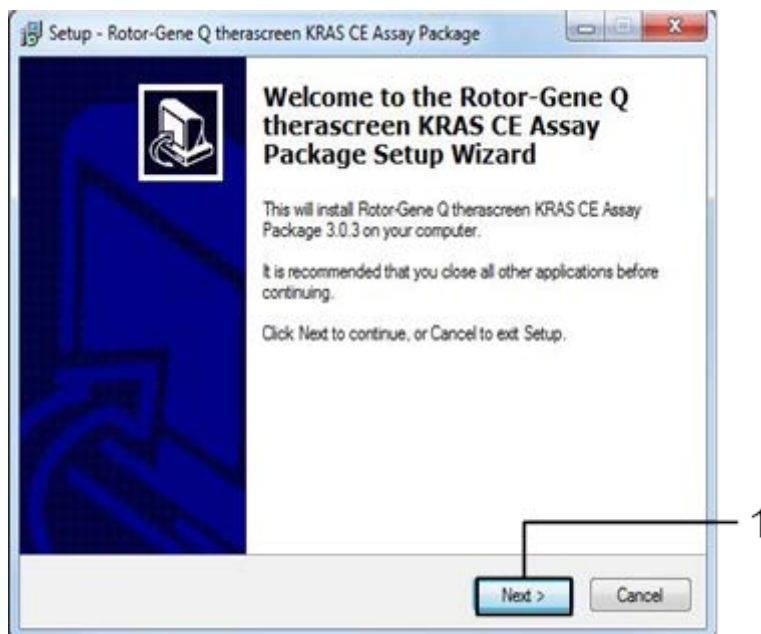


Bild 39. Dialogrutan "Setup" [Installera]. 1 = "Next" [Nästa].

5. Läs licensavtalet i dialogrutan "License Agreement" [Licensavtal] och godkänn avtalet genom att markera "I accept the agreement" [Jag godkänner avtalet]. Klicka på "Next" [Nästa] för att fortsätta (bild 40).

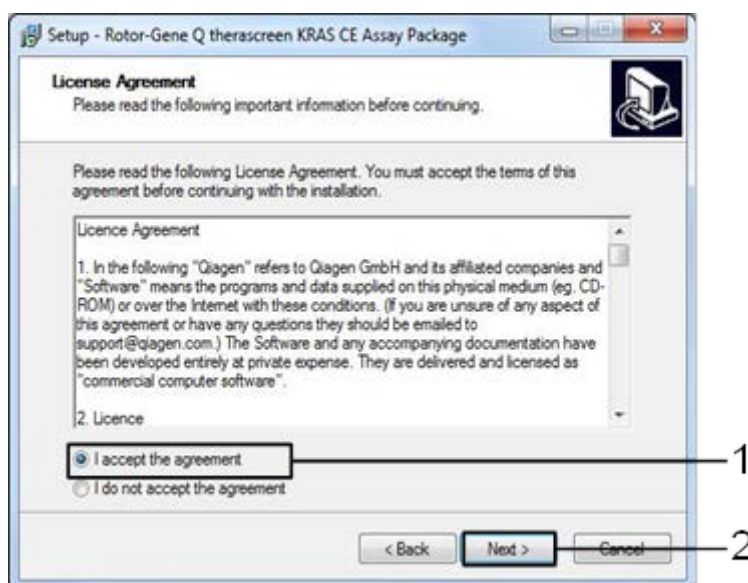


Bild 40. Dialogrutan "License Agreement" [Licensavtal]. 1 = "I accept the agreement" [Jag godkänner avtalet], 2 = "Next" [Nästa].



6. Installationen startar automatiskt och en sista "Setup"-dialogruta [Installera] visas. Klicka på "Finish" [Avsluta] för att avsluta installationsguiden (bild 41).

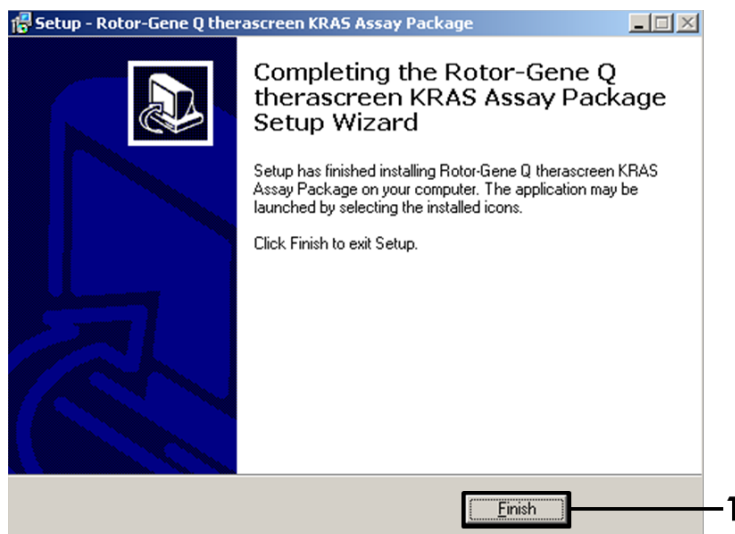


Bild 41. Slutföra installationsguiden.

7. Starta om datorn. Genvägar till både "therascreen KRAS QC Locked Template" och "therascreen KRAS Locked Template" skapas automatiskt på skrivbordet.

## Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: 1 kontrollanalys, 7 mutationsanalyser, positiv kontroll, vatten, <i>Taq</i> DNA-polymeras	874011
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD (version 3.1.1)	Programprotokollpaket för användning med <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR-kitet och instrumentet QIAGEN Rotor-Gene Q MDx med en rotor med 72 brunnar	9023675
<b>Rotor-Gene Q med tillbehör</b>		
Rotor-Gene Q MDx	Realtids-PCR-cykler och HRM-analys-instrument (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	9002032
Rotor-Gene Q MDx	Realtids-PCR-cykler och HRM-analys-instrument (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	9002033
Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett i 72 × 0,1 ml-rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 × 250 remsor med 4 rör med lock för 10 000 reaktioner	981106

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – för rening av genomiskt DNA från paraffininbäddad vävnad</b>		56404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-beredningar: QIAamp MinElute®-kolumner, proteinas K, buffertar och uppsamlingsrör (2 ml)	

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** eller kan beställas från QIAGENs tekniska support eller din lokala distributör.

## Revisionshistorik

Dokumentrevisioner	
R4 01/2019	Tillägg av auktoriserad representant (framsida). Uppdaterade avsnittet "Symboler". Uppdaterade mallen.

Den här sidan har avsiktligt lämnats tom.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN-gruppen); ARMS® (AstraZeneca Ltd.); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Registrerade namn, varumärken etc. som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag även om de inte uttryckligen anges som skyddade.

*Får inte användas med avföringsprov.*

*Får inte användas med urinprov.*

*Får inte användas med extracellulär nukleinsyra från blodprov.*

*Får inte användas med cellfritt benmärgsprov.*

*Får inte användas med salivprov.*

KÖPET AV DEN HÄR PRODUKTEN GER ANVÄNDAREN RÄTT ATT ANVÄNDA DEN ENBART FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKA ÅTGÄRDER UNDER VISSA ROCHE-PATENT. INGET ALLMÄNT PATENT ELLER LICENS AV NÅGOT SLAG FÖRUTOM DEN HÄR SPECIFIKA RÄTTIGHETEN INGÅR I KÖPET.

**Avtal om begränsad licens för *therascreen* KRAS RGQ PCR-kitet**

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. Kiten och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kiten 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 kiten och/eller någon av deras komponenter.

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

HB-1861-004 1116068 01-2019 © 2019 QIAGEN, med ensamrätt.

---

Beställning [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Teknisk support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webbplats [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

