

Januar 2019

therascreen[®] EGFR RGQ PCR Kit Handbuch



Version 2



In-vitro-Diagnostikum

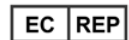
Zur Verwendung mit Rotor-Gene[®] Q MDx Instrumenten



874111



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



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



1116287DE



Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	6
Zusammenfassung und Erläuterung	7
Verfahrensprinzip	9
Mitgelieferte Materialien.....	14
Kit-Inhalt	14
Zusätzlich benötigtes Material	15
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	17
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	17
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	19
Transportbedingungen	19
Lagerungsbedingungen	19
Lagerung und Handhabung der Proben	20
Verfahren	21
DNA-Extraktion und -Vorbereitung	21
Protokoll: Probenbestimmung	22
Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis.....	36
Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)	49
Markierungen des Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> EGFR Assay Package	50
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	56
Qualitätskontrolle.....	57
Anwendungseinschränkungen	57
Leistungsmerkmale	58

Analytische Leistung.....	58
Leerwertgrenze (LOB), Wirkungsbereich und Cutoff-Werte	58
Effekt der DNA-Aufgabemenge auf die ΔC_T -Werte	59
Kreuzreaktivität	60
Richtigkeit: Vergleich mit der analytischen Referenzmethode.....	60
Nachweisgrenzen (LOD: Limit of Detection)	61
Störungen.....	63
Reproduzierbarkeit	63
Klinische Leistungsmerkmale.....	67
Klinische Ergebnisse: GIOTRIF®.....	67
Klinische Ergebnisse: IRESSA®.....	69
Literatur	72
Symbole	74
Anhang A: <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll.....	75
Allgemeine Informationen	75
Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils.....	75
Verfahren (manuell).....	86
Protokoll: Probenbestimmung (manuell)	86
Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis (manuell).....	86
Protokoll: Rotor-Gene Q-Konfiguration des <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kits.....	87
Interpretation der Ergebnisse (manuell)	92
Einstellungen für die Analyse in der Software.....	92
Analyse der Daten aus der Probenbestimmung.....	93
Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis	95

Anhang B: Installation der <i>therascreen</i> EGFR CE Assay Package Software	104
Kontakt.....	107
Bestellinformationen	108
Bearbeitungshistorie des Handbuchs	110

Verwendungszweck

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist ein In-vitro-Diagnostikum zur Detektion von 29 somatischen Mutationen im EGFR-Gen. Er ermöglicht die qualitative Bestimmung des Mutationsstatus in Tumorproben von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer, NSCLC).

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

Mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit werden DNA-Proben, die aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem (formalin-fixed, paraffin embedded, FFPE-) Tumorgewebe von NSCLC-Patienten extrahiert wurden, auf einem Rotor-Gene Q MDx Instrument getestet. Der Kit darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

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

Zusammenfassung und Erläuterung

In menschlichen Karzinomen treten Mutationen des EGFR-Onkogens auf (1, 2). Es gibt einen Zusammenhang zwischen diesen Mutationen und der Therapieantwort bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), die mit bestimmten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) behandelt werden (3–8). Diese Mutationen im EGFR-Onkogen kommen in der allgemeinen Population von NSCLC-Patienten in den USA, Europa oder Australien mit einer Häufigkeit von ungefähr 10 % und in Japan und Taiwan mit einer Häufigkeit von bis zu 30 % vor (1, 2, 9).

Beim *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit handelt es sich um einen gebrauchsfertigen Kit für den Nachweis von 29 Mutationen im krebisrelevanten EGFR-Gen mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) auf dem Rotor-Gene Q MDx System.

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

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

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

Tabelle 1. Liste der Mutationen und COSMIC-IDs

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

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

Tabelle 1. Fortsetzung Liste der Mutationen und COSMIC-IDs

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

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

Verfahrensprinzip

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

ARMS

Die ARMS-Technologie dient zur allel- oder mutationsspezifischen Amplifikation. Mit der *Taq*-DNA-Polymerase (*Taq*) kann äußerst genau zwischen einer Übereinstimmung und einer Nichtübereinstimmung am 3'-Ende eines PCR-Primers unterschieden werden. Spezifische mutierte Sequenzen werden selbst in Proben, bei denen die Mehrzahl der Sequenzen die Mutation nicht aufweist, selektiv amplifiziert. Wenn der Primer vollständig übereinstimmt, erfolgt die Amplifikation mit voller Effizienz. Wenn die 3'-Base nicht übereinstimmt, wird die Amplifikation nur im Hintergrund auf niedrigem Niveau durchgeführt.

Scorpions

Der Nachweis der Amplifikation wird mit Hilfe der Scorpions-Technologie durchgeführt. Scorpions sind bifunktionelle Moleküle, die einen PCR-Primer enthalten, der kovalent mit einer Sonde verbunden ist. Das Fluorophor in der Sonde interagiert mit einem Quencher, der auch in die Sonde eingebunden ist und die Fluoreszenz reduziert. Wenn die Sonde bei der PCR an das Amplifikat bindet, werden Fluorophor und Quencher getrennt, was zu einem nachweisbaren Anstieg der Fluoreszenz führt.

Kit-Zusammenstellung

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

- ein Kontrollassay (CTRL)
- sieben Mutations-Assays

Alle Reaktionsgemische enthalten Reagenzien für den Nachweis der Zielsequenzen, die mit Carboxyfluorescein (FAM™) gekennzeichnet sind, sowie einen internen Kontrollassay, der mit Hexachlorfluorescein (HEX™) gekennzeichnet ist. Mit dem internen Kontrollassay kann nachgewiesen werden, ob Inhibitoren vorhanden sind, die zu falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die FAM-Amplifikation kann die konkurrierende Amplifikation der internen Kontrolle verdrängen, und die interne Kontrolle dient lediglich dem Nachweis, dass es sich beim Ausbleiben einer FAM-Amplifikation tatsächlich um ein negatives Ergebnis und nicht etwa um eine fehlgeschlagene PCR-Reaktion handelt.

Assays

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

Kontrollassay

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

Mutationsassays

Jeder Mutationsassay enthält eine FAM-markierte Scorpions-Sonde sowie einen ARMS-Primer zur Unterscheidung zwischen der Wildtyp-DNA und einer spezifischen mutierten DNA.

Kontrollen

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

Positivkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 1 bis 8 eine Positivkontrolle enthalten sein. Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthält eine EGFR-Positivkontrolle (PC), die in der Positivkontrollreaktion als Template zum Einsatz kommt. Mit den Ergebnissen der Positivkontrolle wird sichergestellt, dass der Kit die angegebenen Akzeptanzkriterien erfüllt.

Negativkontrolle

Bei jedem Lauf muss in den Röhrchen 9 bis 16 eine Negativkontrolle („Nicht-Template-Kontrolle“, NTC) enthalten sein. Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthält Wasser als NTC, das in der Nicht-Template-Kontrolle anstelle von Template zum Einsatz kommt. Die Nicht-Template-Kontrolle dient dazu, mögliche Kontaminationen nachzuweisen, die u. U. bei der Laufkonfiguration eingeschleppt wurden, sowie zur Bestimmung der Zuverlässigkeit der internen Kontrollreaktion.

Interne Kontrollreaktion

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

Probenbestimmung

Zur Bestimmung der gesamten in einer Probe enthaltenen amplifizierbaren EGFR-DNA sollte unbedingt das im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit enthaltene Kontrollreaktionsgemisch (Röhrchen CTRL) verwendet werden. Der Kontrollassay amplifiziert eine Region von Exon 2 des EGFR-Gens. Die Proben sollten ausschließlich mit dem Kontrollassay bestimmt werden, wobei die EGFR-Positivkontrolle als Positivkontrolle und Wasser für das „Template“ als Nicht-Template-Kontrolle zu verwenden sind.

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

Plattform und Software

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

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

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit kann mit der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3 auch im offenen Modus (d. h., ohne Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package) verwendet werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter „Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll“ auf Seite 75.

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

therascreen EGFR RGQ PCR Kit				(24)
Katalog-Nr.				874111
Anzahl der Reaktionen				24
Farbe	Identität	Röhrchen-ID		Volumen
Rot	Control Reaction Mix (Kontrollreaktionsgemisch)	1	CTRL	2 × 600 µl
Lila	T790M Reaction Mix (T790M-Reaktionsgemisch)	2	T790M	600 µl
Orange	Deletions Reaction Mix (Deletionsreaktionsgemisch)	3	Del	600 µl
Rosa	L858R Reaction Mix (L858R-Reaktionsgemisch)	4	L858R	600 µl
Grün	L861Q Reaction Mix (L861Q-Reaktionsgemisch)	5	L861Q	600 µl
Gelb	G719X Reaction Mix (G719X-Reaktionsgemisch)	6	G719X	600 µl
Grau	S768I Reaction Mix (G719X-Reaktionsgemisch)	7	S768I	600 µl
Blau	Insertions Reaction Mix (Insertionsreaktionsgemisch)	8	Insertionen	600 µl
Beige	EGFR Positive Control (EGFR-Positivkontrolle)	9	PK	300 µl
Mintgrün	Taq-DNA-Polymerase	Taq	2 × 80 µl	2 × 80 µl
Weiß	Nukleasefreies Wasser für die Nicht- Template-Kontrolle	NTC	1,9 ml	1,9 ml
Weiß	Nukleasefreies Wasser zur Verdünnung	Dil.	1,9 ml	1,9 ml
(therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook)				1
therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbuch				

Zusätzlich benötigtes Material

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

Reagenzien

- Kit zur DNA-Extraktion (siehe „DNA-Extraktion und -Vorbereitung“ auf Seite 21)

Verbrauchsmaterialien und allgemeine Laborausrüstung

- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Probenvorbereitung
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Herstellung des PCR-Master-Mix
- Spezielle (einstellbare) Pipetten* zur Dispensierung von Template-DNA
- DNase-, RNase- und DNA-freie Pipettenspitzen mit Filtern (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (Strip-Röhrchen und Deckel, 0,1 ml), zur Verwendung mit einem 72-Well-Rotor (Kat.-Nr. 981103 oder 981106)
- DNase-, RNase- und DNA-freie Mikrozentrifugenröhrchen zum Ansetzen von Master-Mix
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (Ladeblock für 72 x 0,1 ml-Röhrchen), Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration mit einer Einkanalpipette (Katalog-Nr. 9018901)
- Thermomixer*, beheizter Orbitalinkubator*, Wärmeblock* oder Wasserbad* zur Inkubation bei 90 °C
- Tischzentrifuge* mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße
- Vortexer*

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

Ausrüstung für die PCR

- Rotor-Gene Q MDx Instrument mit den Fluoreszenzkanälen „Cycling Green“ und „Cycling Yellow“ (für den Nachweis von jeweils FAM und HEX) *†
- Rotor-Gene Q Software, Version 2.3
- Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package CD-Version 3.0.5 (Katalog-Nr. 9023537)

Hinweis: Für die Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package Software wird die Rotor-Gene Q Software, Version 2.3 benötigt.

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

† In einigen Ländern kann ggf. das Rotor-Gene Q 5plex HRM Instrument mit Produktionsdatum ab Mai 2011 verwendet werden. Das Herstellungsdatum kann aus der Seriennummer auf der Rückseite des Geräts abgeleitet werden. Die Seriennummer hat das Format „MMJJNNN“, wobei „MM“ für den Produktionsmonat in Ziffern, „JJ“ für die letzten beiden Ziffern des Produktionsjahres und „NNN“ für die eindeutige Instrumentenkennung steht.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS). Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter **www.qiagen.com/safety** verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

Sicherheitshinweise zum Rotor-Gene Q Instrument finden Sie im zugehörigen Benutzerhandbuch.

Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie stets Folgendes.

- Der Test ist für FFPE-NSCLC-Gewebeproben vorgesehen.
- Lagern und extrahieren Sie positive Materialien (sowohl Proben als auch Positivkontrollen) getrennt von allen anderen Reagenzien und geben Sie sie in einem räumlich getrennten Bereich zum Reaktionsgemisch hinzu.
- Äußerste Vorsicht ist geboten, um die Kontamination von PCR-Reaktionen mit synthetischem Kontrollmaterial zu vermeiden. Wir empfehlen, zum Ansetzen von Reaktionsgemischen und Hinzufügen von DNA-Templates verschiedene Spezialpipetten zu verwenden. Die Herstellung und Dispensierung der Reaktionsgemische darf nicht in dem Bereich durchgeführt werden, in dem die Template-Zugabe erfolgt. Die Rotor-Gene Q Röhrchen dürfen nach Abschluss des PCR-Laufs nicht geöffnet werden. Auf diese Weise soll eine Kontamination mit PCR-Endprodukten im Labor verhindert werden.

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

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

Hinweis: Die Reagenzien sind für die manuelle Einrichtung validiert. Bei automatisierten Methoden ist die Anzahl der möglichen Reaktion u. U. niedriger, da ein Teil der Reagenzien zum Füllen des Totvolumens dieser automatisierten Systeme verloren geht.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Transportbedingungen

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

Lagerungsbedingungen

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit muss unmittelbar nach dem Empfang lichtgeschützt bei -30 bis -15 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur gelagert werden. Scorpions müssen (wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle) vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden und optimale Aktivität und Leistung sicherzustellen. Der Kit ist bei Lagerung unter den empfohlenen Lagerungsbedingungen in der Originalverpackung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden. Es wird empfohlen, acht Einfrier-/Auftauzyklen nicht zu überschreiten.

Die Reagenzien müssen über einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde bis maximal 4,5 Stunden bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufgetaut werden. Wenn die Reagenzien in einem gebrauchsfertigen Zustand sind, können die PCR-Reaktionen eingerichtet werden. Die Rotor-Gene Q MDx Röhrchen, welche die Master-Mixe und die DNA-Probe enthalten, können dann sofort in das Rotor-Gene Q MDx Instrument geladen werden. Die Gesamtdauer vom Beginn der PCR-Konfiguration bis zum Beginn des Laufs sollte nicht überschritten werden:

- 6 Stunden bei Lagerung bei Raumtemperatur

Hinweis: Diese Zeit umfasst sowohl die PCR-Konfiguration als auch die Lagerung.

- 18 Stunden bei Lagerung im Kühlschrank (2–8 °C)

Hinweis: Diese Zeit umfasst sowohl die PCR-Konfiguration als auch die Lagerung.

Hinweis: Scorpions müssen (wie alle fluoreszenzmarkierten Moleküle) vor Licht geschützt werden, um Photobleichung zu vermeiden und optimale Aktivität und Leistung sicherzustellen.

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

Lagerung und Handhabung der Proben

Hinweis: Alle Proben müssen als potenziell infektiöses Material behandelt werden.

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

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

So bereiten Sie Gewebeprobe(n) für die DNA-Extraktion vor:

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

Verfahren

DNA-Extraktion und -Vorbereitung

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

- Die QIAGEN Entparaffinierungslösung darf nicht verwendet werden. Setzen Sie zur Entparaffinierung nur die Xylen-/Ethanol-Methode ein, die im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbuch* (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook) beschrieben ist.

- Es muss für alle erforderlichen Schritte Ethanol* in Molekularbiologie-Qualität verwendet werden.
- Überführen Sie für jede Probe den gesamten Gewebebereich von zwei Schnitten mit einem frischen Skalpell in ein beschriftetes Mikrozentrifugenröhrchen.
- Der Proteinase-K-Verdau (Schritt 11 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) muss 1 Stunde \pm 5 Minuten lang bei $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden.
- Der Proteinase-K-Verdau (Schritt 12 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) muss 1 Stunde \pm 5 Minuten lang bei $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden.
- Der im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook* (Handbuch zum QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) beschriebene RNase-Schritt darf nicht ausgeführt werden.
- Die Proben müssen mit 120 μl Elutionspuffer (ATE) aus dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Schritt 20 im *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Handbook*) eluiert werden.
- Genomische DNA kann nach der Extraktion 1 Woche lang bei 2 bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder vor dem Gebrauch bis zu 8 Wochen lang bei -30 bis $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

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

Protokoll: Probenbestimmung

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

Hinweis: Informationen zur manuellen Bestimmung von DNA-Proben finden Sie unter „Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll“ auf Seite 75.

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

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn den Abschnitt „Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“ auf Seite 17.
- Machen Sie sich mit dem Rotor-Gene Q MDx Instrument ausreichend vertraut, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen. Sehen Sie dazu auch das Benutzerhandbuch des Instruments ein.
- Die *Taq* oder ein *Taq*-haltiges Gemisch darf nicht im Vortexer gemischt werden, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*, indem Sie die Pipettenspitze nur kurz unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.
- Mit dem vorhandenen Kontrollreaktionsgemisch können bis zu 24 Proben bestimmt werden.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Stellen Sie vor dem ersten Gebrauch des Rotor-Gene Q MDx Instruments sicher, dass die *therascreen* EGFR CE Assay Package Software installiert ist (siehe „Anhang B: Installation der *therascreen* EGFR CE Assay Package Software“ auf Seite 104).
- Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch mindestens 1 Stunde und höchstens 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig aufgetaut, durch 10-maliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt.
- Mischen Sie alle Proben durch 10-maliges Umschwenken und zentrifugieren Sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.
- Überprüfen Sie vor der Verwendung, dass die *Taq* Raumtemperatur erreicht hat (15 bis 25 °C). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

1. Tauen Sie das Kontrollreaktionsgemisch (CTRL), das nukleasefreie Wasser für die Nicht-Template-Kontrolle (NTC) und die EGFR-Positivkontrolle (PC) mindestens 1 Stunde und maximal 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) auf.

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

Tabelle 2. Zeiten für Auftauen und PCR-Konfiguration sowie Lagertemperaturen

Minimale Auftauzeit	Maximale Auftauzeit	Lagertemperatur nach der PCR-Konfiguration	Max. Zeit für PCR-Konfiguration und Lagerung
1 Stunde	4,5 Stunden	Raumtemperatur (15 bis 25 °C)	6 Stunden
1 Stunde	4,5 Stunden	2 bis 8 °C	18 Stunden

Hinweis: Die PCR-Konfiguration wird bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) durchgeführt. Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum vom Abschluss der PCR-Konfiguration bis zum Start des PCR-Testlaufs auf dem Rotor-Gene Q MDx Instrument.

Hinweis: Bringen Sie die *Taq* gleichzeitig mit den anderen Reagenzien auf Raumtemperatur (15 bis 25 °C) (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 19). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

2. Mischen Sie die Reagenzien nach dem Auftauen, indem Sie jedes Röhrchen 10-mal umschwenken, um im gesamten Röhrchen eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten, und zentrifugieren Sie dann kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.
3. Setzen Sie für die DNA-Proben gemäß den Volumenangaben in Tabelle 3 ausreichend Kontroll-Master-Mix (Kontrollreaktionsgemisch [CTRL] plus *Taq*), eine EGFR-Positivkontrollreaktion und eine NTC-Reaktion an. Planen Sie Reagenzien für 1 zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.

Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 3. Herstellung des Kontrollassay-Master-Mix

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

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

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

4. Mischen Sie den Master-Mix durch vorsichtiges 10-maliges Auf- und Abpipettieren gründlich. Setzen Sie die benötigte Anzahl von PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 4 dargestellten Anordnung in den Ladeblock ein. Geben Sie sofort 20 μl Master-Mix in jedes PCR-Röhrchen des Streifens.

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

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

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

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

Achten Sie darauf, dass bei der Zugabe von NTC, Proben und Positivkontrolle in die jeweiligen Röhrchen jegliche Beladungs- oder Pipettierfehler vermieden werden. Markieren Sie die Deckel der Röhrchen, um die Richtung anzugeben, in der die Röhrchen in das Rotor-Gene Q MDx Instrument geladen werden sollen.
8. Nachdem Sie alle PCR-Röhrchen mit den Deckeln verschlossen haben, führen Sie eine Sichtkontrolle der Füllstände in den Probenröhrchen durch, um sicherzustellen, dass alle Röhrchen Probe enthalten.
9. Schwenken Sie alle PCR-Röhrchen vier mal um, um Proben und Reaktionsgemische zu mischen.

10. Setzen Sie die PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 4 dargestellten Anordnung in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors ein.

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

11. Setzen Sie den 72-Well-Rotor sofort in das Rotor-Gene Q MDx Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q MDx Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.

Hinweis: Bei Verwendung der manuellen Probenbestimmung finden Sie weitere Informationen unter „Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll“ auf Seite 75.

12. Starten Sie die Rotor-Gene Q Software, indem Sie auf dem Desktop des Computers, der an das Rotor-Gene Q MDx Instrument angeschlossen ist, auf das Symbol „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ klicken (siehe Abbildung 1).



Abbildung 1. Symbol „EGFR CE Locked Template“ für den Kontrolllauf (Probenbestimmung).

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

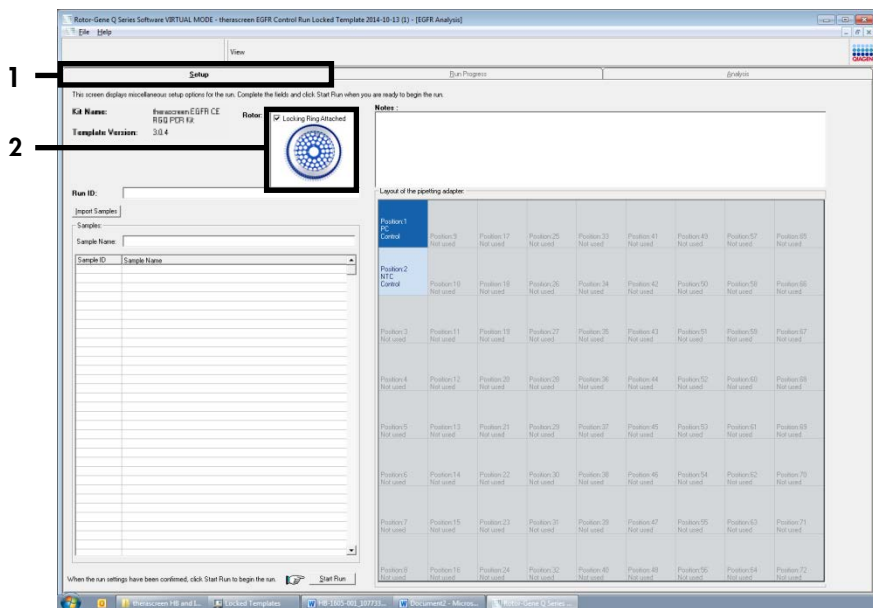


Abbildung 2. Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) (1) mit dem Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht) (2)

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

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

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

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

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

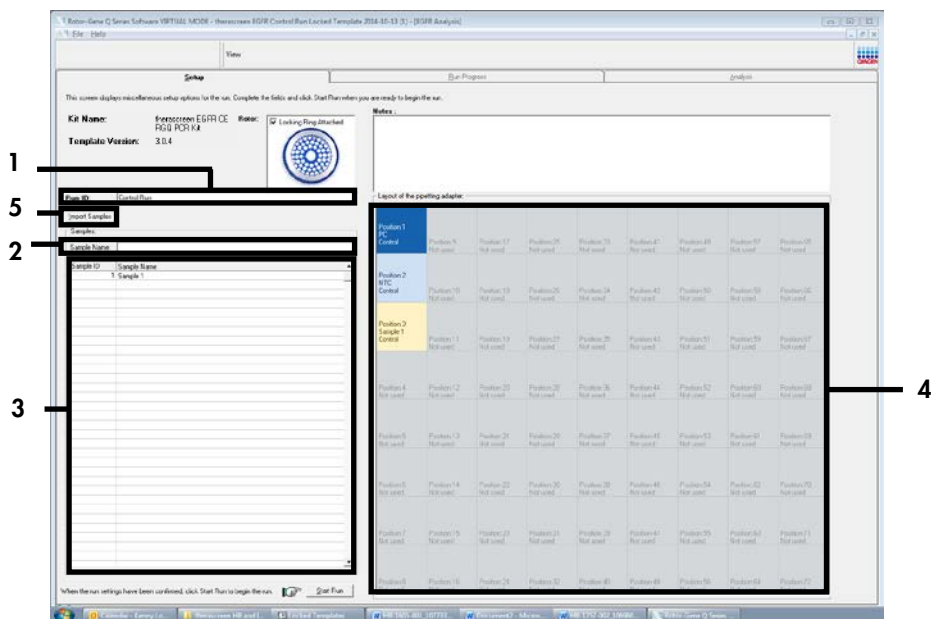


Abbildung 3. Eingabe von Testlauf-ID und Probenname. [1 = Dialogfeld „Run ID“ (Testlauf-ID), 2 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname), 3 = Probenliste, 4 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters), 5 = Fensterabschnitt „Sample Import“ (Probenimport)]

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

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

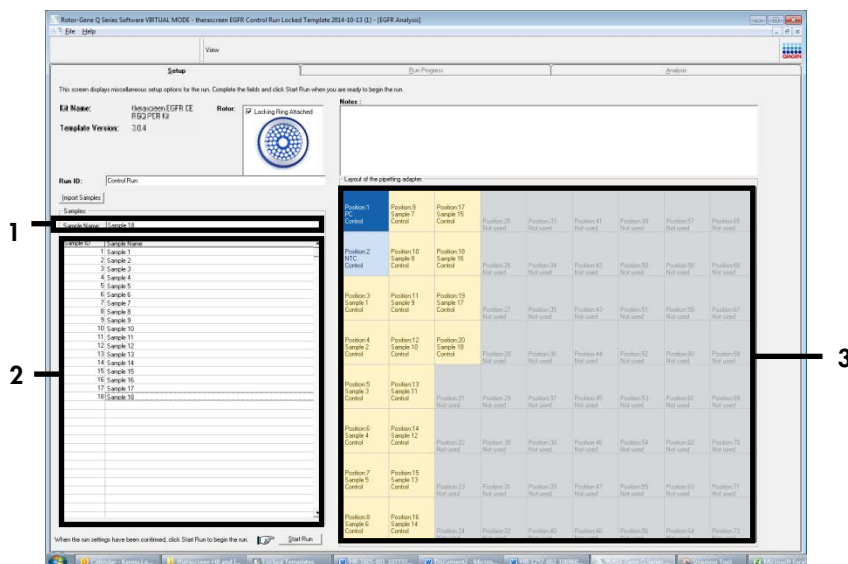


Abbildung 4. Eingabe weiterer Probenamen in das Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname). [1 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname), 2 = Probenliste, 3 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters)]

16. Nachdem alle Probenamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, ob diese korrekt sind. Geben Sie bei Bedarf zusätzliche Informationen in das Dialogfeld „Notes“ (Notizen) ein, und klicken Sie dann auf „Start Run“ (Testlauf starten, siehe Abbildung 5).

Hinweis: Wenn eine Rotorposition unbesetzt ist, wird ein Warnhinweis eingeblendet (siehe Abbildung 5), um den Anwender daran zu erinnern, dass unbesetzte Positionen im

Rotor mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt werden müssen. Stellen Sie sicher, dass alle unbesetzten Rotorpositionen mit verschlossenen, leeren Röhrchen gefüllt sind, und klicken Sie dann auf „OK“, um fortzufahren.

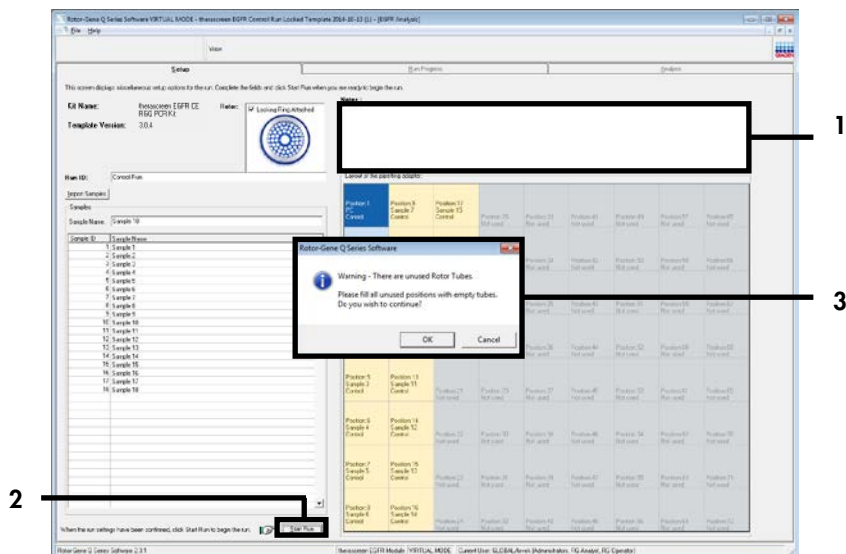


Abbildung 5. Dialogfeld „Notes“ (Notizen) (1), die Schaltfläche „Start Run“ (Lauf starten) (2) und der Warnhinweis über unbesetzte Rotorpositionen (3)

17. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet. Wählen Sie einen geeigneten Dateinamen aus, und speichern Sie den PCR-Testlauf als *.rex-Testlaufdatei in dem ausgewählten Speicherort. Klicken Sie auf „Save“ (Speichern, siehe Abbildung 6).

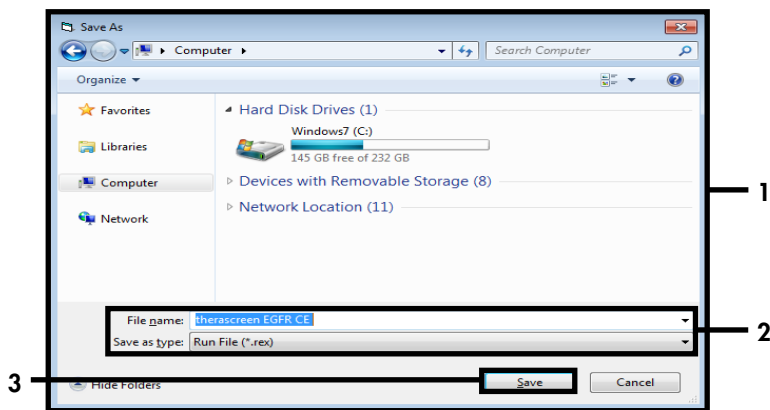


Abbildung 6. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) (1). 2 = Felder „File Name“ (Dateiname) und „Save as type“ (Dateityp); 3 = „Save“ (Speichern).

18. Der PCR-Testlauf wird gestartet.

Hinweis: Beim Start des Testlaufs wird die Registerkarte „Run Progress“ (Testlauffortschritt) geöffnet, auf der die Temperaturkurve und die verbleibende Testlaufzeit angezeigt werden (siehe Abbildung 7).

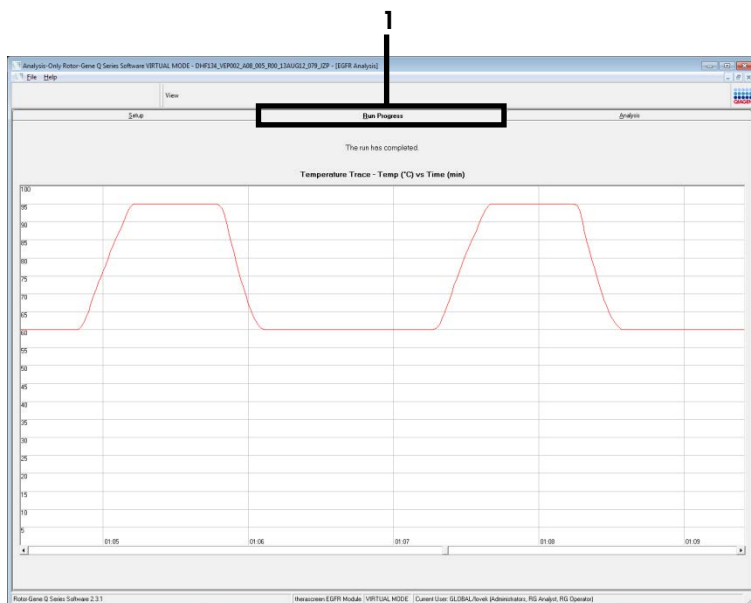


Abbildung 7. Registerkarte „Run Progress“ (Testlauffortschritt) (1)

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

Hinweis: Wenn die Registerkarte „Analysis“ (Analyse) nicht angezeigt wird, klicken Sie auf diese Registerkarte (siehe Abbildung 8).

Hinweis: Eine Beschreibung der Berechnungsmethode finden Sie im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)“ auf Seite 49.

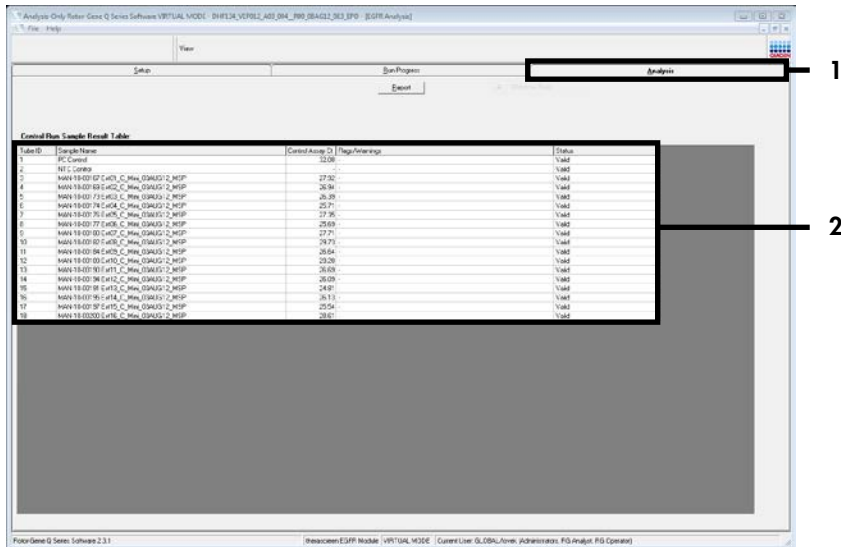


Abbildung 8. Registerkarte „Analysis“ (Analyse) [1] mit den Ergebnissen [2 = „Sample QC Result Table“ (Tabelle der QC-Probenergebnisse)]

20. Die Kontrollergebnisse werden wie folgt in der Tabelle „Sample QC Result Table“ (Tabelle der QC-Probenergebnisse) angegeben (siehe Abbildung 8).

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

Für Probenkontrollreaktionen mit einem $C_T > 31,10$ wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt.

Die Menge an DNA ist nicht ausreichend für die Mutationsanalyse. Wiederholen Sie den Test der Probe. Wenn die Menge an DNA weiterhin unzureichend ist, extrahieren Sie mehr Tumorgewebe, sofern verfügbar.

Für Probenkontrollreaktionen mit einem $C_T < 23,70$ wird „Invalid“ (Ungültig) angezeigt. Die

DNA-Konzentration ist zu hoch für die Mutationsanalyse. Verdünnen Sie mit nukleasefreiem Wasser zur Verdünnung (Dil.) und wiederholen Sie den Test. Verdünnen Sie auf einen C_T im Bereich von 23,70 bis 31,10. Durch eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 erhöht sich der C_T -Wert um etwa 1,0.

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

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

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

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

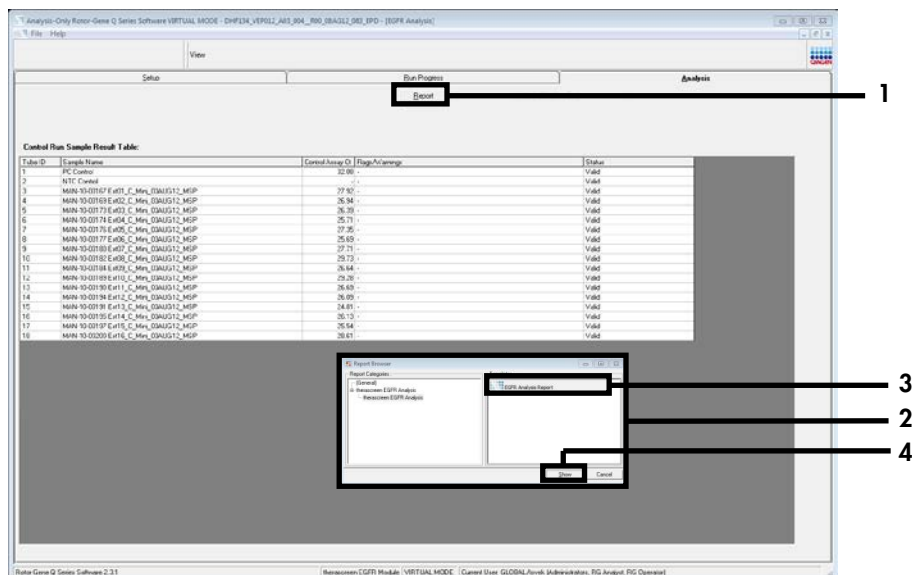


Abbildung 9. Auswahl des EGFR CE-Analyseberichts 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fenster „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = Schaltfläche „EGFR Analysis Report“ (EGFR-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis

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

Hinweis: Informationen zum manuellen Mutationsnachweis finden Sie unter „Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll“ auf Seite 75.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn den Abschnitt „Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen“ auf Seite 17.
- Machen Sie sich mit dem Rotor-Gene Q MDx Instrument ausreichend vertraut, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen. Sehen Sie dazu auch das Benutzerhandbuch des Instruments ein.
- Nach einer erfolgreichen DNA-Probenbestimmung kann die Probe mit den EGFR-Mutationsassays getestet werden.
- Die Proben sollten in Chargen zu jeweils sieben Proben zusammengefasst werden, um den *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit effizient zu nutzen. Bei kleineren Chargengrößen wird die Anzahl der Proben, die mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit getestet werden können, verringert.
- Für den Test einer Probe müssen alle im *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit vorhandenen Reaktionsgemische verwendet werden.
- Die *Taq* oder ein *Taq*-haltiges Gemisch darf nicht im Vortexer gemischt werden, da das Enzym hierdurch inaktiviert werden kann.
- Pipettieren Sie die *Taq*, indem Sie die Pipettenspitze vorsichtig nur kurz unter die Flüssigkeitsoberfläche eintauchen. Dadurch soll verhindert werden, dass die Spitze großflächig mit dem Enzym in Berührung kommt.

Wichtige Schritte, die vor der Durchführung auszuführen sind

- Stellen Sie vor dem ersten Gebrauch des Rotor-Gene Q MDx Instruments sicher, dass die *therascreen* EGFR CE Assay Package Software installiert ist (siehe „Anhang B: Installation der *therascreen* EGFR CE Assay Package Software“ auf Seite 104).
- Alle Reagenzien müssen vor dem Gebrauch mindestens 1 Stunde und höchstens 4,5 Stunden lang bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) vollständig aufgetaut, durch 10-maliges Umschwenken gemischt und kurz zentrifugiert werden, damit sich der Inhalt unten im Röhrchen sammelt.
- Mischen Sie alle Proben durch 10-maliges Umschwenken und zentrifugieren Sie kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.
- Überprüfen Sie vor der Verwendung, dass die *Taq* Raumtemperatur erreicht hat (15 bis 25 °C). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

Verfahren

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

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

Tabelle 5. Zeiten für Auftauen und PCR-Konfiguration sowie Lagertemperaturen

Minimale Auftauzeit	Maximale Auftauzeit	Lagertemperatur nach der PCR-Konfiguration	Max. Zeit für PCR-Konfiguration und Lagerung
1 Stunde	4,5 Stunden	Raumtemperatur (15 bis 25 °C)	6 Stunden
1 Stunde	4,5 Stunden	2 bis 8 °C	18 Stunden

Hinweis: Die PCR-Konfiguration wird bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C) durchgeführt. Der Begriff „Lagerung“ bezieht sich auf den Zeitraum vom Abschluss der PCR-Konfiguration bis zum Start des PCR-Testlaufs auf dem Rotor-Gene Q MDx Instrument.

Hinweis: Bringen Sie die *Taq* (Röhrchen *Taq*) gleichzeitig mit den anderen Reagenzien auf Raumtemperatur (15 bis 25 °C) (siehe „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 19). Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, damit sich das Enzym am Boden des Röhrchens sammelt.

2. Mischen Sie die Reagenzien nach dem Auftauen, indem Sie jedes Röhrchen 10-mal umschwenken, um im gesamten Röhrchen eine einheitliche Salzkonzentration zu gewährleisten, und zentrifugieren Sie dann kurz, damit sich der Inhalt unten am Boden des Röhrchens sammelt.
3. Setzen Sie für die DNA-Proben gemäß den Volumenangaben in Tabelle 6 ausreichend Assay-Master-Mixe (Assay-Reaktionsgemisch plus *Taq*), eine EGFR-Positivkontrolle und eine NTC-Reaktion an. Planen Sie Reagenzien für 1 zusätzliche Probe ein, damit bei der PCR-Konfiguration ausreichend Material vorhanden ist.

Die Master-Mixe enthalten mit Ausnahme der Probe alle Komponenten, die für die PCR benötigt werden.

Tabelle 6. Herstellung der Assay-Master-Mixe

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

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

- Mischen Sie die Assay-Master-Mixe durch vorsichtiges 10-maliges Auf- und Abpipettieren gründlich. Setzen Sie die benötigte Anzahl von PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 7 dargestellten Anordnung in den Ladeblock ein. Geben Sie sofort 20 µl des entsprechenden Assay-Master-Mix in jedes PCR-Röhrchen des Streifens.

Die Deckel verbleiben im Kunststoffbehälter, bis sie benötigt werden.

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

Assay	Kontrollen		Position						
	PC	NTC	1	2	Probennummer				
Kontrolle	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deletionen	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insertionen	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- Geben Sie sofort 5 µl Wasser für die NTC in die Röhrchen an den Positionen 9 bis 16 und verschließen Sie die Röhrchen mit dem Deckel.
- Geben Sie jeweils 5 µl Probe in die Probenröhrchen (Röhrchenpositionen 17 bis 24, 25 bis 32, 33 bis 40, 41 bis 48, 49 bis 56, 57 bis 64 sowie 65 bis 72) und verschließen Sie die Röhrchen mit den Deckeln.
- Geben Sie 5 µl EGFR-Positivkontrolle in die Röhrchen an den Positionen 1 bis 8 und verschließen Sie die Röhrchen mit den Deckeln.

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

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

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

8. Nachdem Sie alle PCR-Röhrchen mit den Deckeln verschlossen haben, führen Sie eine Sichtkontrolle der Füllstände in den Probenröhrchen durch, um sicherzustellen, dass alle Röhrchen Probe enthalten.

9. Schwenken Sie alle PCR-Röhrchen vier mal um, um Proben und Reaktionsgemische zu mischen.

10. Setzen Sie die PCR-Röhrchenstreifen gemäß der in Tabelle 7 dargestellten Anordnung in die entsprechenden Positionen des 72-Well-Rotors ein.

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

11. Setzen Sie den 72-Well-Rotor sofort in das Rotor-Gene Q MDx Instrument ein. Stellen Sie sicher, dass der Schließring (Zubehör des Rotor-Gene Q MDx Instruments) oben am Rotor angebracht ist, um die Röhrchen während des Laufs zu sichern.

Hinweis: Bei Verwendung des manuellen EGFR-Mutationsnachweises finden Sie weitere Informationen in „Anhang A: *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit – manuelles Protokoll“, Seite 61.

12. Starten Sie die Rotor-Gene Q Software, indem Sie auf dem Desktop des Notebooks, das an das Rotor-Gene Q MDx Instrument angeschlossen ist, auf das Symbol „*therascreen* EGFR CE Locked Template“ klicken (siehe Abbildung 10).



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

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

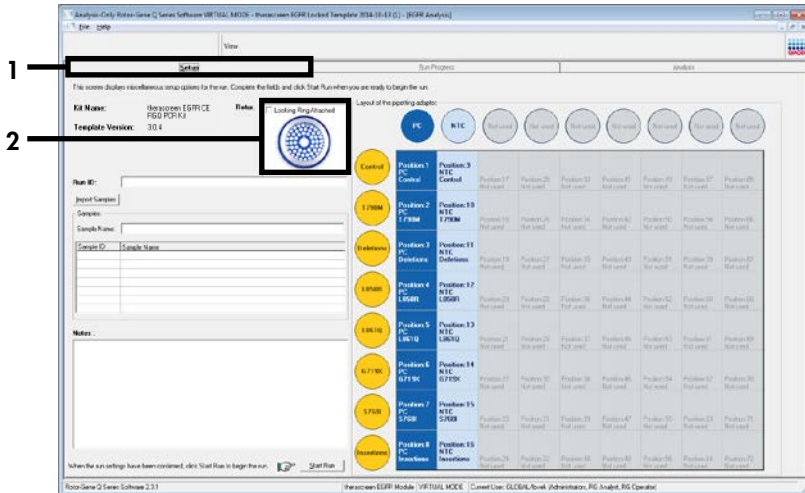


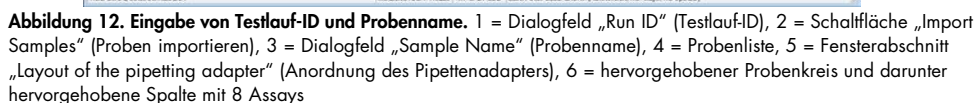
Abbildung 11. Registerkarte „Setup“ (Konfiguration) (1) mit dem Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht) (2)

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

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

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

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



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

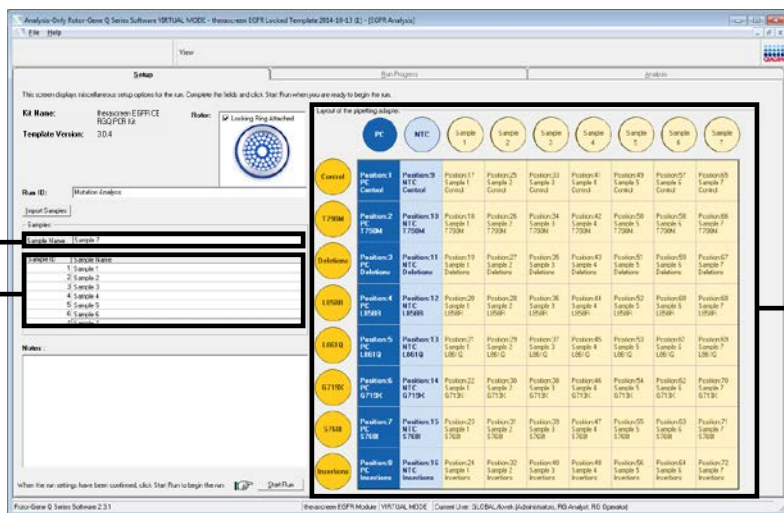


Abbildung 13. Eingabe weiterer Probenamen in das Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname). [1 = Dialogfeld „Sample Name“ (Probenname), 2 = Probenliste, 3 = Fensterabschnitt „Layout of the pipetting adapter“ (Anordnung des Pipettenadapters)]

16. Nachdem alle Probenamen eingegeben wurden, überprüfen Sie, ob diese korrekt sind.

Geben Sie bei Bedarf zusätzliche Informationen in das Dialogfeld „Notes“ (Notizen) ein, und klicken Sie dann auf „Start Run“ (Testlauf starten, siehe Abbildung 14).

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

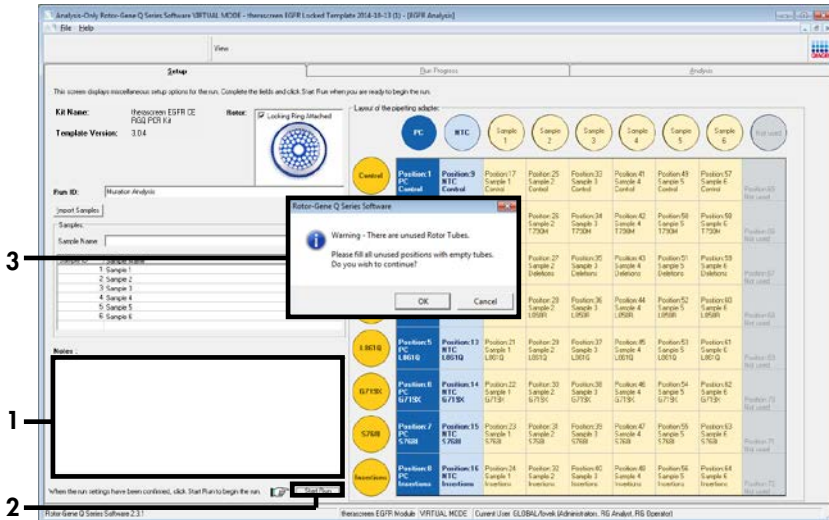


Abbildung 14. Dialogfeld „Notes“ (Notizen) (1), die Schaltfläche „Start Run“ (Lauf starten) (2) und der Warnhinweis über unbesetzte Rotorpositionen (3)

17. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet. Wählen Sie einen geeigneten Dateinamen aus, und speichern Sie den PCR-Testlauf als *.rex-Testlaufdatei in dem ausgewählten Speicherort. Klicken Sie auf „Save“ (Speichern, siehe Abbildung 15).

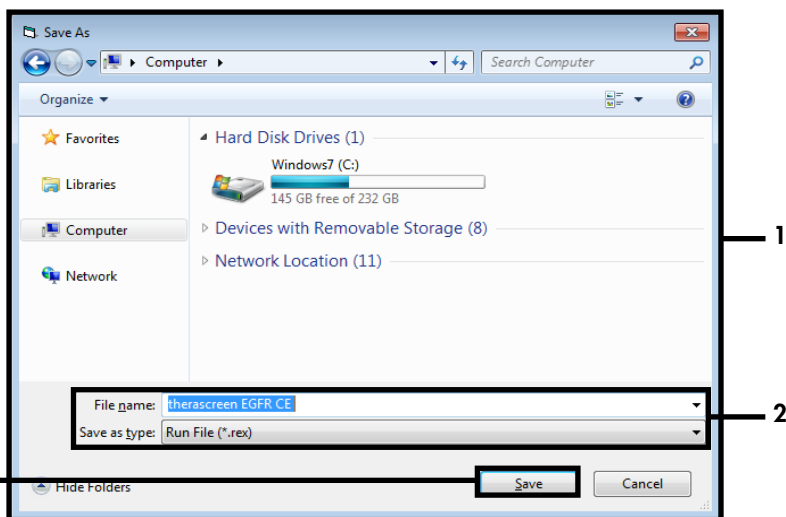


Abbildung 15. Das Fenster „Save As“ (Speichern unter) (1). 2 = Felder „File Name“ (Dateiname) und „Save as type“ (Dateityp); 3 = „Save“ (Speichern).

18. Der PCR-Testlauf wird gestartet.

Hinweis: Beim Start des Testlaufs wird die Registerkarte „Run Progress“ (Testlauffortschritt) geöffnet, auf der die Temperaturkurve und die verbleibende Testlaufzeit angezeigt werden (siehe Abbildung 16).

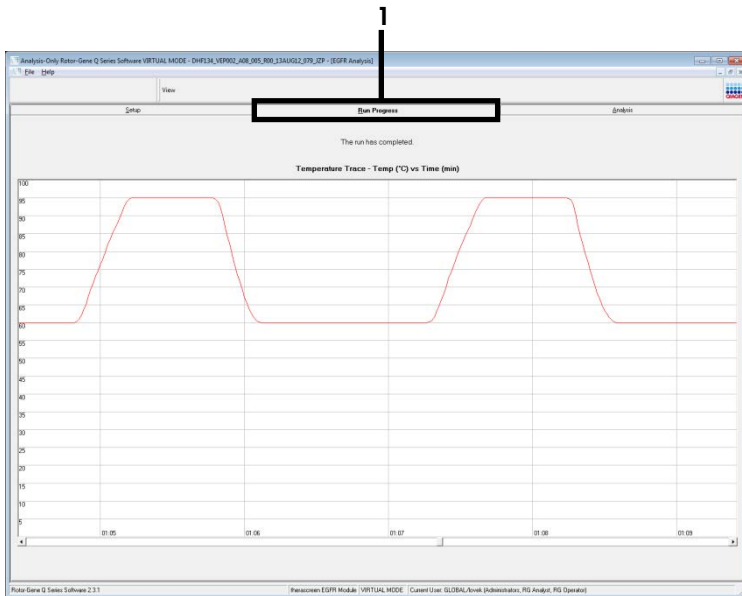


Abbildung 16. Registerkarte „Run Progress“ (Testlauffortschritt).

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

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

Hinweis: Eine Beschreibung der Berechnungsmethode finden Sie im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)“ auf Seite 49.

Run Controls, Positive Control

Probe Position	Assay	Flag/Range	Positive Control Status
Control			Valid
1730M			Valid
Exon9			Valid
1731D			Valid
1732D			Valid
1733D			Valid
1734D			Valid

Run Controls, Negative Control

Probe Position	Assay	NTC	Internal Control	Flag/Range	Negative Control Status
Control		Valid			Valid
1730M		Valid			Valid
Exon9		Valid			Valid
1731D		Valid			Valid
1732D		Valid			Valid
1733D		Valid			Valid
1734D		Valid			Valid

Sample Result Table

Sample ID	Sample Name	EGFR Status	Control ID	Delta Ct	Flag/Range	EGFR Mutation Status
1	SAMPLE 1	Mutation Detected	27.26	4.37	Valid	770M Detected Exon9 Detected 1731D Detected 1732D Detected 1733D Detected 1734D Detected
2	SAMPLE 2	Mutation Detected	30.06	2.10	Valid	770M Detected Exon9 Detected 1731D Detected 1732D Detected 1733D Detected 1734D Detected
3	SAMPLE 3	Mutation Detected	27.11	4.41	Valid	770M Detected Exon9 Detected 1731D Detected 1732D Detected 1733D Detected 1734D Detected
4	SAMPLE 4	Mutation Detected	30.75	3.52	Valid	770M Detected Exon9 Detected 1731D Detected 1732D Detected 1733D Detected 1734D Detected
5	SAMPLE 5	Mutation Detected	35.41	6.36	Valid	770M Detected Exon9 Detected 1731D Detected 1732D Detected 1733D Detected 1734D Detected
6	SAMPLE 6	Mutation Detected	25.22	6.22	Valid	770M Detected Exon9 Detected 1731D Detected 1732D Detected 1733D Detected 1734D Detected
7	SAMPLE 7	Mutation Detected	25.22	7.15	Valid	770M Detected Exon9 Detected 1731D Detected 1732D Detected 1733D Detected 1734D Detected

Abbildung 17. Registerkarte „Analysis“ (Analyse) (1) mit den Ergebnissen. 2 = Fensterabschnitt „Run Controls, Positive Control“ (Testlaufkontrollen, Positivkontrolle), 3 = Fensterabschnitt „Run Controls, Negative Control“ (Testlaufkontrollen, Negativkontrolle), 4 = „Sample Result Table“ (Tabelle der Probenergebnisse), 5 = Fensterabschnitt „Mutation Status“ (Mutationsstatus)

20. Die Assay-Ergebnisse werden wie folgt angegeben (siehe Abbildung 18):

Run Controls, Positive Control (Testlaufkontrollen, Positivkontrolle): Wenn die Ergebnisse im zulässigen Bereich liegen, wird für „Positive Control Status“ (Status der Positivkontrolle) das Ergebnis „Valid“ (Gültig) angezeigt, ansonsten lautet die Anzeige „Invalid“ (Ungültig).

Run Controls, Negative Control (Testlaufkontrollen, Negativkontrolle): Wenn die Ergebnisse für NTC und die interne Kontrolle im zulässigen Bereich liegen, wird für „Negative Control Status“ (Status der Negativkontrolle) das Ergebnis „Valid“ (Gültig) angezeigt, ansonsten lautet die Anzeige „Invalid“ (Ungültig).

Sample Result Table (Tabelle der Probenergebnisse): Für mutationspositive Proben werden in der Spalte „EGFR-Mutationsstatus“ die jeweiligen Mutationen angegeben.

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

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

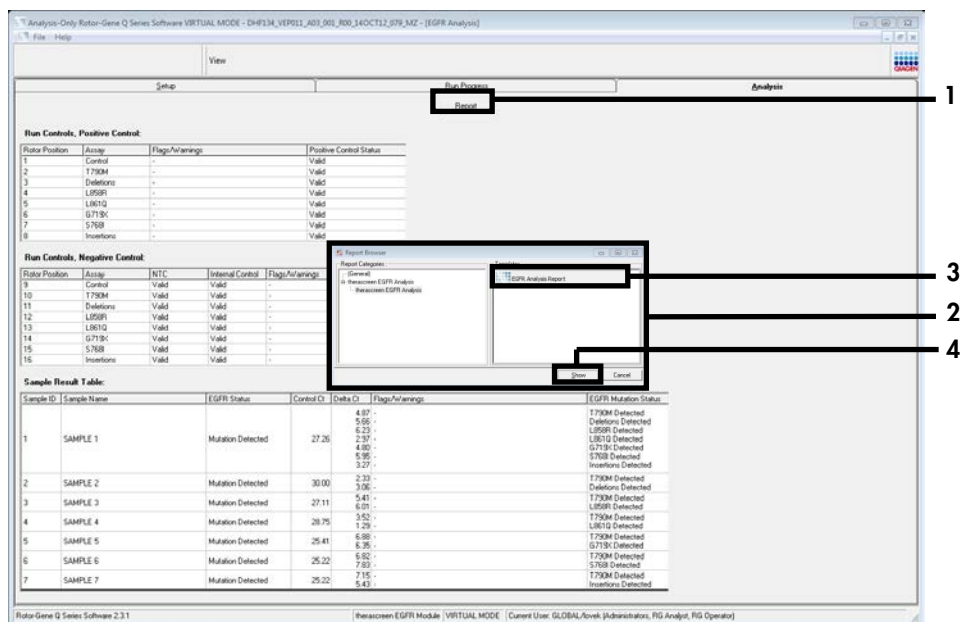


Abbildung 18. Auswahl des EGFR CE-Analyseberichts 1 = „Report“ (Bericht), 2 = Fensterabschnitt „Report Browser“ (Berichtsbrowser), 3 = „EGFR CE Analysis Report“ (EGFR CE-Analysebericht), 4 = „Show“ (Anzeigen).

Interpretation der Ergebnisse (automatisiert)

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

Hinweis: Informationen zur manuellen Analyse der Ergebnisse finden Sie unter „Interpretation der Ergebnisse (manuell)“ auf Seite 92.

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

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

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

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

Proben werden als mutationspositiv eingestuft, wenn ein ΔC_T -Wert nicht größer als der ΔC_T -Cut-off-Wert für diesen Assay ist. Über diesem Wert enthält die Probe entweder weniger als den Prozentsatz an Mutation, der mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit nachgewiesen werden kann (außerhalb der Assay-Grenzwerte), oder die Probe ist mutationsnegativ, was zu der Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) führt.

Wenn in den Mutationsreaktionen keine Amplifikation festgestellt wird, wird die Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgegeben. Von den ΔC_T -Werten, die von der Hintergrundamplifikation berechnet werden, wird vorausgesetzt, dass sie über den ΔC_T -Cut-off-Werten liegen, und für die Probe wird dementsprechend die Bewertung „No Mutation Detected“ (Keine Mutation nachgewiesen) ausgegeben.

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

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

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

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

Zum Beispiel:

- PC_CTRL_ASSAY_FAIL = Die Positivkontrolle (PC), Kontrollassay (CTRL_ASSAY), ist fehlgeschlagen (FAIL).
- NTC_INT_CTRL_FAIL = Die Nicht-Template-Kontrolle (NTC), interne Kontrolle (INT_CTRL), ist fehlgeschlagen (FAIL).

SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC = Die Probe (SAMPLE), Kontrollassay (CTRL), hat eine hohe Konzentration (HIGH_CONC).

Tabelle 8. Markierungen, Bedeutung und empfohlene Maßnahmen

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-Testlauf ungültig – FAM-C _T für die Positivkontrolle in der Kontrollreaktion außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR-Testlauf ungültig – FAM-C _T für mindestens eine Mutationskontrollreaktion außerhalb des zulässigen Bereichs.	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR-Testlauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Positivkontrolle (Kontrollreaktionsgemisch) können nicht ausgewertet werden.	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR-Testlauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Positivkontrolle (Mutationsreaktionsgemisch) können nicht ausgewertet werden.	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR-Testlauf ungültig – interne Kontrolle über dem Bereich für die Negativkontrolle.	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR-Testlauf ungültig – interne Kontrolle unter dem Bereich für die Negativkontrolle.	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
NTC_INVALID_CT	PCR-Testlauf ungültig – FAM für die Negativkontrolle ungültig (unterhalb des Grenzwerts).	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.
NTC_INVALID_DATA	PCR-Testlauf ungültig – Fluoreszenzdaten der Negativkontrolle können nicht ausgewertet werden.	Den gesamten PCR-Testlauf wiederholen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Probe ungültig – Fluoreszenzdaten der Probenkontrolle können nicht ausgewertet werden.	Neuen PCR-Testlauf einrichten, um die entsprechenden Proben zu wiederholen.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Probe ungültig – FAM-CT in Probenkontrolle zu niedrig.	Probe verdünnen, um den C_T -Wert der Kontrolle zu erhöhen. Diese Verdünnung ist auf der Grundlage der Annahme zu berechnen, dass eine Verdünnung mit dem im Kit enthaltenen Wasser im Verhältnis 1:1 den C_T um 1,0 erhöht. Nach der Verdünnung der Probe einen neuen Lauf zur Mutationsbestimmung einrichten, um die Probe zu wiederholen. Oder direkt mit dem Lauf zum EGFR-Mutationsnachweis unter Verwendung der verdünnten Probe fortfahren, wenn die Probe nach dem Lauf zur DNA-Probenbestimmung verdünnt wurde.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Probe ungültig – FAM- C_T in der Probenkontrollreaktion zu hoch.	Neuen PCR-Testlauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe im wiederholten PCR-Testlauf ungültig und die DNA-Menge weiterhin unzureichend ist, zwei weitere FFPE-Gewebeschnitte extrahieren, sofern möglich. Neuen PCR-Testlauf einrichten, um diese Extraktion zu testen. Wenn die Probe ungültig ist, den PCR-Testlauf für die zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Testlauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen, und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.

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

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsröhrchen ungültig – Fluoreszenzdaten der internen Kontrolle können nicht ausgewertet werden.	<p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Probe positiv und ungültig) ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch eine Mutation nachgewiesen (oder nicht nachgewiesen) wurde: Ergebnisse angeben, keine weiteren Tests erforderlich.</p> <p>Neuen PCR-Testlauf einrichten, um die Probe zu wiederholen. Wenn die Probe nach dem wiederholten PCR-Lauf weiterhin ungültig ist, zwei weitere FFPE-Gewebeschnitte extrahieren, sofern verfügbar. Neuen PCR-Testlauf einrichten, um diese Extraktion zu testen. Wenn ungültig, den PCR-Lauf für die zweite Extraktion wiederholen. Wenn die Probe nach diesem Testlauf kein gültiges Ergebnis ergibt, wird der Probe der Mutationsstatus „Unbestimmt“ zugewiesen, und es werden keine weiteren Tests mehr durchgeführt.</p>

Markierung	Bedeutung	Maßnahme
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	Mindestens eine Mutation ist für eine Probe positiv, und gleichzeitig ist mindestens eine Mutation für dieselbe Probe ungültig.	<p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Probe positiv und ungültig) ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch eine Mutation nachgewiesen (oder nicht nachgewiesen) wurde: Ergebnisse angeben, keine weiteren Tests erforderlich.</p> <p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Probe positiv und ungültig) ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch das Ergebnis INVALID (ungültig) erhalten wurde, die Probe nach dem Ergreifen der spezifischen Maßnahme für ungültige Markierungen mit allen Reaktionsgemischen neu testen.</p> <p>Wenn für die betroffene Probe die Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL in Verbindung mit einer anderen Markierung ausgegeben wird, muss die Maßnahme zur Verdünnung der Probe aus der Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL befolgt werden. Neuen PCR-Testlauf einrichten und die Probe neu testen.</p> <p>Bei Proben, für die die Markierung SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID (Probe positiv und ungültig) ausgegeben und in einem klinisch relevanten Mutationsreaktionsgemisch beim wiederholten PCR-Testlauf das Ergebnis INVALID (ungültig) Ergebnis erhalten wurde, eine Probe von zwei weiteren FFPE-Schnitten extrahieren. Einen neuen PCR-Testlauf mit allen Reaktionsgemischen einrichten, um diese Extraktion zu testen.</p> <p>Wenn für diese Probe in einem klinisch relevanten Reaktionsgemisch erneut ein ungültiges Ergebnis erhalten wird, die Probe nach dem Ergreifen der spezifischen Maßnahme für ungültige Markierungen mit allen Reaktionsgemischen wiederholen. Wenn für die betroffene Probe die Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL in Verbindung mit einer anderen Markierung ausgegeben wird, muss die Maßnahme zur Verdünnung der Probe aus der Markierung SAMPLE_INT_CTRL_FAIL befolgt werden. Einen neuen PCR-Testlauf einrichten und diese Probe neu testen.</p> <p>Wenn bei dieser Wiederholung die Markierung SAMPLE_POS_AND_INVALID ausgegeben wird, erhält die Probe den Mutationsstatus unbestimmt.</p>

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen) unseres Support-Centers unter: **www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx**. Die Wissenschaftler des technischen Service von QIAGEN helfen Ihnen in allen Fragen zum Protokoll oder zu anderen Angaben in diesem Handbuch bzw. zu Proben- und Assay-Technologien gerne weiter (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter **www.qiagen.com**).

Kommentare und Vorschläge

NTC-Proben zeigen im grünen FAM-Kanal positive Ergebnisse

Kontamination bei Vorbereitung der PCR	Wiederholen Sie die PCR mit Replikaten mit neuen Reagenzien. Verschließen Sie die PCR-Röhrchen möglichst sofort nach der Zugabe der zu testenden Probe. Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
--	--

Kein Signal für die EGFR-Positivkontrolle

a) Der für die PCR-Datenanalyse ausgewählte Fluoreszenzkanal erfüllt nicht die Anforderungen des Protokolls.	Wählen Sie bei der Datenanalyse für die analytische EGFR-PCR-Reaktion den Fluoreszenzkanal „Cycling Green“ und für die PCR-Reaktion der internen Kontrolle den Fluoreszenzkanal „Cycling Yellow“.
b) Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils für das RotorGene Q MDx System	Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Angaben im Protokoll. Wiederholen Sie den Lauf, wenn inkorrekt.
c) Fehlerhafte Konfiguration der PCR	Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte anhand des Pipettierschemas und wiederholen Sie bei Bedarf die PCR.
d) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Komponenten des Kits stimmen nicht mit den Anweisungen im Abschnitt „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ auf Seite 19 überein.	Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit.
e) Der <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit ist abgelaufen.	Überprüfen Sie die Lagerungsbedingungen und das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Etikett des Kits) und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits zur Gewährleistung einer einheitlichen Produktqualität nach festgelegten Prüfkriterien getestet.

Anwendungseinschränkungen

Zur Auswertung der mit dem Produkt erhaltenen Ergebnisse müssen alle relevanten klinischen und labortechnischen Daten berücksichtigt werden. Die Ergebnisse dürfen nicht alleine für die Diagnose verwendet werden.

Das Produkt darf nur von Personen verwendet werden, die für die Anwendung in-vitro-diagnostischer Verfahren und das Rotor-Gene Q MDx Instrument speziell eingewiesen und geschult wurden.

Das Produkt ist ausschließlich für die Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx Echtzeit-PCR-Cycler vorgesehen.

Zur Gewährleistung optimaler Ergebnisse müssen die Anweisungen im *therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbuch* (*therascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook*) genau befolgt werden. Eine Verdünnung der Reagenzien, die von den in diesem Handbuch beschriebenen Anweisungen abweicht, ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer Leistungsbeeinträchtigung führt.

Vor der Analyse der Proben mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit müssen Menge und Qualität der DNA in der Probe bestimmt werden. Im Lieferumfang ist ein zusätzliches Kontrollreaktionsgemisch enthalten, mit dem bestimmt werden kann, ob der C_T -Wert im

zulässigen Bereich für diesen Assay liegt. Extinktions-Messwerte dürfen nicht verwendet werden, da sie mit den C_T-Werten in fragmentierten DNA-Proben nicht korrelieren.

Achten Sie auf die Verfallsdaten und Lagerbedingungen, die auf der Kit-Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten des Kits aufgedruckt sind. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Leistungsmerkmale

Analytische Leistung

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

Leerwertgrenze (LOB), Wirkungsbereich und Cutoff-Werte

Unter Verwendung einer Methode, die an NCCLS EP17-A (2004) (12) angelehnt ist, wurden insgesamt 417 FFPE-Proben getestet, um die Leerwertgrenze (Limit of Blank, LOB) und die Cut-off-Werte für die verschiedenen Mutationsassays zu bestimmen. Darüber hinaus wurde der Messbereich bestimmt. Die Cut-off-Werte wurden bestimmt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9. Cut-off-Werte, die für die verschiedenen Mutationsassays bestimmt wurden

Assay	Cut-off-Wert (ΔCT)
T790M	≤ 7,40
Deletionen	≤ 8,00
L858R	≤ 8,90
L861Q	≤ 8,90

Assay	Cut-off-Wert (ΔCT)
G719X	$\leq 8,90$
S768I	$\leq 8,90$
Insertionen	$\leq 8,00$

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

Die Cut-off-Werte und Messbereiche des Assays wurden anhand von Standards und weiteren FFPE-Proben verifiziert. Im Rahmen der Verifizierung wurden die Cut-off-Werte auf die Fähigkeit zur Differenzierung der korrekten Mutation in einem Hintergrund von Wildtyp-DNA bewertet. Dazu wurde jeder Assay mit einer hohen Aufgabekonzentration von genomischer DNA und mutierter DNA bewertet (siehe „Kreuzreaktivität“ auf Seite 60). Auch der Effekt der DNA-Aufgabemenge auf das Mutationsergebnis wurde bewertet (siehe „Effekt der DNA-Aufgabemenge auf die ΔCT -Werte“ auf Seite 59).

Es wurden Proben ohne Template und NSCLC-EGFR-Wildtyp-DNA untersucht, um die Leistung des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits in der Abwesenheit von Template zu bestimmen und um sicherzustellen, dass eine Leerprobe oder eine Probe mit Wildtyp-DNA kein analytisches Signal liefert, das eine niedrige Mutationskonzentration anzeigen könnte. Die Ergebnisse zeigten, dass für NTC-Proben und FFPE-Wildtyp-Proben keine positiven Mutationsergebnisse erhalten werden.

Effekt der DNA-Aufgabemenge auf die ΔC_T -Werte

Die DNA-Aufgabemenge ist als die Gesamtmenge amplifizierbarer EGFR-DNA in einer Probe definiert. Dazu werden als Bestimmungsgrundlage die C_T -Werte der Kontrollreaktion herangezogen. Um nachzuweisen, dass die Leistung des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits über den gesamten C_T -Bereich der Kontrollreaktion (23,70 bis 31,10) konstant ist, wurden alle sieben EGFR-Mutations-Assays gegen eine aus 6 Punkten bestehende 1:3-Verdünnungsreihe getestet (aus FFPE-Zelllinien extrahierte DNA). Der C_T -Zielwert für Verdünnung 1 betrug für jede Mutation ungefähr 24,70. Die letzte Verdünnung, die einen

C_T -Wert von ungefähr 32 bis 33 ergab, lag außerhalb des C_T -Bereichs der Kontrollreaktion. Die für unterschiedliche DNA-Gesamtaufgabekonzentrationen gemessenen ΔC_T -Werte waren über den Messbereich des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits insgesamt konsistent.

Kreuzreaktivität

Zur Bewertung der nicht-spezifischen Amplifikation wurde Wildtyp-EGFR-DNA mit einer hohen Aufgabekonzentration getestet. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die niedrigsten ΔC_T -Werte die festgelegten Cut-off-Werte überschritten, was eine nicht-spezifische Amplifikation anzeigt.

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

Richtigkeit: Vergleich mit der analytischen Referenzmethode

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

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

Tabelle 10. Analyse der Übereinstimmung

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

Von den 28 nicht übereinstimmenden Ergebnissen der Gesamtübereinstimmungs-Studie:

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

Nachweisgrenzen (LOD: Limit of Detection)

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

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

Tabelle 11. Nachweisgrenzen (LOD), die unter Verwendung von klinischen FFPE-Proben, FFPE-Zelllinien oder Plasmid mit niedrigen und hohen DNA-Aufgabekonzentrationen bestimmt wurden

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basenveränderung	LOD (% mutiert)	
				Niedrig	Hoch
18	G719A	6239	2156G>C	7,41 [†]	1,57 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5,08 [‡]	7,75 [§]
	G719C	6253	2155G>T	10,30 [‡]	– [¶]
19	Deletionen	12384	2237_2255>T	1,58 [§]	0,49 [§]
		12387	2239_2258>CA	4,91 [†]	1,48 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16,87 [†]	12,47 [†]
		12422	2238_2248>GC	3,24 [†]	1,65 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4,24 [†]	1,41 [†]
		12678	2237_2251del15	0,55 [§]	0,24 [§]
		6218	2239_2247del9	8,47 [†]	– [¶]
		12728	2236_2253del18	2,43 [†]	– [¶]
		12367	2237_2254del18	2,72 [†]	– [¶]
		6210	2240_2251del12	4,09 [†]	– [¶]
		6220	2238_2255del18	2,70 [†]	0,82 [†]
		6223	2235_2249del15	6,40 [†]	1,63 [†]
		6225	2236_2250del15	2,80 [†]	1,42 [†]
		6254	2239_2253del15	0,86 [§]	0,47 [§]
		6255	2239_2256del18	0,14 [§]	0,05 [§]
		12369	2240_2254del15	4,94 [§]	1,56 [§]
		12370	2240_2257del18	8,10 [§]	2,08 [§]
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0,25 [§]	0,10 [§]
		12383	2239_2251>C	4,58 [§]	1,74 [§]
20	S768I	6241	2303G>T	7,66 [†]	2,18 [†]
	Insertionen	12376	2307_2308insGCCAGCGTG	11,61 [†]	– [¶]
		12378	2310_2311insGGT	4,91 [†]	1,31 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2,40 [†]	0,65 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9,72 [†]	5,09 [†]

Exon	Mutation	COSMIC*-ID	Basenveränderung	LOD (% mutiert)	
				Niedrig	Hoch
21	L858R	6224	2573T>G	5,94 [†]	1,13 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2,22 [†]	0,66 [†]

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

[†] Die Nachweisgrenzen wurden unter Verwendung von Zelllinien bestimmt.

[‡] Die Nachweisgrenzen wurden unter Verwendung von Plasmiden bestimmt.

[§] Die Nachweisgrenzen wurden unter Verwendung von klinischen Proben bestimmt.

[¶] Nicht untersucht

Störungen

Effekte durch nekrotisches Gewebe

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

Exogene Substanzen

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

Reproduzierbarkeit

Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit

Das Testsystem des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits umfasst zwei separate Kits: den QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit oder den QIAamp DNA FFPE Tissue Kit zur DNA-Isolierung und den *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit zur DNA-Amplifikation und zum Nachweis des EGFR-Mutationsstatus. Die Inter-Chargen-Reproduzierbarkeit und -

Austauschbarkeit wurde anhand von drei Chargen des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits und drei Chargen des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits nachgewiesen. Der chargenübergreifende Gesamtprozentsatz der korrekten Bestimmungen betrug für den EGFR-Mutationsassay 97,8 % (317/324) und für Wildtyp-Proben 100 % (379/379).

Handhabung der Proben

Die Reproduzierbarkeit des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits wurde anhand von Schnitten untersucht, die von drei FFPE-Probenblöcken gewonnen wurden. Dabei wurden insbesondere die Deletionsmutation in Exon 19 (2235-2249 del15), die Mutation L858R in Exon 21 und ein Wildtyp untersucht. Es wurden für jede Probe an drei Zentren Extraktionen in Duplikaten durchgeführt und an drei nicht zusammenhängenden Tagen über einen Zeitraum von sechs Tagen getestet. Dabei wurden für jede Probe insgesamt 18 Datenpunkte erhalten. Die Tests wurden an jedem Zentrum von zwei Bedienern unter Verwendung von einer Charge des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits (eine Charge pro Zentrum, insgesamt drei Chargen) in Verbindung mit der gleichen Charge von *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit-Reagenzien (chargenübergreifend) durchgeführt. Alle Ergebnisse der mutierten und Wildtyp-Proben waren gültig und ergaben die erwartete Bestimmungsrate (korrekte Bestimmungen = 100 %, 18/18 für jede Probe). Dies stützt die Reproduzierbarkeit und Wiederholpräzision, die in der präanalytischen Phase der DNA-Isolierung für den *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit bestimmt wurden.

Präzision und Reproduzierbarkeit

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

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit des Assays wurde ein Matrix-Studiendesign implementiert. Im Rahmen dieses Designs wurden Proben in drei Labors (Zentren) mit drei Chargen des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits (drei Chargen an drei Zentren), zwei Bedienern pro Zentrum auf zwei Instrumenten pro Zentrum über einen Zeitraum von insgesamt 16 Tagen in Doppelbestimmungen (in Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze) getestet. Die Reproduzierbarkeit wurde für jede einzelne Mutation über nicht zusammenhängende Tage an jedem Zentrum untersucht. Der Anteil der korrekten Bestimmungen ist in Tabelle 12 (nächste Seite) zusammengefasst.

Tabelle 12. Reproduzierbarkeit des Assays: Anteil der korrekten Bestimmungen bei den Tests der EGFR-Mutationen

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

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

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

Klinische Leistungsmerkmale

Klinische Ergebnisse: GIOTRIF®

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

In der randomisierten Gruppe befanden sich auf der Grundlage der CTA-Testergebnisse 345 Patienten (Afatinib: 230 Patienten, Chemotherapie: 115 Patienten). Der primäre Wirksamkeitsendpunkt, der von einem unabhängigen Überprüfungsgremium (independent review committee, IRC) bewertet wurde, war progressionsfreies Überleben (progression-free survival, PFS). Von den 345 randomisierten Patienten wurden von 264 Patienten (Afatinib: 178 Patienten, Chemotherapie: 86 Patienten) Tumorproben mit dem *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit retrospektiv getestet. Im Vergleich zu den Patienten, die in die Gruppe der

Chemotherapie randomisiert wurden, zur CTA+-Gesamtpopulation und zur *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-Population wurde für die randomisierten Patienten der Afatinib-Gruppe eine signifikante Verbesserung des vom IRC bestimmten progressionsfreien Überlebens festgestellt. Die Ergebnisse der Gesamtwirksamkeit sind in Tabelle 13 und Abbildung 19 zusammengefasst.

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

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

* Nach EGFR-Mutationsstatus und ethnischer Herkunft stratifiziert

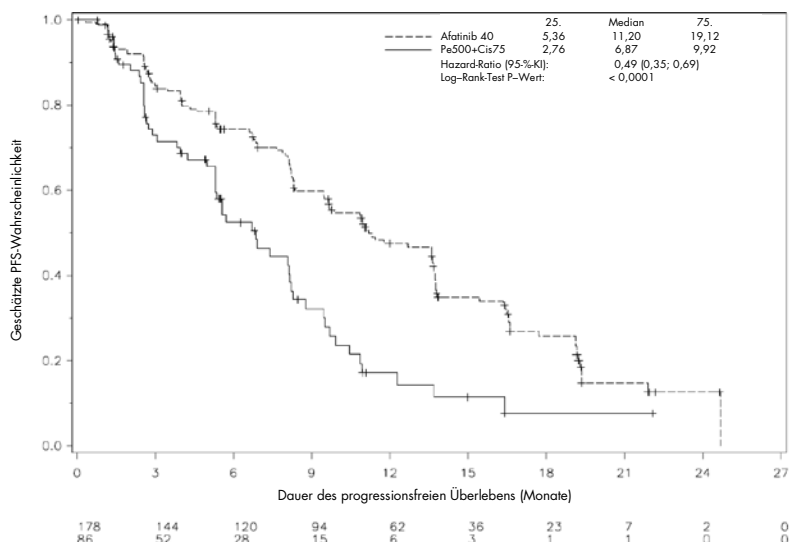


Abbildung 19. Kaplan-Meier-Kurve des von einem unabhängigen Überprüfungsgremium bestimmten progressionsfreien Überlebens (PFS) nach Behandlungsgroupe (*therascreen* EGFR RGQ PCR Kit+/CTA+-Population).

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

Klinische Ergebnisse: IRESSA®

Die IRESSA-Follow-up-Studie (IFUM) war eine offene, einarmige Phase-IV-Studie (NCT01203917) zur Bestimmung der Wirksamkeit und Sicherheit/Verträglichkeit von Gefitinib als First-Line-Therapie bei europäischen Patienten mit EGFR-mutationspositivem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC im Stadium IIIA/B/IV. Ziel der IFUM-Studie

war es, bei prospektiv ausgewählten europäischen Patienten mit EGFR-mutationspositivem NSCLC die objektive Ansprechrate gemäß RECIST-Kriterien zu bestimmen.

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

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

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

Die Ergebnisse der Gesamtwirksamkeit sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

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

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

BICR: Blinded independent central review (Verblindete, unabhängige, zentrale Bewertung);

KI: Konfidenzintervall; **CTA:** Clinical Trial Assay.

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

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














Literatur

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

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

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 <N>	Kit enthält Reagenzien für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
	Katalognummer
	Chargennummer („Lot number“)
	Materialnummer
	Vor Lichteinwirkung schützen
	Global Trade Item Number
	Bevollmächtigter
Rn	R = Revision der Gebrauchsanleitung (Handbuch); n = Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vorsicht

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

Dieser Abschnitt enthält Anweisungen für die Verwendung des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits mit der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3 im offenen Modus (d. h., ohne Rotor-Gene Q *therascreen* EGFR CE Assay Package).

Allgemeine Informationen

- Eine Liste des benötigten Materials finden Sie unter „Zusätzlich benötigtes Material“ auf Seite 15.
- Vollständige Anleitungen zur Vorbereitung und Anordnung der Proben finden Sie in den Abschnitten „Protokoll: Probenbestimmung“ auf Seite 22 und „Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis“ auf Seite 36.
- Stellen Sie vor dem Start jedes Laufs sicher, dass die Zyklusparameter korrekt sind.

Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils

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

Verfahren

Eine Übersicht der Zyklusparameter ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Temperaturprofil

Zyklen	Temperatur	Zeit	Datenerfassung
1	95°C	15 Minuten	Keine
40	95°C	30 Sekunden	Keine
	60°C	60 Sekunden	Grün und gelb

1. Doppelklicken Sie auf dem Desktop des Computers, der mit dem Rotor-Gene Q MDx Instrument verbunden ist, auf das Symbol der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.
2. Wählen Sie zum Erstellen einer neuen Vorlage „Empty Run“ (Leerer Lauf) und klicken Sie dann auf „New“ (Neu), um den „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) aufzurufen.
3. Wählen Sie „72-Well Rotor“ als Rotortyp aus. Vergewissern Sie sich, dass der Schließring angebracht ist und aktivieren Sie das Kontrollkästchen „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht). Klicken Sie auf „Next“ (Weiter) (Abbildung 20).

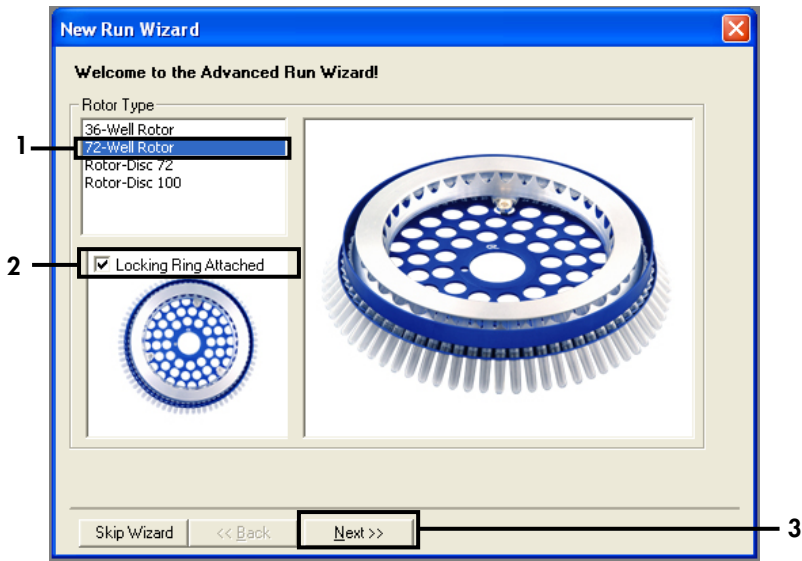


Abbildung 20. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe). 1 = „Rotor Type“ (Rotortyp), 2 = Feld „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht), 3 = „Next“ (Weiter).

4. Geben Sie den Namen des Bedieners ein. Geben Sie unter „Notes“ (Notizen) Anmerkungen ein und wählen Sie für „Reaction Volume“ (Reaktionsvolumen) den Wert 25 aus. Vergewissern Sie sich, dass unter „Sample Layout“ (Probenkonfiguration) „1, 2, 3...“ ausgewählt ist. Klicken Sie auf „Next“ (Weiter) (Abbildung 21).

New Run Wizard

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

Operator : NAME

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.

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

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

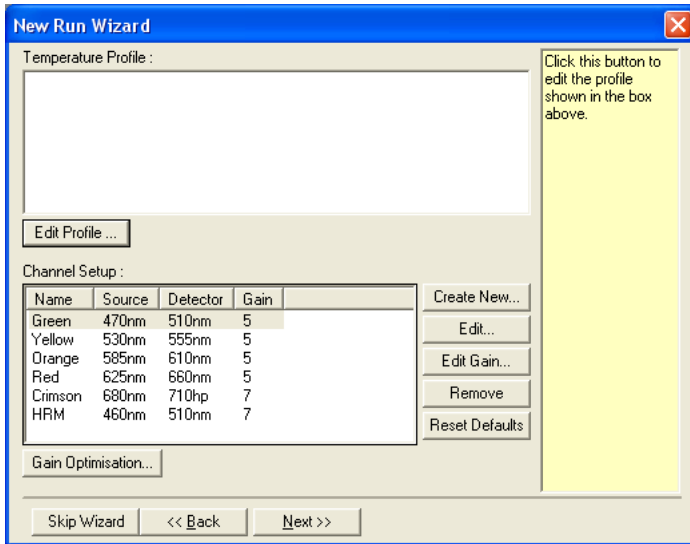


Abbildung 22. „Edit Profile“ (Profil bearbeiten) im Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe)

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

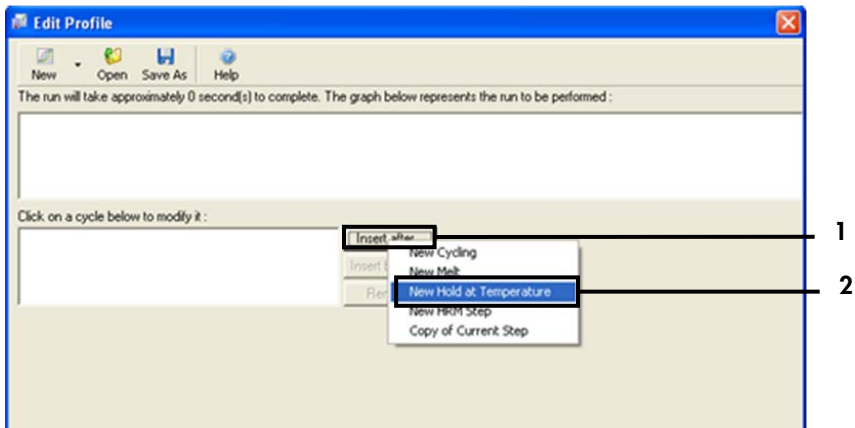


Abbildung 23. Einfügen eines ersten Inkubationsschritts. 1 = „Insert after“ (Einfügen nach), 2 = „New Hold at Temperature“ (Neue Temperatur halten).

7. Ändern Sie den Wert für „Hold Temperature“ (Temperatur halten) auf 95 °C und den für „Hold Time“ (Zeit halten) auf „15 mins 0 secs“ (15 Min. 0 Sek.). Klicken Sie auf „Insert after“ (Einfügen nach) und wählen Sie „New Cycling“ (Neuer Zyklus) (Abbildung 24).

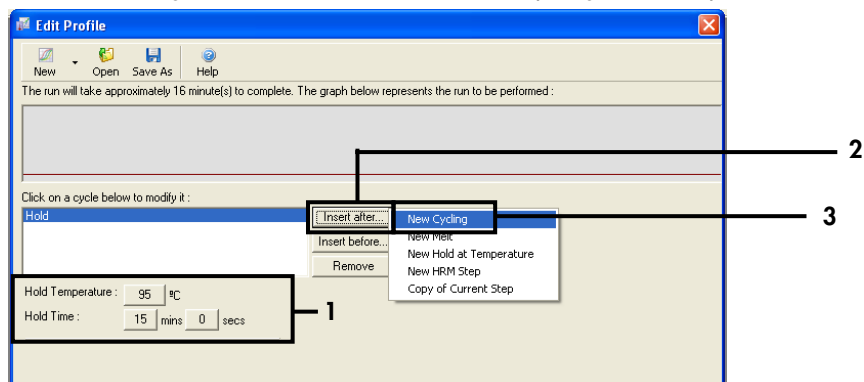


Abbildung 24. Erster Inkubationsschritt bei 95 °C. 1 = „Hold Temperature“ (Temperatur halten) und „Hold Time“ (Zeit halten), 2 = „Insert after“ (Einfügen nach), 3 = „New Cycling“ (Neuer Zyklus).

8. Ändern Sie die Anzahl der Zykluswiederholungen auf 40. Wählen Sie den ersten Schritt aus und stellen Sie diesen auf „95°C for 30 secs“ (95 °C für 30 Sek.) ein (siehe Abbildung 25).

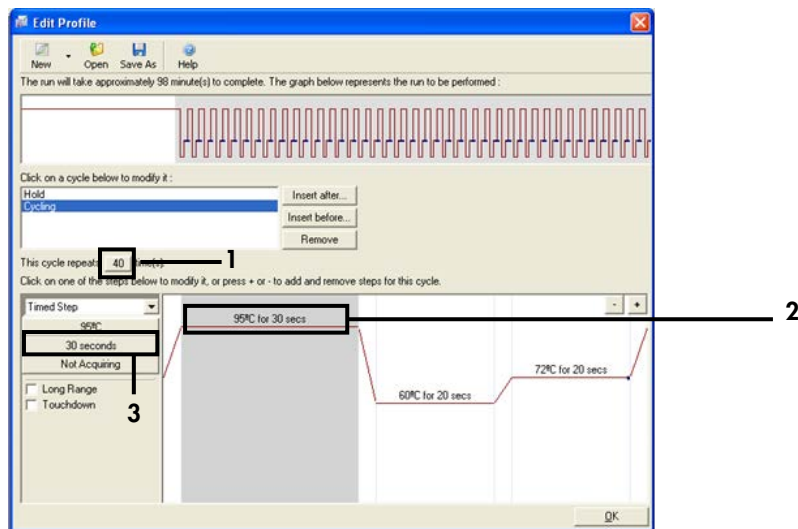


Abbildung 25. Zyklusschritt bei 95 °C. 1 = Anzahl der Zykluswiederholungen, 2 = Temperatureinstellung für ersten Schritt, 3 = Zeiteinstellung für ersten Schritt.

9. Markieren Sie den zweiten Schritt und stellen Sie diesen auf „60°C for 60 secs“ (60 °C für 60 Sek.) ein. Aktivieren Sie durch Klicken auf „Not Acquiring“ (Keine Erfassung) die Datenerfassung für diesen Schritt (Abbildung 26).

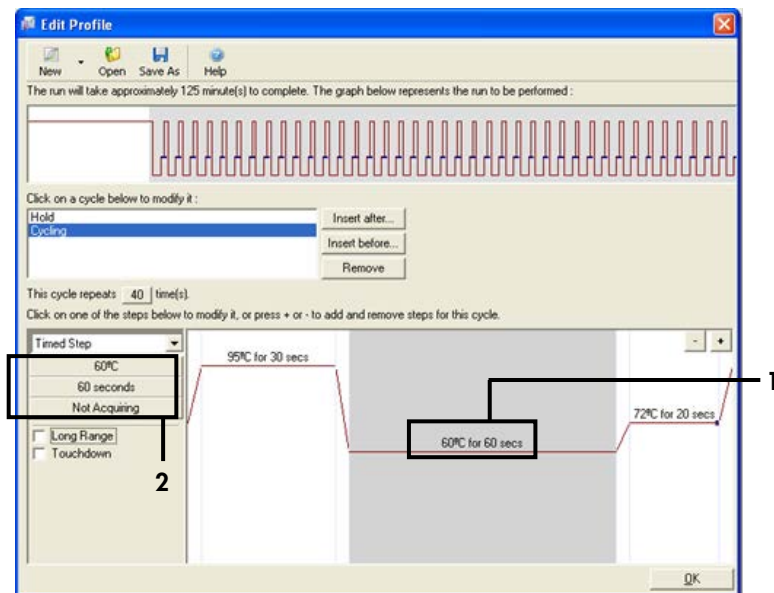


Abbildung 26. Zyklusschritt bei 60 °C. 1 = Temperatur- und Zeiteinstellung für zweiten Schritt, 2 = „Not Acquiring“ (Keine Erfassung).

10. Wählen Sie „Green“ (Grün) und „Yellow“ (Gelb) als zu erfassende Kanäle aus, indem Sie auf „>“ klicken, um diese Kanäle aus der Liste „Available Channels“ (Verfügbare Kanäle) zu verschieben. Klicken Sie auf „OK“ (Abbildung 27).

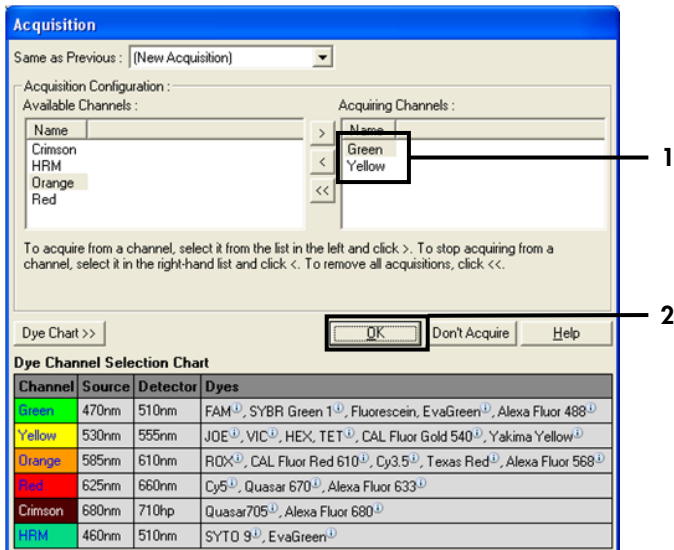


Abbildung 27. Erfassung im Zyklusschritt bei 60 °C. 1 = Ausgewählte Kanäle, 2 = „OK“.

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

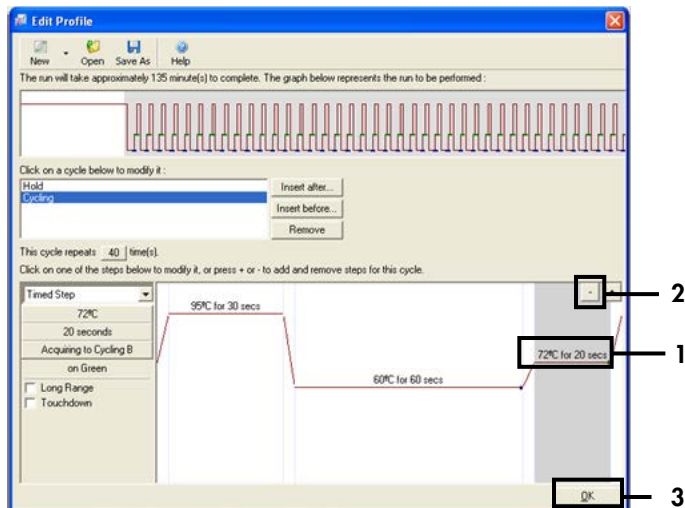


Abbildung 28. Entfernen des Erweiterungsschrittes 1 = Dritter Schritt, 2 = „Delete“ (Löschen), 3 = „OK“

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

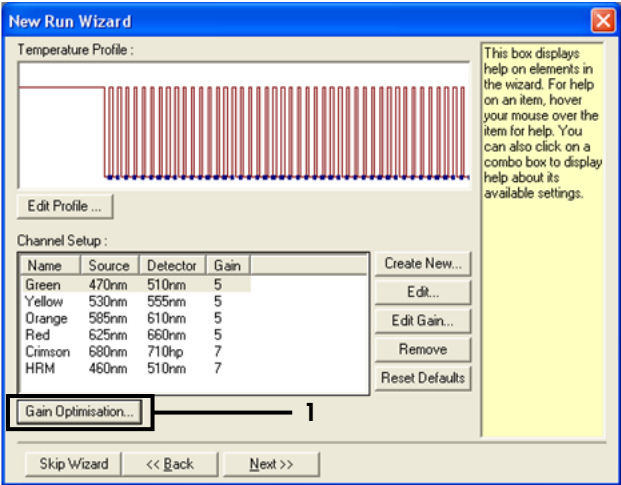


Abbildung 29. Verstärkungsoptimierung (1).

13. Klicken Sie auf „Optimise Acquiring“ (Erfassung optimieren). Es werden für jeden Kanal die Kanaleinstellungen angezeigt. Bestätigen Sie diese Standardwerte, indem Sie für beide Kanäle auf „OK“ klicken (Abbildung 30).

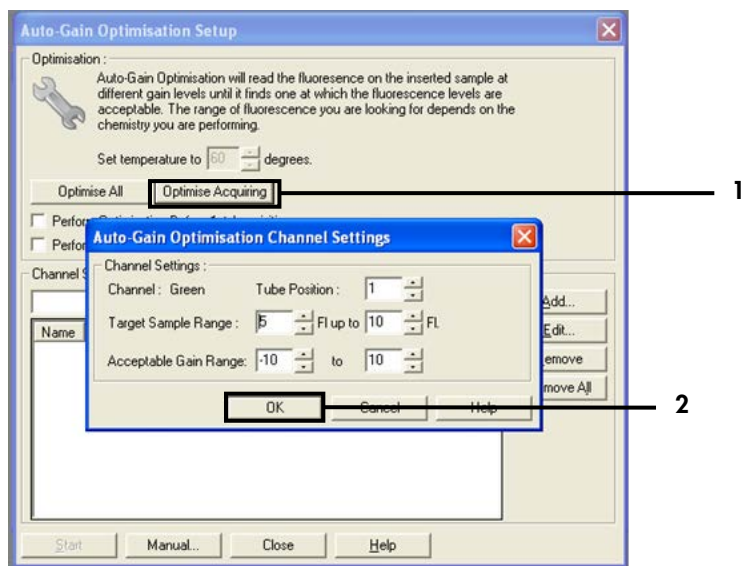


Abbildung 30. Automatische Verstärkungsoptimierung für den grünen Kanal 1 = „Optimise Acquiring“ (Erfassung optimieren), 2 = „OK“

14. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen „Perform Optimisation before 1st Acquisition“ (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen) und klicken Sie dann auf „Close“ (Schließen), um zum Assistenten zurückzukehren (Abbildung 31).

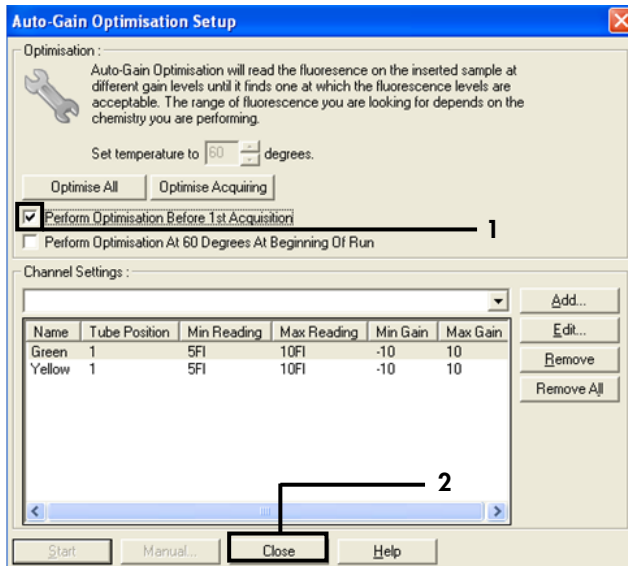


Abbildung 31. Auswahl des grünen und gelben Kanals. 1 = Kontrollkästchen „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen), 2 = „Close“ (Schließen)

15. Klicken Sie auf „Next“ (Weiter, Abbildung 32), um die Vorlage des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits (*.ret-Datei) am gewünschten Speicherort zu speichern. Klicken Sie dazu auf „Save Template“ (Vorlage speichern).

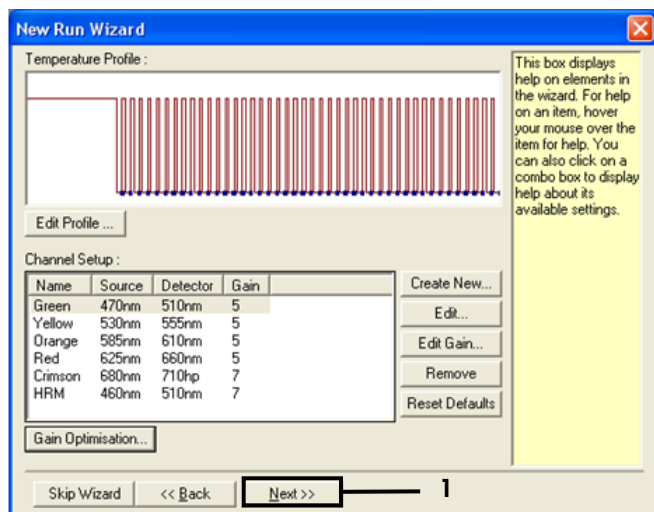


Abbildung 32. „Next“ (Weiter) (1).

Verfahren (manuell)

Protokoll: Probenbestimmung (manuell)

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

- Bereiten Sie die Proben wie unter „Protokoll: Probenbestimmung“ auf Seite 22 beschrieben bis Schritt 11 vor.
- Richten Sie den PCR-Testlauf auf dem Rotor-Gene Q MDx Instrument wie unter „Protokoll: *Rotor-Gene Q-Konfiguration* des therascreen EGFR RGQ PCR Kits“ auf Seite 87 beschrieben ein.
- Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß der Anleitung unter „Analyse der Daten aus der Probenbestimmung“ auf Seite 93.

Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis (manuell)

- Nach einer erfolgreichen Probenbestimmung kann die Probe zum Nachweis von EGFR-Mutationen getestet werden.
- Bereiten Sie die Proben wie unter „Protokoll: EGFR-Mutationsnachweis“ auf Seite 36 beschrieben bis Schritt 11 vor.
- Richten Sie den PCR-Testlauf auf dem Rotor-Gene Q MDx Instrument wie unter „Protokoll: *Rotor-Gene Q-Konfiguration* des therascreen EGFR RGQ PCR Kits“ auf Seite 87 beschrieben ein.
- Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs gemäß der Anleitung unter „Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis“ auf Seite 95.

Protokoll: Rotor-Gene Q-Konfiguration des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits

Verfahren

1. Öffnen Sie die Rotor-Gene Q Software, Version 2.3 und rufen Sie das gewünschte Temperaturprofil des *therascreen* EGFR RGQ PCR Kits (*.ret-Datei) auf.
Informationen zum Erstellen des Temperaturprofils und zur Überprüfung der Laufparameter finden Sie unter „Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils“ auf Seite 75.
2. Vergewissern Sie sich, dass der richtige Rotor ausgewählt ist, und aktivieren Sie das Kontrollkästchen, um zu bestätigen, dass der Schließring angebracht ist. Klicken Sie auf „Next“ (Weiter) (Abbildung 33).

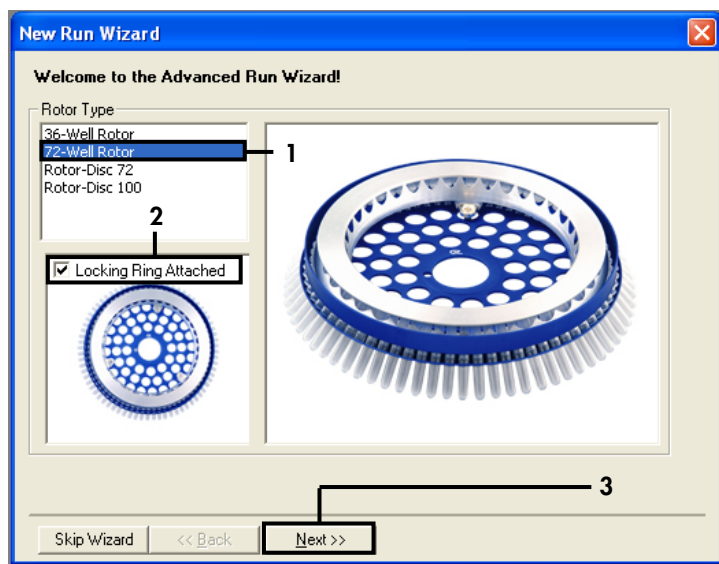


Abbildung 33. Dialogfeld „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) mit Willkommensfenster. 1 = „Rotor Type“ (Rotortyp), 2 = Feld „Locking Ring Attached“ (Schließring angebracht), 3 = „Next“ (Weiter).

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

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. It has a blue title bar with the text 'New Run Wizard' and a red close button. The main content area is light gray. On the right, there is a yellow help box with text: '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.' The main area contains the following elements: 'Operator :' followed by a text input field labeled 'NAME' with a line pointing to it labeled '1'; 'Notes :' followed by a large text area labeled '2'; 'Reaction Volume (µL):' followed by a spin box showing '25' with a line pointing to it labeled '3'; and 'Sample Layout : ' followed by a dropdown menu showing '1, 2, 3...' with a line pointing to it labeled '4'. At the bottom of the main area, there is a line pointing to the 'Next >>' button labeled '5'. At the very bottom of the dialog are three buttons: 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'.

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

4. Im nächsten Fenster kann das Temperaturprofil bearbeitet werden. (Wenn das Temperaturprofil gemäß der Anleitung unter „Protokoll: Erstellen eines Temperaturprofils“ auf Seite 75 erstellt wurde, ist keine Bearbeitung notwendig.) Klicken Sie auf „Next“ (Weiter) (Abbildung 35).

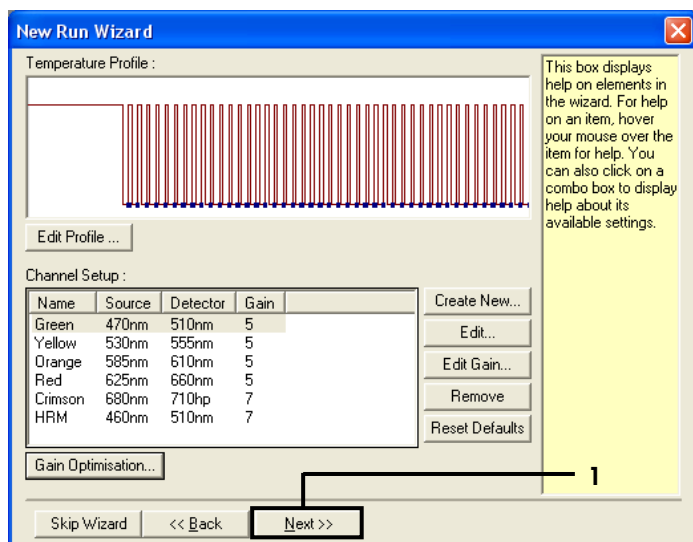


Abbildung 35. Temperaturbearbeitungsfenster des Dialogfelds „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe)
[1 = „Next“ (Weiter)]

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

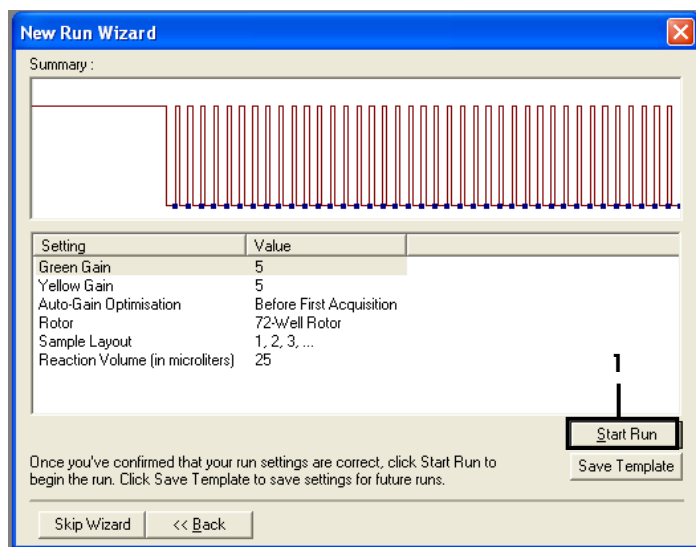


Abbildung 36. Zusammenfassungsfenster des Dialogfelds „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) [1 = „Start Run“ (Lauf starten)]

6. Nach dem Start des Laufs wird ein neues Fenster aufgerufen. Hier können Sie entweder gleich die Probenamen eingeben oder auf „Finish“ (Fertigstellen) klicken und diese zu einem späteren Zeitpunkt eingeben, indem Sie während oder nach Abschluss des Laufs auf „Sample“ (Probe) klicken.

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

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

8. Analysieren Sie die Daten nach Abschluss des Laufs wie unter „Analyse der Daten aus der Probenbestimmung“ auf Seite 93 oder „Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis“ auf Seite 95 beschrieben.

9. Falls Quantifizierungsberichte erforderlich sind, klicken Sie in der Symbolleiste der Rotor-Gene Q Laufdatei auf das Berichtssymbol.

10. Klicken Sie in der Berichtansicht unter „Report Categories“ (Berichtskategorien) auf „Cycling A. Green (page 1)“ (Zyklus A. Grün [Seite 1]) (siehe Abbildung 37).

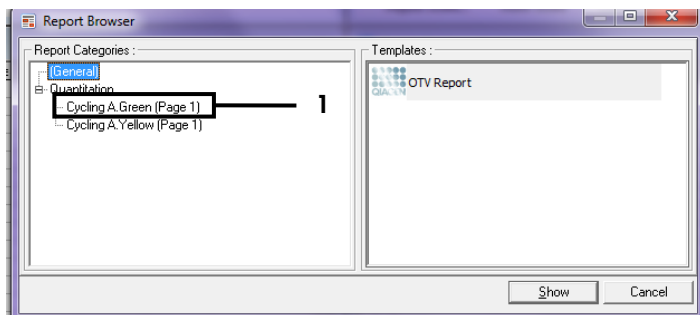


Abbildung 37. Berichtansicht [1 = „Cycling A. Green (Page 1)“ (Zyklus A. Grün [Seite 1])]

11. Wählen Sie unter „Templates“ die Option „Quantitation (Full Report)“ (Quantifizierung [Vollständiger Bericht]) (siehe Abbildung 38).

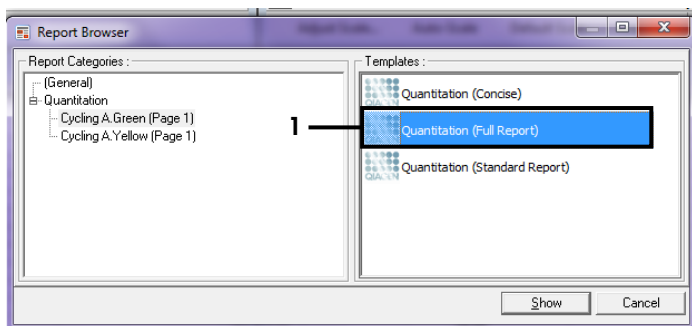


Abbildung 38. Vollständiger Quantifizierungsbericht (1).

12. Klicken Sie auf „Show“ (Anzeigen), um den Bericht zu erstellen.

13. Klicken Sie auf „Save As“ (Speichern unter), um den Bericht als Datei zu speichern.

14. Wiederholen Sie diese Schritte für „Cycling A. Yellow (Page 1)“ (Zyklus A. Gelb [Seite 1]).

Interpretation der Ergebnisse (manuell)

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

- Softwareeinstellungen für die Analyse
- Analyse der DNA-Probenbestimmung (manuell)
Hinweis: Siehe Röhrenchenanordnung in Tabelle 4 auf Seite 26
- Analyse des EGFR-Mutationsnachweises (manuell)
Hinweis: Siehe Röhrenchenanordnung in Tabelle 7 auf Seite 39

Einstellungen für die Analyse in der Software

1. Öffnen Sie über die Rotor-Gene Q Software, Version 2.3 die entsprechende Laufdatei (*.rex).
2. Wenn die Proben nicht schon bereits vor dem Lauf benannt wurden, klicken Sie auf „Edit Samples“ (Proben bearbeiten).
3. Geben Sie die Namen der Proben in die Spalte „Name“ ein.
Hinweis: Lassen Sie die Namen für leere Röhren leer.
4. Klicken Sie auf „Analysis“ (Analyse). Klicken Sie auf der Analysenseite auf „Cycling A Yellow“ (Zyklus A. Gelb), um den gelben (HEX) Kanal zu aktivieren.
5. Klicken Sie auf „Named On“ (Mit Benennung).
Hinweis: Auf diese Weise wird sichergestellt, dass leere Röhren in der Analyse nicht berücksichtigt werden.
6. Wählen Sie „Dynamic tube“ (Dynamisches Röhren).
7. Wählen Sie „Slope correct“ (Steigungskorrektur).
8. Wählen Sie „Linear scale“ (Linearer Bereich).

9. Wählen Sie „Take off Adj.“ (Ausgangspunkt anpassen) und geben Sie im oberen Feld („If take off point was calculated before cycle“ [Wenn Ausgangspunkt vor Zyklus berechnet wurde]) den Wert „15.01“ und in das untere Feld („then use the following cycle and take off point“ [dann folgenden Zyklus und Ausgangspunkt verwenden]) den Wert „20.01“ ein.
10. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0,02 ein und überprüfen Sie die C_T-Werte des gelben (HEX) Kanals.
11. Klicken Sie auf der Analysenseite auf „Cycling A Green“ (Zyklus A. Grün), um den grünen (FAM) Kanal anzuzeigen.
12. Wählen Sie „Named On“ (Mit Benennung).
13. Wählen Sie „Dynamic tube“ (Dynamisches Röhrchen).
14. Wählen Sie „Slope correct“ (Steigungskorrektur).
15. Wählen Sie „Linear scale“ (Linearer Bereich).
16. Wählen Sie „Take off Adj.“ (Ausgangspunkt anpassen) und geben Sie im oberen Feld („If take off point was calculated before cycle“ [Wenn Ausgangspunkt vor Zyklus berechnet wurde]) den Wert „15.01“ und in das untere Feld („then use the following cycle and take off point“ [dann folgenden Zyklus und Ausgangspunkt verwenden]) den Wert „20.01“ ein.
17. Stellen Sie den Schwellenwert auf 0,075 ein und überprüfen Sie die C_T-Werte des grünen (FAM) Kanals.

Analyse der Daten aus der Probenbestimmung

Nach Abschluss des Laufs zur DNA-Probenbestimmung sehen Sie „Einstellungen für die Analyse in der Software“ auf Seite 92 ein und analysieren die Daten wie folgt (siehe Röhrchenanordnung in Tabelle 4 auf Seite 26).

Analyse der Laufkontrollen

Negativkontrolle

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

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

Positivkontrolle

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

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

Probenanalyse

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

- C_T -Wert des Proben-Kontrollassays $< 23,70$

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

- C_T -Wert des Proben-Kontrollassays $> 31,10$

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

Analyse der Daten aus dem EGFR-Mutationsnachweis

Eine Probe muss die DNA-Probenbestimmung bestehen, bevor sie auf EGFR-Mutationen getestet werden kann (siehe „Analyse der Daten aus der Probenbestimmung“ auf Seite 93).

Nach Abschluss des Laufs zum EGFR-Mutationsnachweis sehen Sie „Einstellungen für die Analyse in der Software“ auf Seite 92 ein und analysieren die Daten wie folgt (siehe Röhrenchenanordnung in Tabelle 7 auf Seite 39).

Analyse der Laufkontrollen

Weitere Informationen hierzu finden Sie im Flussdiagramm „Analyse der Laufkontrollen“ in Abbildung 39.

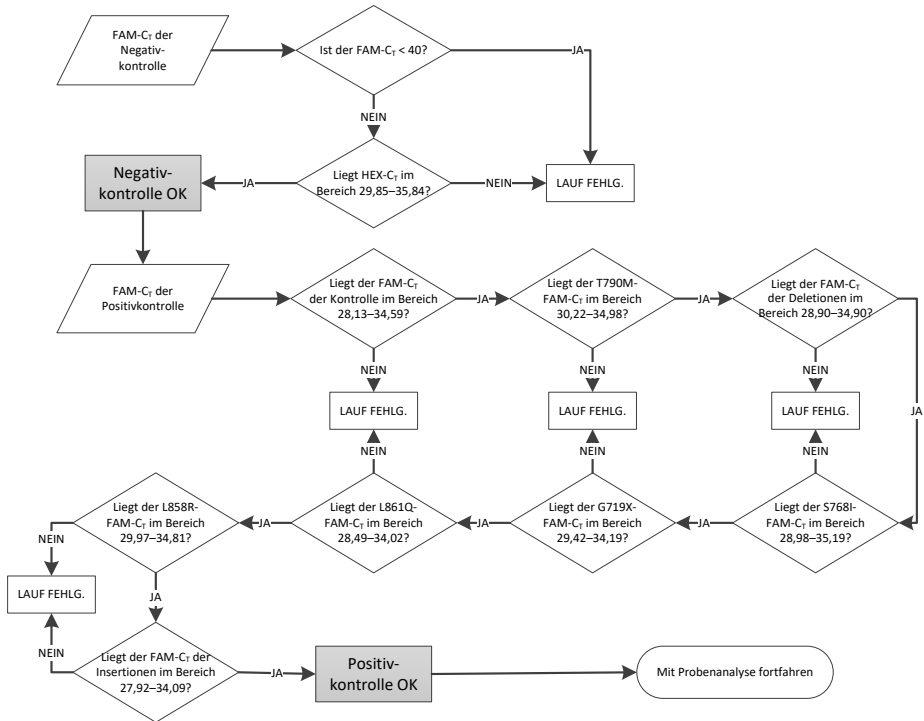


Abbildung 39. Flussdiagramm zur Analyse der Laufkontrollen für den EGFR-Mutationsnachweis

Negativkontrolle

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

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

Positivkontrolle

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

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

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

Reaktionsgemisch	Probe	Kanal	C _T -Bereich
Kontrolle	PK	Grün	28,13 bis 34,59
T790M	PK	Grün	30,22 bis 34,98
Deletionen	PK	Grün	28,90 bis 34,90
L858R	PK	Grün	29,97 bis 34,81
L861Q	PK	Grün	28,49 bis 34,02
G719X	PK	Grün	29,42 bis 34,19
S768I	PK	Grün	28,98 bis 35,19
Insertionen	PK	Grün	27,92 bis 34,09

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

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

Der C_T -Wert der Kontrolle muss im grünen (FAM) Kanal im Bereich von 23,70 bis 31,10 liegen (siehe Röhrenchenanordnung in Tabelle 7 auf Seite 40).

Wenn der C_T -Wert der Probenkontrolle außerhalb dieses Bereichs liegt, gehen Sie wie folgt vor:

- C_T -Wert des Proben-Kontrollassays < 23,70
Proben mit einem Kontroll- C_T von < 23,70 (hohe DNA-Konzentration) müssen verdünnt werden, da sie die Mutationsassays sonst überlasten würden. Um jede Mutation in einer niedrigen Konzentration nachzuweisen, werden überkonzentrierte Proben so verdünnt, dass der C_T -Wert im Bereich von 23,70 bis 31,10 liegt. Durch die Verdünnung der DNA in der Probe erhöht sich der C_T -Wert (eine Verdünnung im Verhältnis 1:1 erhöht den C_T -Wert um ungefähr 1,0). Verdünnen Sie die Proben mit dem im Kit enthaltenen Wasser (Wasser zur Verdünnung [Dil.]).
- C_T -Wert des Proben-Kontrollassays > 31,10
Bei einem Kontroll- C_T > 31,10 im grünen (FAM) Kanal wird eine erneute Extraktion der Proben empfohlen. Es liegt nicht genug DNA-Starttemplate vor, um alle EGFR-Mutationen an den für den Assay angegebenen Cut-off-Werten nachzuweisen.

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

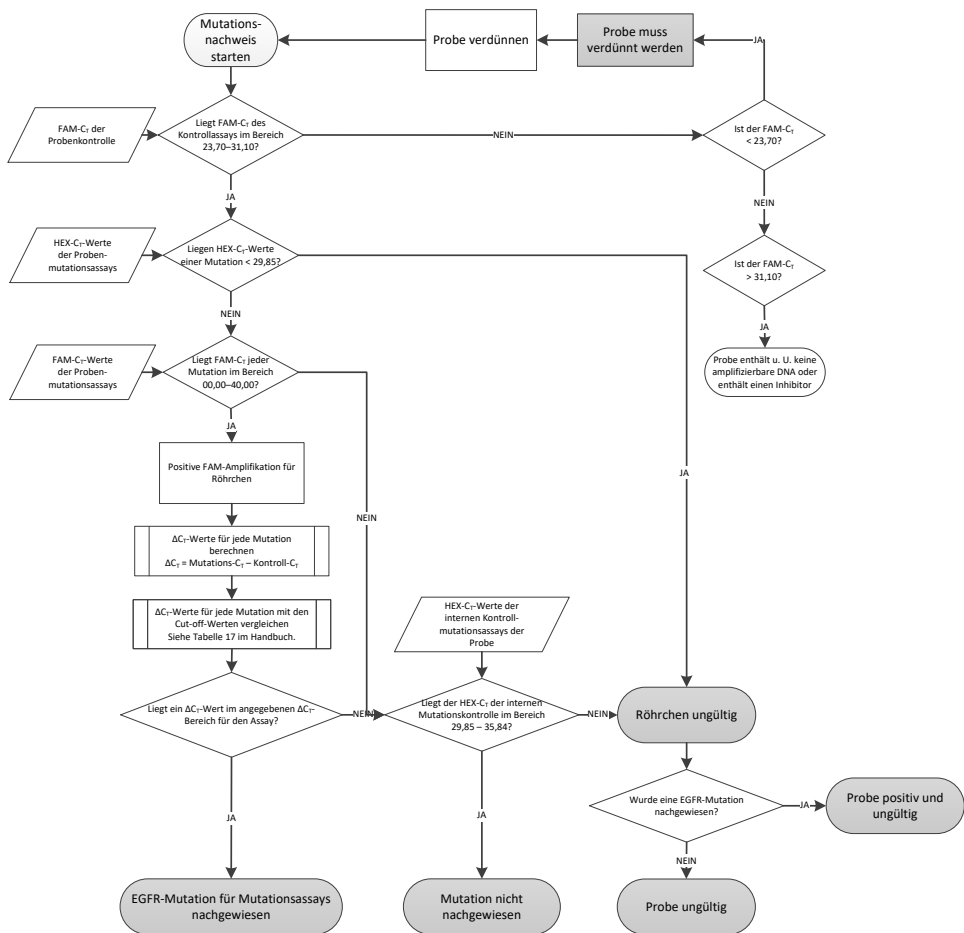


Abbildung 40. Flussdiagramm der Probenanalyse für den EGFR-Mutationsnachweis

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

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

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

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

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

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

Probenanalyse – C_T-Wert für den grünen (FAM) Kanal des Mutationsassays der Probe

Die Werte des grünen (FAM) Kanals sind für alle sieben EGFR-Mutationsreaktionsgemische mit den in Tabelle 17 aufgeführten Werten zu vergleichen. Die angegebenen Werte liegen innerhalb des zulässigen Bereichs, einschließlich der angegebenen Werte (siehe Röhrchenanordnung in Tabelle 7 auf Seite 39).

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

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

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

Berechnen Sie für jedes EGFR-Mutationsröhrchen mit einer positiven FAM-Amplifikation wie folgt den ΔC_T-Wert und achten Sie darauf, dass die Mutations- und Kontroll-C_T-Werte von derselben Probe stammen (siehe Röhrchenanordnung in Tabelle 7 auf Seite 39).

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

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

Ist der Cut-off-Wert überschritten, so könnte ein positives Signal für ein Assay auch nur ein Hintergrundsignal des ARMS-Primers bei Wildtyp-DNA sein. Liegt der ΔC_T -Wert der Probe über dem Cut-off-Wert eines Assays, so wird die Probe für diesen Assay als negativ oder außerhalb der Nachweisgrenze des Kits eingestuft.

Die verschiedenen Mutationsreaktionen der Proben können den folgenden Status haben:

- Mutation nachgewiesen
- Mutation nicht nachgewiesen
- Ungültig

Mutation nachgewiesen

Die Amplifikation des grünen (FAM) Kanals ist positiv und der ΔC_T -Wert ist kleiner oder gleich dem Cut-off-Wert. Wenn für eine Probe mehrere Mutationen nachgewiesen werden, können sie alle angegeben werden.

Mutation nicht nachgewiesen

Die Amplifikation des grünen (FAM) Kanals ist positiv und der ΔC_T -Wert liegt über dem Cut-off-Wert.

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

Ungültig

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

Die Amplifikation des grünen (FAM) Kanals ist negativ und die Amplifikation des gelben (HEX) Kanals (interne Kontrolle) ist negativ.

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

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

Der *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit ist für den Gebrauch mit dem Rotor-Gene Q MDx und einem 72-Well-Rotor bestimmt. Die *therascreen* EGFR CE Assay Package Software ist separat auf CD erhältlich (Katalog-Nr. 9023537). Das Assay Package enthält die Vorlagen „*therascreen* EGFR CE Control Run Locked Template“ und „*therascreen* EGFR CE Locked Template“.

Hinweis: Das *therascreen* EGFR CE Assay Package ist nur mit der RotorGene Q Software, Version 2.3 kompatibel. Stellen Sie vor der Installation des *therascreen* EGFR CE Assay Package sicher, dass die richtige Version der RotorGene Q Software installiert ist. Wenn Ihr Rotor-Gene Q MDx Instrument mit einer früheren Softwareversion ausgeliefert wurde, aktualisieren Sie diese, indem Sie die RotorGene Q Software, Version 2.3 von der Rotor-Gene Q MDx Produktseite im Abschnitt „Product Resources“ (Produktressourcen) unter „Operating Software“ (Betriebssoftware) herunterladen (siehe www.qiagen.com/shop/automated-solutions/pcr-instruments/rotor-gene-q-mdx/#resources).

Verfahren

1. Bestellen Sie die *therascreen* EGFR CE Assay Package CD (Katalog-Nr. 9023537).
2. Legen Sie die CD in das CD-Laufwerk des Computers ein, der an das Rotor-Gene Q MDx Instrument angeschlossen ist.
3. Wenn die CD automatisch geladen wird, starten Sie die Installation durch Doppelklicken auf die Datei „*therascreen*_EGFR_CE_Assay_Package_3.0.5.exe“.
Ansonsten suchen Sie im Dateibrowser des angeschlossenen Computers nach dieser ausführbaren Datei und starten sie.
4. Der Einrichtungsassistent des *therascreen* EGFR CE Assay Package wird geöffnet. Klicken Sie auf „Next“ (Weiter), um fortzufahren (Abbildung 41).

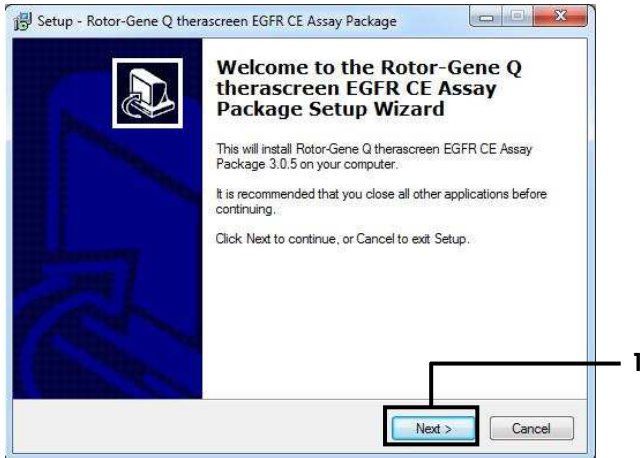


Abbildung 41. Das Dialogfeld „Setup Wizard“ (Einrichtungsassistent); 1 = „Next“ (Weiter)

5. Lesen Sie die Lizenzvereinbarung und akzeptieren Sie die Vereinbarung, indem Sie das Optionsfeld „I accept the agreement“ (Ich stimme der Vereinbarung zu) aktivieren. Klicken Sie auf „Next“ (Weiter), um fortzufahren (Abbildung 42).

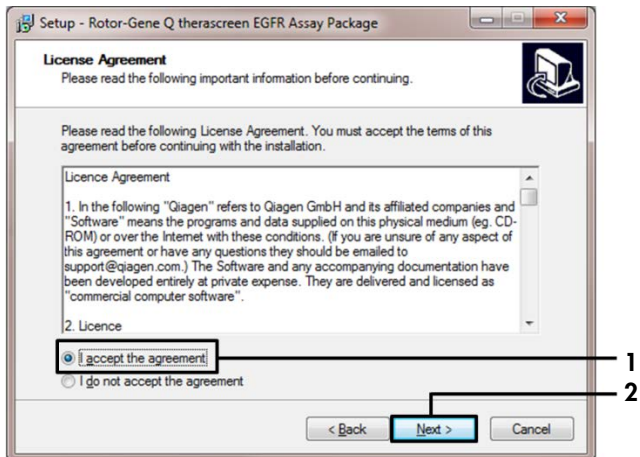


Abbildung 42. Das Dialogfeld „License Agreement“ (Lizenzvereinbarung). 1 = „I accept the agreement“ (Ich stimme der Vereinbarung zu), 2 = „Next“ (Weiter).

6. Die Einrichtung wird automatisch gestartet. Nach Abschluss der Installation wird ein abschließendes Dialogfeld des Einrichtungsassistenten geöffnet. Klicken Sie auf „Finish“ (Fertigstellen), um den Vorgang zu beenden (siehe Abbildung 43).

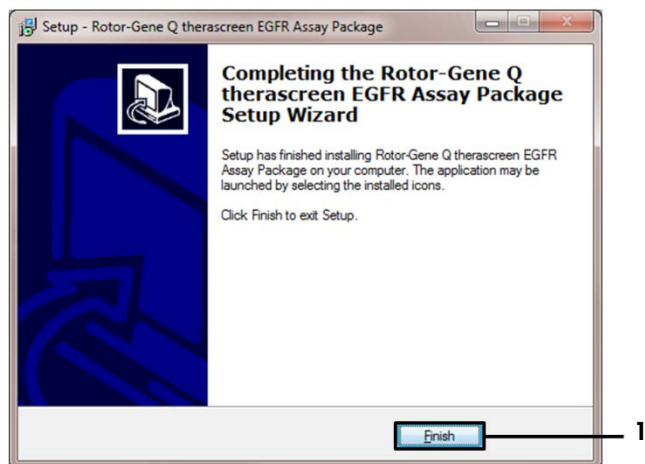


Abbildung 43. Schließen des Einrichtungsassistenten [1 = „Finish“ (Fertigstellen)]

7. Starten Sie den Computer neu.

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

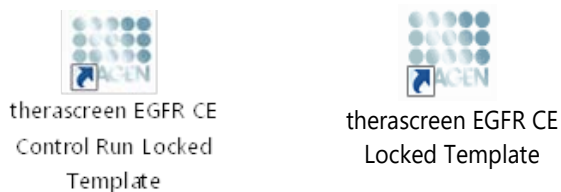


Abbildung 44. Symbole für „EGFR CE Control Run Locked Template“ und „EGFR CE Locked Template“.

Kontakt

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

Bestellinformationen

Produkt	Inhaltsverzeichnis	Kat.-Nr.
<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit (24)	Für 24 Reaktionen: Kontrollassay, 7 Mutationsassays, Positivkontrolle, Taq-DNA-Polymerase, Wasser als NTC und Wasser zur Probenverdünnung	874111
<i>therascreen</i> EGFR Assay Package CD	Softwarepaket mit Protokollen für das <i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit und das QIAGEN Rotor-Gene Q MDx Instrument	9023537
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: QIAamp MinElute® Säulen, Proteinase K, Puffer, Entnahmeröhrchen (2 ml)	60404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 Präparationen: 50 QIAamp MinElute Säulen, Proteinase K, Puffer, Entnahmeröhrchen (2 ml)	56404
Rotor-Gene Q MDx und Zubehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör, 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation und Schulung	9002033

Produkt	Inhaltsverzeichnis	Kat.-Nr.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Echtzeit-PCR-Cycler und HRM-Analysator (für hochauflösende Schmelzkurvenanalyse) mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör: umfasst 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, ohne Installation und Schulung.	9002032
Loading Block 72 x 0.1ml Tubes	Aluminium-Ladeblock für die manuelle Reaktionskonfiguration mit einer Einkanalpipette in 72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (250)	250 Streifen mit je 4 Röhrchen und Deckeln, für 1000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1ml (2500)	10 x 250 Streifen mit jeweils 4 Röhrchen und Deckeln für 10.000 Reaktionen	981106

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Benutzerhandbuch. Diese stehen unter **www.qiagen.com** zur Verfügung oder können vom technischen Service von QIAGEN oder dem für Sie zuständigen Vertriebspartner angefordert werden.

Bearbeitungshistorie des Handbuchs

Dokument	Änderungen	Datum
HB-1909-002	Aktualisierung der LOD-Werte (Tabelle 11) in „Leistungsmerkmale“.	Juni 2015
HB-1909-003	Aktualisierungen der Assay-Software-Markierungen (Tabelle 8). Aktualisierungen der Daten zur Reproduzierbarkeit des Assays (Tabelle 12). Ergänzung klinischer Ergebnisse für IRESSA in „Leistungsmerkmale“.	August 2016
HB-1909-004	Änderung der Festlegung von Lagerungszeiten zur Klärung der Auftauzeit und der Gesamtlagerungsdauer in „Lagerungsbedingungen“ und in den Tabellen 2 und 5. Aktualisierung von Abbildung 40. Flussdiagramm der Probenanalyse für den EGFR-Mutationsnachweis Ergänzung von Bestellinformationen für den QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (Katalog-Nr. 60404)	März 2018
HB-1909-005	Hinzufügung des Bevollmächtigten (Titelseite). Der Abschnitt „Symbole“ wurde aktualisiert.	Januar 2019

Warenzeichen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN Group); FAM™, HEX™ (Thermo Fisher Scientific Inc.); GIOTRIF® (Boehringer Ingelheim), IRESSA® (AstraZeneca Group)

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

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für *therascreen* EGFR RGQ PCR Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Panels gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Panels gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

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

HB-1909-005 01-2019 © 2019 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Hinweise

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com