

# EGFR T790M RealFast™ Assay

REF 8-110 / 8-113  $\Sigma$  100 / 32 reactions  
-30°C / -15°C



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Intended Use

The EGFR T790M RealFast™ Assay is a real-time PCR test for the qualitative detection of the somatic c.2369C>T (p.T790M) mutation in exon 20 of the human *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* gene. The kit is designed to identify the resistance mutation in human plasma-derived, circulating cell-free DNA (cfDNA) from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. The test is intended as companion diagnostic to support the selection of NSCLC patients eligible for EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy with osimertinib (TAGRISSO™). The assessment of the EGFR T790M status in cfDNA from plasma is suggested for patients not amenable to tumor biopsy. Reference sequence: NM\_005228.3; HGVS: c.2369C>T (p.T790M); Cosmic ID: 6240.

## 2. Introduction

EGFR plays a crucial role in cell proliferation and growth by activation of the Ras-Raf-MAPK pathway. EGFR mutations in exon 18, 19, 20 and 21 are found with a prevalence of 10% to 30% in NSCLC patients. The most prominent activating EGFR mutations are deletions in exon 19 and L858R in exon 21. NSCLC patients with activating EGFR mutations may benefit from EGFR TKI therapy. However, approximately 50% of NSCLC patients that acquire resistance to these TKIs (e.g. erlotinib) exhibit the T790M mutation. Based on clinical studies osimertinib treatment is an option/alternative therapy for T790M positive patients.

## 3. Kit Contents

		100 / 32 Rxn
RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial <input type="checkbox"/> white cap	1000 / 320 µl
EGFR T790M Assay Mix	1 vial <input type="checkbox"/> purple cap	550 / 550 µl
EGFR T790M Positive Control	1 vial <input type="checkbox"/> green cap	75 / 75 µl

The RealFast™ 2x Probe Mix comprises HotStart Taq DNA polymerase and dNTPs in an optimized buffer system. The EGFR T790M Assay Mix consists of gene-specific primers, dual-labeled hydrolysis probes for *EGFR* and the endogenous control (EC) gene, an EGFR wild-type suppressor and uracil-N-glycosylase to minimize the risk of cross-contaminating PCR products. A synthetic EGFR T790M Positive Control representing the mutated *EGFR* and the EC gene is supplied with the kit.

The kit contains reagents for 100 / 32 reactions in a final volume of 20 µl each.

## 4. Storage and Stability

The EGFR T790M RealFast™ Assay is shipped on cooling blocks. On arrival, store the kit at -30 to -15°C. Alternatively, store at 2 to 8°C for short-term use within one month. The kit withstands up to 20 freeze/thaw cycles with no loss of activity. Avoid prolonged exposure to intense light. If stored correctly, the kit will retain full activity until the expiration date indicated on the label.

## 5. Product Description

### 5.1. Principle of the Test

The test is based on the fluorogenic 5' nuclease assay, also known as TaqMan® assay. Each reaction contains gene-specific primer pairs for amplification of a 92 bp *EGFR* exon 20 fragment and a 147 bp EC gene fragment. Further components are two dual-labeled, gene-specific hydrolysis probes, the **FAM-labeled EGFR probe** and the **HEX-labeled EC probe**, which hybridize to an internal sequence of the amplified fragments. The proximity of the 5'-fluorescent reporter and 3'-quencher dye on intact probes prevents the reporter from fluorescing. During the extension phase of PCR the 5' - 3' exonuclease activity of Taq DNA polymerase cleaves the 5'-fluorescent reporter from the hybridized probe. The physical separation of the fluorophore from the quencher dye generates a fluorescent signal in real-time, which is proportional to the accumulated PCR product.

The EC serves as a PCR positive control and as a parameter to evaluate EGFR c.2369C>T (p.T790M) positivity within the range of/bf determination of a  $\Delta C_q$  ( $C_{q\ EGFR} - C_{q\ EC}$ ) value  $\leq 8$ .

### 5.2. Real-time PCR Instrument Compatibility

The EGFR T790M RealFast™ Assay is validated for use with the AB 7500 Fast instrument.

The kit is compatible with various common real-time PCR instruments capable of recording FAM and HEX fluorescence:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Note:** RealFast™ Variant Detection QuickGuides for setting up and analyzing experiments on different types of instruments can be downloaded from [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

When using AB 7500 Fast, StepOne™ or Mx3005P set passive reference dye to "ROX"! «

The kit is supplied with **low ROX**. For use with real-time PCR instruments requiring high ROX for normalization of data (e.g. Applied Biosystems® instruments: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), add ROX to a final concentration of 1 µM to the 2x Probe Mix.

### 5.3. Assay Performance Specifications

Determination of **sensitivity** was performed on 24 samples testing positive for the EGFR T790M mutation with a reference method. The EGFR T790M RealFast™ Assay determined 22 samples as positive, which equaled a true positive rate of 91,7%.

Determination of **specificity** was performed on 32 samples testing negative for EGFR T790M mutation with a reference method. The EGFR T790M RealFast™ Assay determined 31 samples as negative, which equaled a true negative rate of 96,9%.

Limit of detection: 8 mutant copies of EGFR T790M in a background of 2.5 ng wild-type cfDNA per reaction.

Recommended DNA concentration: 0.5 ng/µl to 10 ng/µl cfDNA.

## 6. Materials Required but not Supplied

Real-time PCR instrument with FAM (520 nm) and HEX (556 nm) filters, instrument-compatible reaction vessels, disposable powder-free gloves, vortexer, mini-centrifuge for 2.0 ml tubes, tube racks, set of calibrated micropipettes (0.5 – 1000 µl), sterile tips with aerosol-barrier filter, molecular grade water, DNA extraction system, freezer, biohazard waste container. Equipment for blood drawing, plasma preparation and cfDNA isolation.

## 7. Specimen handling and cfDNA extraction:

Sample material must be cfDNA isolated from **fresh or frozen** human plasma.

### 7.1. Plasma preparation

Collect 9 ml peripheral blood in EDTA tubes according to the manufacturer's instruction. Avoid unnecessary agitation to reduce cfDNA degradation and leukocyte lysis. Proceed with EDTA plasma preparation **within one hour** of blood drawing according to the following protocol:

- Centrifuge for 10 minutes at 1.600 x g in a swinging bucket rotor centrifuge.
- Transfer the plasma fraction (supernatant) to tubes suitable for high-speed centrifugation.

» **Note:** Avoid carry-over of cells as contaminating leukocytes may increase the genomic DNA background and thus dilute the target cfDNA. «

- Centrifuge the plasma for 10 minutes at 16.000 x g in a fixed angle rotor centrifuge.
- Transfer the supernatant to fresh tubes avoiding contact with and potential transfer of the pellet.
- Freeze the plasma at -40°C to -80°C or proceed immediately with cfDNA extraction.

» **Note:** If blood collection tubes other than EDTA tubes e.g. PAXgene® Blood ccfDNA tubes or STRECK Cell-Free DNA BCT® tubes are used, follow the respective instructions of the supplier for blood drawing, storage conditions and plasma preparation. «

### 7.2. DNA extraction

DNA extraction reagents are **not supplied** with the kit.

For cfDNA extraction from 4 ml double-centrifuged plasma the ViennaLab Plasma cfDNA Extraction Kit [REF 2-040] is recommended. The EGFR T790M RealFast™ Assay requires 2.5 – 50 ng cfDNA per reaction. The cfDNA concentration in human plasma is usually very low. Therefore, it is recommended to use a highly sensitive method (e.g. Qubit dsDNA HS Assay) for cfDNA quantification.

Ensure extracted DNA is suitable for amplification in terms of concentration, purity and integrity. Accidental carry-over of residual amounts of washing buffers during DNA extraction may interfere with cfDNA analysis. For reliable analysis the cfDNA concentration of the sample should be at least 0.5 ng/µl.

» **Note:** UV-VIS or fluorescence-based quantification of cfDNA below 0.2 ng/µl is error-prone and hence may be inaccurate. For the EGFR T790M RealFast™ Assay however, samples showing a  $C_{q\ EC\ [HEX]} \leq 32$  are eligible for analysis. «

## 8. Experimental Protocol

### 8.1. PCR Controls

**Always** include a **No Template Control** (NTC) in each experiment to confirm absence of potential contaminations. Use PCR-grade water instead of DNA and run the NTC in duplicate.

**Always** include the EGFR T790M **Positive Control** as positive reference signal for your unknown samples.

» **Note:** The Positive Control is a potential source of contamination. Make sure to handle it carefully. «

### 8.2. Preparation of EGFR T790M RealFast™ Master Mix

Gently vortex and briefly centrifuge all solutions after thawing. Set up PCR at room temperature. Prepare sufficient **Master Mix** for all your reactions (N samples + positive control + negative controls) plus at least one additional reaction to compensate for pipetting inaccuracies:

Component	per reaction	e.g. 24+1 reactions
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	250 µl
EGFR T790M Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

Dispense **15 µl Master Mix** into each well. Add **5 µl** purified **DNA** or **Control** template to reach a final reaction volume of 20 µl.

To minimize risk of contamination, always pipette templates in the following order: first NTC, then samples, last positive control. Immediately close reaction vessels.

» **Note:** Avoid creating bubbles in the final reaction mix and avoid touching the optical surface of the cap or sealing film without gloves. Both may interfere with fluorescence measurements. Centrifuge briefly if needed. «

### 8.3. PCR Program

Program the real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions for quantitation experiments with two targets / reporter dyes. Place the samples into the thermal cycler and run the following program:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P and other Peltier heating block-based instruments:**

Cycles	Temp	Time	Steps
1	37°C	10 min	Degradation of uracil-containing DNA
1	95°C	2 min	Initial denaturation
45	95°C	5 sec	Denaturation
	60°C	30 sec	Annealing/Extension –
			<b>Data acquisition</b> on FAM- and HEX-channel

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Cycles	Temp	Time	Steps
1	37°C	10 min	Degradation of uracil-containing DNA
1	95°C	2 min	Initial denaturation
	95°C	5 sec	Denaturation
45	<b>60°C</b> *for 36-well rotor: <b>56°C</b>	30 sec	Annealing/Extension – <b>Data acquisition</b> on Green and Yellow channel

## 9. Data Analysis / Interpretation of Results

Successful amplification of a sample can be verified by a positive signal of the EC in the HEX channel. The presence or absence of an EGFR c.2369C>T (p.T790M) mutation in the sample is defined by the occurrence of a signal in the FAM channel within certain limits (see Table Data analysis).

EGFR c.2369C>T **negative** cfDNA samples exhibit amplification in the HEX channel only.

EGFR c.2369C>T **positive** cfDNA samples exhibit amplification in the FAM and HEX channel, they show a calculated  $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR [FAM]} - C_q \text{ EC [HEX]}) \leq 8$ .

Fluorescent levels and corresponding amplification curves are automatically displayed in amplification plots in the real-time PCR software.

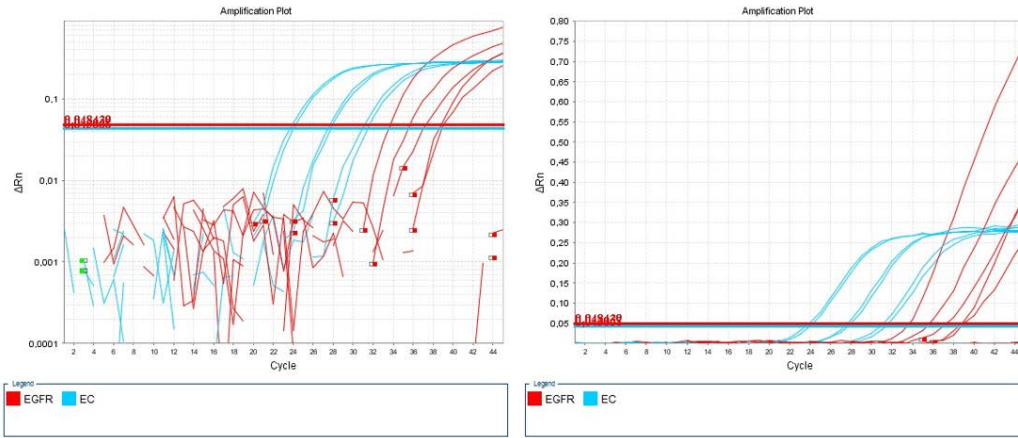
Data analysis		
Data analysis is performed automatically by the real-time PCR instrument software selecting <b>automatic threshold and base-line settings</b> . However, the user must verify the correct setting of the threshold and base-line → see section 10. Important Information.		
Target	C <sub>q</sub>	Interpretation
EC [HEX]	22 - 32	Sample is within range of analysis → sufficient template DNA (> 0.5ng / reaction)
	< 22	Excess of template DNA → dilute sample and repeat testing
	> 32	Insufficient amounts of cfDNA or presence of PCR inhibitor → column-based purification and concentration of sample DNA recommended
	N.A.	Sample contains no template DNA
EGFR c.2369C>T (p.T790M) [FAM]	20 - 37	Sample is within range of analysis → perform $\Delta C_q$ calculation
	35 - 37	Sample is within range of analysis. However, to confirm the presence of mutated cfDNA at low level it is recommended to repeat the testing in duplicate
	< 20	Excess of template DNA → dilute the sample and repeat testing
	> 37 or N.A.	Sample is EGFR c.2369C>T (p.T790M) negative. FAM signals C <sub>q</sub> > 37 represent co-amplified EGFR wild-type fragments.
Samples fulfilling the above requirements <b>AND</b> the condition $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR} - C_q \text{ EC}) \leq 8$ are EGFR c.2369C>T (p.T790M) <b>positive</b> . A $\Delta C_q > 8$ indicates co-amplification of EGFR wild-type, sample has to be considered as EGFR c.2369C>T (p.T790M) <b>negative</b> .		

Examples for interpretation of results		
C <sub>q</sub> Values	Evaluation	Interpretation
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 30	Both signals within range and $\Delta C_q = 6$	The sample is <b>positive</b> for EGFR c.2369C>T.
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 23	Both signals within range and $\Delta C_q = -1$	
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 32	Both signals within range and $\Delta C_q = 8$	
HEX C <sub>q</sub> = 29 and FAM C <sub>q</sub> = 36	HEX signal within range. FAM signal > C <sub>q</sub> 35. $\Delta C_q = 7$	<b>Retest</b> sample to confirm low-level EGFR c.2369C>T mutation.
HEX C <sub>q</sub> = 30 and FAM C <sub>q</sub> = 37.5	HEX signal within range. FAM signal out of range.	The sample is EGFR c.2369C>T <b>negative</b> . FAM C <sub>q</sub> > 37 suggests EGFR wild-type co-amplification.
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 33	Both signals within range and $\Delta C_q = 9$	The sample is <b>negative</b> for EGFR c.2369C>T ( $\Delta C_q > 8$ ).
HEX C <sub>q</sub> = 29 and FAM C <sub>q</sub> = N.A.	HEX signal within range. No FAM signal.	The sample is <b>negative</b> for EGFR c.2369C>T.
HEX C <sub>q</sub> = 32.5 and FAM C <sub>q</sub> = N.A.	HEX signal out of range. No FAM signal.	<b>Repeat</b> the test with more DNA.

## 10. Important Information

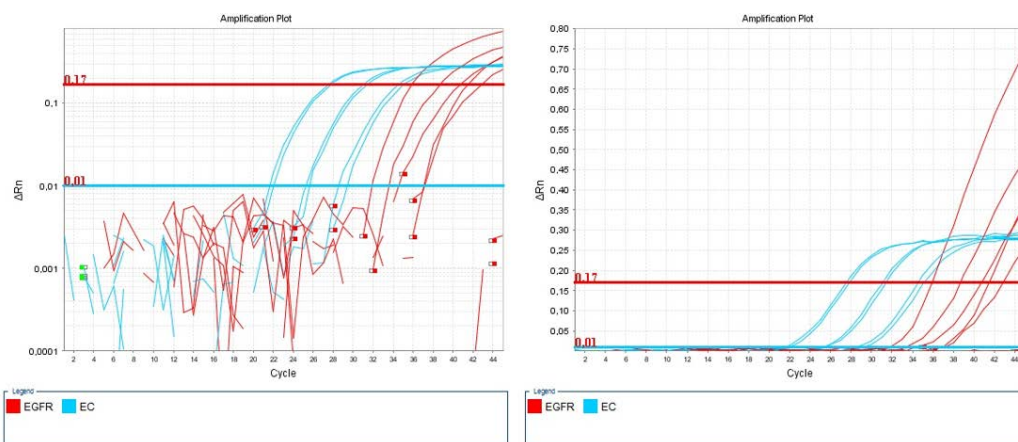
- The data analysis is valid for cfDNA testing only. The parameters cannot be used to evaluate DNA extracted from formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) samples.
- C<sub>q</sub> values < 22 for EC (HEX) or < 20 for EGFR (FAM) may result from excess DNA in the reaction or contaminating PCR products.
- Deviations from the protocol, e.g. variation of reaction volumes or modification of the PCR program, may affect automatic threshold setting and/or C<sub>q</sub> values and thus lead to false-positive or false-negative results.
- The user is advised to visually inspect the software-generated curves and to verify the correctness of the automated threshold setting. However, manual adjustment of the thresholds and baselines must only be performed, if an intervention is necessary (see Correct Threshold Setting).

### Correct Threshold Setting (logarithmic and linear view)



The automatic threshold is set correctly in the exponential phase of the amplification curves.

### Wrong Threshold Setting (logarithmic and linear view)



The automatic threshold of the Control (blue line) is set too low. The threshold of EGFR (red line) is set too high.  
 → Both thresholds must be individually placed in the exponential phase of the amplification curve by the user.

## 11. Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostics use only.
- Always use disposable powder-free gloves and wear suitable lab coat when handling specimens and reagents.
- Perform reaction setup in an area separate from nucleic acid preparation and PCR product analysis.
- Use pipettes dedicated for PCR setup only, use aerosol-guarded pipette tips.
- Use instrument-compatible reaction vessels with optically clear caps or sealers.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not use expired kits or kit components.

# EGFR T790M RealFast™ Assay

REF 8-110 / 8-113  $\Sigma$  100 / 32 Reaktionen  
-30°C / -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Verwendungszweck

Der EGFR T790M RealFast™ Assay ist ein real-time PCR basierter Test für die qualitative Detektion der somatischen Mutation c.2369C>T (p.T790M) im Exon 20 des Gens für den humanen *Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)*. Der Kit dient dem Nachweis dieser Resistenzmutation in zirkulierender, zellfreier DNA (cfDNA) aus humanem Plasma von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer; NSCLC). Der Test ist ein diagnostisches Hilfsmittel, um die Eignung von NSCLC-Patienten für eine EGFR Tyrosin Kinase Inhibitor (TKI) Therapie mit Osimertinib (TAGRISSO™) festzustellen. Die Beurteilung des EGFR T790M Status in cfDNA aus Plasma wird bei jenen Patienten empfohlen, von denen keine Tumor Biopsie erhalten werden kann.  
Referenzsequenz: NM\_005228.3; HGVS: c.2369C>T (p.T790M); Cosmic ID: 6240.

## 2. Einleitung

EGFR spielt durch die Aktivierung der Ras-Raf-MAPK Signalwegs eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und dem Zellwachstum. EGFR Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21 treten in NSCLC Patienten mit einer Prävalenz von 10% bis 30% auf. Die wichtigsten aktivierenden EGFR Mutationen sind Deletionen in Exon 19 und die L858R Mutation in Exon 21. NSCLC Patienten mit aktivierenden EGFR Mutationen können von einer EGFR TKI Therapie profitieren. Ungefähr 50% der NSCLC Patienten, die eine Resistenz gegen TKIs aufweisen, tragen die T790M Mutation. Klinische Studien zeigten, dass eine Therapie mit Osimertinib eine Alternative für T790M positive Patienten darstellt.

## 3. Kit Contents

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial <input type="checkbox"/> white cap	1000 / 320 µl
EGFR T790M Assay Mix	1 vial <input type="checkbox"/> purple cap	550 / 550 µl
EGFR T790M Positive Control	1 vial <input type="checkbox"/> green cap	75 / 75 µl

Der RealFast™ 2x Probe Mix enthält HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der EGFR T790M Assay Mix besteht aus genspezifischen Primern, doppelt-markierten Hydrolysesonden für das EGFR- und ein endogenes Kontroll-(EC) Gen, dem EGFR Wildtyp-Blocker, sowie Uracil-N-Glycosylase zur Minimierung des Risikos einer Kreuzkontamination. Weiters ist eine EGFR T790M Positivkontrolle für das mutierte EGFR und das EC Gen inkludiert.

Der Kit beinhaltet Reagenzien für 100 / 32 Reaktionen mit je 20µl Endvolumen.

## 4. Lagerung und Stabilität

Der EGFR T790M RealFast™ Assay wird auf Kühlblöcken geliefert. Lagern Sie den Kit nach Erhalt bei -30 bis -15°C. Alternativ bei Verwendung innerhalb eines Monats bei 2 bis 8°C. Die Reagenzien überdauern ohne Aktivitätsverlust bis zu 20 Einfrier-/Auftauzyklen. Vermeiden Sie längere Exposition gegenüber direktem Licht. Bei korrekter Lagerung behält der Kit seine volle Funktionsfähigkeit bis zum angegebenen Ablaufdatum.

## 5. Produktbeschreibung

### 5.1. Testprinzip

Der Test basiert auf dem fluorogenen 5'-Nuklease-Assay, bekannt auch als TaqMan®-Assay. Jede Reaktion enthält ein genspezifisches Primerpaar zur Amplifizierung eines 92 bp EGFR Exon 20 Fragments und eines 147 bp EC-Gen Fragments. Weitere Komponenten sind zwei doppelt-markierte genspezifische Hydrolysesonden, eine FAM-markierte EGFR Sonde und eine HEX-markierte EC Sonde, welche an eine interne Sequenz des amplifizierten Fragments binden. Die unmittelbare Nähe von 5'-Fluoreszenzreporter und 3'-Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz der intakten Sonde. Während des Extensionsschrittes der PCR spaltet die 5' – 3' Exonuklease Aktivität der Taq DNA-Polymerase den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher verursacht in Echtzeit ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

Die endogene Kontrolle (EC) dient als PCR Positivkontrolle und als ein Parameter zur Bewertung der EGFR c.2369C>T (p.T790M) Positivität, welche innerhalb einer bestimmten Grenze, die durch  $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR} - C_q \text{ EC}) \leq 8$  definiert wird, erfolgt.

### 5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der EGFR T790M RealFast™ Assay ist für die Verwendung mit dem AB 7500 Fast Gerät validiert.

Der Kit ist mit verschiedenen handelsüblichen real-time PCR Geräten, die FAM- und HEX-Fluoreszenz detektieren können, kompatibel.

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycle® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cyler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Anmerkung:** RealFast™ Variant Detection QuickGuides zur Programmierung und Auswertung von Assays auf verschiedenen Geräten sind als Download verfügbar: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

Bei Verwendung von AB 7500 Fast, StepOne™ oder Mx3005P muss der passive Referenzfarbstoff auf "ROX" gesetzt werden! «

Der Kit enthält **low ROX**. Bei Verwendung von real-time PCR Geräten, die eine hohe ROX- Konzentration zur Normalisierung der Daten erfordern (z.B. Applied Biosystems® Geräte: StepOne™, 7300, 7900/7900HT), muss ROX in einer Endkonzentration von 1 µM dem 2x Probe Mix zugefügt werden.

### 5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 24 Proben, die mit einem Referenztest als EGFR T790M positiv typisiert wurden, bestimmt. Der EGFR T790M RealFast™ Assay testete 22 Proben als positiv = 91,7% Richtig-Positiv-Rate.

Die **Spezifität** wurde anhand von 32 Proben, die mit einem Referenztest als EGFR T790M negativ typisiert wurden, bestimmt. Der EGFR T790M RealFast™ Assay testete 31 Proben als negativ= 96,9% Richtig-Negativ-Rate.

Detektionslimit: 8 mutierte EGFR T790M Kopien in einem Hintergrund von 2.5 ng wildtyp cfDNA pro Reaktion.

Empfohlene DNA Konzentration: 0.5 ng/µl bis 10 ng/µl cfDNA.

## 6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM (520 nm) und HEX (556 nm) Filter, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, DNA Extraktionssystem, Kühl- oder Gefrierschrank, Abfallbehälter. Equipment für Blutabnahme, Plasma Präparation und cfDNA Isolation.

## 7. Probenbereitung und cfDNA Extraktion

Das Probenmaterial ist cfDNA, die aus frischem, oder gefrorenem humanen Plasma isoliert wurde.

### 7.1. Plasma-Präparation

Die Abnahme von 9 ml peripherischem Blut in EDTA Röhrcchen erfolgt entsprechend der Anleitung des Herstellers. Um cfDNA Degradierung und Leukozytenlyse zu minimieren, sollte unnötiges Schütteln vermieden werden. Die EDTA Plasma-Präparation sollte **innerhalb einer Stunde** nach Blutabnahme entsprechend dem folgenden Protokoll erfolgen:

- Zentrifugation des Blutes 10 Minuten bei 1.600 x g in einer Ausschwingrotor-Zentrifuge.
- Transfer der Plasma-Fraktion (Überstand) in Röhrcchen, die für „high-speed“ Zentrifugation geeignet sind.

» **Anmerkung:** Ein Übertrag von kontaminierenden Leukozyten sollte vermieden werden. Freigesetzte DNA aus lysierten Leukozyten erhöht den genomischen DNA Hintergrund und verdünnt somit die Ziel-cfDNA. «

- Zentrifugation des Plasmas, 10 Minuten bei 16.000 x g in einer Winkelrotor-Zentrifuge.
- Transfer des Überstandes in frische Röhrcchen, wobei der Kontakt und Übertrag des Sediments zu vermeiden ist.
- Einfrieren des Plasmas bei -40°C bis -80°C, oder sofortige cfDNA Extraktion.

» **Anmerkung:** Wenn anstelle von EDTA andere Röhrcchen verwendet werden (z.B.: PAXgene® Blood ccfDNA tubes, oder STRECK Cell-Free DNA BCT® tubes), sind die entsprechenden Angaben der Hersteller bezüglich Blutabnahme, Lagerung und Plasmapräparation zu befolgen. «

### 7.2. DNA Extraktion

DNA Extraktionsreagenzien sind **nicht im Kit** enthalten.

Für die cfDNA Extraktion von 4 ml doppelt-zentrifugiertem Plasma wird der ViennaLab Plasma cfDNA Extraction Kit [REF 2-040] empfohlen. Der EGFR T790M RealFast™ Assay benötigt 2.5 – 50 ng cfDNA pro Reaktion. Die cfDNA Konzentration in humanem Plasma ist üblicherweise sehr gering. Es wird daher empfohlen, hoch-sensitive Methoden (z.B.: Qubit dsDNA HS Assay) zur cfDNA Quantifizierung zu verwenden.

Es muss sichergestellt sein, dass die Konzentration, Reinheit und Integrität der extrahierten DNA für eine Amplifikation geeignet ist. Das unachtsame Verschleppen von Resten des Wasch-Puffers während der DNA Extraktion kann mit der cfDNA Analyse interferieren. Für eine sichere Analyse der cfDNA sollte die Probenkonzentration zumindest 0.5 ng/µl betragen.

» **Anmerkung:** UV-VIS oder fluoreszenzbasierte Quantifizierung von cfDNA mit einer Konzentration unter 0.2 ng/µl ist fehleranfällig und könnte daher inexakt sein. Proben mit einem  $C_{q, EC [HEX]} \leq 32$  sind für die Analyse mit dem EGFR T790M RealFast™ Assay geeignet. «

## 8. Arbeitsanleitung

### 8.1. PCR Kontrollen

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** eine **No Template Control (NTC)** zur Kontrolle potentieller Kontaminationen mit ein. Es ist empfehlenswert die NTC (hochreines Wasser anstelle von DNA) als Duplikat einzusetzen.

Führen Sie in jedem Lauf **immer** die EGFR T790M **Positive Control** als positives Referenzsignal für unbekannte Proben mit.

» **Anmerkung:** Die Positive Control stellt eine potentielle Kontaminationsquelle dar und muss daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

### 8.2. Vorbereitung des EGFR T790M RealFast™ Master Mixes

Alle Lösungen komplett auftauen, vorsichtig mischen und kurz abzentrifugieren. Das Ansetzen der PCR erfolgt bei Raumtemperatur. Bereiten Sie ausreichend **Master Mix** für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze (N Proben + Positivkontrolle + Negativkontrollen) vor und berechnen Sie mindestens eine zusätzliche Reaktion ein, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen.

Komponente	pro Reaktion	z.B. 24+1 Reaktionen
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	250 µl
EGFR T790M Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

Legen Sie **15 µl Master Mix** in jedes Gefäß vor. Pipettieren Sie **5 µl** gereinigte **DNA** oder **Control** Template dazu, um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen.

Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos pipettieren Sie die Proben in dieser Reihenfolge: Zuerst NTC, danach Ihre Proben, zuletzt die Positivkontrolle. Reaktionsgefäße sofort verschließen.

» **Anmerkung:** Vermeiden Sie Luftblasen im PCR-Ansatz und Fingerabdrücke auf den optischen Oberflächen der Reaktionsgefäße. Beides kann die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen. Falls nötig, zentrifugieren Sie die PCR-Ansätze kurz. «

### 8.3. PCR Programm

Programmieren Sie das real-time PCR Gerät wie vom Hersteller angegeben für „quantitation experiments with two targets / reporter dyes“. Stellen Sie die PCR-Ansätze in den Thermocycler und starten Sie folgendes Programm:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P** und andere Peltier-Heizblock-basierende **Geräte:**

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	37°C	10 min	Degradierung Uracil-haltiger DNA
1	95°C	2 min	Initiale Denaturierung
	95°C	5 sec	Denaturierung
45	<b>60°C</b>	30 sec	Annealing/Extension – <b>Datenaufnahme</b> im FAM- und HEX-Kanal

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Zyklen	Temp	Zeit	Schritt
1	37°C	10 min	Degradierung Uracil-haltiger DNA
1	95°C	2 min	Initiale Denaturierung
	95°C	5 sec	Denaturierung
45	<b>60°C</b> *für 36-well rotor: <b>56°C</b>	30 sec	Annealing/Extension – <b>Datenaufnahme</b> im Green und Yellow-Kanal



## 9. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Die erfolgreiche Amplifikation einer Probe kann als positives EC Signal im HEX-Kanal festgestellt werden. Die Anwesenheit / Abwesenheit einer EGFR c.2369C>T (p.T790M) Mutation in der Probe ist durch das Vorhandensein eines Signals im FAM-Kanal innerhalb bestimmter Bereiche definiert (siehe Tabelle Datenanalyse).

EGFR c.2369C>T **negative** cfDNA Proben zeigen eine Amplifikation ausschließlich im HEX-Kanal.

EGFR c.2369C>T **positive** cfDNA Proben zeigen eine Amplifikation im HEX-Kanal und FAM-Kanal, wobei  $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR [FAM]} - C_q \text{ EC [HEX]}) \leq 8$  zutreffen muss.

Fluoreszenzwerte und die korrespondierenden Amplifikationskurven werden von den meisten real-time PCR Auswerteprogrammen automatisch in „amplification plots“ dargestellt.

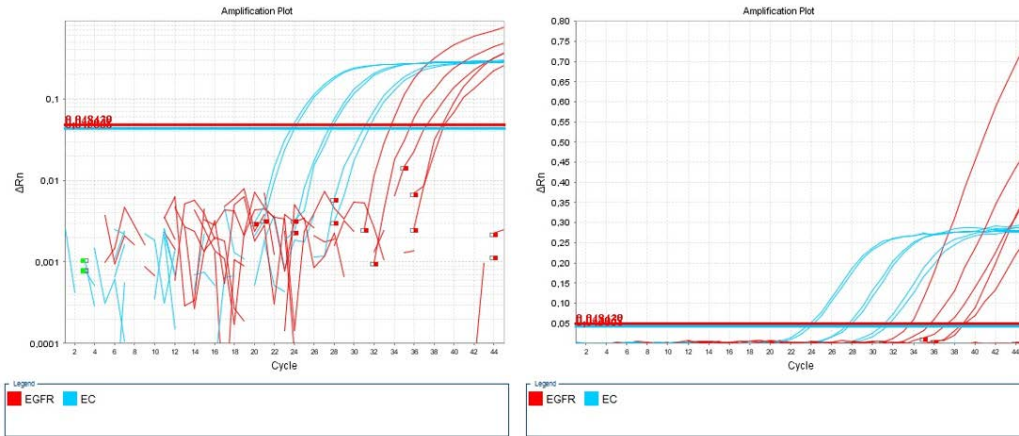
Datenanalyse		
Die Datenanalyse erfolgt automatisch durch die real-time PCR Instrumenten Software, wenn automatischer Schwellenwert ( <b>automatic threshold</b> ) und Basislinie ( <b>base-line setting</b> ) ausgewählt werden. Der Anwender muss die Einstellungen allerdings überprüfen und gegebenenfalls <b>threshold</b> und <b>base-line setting</b> korrigieren → siehe Abschnitt 10. Wichtige Information.		
Target	C <sub>q</sub>	Interpretation
EC [HEX]	22 - 32	Die Probe befindet sich innerhalb des Analysebereichs → ausreichend DNA (> 0.5ng / Reaktion).
	< 22	Überschuss an DNA → Probe verdünnen und Test wiederholen.
	> 32	Unzureichende Menge an cfDNA oder Anwesenheit eines PCR Inhibitors → es wird eine säulenbasierte Reinigung und Konzentrierung der Proben DNA empfohlen.
	N.A.	Die Probe enthält keine DNA.
EGFR c.2369C>T (p.T790M) [FAM]	20 - 37	Die Probe befindet sich innerhalb des Analysebereichs → führen Sie die $\Delta C_q$ Berechnung durch.
	35 - 37	Die Probe befindet sich innerhalb des Analysebereichs. Eine Wiederholung des Tests in Duplikaten wird jedoch empfohlen um die Anwesenheit derart geringer Mengen an mutierter cfDNA zu bestätigen.
	< 20	Überschuss an DNA → Probe verdünnen und Test wiederholen.
	> 37 oder N.A.	Die Probe ist EGFR c.2369C>T (p.T790M) negativ. FAM Signale mit C <sub>q</sub> > 37 stellen ko-amplifizierte EGFR Wildtyp-Fragmente dar.
Proben, welche die oben genannten Bedingungen <b>UND</b> $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR} - C_q \text{ EC}) \leq 8$ erfüllen, sind EGFR c.2369C>T (p.T790M) <b>positiv</b> . Ein $\Delta C_q > 8$ deutet auf ko-amplifizierten EGFR Wildtyp hin, und die Probe muss als EGFR c.2369C>T (p.T790M) <b>negativ</b> gewertet werden.		

Beispiele zur Ergebnisinterpretation		
C <sub>q</sub> Werte	Auswertung	Interpretation
HEX C <sub>q</sub> = 24 und FAM C <sub>q</sub> = 30	Beide Signale im Analysebereich und $\Delta C_q = 6$	Die Probe ist <b>positiv</b> für EGFR c.2369C>T.
HEX C <sub>q</sub> = 24 und FAM C <sub>q</sub> = 23	Beide Signale im Analysebereich und $\Delta C_q = -1$	
HEX C <sub>q</sub> = 24 und FAM C <sub>q</sub> = 32	Beide Signale im Analysebereich und $\Delta C_q = 8$	
HEX C <sub>q</sub> = 29 und FAM C <sub>q</sub> = 36	HEX Signal im Analysebereich. FAM signal > C <sub>q</sub> 35. $\Delta C_q = 7$	<b>Wiederholung des Tests</b> der Probe um eine geringfügige Menge an EGFR c.2369C>T Mutation zu bestätigen.
HEX C <sub>q</sub> = 30 und FAM C <sub>q</sub> = 37.5	HEX Signal im Analysebereich. FAM Signal außerhalb des Analysebereichs.	Die Probe ist EGFR c.2369C>T <b>negativ</b> . FAM C <sub>q</sub> > 37 deutet auf EGFR Wildtyp Ko-Amplifizierung.
HEX C <sub>q</sub> = 24 und FAM C <sub>q</sub> = 33	Beide Signale im Analysebereich und $\Delta C_q = 9$	Die Probe ist <b>negativ</b> für EGFR c.2369C>T ( $\Delta C_q > 8$ ).
HEX C <sub>q</sub> = 29 und FAM C <sub>q</sub> = N.A.	HEX Signal im Analysebereich. Kein FAM Signal.	Die Probe ist <b>negativ</b> für EGFR c.2369C>T.
HEX C <sub>q</sub> = 32.5 und FAM C <sub>q</sub> = N.A.	HEX Signal ausserhalb des Analysebereichs. Kein FAM Signal.	<b>Wiederholung des Tests</b> mit mehr DNA.

## 10. Wichtige Information

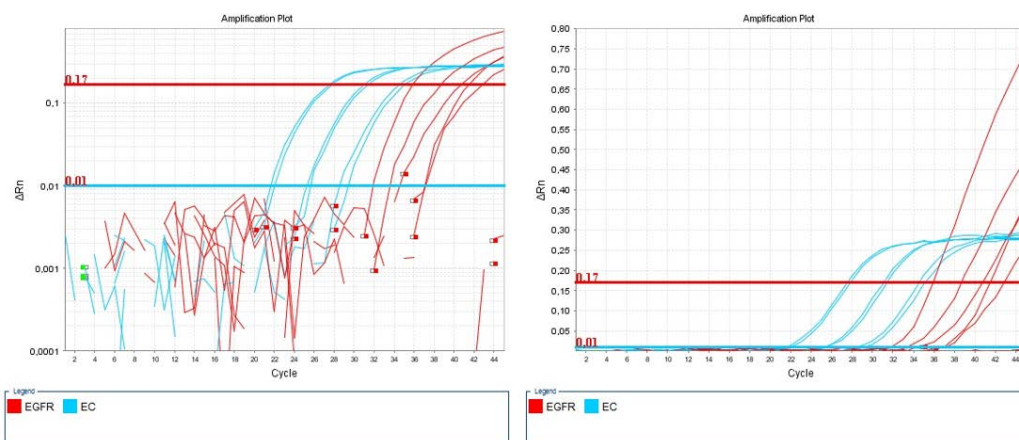
- Die Datenanalyseparameter gelten ausschließlich für cfDNA. Die Parameter können nicht angewendet werden um DNA zu analysieren, welche aus Formalin-fixiertem und Paraffin eingebetteten (FFPE) Probenmaterial extrahiert wurde.
- C<sub>q</sub> Werte < 22 für EC (HEX) oder < 20 für EGFR (FAM) können aufgrund eines Übermaßes an DNA in der Reaktion oder einer Kontamination mit PCR Produkten hervorgerufen werden.
- Abweichungen vom Protokoll (z.B. Änderung der Volumina oder Modifikation des PCR Programms) können den automatischen Schwellenwert und/oder die C<sub>q</sub> Werte verändern und somit zu falsch-positiven, oder falsch-negativen Ergebnissen führen.
- Dem Anwender wird geraten, die von der Software ausgegebenen Kurven visuell zu kontrollieren und die Richtigkeit der Schwellenwertsetzung (threshold setting) zu prüfen. Die manuelle Anpassung von "thresholds" und "baselines" muss nur erfolgen, wenn eine Intervention nötig ist (siehe Richtige Schwellenwertsetzung).

### Richtige Schwellenwert Setzung (logarithmische und lineare Ansicht)



Der automatische Schwellenwert ist korrekt in die exponentielle Phase der Amplifikationskurven gesetzt.

### Falsche Schwellenwert Setzung (logarithmische und lineare Ansicht)



Der automatische Schwellenwert der Kontrolle (blaue Linie) ist zu tief gesetzt. Der Schwellenwert von EGFR (rote Linie) ist zu hoch gesetzt. → Beide Schwellenwerte müssen durch den Anwender individuell in die exponentielle Phase der Amplifikationskurven gesetzt werden.

## 11. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Der Kit ist ausschließlich für *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Tragen Sie beim Hantieren der Proben und Reagenzien immer puderfreie Einweghandschuhe und geeignete Laborkleidung.
- Bereiche für die DNA Extraktion und den Ansatz des PCR Mastermixes sollten räumlich streng getrennt sein.
- Benützen Sie ein eigenes Pipettenset nur für den PCR-Ansatz und verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolfilter.
- Benützen Sie ausschließlich dünnwandige, gerätekompabile PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.



# EGFR T790M RealFast™ Assay

REF 8-110 / 8-113  $\Sigma$  100 / 32 réactions  
-30°C / -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilisation

Le EGFR T790M RealFast™ Assay est un test PCR en temps réel pour la détection qualitative de la mutation somatique c.2369C>T (p.T790M) dans l'exon 20 du gène pour le *récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)* humain. Le kit est conçu pour détecter cette mutation de résistance dans l'ADN libre circulant (ADNlc) provenant du plasma humain de patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC). Le test est un outil diagnostique qui permet de déterminer si les patients atteints de NSCLC sont en mesure de suivre un traitement par l'osimertinib (TAGRISSO™), inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) du EGFR. L'évaluation du statut EGFR T790M dans l'ADNlc à partir du plasma est recommandée chez les patients pour lesquels aucune biopsie tumorale ne peut être prélevée. Séquence de référence: NM\_005228.3; HGVS: c.2369C>T (p.T790M); Cosmic ID: 6240.

## 2. Introduction

Le récepteur EGFR joue un rôle important dans la division et la croissance cellulaire grâce à l'activation des voies de signalisation Ras-Raf-MAPK. Les mutations du EGFR dans les exons 18, 19, 20 et 21 surviennent chez des patients atteints de NSCLC avec une prévalence de 10 à 30 %. Les plus importantes mutations activatrices du EGFR sont les délétions de l'exon 19 et la mutation L858R de l'exon 21, et les patients atteints de NSCLC qui présentent des mutations activatrices du EGFR peuvent bénéficier d'un traitement par inhibiteurs TK EGFR. Environ 50 % des patients atteints de NSCLC résistants aux inhibiteurs TK sont porteurs de la mutation T790M. Des études cliniques ont montré que le traitement par l'osimertinib présente une alternative pour les patients positifs au T790M.

## 3. Composants du kit

100 / 32 Rxn  
RealFast™ 2x Probe Mix 1 vial  couvercle blanc 1000 / 320 µl  
EGFR T790M Assay Mix 1 vial  couvercle violet 550 / 550 µl  
EGFR T790M Positive Control 1 vial  couvercle vert 75 / 75 µl

Le RealFast™ 2x Probe Mix comprend HotStart Taq DNA polymerase et des dNTPs dans un système tampon optimisé. Le Assay Mix EGFR T790M se compose de primers spécifiques de gènes, de sondes d'hydrolyse à double marquage pour le gène *EGFR* et d'un contrôle endogène (EC), le bloqueur de type sauvage EGFR, et de uracile N-glycosylase pour minimiser le risque de contamination croisée. Il comprend également un témoin positif T790M pour le gène mutant EGFR et EC de contrôle endogène.

Le kit comprend des réactifs pour 100 / 32 réactions de chacune d'un volume final de 20 µl.

## 4. Stockage et stabilité

Le EGFR T790M RealFast™ Assay est livré sur des blocs de refroidissement. Stockez le kit après réception de -30 à -15°C. Ou bien si vous l'utilisez à court terme en l'espace d'un mois, conservez-le de 2 à 8°C. Les réactifs perdurent sans perdre leur activité jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation. Evitez les expositions prolongées à la lumière directe. Stocké de manière correcte, le kit conserve toute sa fonctionnalité jusqu'à la date de péremption indiquée.

## 5. Description du produit

### 5.1. Principe du test

Le test repose sur un test fluorogène à la nucléase 5', connu aussi sous le nom de TaqMan®-Assay. Chaque réaction contient des paires de primers gène-spécifiques pour amplifier un fragment 92 bp dans l'exon 20 du *EGFR* et un fragment 147 bp d'un contrôle endogène (EC). Les autres composants sont deux sondes hydrolyses gène-spécifiques munies d'un double marqueur, la sonde **EGFR marquée FAM** et la sonde de **contrôle EC marquée HEX**, qui s'hybrident à la séquence cible du fragment correspondant. La proximité directe entre les indicateurs fluorescents 5' et les colorants 3' sur une sonde intacte inhibe la fluorescence. Au cours de la PCR l'activité exonucléase 5' – 3' de la polymérase ADN Taq clive l'indicateur fluorescent 5' de l'échantillon hybridisé. La séparation spatiale du fluorophore du quencher provoque un signal fluorescent en temps réel, qui est proportionnel à la quantité du produit de la PCR.

Le contrôle endogène (CE) sert de contrôle positif de la PCR et de paramètre pour évaluer la positivité du EGFR c.2369C>T (p.T790M) située dans une certaine limite définie par  $\Delta C_q (C_{q\ EGFR} - C_{q\ EC}) \leq 8$ .

### 5.2. Compatibilité avec les machines de la PCR temps réel

Le EGFR T790M RealFast™ est homologué pour une utilisation avec l'appareil AB 7500 Fast.

Le kit est compatible avec différentes machines de la PCR en temps réel standards du commerce capables de détecter la fluorescence FAM et HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycloer (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Remarque:** RealFast™ Variant Detection QuickGuides pour la programmation et l'exploitation des résultats des tests sur différents types d'appareils peuvent être téléchargés sur le site: [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

Lors de l'utilisation d'AB 7500 Fast, StepOne™ ou Mx3005P, définissez le colorant de référence passif sur "ROX" ! «.

Le kit est fourni avec **faible ROX**. Pour l'utilisation d'appareils PCR en temps réel nécessitant une haute concentration pour la normalisation des données (par ex. Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), il faut ajouter du ROX dans une concentration finale de 1 µM à 2x Probe Mix.

### 5.3. Spécifications du test

La **sensibilité** a été déterminée à partir de 24 échantillons, qui ont été testées positives à l'allèle EGFR T790M à partir d'un test de référence certifié CE.

Le RealFast™ Assay EGFR T790M a testé 22 échantillons comme positifs = 91,7 % de taux positif correct.

La spécificité a été déterminée à partir de 32 échantillons qui ont été typés négatifs avec un test de référence comme T790M EGFR. Le EGFR T790M RealFast™ Assay a testé 31 échantillons avec un taux négatif = 96,9 % de taux négatif correct.

Limite de détection : 8 copies mutantes d'EGFR T790M dans un fond de 2,5 ng d'ADNlc de type sauvage par réaction.

Concentration d'ADN recommandée: 0,5 à 10 ng/µl ADNlc

## 6. Matériel nécessaire, mais non fourni

Appareil de la PCR en temps réel avec des filtres FAM (520 nm) et HEX (556 nm), tubes PCR optiques compatibles avec l'appareil, gants non-poudrés à usage unique, vortexer, minicentrifugeuse pour des tubes de 2.0 ml, racks pour tubes, set de micropipettes calibrées (0.5 – 1000 µl), des pointes de pipettes stériles avec des filtres aérosol, eau ultrapure, système d'extraction d'ADN, réfrigérateur et congélateur, contenant pour déchets biomédicaux. Equipement pour le prélèvement de sang, la préparation de plasma et l'isolement de l'ADNlc.

## 7. Préparation des échantillons et extraction de l'ADNlc

L'échantillon est isolé à partir de l'ADNlc de plasma humain frais ou congelé.

### 7.1 Préparation du plasma

Le prélèvement de 9 ml de sang périphérique dans les tubes EDTA s'effectue selon les instructions du fabricant. Pour minimiser la dégradation de l'ADNlc et la lyse des leucocytes, il faut éviter de secouer inutilement l'ADNlc. La préparation du plasma EDTA doit être effectuée **dans l'heure qui suit** le prélèvement sanguin conformément au protocole suivant :

- Centrifugation du sang pendant 10 minutes à 1 600 x g dans une centrifugeuse à rotor pivotant.
- Transfert de la fraction plasmatique (surnageant) dans des tubes adaptés à la centrifugation à grande vitesse.

» **Remarque:** *Le transfert de leucocytes contaminants doit être évité. L'ADN libéré des leucocytes lysés augmente le fond de l'ADN génomique et dilue ainsi l'ADNlc cible.* «

- Centrifugation du plasma pendant 10 minutes à 16 000 x g dans une centrifugeuse à rotor angulaire.
- Transfert du surnageant dans des tubes frais, en évitant le contact et le transfert du sédiment.
- Congélation du plasma entre -40°C et -80°C, ou extraction immédiate de l'ADNlc.

» **Remarque:** *Si d'autres tubes sont utilisés à la place du EDTA (p. ex. les tubes PAXgene® Blood ccfDNA ou les tubes STRECK Cell-Free DNA BCT®, suivre les instructions du fabricant pour le prélèvement, le stockage et la préparation du plasma.* «

### 7.2. Extraction de l'ADN

Les réactifs d'extraction d'ADN ne sont **pas inclus** dans le kit.

Nous recommandons le kit d'extraction cfDNA ViennaLab [REF 2-040] pour l'extraction d'ADNlc de 4 ml de plasma doublement centrifugé. Le EGFR T790M RealFast™ Assay nécessite 2,5 à 50 ng ADNlc par réaction. La concentration d'ADNlc dans le plasma humain est généralement très faible. Il est donc recommandé d'utiliser des méthodes très sensibles (par exemple, le test Qubit dsDNA HS Assay) pour la quantification de l'ADNlc.

Il faut s'assurer que la concentration, la pureté et l'intégrité de l'ADN extrait conviennent à l'amplification. Le transfert négligent de résidus de lavage pendant l'extraction de l'ADN peut interférer avec l'analyse de l'ADNlc. Pour une analyse fiable de l'ADNlc, la concentration de l'échantillon doit être d'au moins 0,5 ng/µl.

» **Remarque:** *La quantification UV-VIS ou par fluorescence de l'ADNlc avec une concentration inférieure à 0,2 ng/µl est sujette aux erreurs et peut donc être inexacte. Les échantillons ayant un  $C_{q_{EC[HEX]}} \leq 32$  conviennent à l'analyse avec le EGFR T790M RealFast™ Assay.* «

## 8. Procédure

### 8.1. Contrôle de la PCR

Incluez **toujours** un **No Template Control** (NTC) dans chaque test pour contrôler la présence d'éventuelles contaminations. Il est recommandé d'effectuer les NTC (utilisez une eau ultrapure à la place de l'ADN) comme duplicat.

Incluez **toujours** le EGFR T790M **Positive Control** comme signal de référence positif pour des échantillons inconnus.

» **Remarque:** *les échantillons de contrôle représentent des sources de contaminations éventuelles, il faut donc veiller à les manipuler avec le plus grand soin.* «

### 8.2. Préparation du EGFR T790M RealFast™ Master Mix

Décongelez complètement toutes les solutions, centrifugez-les brièvement après les avoir mélangées avec précaution. La réalisation de la PCR s'effectue à température ambiante. Préparez suffisamment de **Master Mix** pour le nombre total d'amorces PCR prévues (N échantillons + contrôles positifs + contrôles négatifs) et calculez en plus au moins une réaction supplémentaire pour compenser une imprécision de pipetage:

Composants	Par réaction	Par ex. 24+1 réactions
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	250 µl
EGFR T790M Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

Mettez **15 µl** de **Master Mix** dans chaque godet. Pipetez et ajoutez **5 µl** d'**ADN** ou de **Control** Template pour obtenir un volume final de 20 µl.

Pour minimiser les risques de contaminations, pipetez les échantillons dans cet ordre: premièrement NTC, ensuite les échantillons, et finalement les contrôles positifs. Fermez immédiatement les récipients de réaction.

» **Remarque:** *évités les bulles d'air dans les mélanges finaux de réaction et les empreintes digitales sur les surfaces optiques des récipients de réaction qui peuvent toutes les deux altérer la mesure de la fluorescence. Centrifugez si nécessaire.* «

### 8.3. Programme de la PCR

Programmez la machine PCR en temps réel comme indiqué par le fabricant pour les expériences de quantification. Mettez les échantillons PCR dans le thermocycleur et lancez le programme suivant:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P**  
et autres machines reposant sur le bloc thermique Peltier:

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	37°C	10 min	Dégradation de l'ADN contenant de l'uracile
1	95°C	2 min	Dénaturation initiale
45	95°C	5 sec	Dénaturation
	<b>60°C</b>	30 sec	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> dans le canal FAM et HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Cycles	Temp	Durée	Etape
1	37°C	10 min	Dégradation de l'ADN contenant de l'uracile
1	95°C	2 min	Dénaturation initiale
45	95°C	5 sec	Denaturation
	<b>60°C</b> *)for 36-well rotor: <b>56°C</b>	30 sec	Annealing/Extension – <b>Réception de données</b> dans le canal Green et Yellow

## 9. Analyse des données / interprétation des résultats

Un signal EC positif dans le canal HEX indique que l'amplification d'un échantillon a réussi. La présence ou l'absence d'une mutation EGFR c.2369C>T (p.T790M) dans l'échantillon est définie par la présence d'un signal dans le canal FAM dans certaines plages (voir analyse des données du tableau).

Les échantillons d'EGFR c.2369C>T **négatifs** ADNlc montrent une amplification exclusivement dans le canal HEX.

Les échantillons d'EGFR c.2369C>T **positifs** ADNlc montrent une amplification dans le canal HEX et le canal FAM, où la valeur  $\Delta C_q$  doit être  $(C_{q \text{ EGFR [FAM]}} - C_{q \text{ EC [HEX]}}) \leq 8$ .

Les valeurs de fluorescence et les courbes d'amplification correspondantes sont automatiquement affichées dans les courbes d'amplification par la plupart des programmes d'évaluation PCR en temps réel.

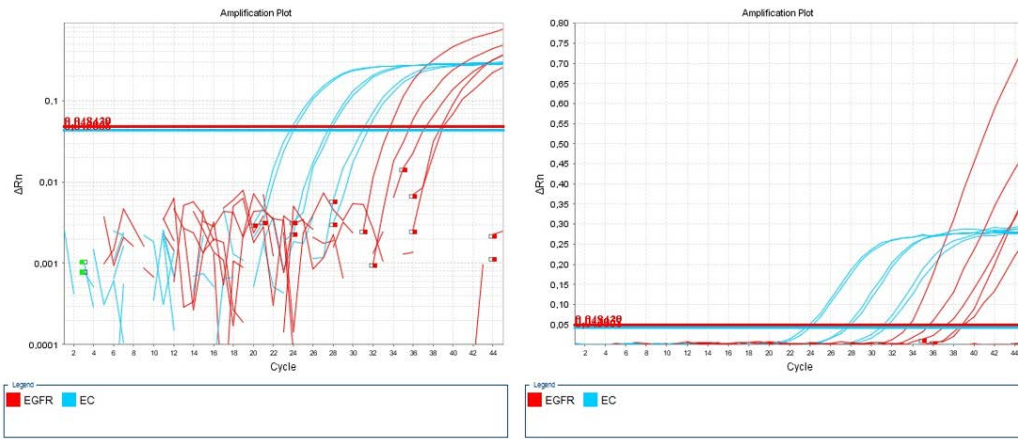
Analyse des données		
L'analyse des données se fait automatiquement par le logiciel des instruments de PCR en temps réel quand le seuil automatique ( <b>automatic threshold</b> ) et le réglage de base ( <b>base-line setting</b> ) sont sélectionnés. Cependant, l'utilisateur doit vérifier les réglages et corriger les réglages du seuil ( <b>threshold</b> ) et les réglages ( <b>base-line setting</b> ) si nécessaire → voir chapitre 10 - Informations importantes.		
Target	$C_q$	Interprétation
EC [HEX]	22 - 32	L'échantillon se trouve dans la zone d'analyse → ADN en quantité suffisante (> 0,5ng / réaction)
	< 22	excès d'ADN → diluer l'échantillon et répéter le test
	> 32	Quantité insuffisante d'ADNlc ou présence d'un inhibiteur de la PCR → nous conseillons la purification à base de colonnes et la concentration des échantillons d'ADN
	N.A.	L'échantillon ne contient pas d'ADN
EGFR c.2369C>T (p.T790M) [FAM]	20 - 37	L'échantillon se trouve dans la zone d'analyse → Effectuer le calcul du $\Delta C_q$
	35 - 37	L'échantillon se situe dans la zone d'analyse. Cependant, il est recommandé de répéter le test en double pour confirmer la présence de si petites quantités de ADNlc mutant.
	< 20	excès d'ADN → diluer l'échantillon et répéter le test
	> 37 ou N.A.	L'échantillon est EGFR c.2369C>T (p.T790M) négatif. Les signaux FAM avec $C_q > 37$ représentent des fragments d'EGFR de type sauvage co-amplifiés.
Les échantillons répondant aux conditions ci-dessus <b>ET dont le <math>C_q</math> (<math>C_{q \text{ EGFR}} - C_{q \text{ EC}}</math>) est <math>\leq 8</math> sont positifs</b> au C.2369C>T (p.T790M) du EGFR. Un $\Delta C_q > 8$ indique la co-amplification de fragments d'EGFR de type sauvage et que l'échantillon doit être considéré comme EGFR c.2369C>T (p.T790M) <b>négatif</b> .		

Exemples pour l'interprétation des résultats		
Valeurs $C_q$	Résultat	Interprétation
HEX $C_q = 24$ und FAM $C_q = 30$	Les deux signaux dans la zone d'analyse et $\Delta C_q = 6$	L'échantillon est <b>positif</b> pour EGFR c.2369C>T.
HEX $C_q = 24$ und FAM $C_q = 23$	Les deux signaux dans la zone d'analyse et $\Delta C_q = -1$	
HEX $C_q = 24$ und FAM $C_q = 32$	Les deux signaux dans la zone d'analyse et $\Delta C_q = 8$	
HEX $C_q = 29$ und FAM $C_q = 36$	Signal HEX dans la zone d'analyse Signal FAM > $C_q$ 35. $\Delta C_q = 7$	<b>Répétition du test de l'échantillon</b> pour confirmer une petite quantité de mutation EGFR c.2369C>T.
HEX $C_q = 30$ und FAM $C_q = 37.5$	Signal HEX dans la zone d'analyse Signal FAM hors de la zone d'analyse	L'échantillon est <b>négatif</b> pour EGFR c.2369C>T. FAM $C_q > 37$ indique la co-amplification du EGFR de type sauvage.
HEX $C_q = 24$ und FAM $C_q = 33$	Les deux signaux dans la zone d'analyse et $\Delta C_q = 9$	L'échantillon est <b>négatif</b> pour EGFR c.2369C>T ( $\Delta C_q > 8$ ).
HEX $C_q = 29$ und FAM $C_q = \text{N.A.}$	Signal HEX Signal dans la zone d'analyse Pas de signal FAM Signal.	L'échantillon est <b>négatif</b> pour EGFR c.2369C>T.
HEX $C_q = 32.5$ und FAM $C_q = \text{N.A.}$	Signal HEX hors de la zone d'analyse. Pas de signa FAM Signal.	<b>Répétition du test</b> avec davantage d'ADN.

## 10. Informations importantes

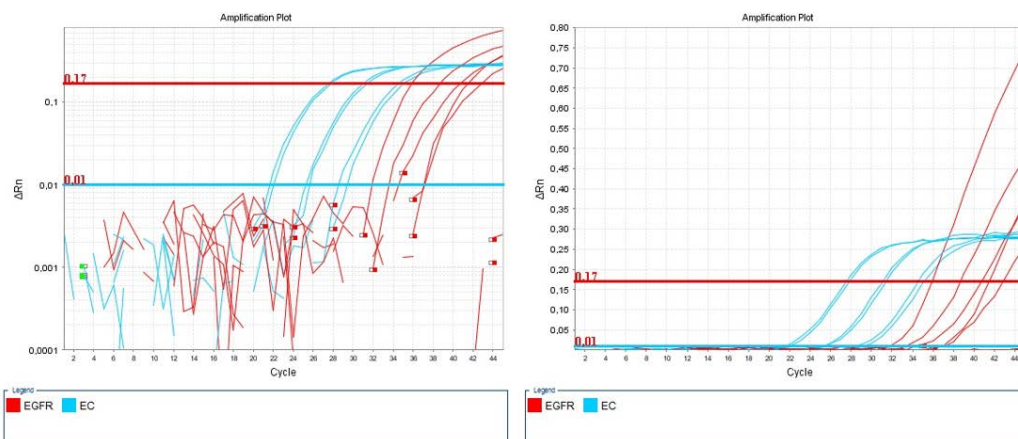
- Les paramètres d'analyse des données s'appliquent exclusivement au ADNlc. Les paramètres ne peuvent pas être utilisés pour analyser l'ADN extrait d'un échantillon fixé à la formaline et incorporé à la paraffine (FFPE).
- Les valeurs de  $C_q < 22$  pour la CE (HEX) ou  $< 20$  pour l'EGFR (FAM) peuvent être imputables à un excès d'ADN dans la réaction ou à une contamination par des produits PCR
- Des écarts par rapport au protocole (par ex. changement de volume ou modification du programme PCR) peuvent modifier la valeur seuil automatique et/ou les valeurs  $C_q$  et entraîner des résultats faux positifs ou faux négatifs.
- Il est conseillé à l'utilisateur de vérifier visuellement les courbes délivrées par le logiciel et de vérifier l'exactitude du réglage du seuil (threshold setting). Le réglage manuel des seuils "thresholds" et des baes "baselines" ne doit être effectué que si une intervention est nécessaire (voir Réglage correct des seuils).

### Réglage **correct** de la valeur seuil (vue logarithmique et linéaire)



La valeur seuil automatique est correctement réglée dans la phase exponentielle des courbes d'amplification

### Réglage **incorrecte** de la valeur seuil (vue logarithmique et linéaire)



Le seuil automatique de la commande (ligne bleue) est réglé trop bas. La valeur seuil de l'EGFR (ligne rouge) est trop élevée. Les deux valeurs seuils doivent être réglées individuellement par l'utilisateur dans la phase exponentielle des courbes d'amplification.

## 11. Mises en garde et précautions

- Le kit est à utiliser uniquement pour des diagnostics *in vitro*.
- Pour manipuler les échantillons et les réactifs, mettez toujours des gants poudrés à usage unique et des vêtements de laboratoire appropriés.
- Effectuez l'extraction de l'ADN dans un endroit strictement séparé de celui où vous réalisez la préparation de la PCR.
- Utilisez un jeu de pipettes uniquement destiné à la préparation de la PCR et utilisez des pointes de pipettes avec un filtre aérosol.
- Utilisez uniquement des récipients PCR compatibles avec la machine, aux parois fines, avec un couvercle approprié à faire des mesures optiques.
- Ne mélangez pas de réactifs avec différents numéros de lot.
- N'utilisez pas de kits et de composants de kit périmés.

# EGFR T790M RealFast™ Assay

REF 8-110 / 8-113  $\Sigma$  100 / 32 reazioni  
-30°C -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Utilizzo

L'EGFR T790M RealFast™ Assay è un test in tempo reale, basato sulla PCR, per la rilevazione qualitativa della mutazione somatica c.2369C>T (p.T790M) nell'esone 20 del gene umano del *Recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR)*. Il kit è progettato per identificare la mutazione di resistenza nel DNA (cfDNA) circolante libero da cellule, derivato dal plasma umano di pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Il test è uno strumento diagnostico complementare a supporto della selezione di pazienti con NSCLC candidabili alla terapia con osimertinib (TAGRISSO™), un inibitore della tirosin chinasi (TKI) dell'EGFR. La valutazione dello stato della mutazione T790M dell'EGFR nel cfDNA plasmatico viene suggerita ai pazienti non idonei alla biopsia tumorale.  
Sequenza di riferimento: NM\_005228.3; HGVS: c.2369C>T (p.T790M); Cosmic ID: 6240.

## 2. Introduzione

L'EGFR svolge un ruolo essenziale nella proliferazione e nella crescita cellulare mediante l'attivazione del pathway Ras-Raf-MAPK. Le mutazioni dell'EGFR negli esoni 18, 19, 20 e 21 si osservano nei pazienti affetti da NSCLC con una prevalenza compresa tra il 10 e il 30%. Le principali mutazioni attivanti l'EGFR sono delezioni dell'esone 19 e, nel caso della mutazione L858R, dell'esone 21. I pazienti affetti da NSCLC con mutazioni attivanti l'EGFR possono trarre beneficio dalla terapia con EGFR TKI. Ciò nonostante, circa il 50% dei pazienti con NSCLC che acquisiscono resistenza ai TKI (per es. erlotinib) presentano la mutazione T790M. Secondo studi clinici, il trattamento a base di osimertinib costituisce un'opzione/terapia alternativa per i pazienti T790M-positivi.

## 3. Contenuto del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Probe Mix	1 fiala □ tappo bianco	1000 / 320 µl
EGFR T790M Assay Mix	1 fiala ■ tappo viola	550 / 550 µl
EGFR T790M Positive Control	1 fiala ■ tappo verde	75 / 75 µl

Il kit contiene reagenti per 100 / 32 reazioni in un volume finale di 20 µl ciascuno.

Il RealFast™ 2x Probe Mix include la HotStart Taq DNA polymerase e i dNTP in un sistema tampone ottimizzato. L'EGFR T790M Assay Mix consiste di primer gene-specifici di sonde di idrolisi a doppia etichetta per l'EGFR e un gene di controllo endogeno (EC), di un soppressore di tipo selvatico dell'EGFR e di uracil-N-glicosilasi al fine di minimizzare il rischio di prodotti PCR cross-contaminanti. Con il kit viene fornito un controllo sintetico positivo alla mutazione EGFR T790M che rappresenta l'EGFR mutato e il gene EC.

## 4. Conservazione e stabilità

L'EGFR T790M RealFast™ Assay viene inviato su blocchi refrigeranti. Al suo arrivo, conservare il kit da -30 a -15°C. In alternativa, il kit può essere conservato a una temperatura tra i 2 e gli 8°C per un uso a breve termine entro un mese. Il kit sopporta fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza perdita di attività. Evitare un'esposizione prolungata a luce intensa. Se conservato in modo adeguato, il kit manterrà piena attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

## 5. Descrizione del prodotto

### 5.1. Principio del Test

Il test è basato sul saggio fluorogenico della 5' nucleasi, anche denominato TaqMan® Assay. Ciascuna reazione contiene coppie di primer gene-specifici che amplificano un frammento di 92 bp nell'esone 20 del gene *EGFR* e un frammento di 147 bp del gene di controllo endogeno (EC). Tra le altre componenti vi sono due sonde di idrolisi gene-specifiche a doppia etichetta (la **sonda EGFR marcata con FAM** e la **sonda EC marcata con HEX**), che ibridano con la sequenza target del frammento corrispondente. La prossimità del reporter fluorescente in 5' e del quencher colorante in 3' sulle sonde intatte induce la soppressione della fluorescenza del reporter. Durante la fase di estensione della PCR, l'attività 5' – 3' esonucleasica della Taq DNA polimerasi cliva il reporter fluorescente in 5' dalla sonda ibridata. La separazione fisica del fluoroforo dal quencher colorante genera un segnale fluorescente in tempo reale, che è proporzionale al prodotto della PCR accumulato. L'EC funge da controllo positivo per la PCR e da parametro per valutare la positività dell'EGFR c.2369C>T (p.T790M) entro l'intervallo di valori o tramite la determinazione di un valore  $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR} - C_q \text{ EC}) \leq 8$ .

### 5.2. Compatibilità dello strumento Real-time PCR

L'EGFR T790M RealFast™ Assay è validato per l'utilizzo con lo strumento AB 7500 Fast.

Il kit è compatibile con vari strumenti comuni Real-time PCR in grado di registrare la fluorescenza FAM e HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** Le RealFast™ Variant Detection QuickGuide per l'allestimento e l'analisi di esperimenti su strumenti di tipo diverso possono essere scaricate dal sito [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

Quando si utilizza AB 7500 Fast, StepOne™ o Mx3005P impostano il colorante di riferimento passivo su "ROX" ! «

Il kit viene fornito con **ROX basso**, per utilizzare il kit con strumenti Real-time PCR che richiedono un ROX elevato per la normalizzazione dei dati (per es. strumenti Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), aggiungere ROX in una concentrazione finale di 1 µM al 2x Probe Mix.

### 5.3. Specifiche delle prestazioni dell'Assay

La determinazione della **sensibilità** è stata eseguita su 24 campioni risultati positivi per la mutazione T790M dell'EGFR con un metodo di riferimento. L'EGFR T790M RealFast™ Assay ha determinato la positività di 22 campioni, con una percentuale di veri positivi pari al 91,7%.

La determinazione della **specificità** è stata eseguita su 32 campioni risultati negativi per la mutazione T790M dell'EGFR con un metodo di riferimento. L'EGFR T790M RealFast™ Assay ha determinato la negatività di tutti i 31 campioni, con una percentuale di veri negativi pari al 96,9%.

Limite di rilevazione: 8 copie mutanti dell'EGFR T790M su uno sfondo di 2.5 ng di cfDNA di tipo selvatico per reazione.

Concentrazione di DNA raccomandata: da 0.5 a 10 ng/µl di cfDNA.

## 6. Materiali richiesti ma non forniti

Strumento Real-time PCR con filtri FAM (520 nm) e HEX (556 nm), contenitori di reazione da compatibili con lo strumento, guanti monouso senza polvere, vortex, minicentrifuga per provette da 2.0 ml, portaprovette, set di micropipette calibrate (0.5 – 1000 µl), punte sterili con filtro barriera antiaerosol, acqua di grado molecolare, sistema per l'estrazione del DNA, congelatore, contenitore per rifiuti biologici. Attrezzature per prelievo di sangue, preparazione del plasma e isolamento del cfDNA.

## 7. Manipolazione dei campioni ed estrazione del cfDNA:

I campioni devono consistere di cfDNA isolato da plasma umano **fresco** o **congelato**.

### 7.1 Preparazione del plasma

Raccogliere 9 ml di sangue periferico in provette EDTA seguendo le istruzioni del produttore. Evitare scuotimenti al fine di limitare il degrado del cfDNA e la lisi dei leucociti. Procedere alla preparazione del plasma EDTA **entro un'ora** dal prelievo ematico in base al seguente protocollo:

- Centrifugare per 10 minuti a 1.600 x g in una centrifuga a rotore oscillante.
- Trasferire la frazione plasmatica (surnatante) in provette idonee per la centrifugazione ad alta velocità.

» **Nota:** Evitare il carry-over di cellule poiché la contaminazione leucocitaria può aumentare lo sfondo del DNA genomico diluendo così il cfDNA target. «

- Centrifugare il plasma per 10 minuti a 16.000 x g in una centrifuga ad angolo fisso.
- Trasferire il surnatante in provette nuove evitando il contatto e il potenziale trasferimento del *pellet*.
- Congelare il plasma a temperature comprese tra -40°C e -80°C oppure procedere immediatamente all'estrazione del cfDNA.

» **Nota:** Qualora siano utilizzate provette per la raccolta ematica diverse da quelle EDTA, per esempio provette PAXgene® Blood ccfDNA oppure provette STRECK Cell-Free DNA BCT®, seguire le rispettive istruzioni del produttore per il prelievo ematico, le condizioni di stoccaggio e la preparazione del plasma. «

### 7.2. Estrazione del DNA

I reagenti per l'estrazione del DNA **non sono forniti** con il kit.

Per l'estrazione del cfDNA da 4 ml di plasma trattato con doppia centrifugazione, si raccomanda l'uso del Kit per l'estrazione del cfDNA plasmatico ViennaLab [REF 2-040]. L'EGFR T790M RealFast™ Assay richiede 2.5 – 50 ng di cfDNA per reazione. La concentrazione del cfDNA nel plasma umano è solitamente molto bassa. Si raccomanda, pertanto, l'uso di una metodica ad elevata sensibilità (per es. Qubit dsDNA HS Assay) per la quantificazione del cfDNA.

Accertarsi che il DNA estratto sia idoneo per l'amplificazione dal punto di vista della concentrazione, della purezza e dell'integrità. Il carry-over accidentale di residui di tamponi di lavaggio durante l'estrazione del DNA può interferire con l'analisi del cfDNA. Per un'analisi affidabile, la concentrazione del cfDNA del campione dev'essere almeno pari a 0.5 ng/μl.

» **Nota:** L'UV-VIS o la quantificazione del cfDNA basata sulla fluorescenza al di sotto di 0.2 ng/μl è soggetta ad errori e può quindi essere inaccurata. Tuttavia, nel caso dell'EGFR T790M RealFast™ Assay, i campioni che presentano un  $C_{q_{EC [HEX]}} \leq 32$  possono essere sottoposti ad analisi. «

## 8. Protocollo sperimentale

### 8.1. Controlli della PCR

Includere **sempre** un **No Template Control (NTC)** in ciascun esperimento per confermare l'assenza di potenziali contaminazioni. E' consigliabile condurre l'NTC in duplicato (utilizzare acqua di grado PCR invece di DNA).

Includere **sempre** l'EGFR T790M **Positive Control** come segnale di riferimento positivo per i campioni non noti.

» **Nota:** I campioni di controllo costituiscono potenziali fonti di contaminazione. Assicuratevi di maneggiarli con cautela. «

### 8.2. Preparazione del Master Mix delle EGFR T790M RealFast™:

Una volta scongelate, vortexare leggermente e centrifugare brevemente tutte le soluzioni. Allestire la PCR a temperatura ambiente. Preparare una quantità di **Master Mix** che sia sufficiente per tutte le reazioni (N campioni + controlli positivi + controlli negativi) nonché almeno una reazione aggiuntiva per rimediare a eventuali imprecisioni nel pipettaggio:

Componenti	per reazione	Per es. 24+1 reazioni
RealFast™ 2x Probe Mix	10 μl	250 μl
EGFR T790M Assay Mix	5 μl	125 μl
<b>Master Mix</b>	<b>15 μl</b>	<b>375 μl</b>

Dispensare **15 μl** di **Master Mix** in ciascun pozzetto. Aggiungere **5 μl** di **DNA** purificato o di **Control** template per ottenere un volume di reazione finale di 20 μl.

Minimizzare il rischio di contaminazione, pipettare sempre i template nel seguente ordine: prima l'NTC, quindi i campioni e, per ultimi, i controlli positivi. Chiudere immediatamente i contenitori di reazione.

» **Nota:** Evitare la creazione di bolle nel mix di reazione finale ed evitare di toccare la superficie ottica del tappo o la pellicola sigillante senza guanti. Entrambi possono interferire con le misurazioni della fluorescenza. Centrifugare brevemente se necessario. «

### 8.3. Programma della PCR

Programmare lo strumento Real-time PCR secondo le istruzioni del fabbricante per gli esperimenti di quantificazione. Collocare i campioni nel termociclatore e svolgere il seguente programma:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P e altri strumenti Peltier basati su blocco di riscaldamento:**

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	37°C	10 min	Degrado del DNA contenente uracile
1	95°C	2 min	Denaturazione iniziale
45	95°C	5 sec	Denaturazione
	60°C	30 sec	Annealing/Estensione –
			<b>Acquisizione dei dati</b> nel canale FAM e HEX

**MIC qPCR Cyclers, Rotor-Gene® 6000\*):**

Cicli	Temp	Tempo	Step
1	37°C	10 min	Degrado del DNA contenente uracile
1	95°C	2 min	Denaturazione iniziale
45	95°C	5 sec	Denaturazione
	60°C *for 36-well rotor: 56°C	30 sec	Annealing/Estensione –
			<b>Acquisizione dei dati</b> nel canale Green e Yellow



## 9. Analisi dei dati / Interpretazione dei risultati

Una buona riuscita dell'amplificazione di un campione può essere verificata mediante un segnale positivo dell'EC nel canale HEX. La presenza o l'assenza di una mutazione c.2369C>T (p.T790M) dell'EGFR nel campione è definita dal verificarsi di un segnale nel canale FAM all'interno di certi limiti (cfr. Tabella dell'Analisi dei dati)

I campioni di cfDNA **negativi** per l'EGFR c.2369C>T presentano un'amplificazione soltanto nel canale HEX.

I campioni di cfDNA **positivi** per l'EGFR c.2369C>T presentano un'amplificazione nei canali FAM e HEX, essi mostrano un  **$\Delta$  calcolato**  $C_q (C_{q\ EGFR\ [FAM]} - C_{q\ EC\ [HEX]}) \leq 8$ .

I livelli di fluorescenza e le corrispondenti curve di amplificazione vengono rappresentati automaticamente nei grafici di amplificazione del software Real-time PCR.

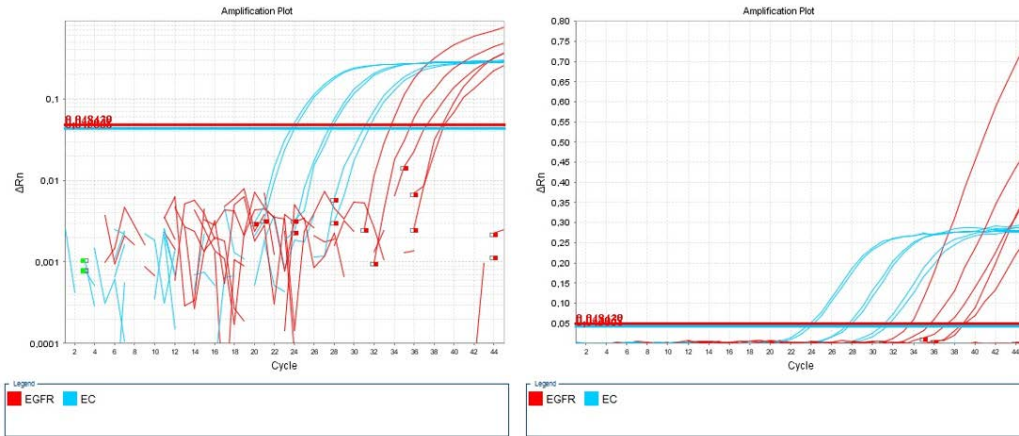
Analisi dei dati		
L'analisi dei dati viene effettuata automaticamente dal software dello strumento Real-time PCR selezionando la <b>soglia automatica</b> e le <b>impostazioni di base</b> . L'utente deve comunque verificare l'impostazione corretta dei valori di soglia e di base →. Cfr sezione 10. Informazioni importanti.		
Target	$C_q$	Interpretazione
EC [HEX]	22 - 32	Il campione è compreso nell'intervallo di analisi → il DNA template è sufficiente (> 0.5ng / reazione)
	< 22	Eccesso di DNA template → diluire il campione e ripetere il test
	> 32	Quantità insufficienti di cfDNA o presenza di inibitori della PCR → si raccomanda la purificazione su colonna e la concentrazione del campione di DNA
	N.A.	Il campione non contiene alcun DNA <i>template</i>
EGFR c.2369C>T (p.T790M) [FAM]	20 - 37	Il campione è compreso nell'intervallo di analisi → effettuare il calcolo di $\Delta C_q$
	35 - 37	Il campione è compreso nell'intervallo di analisi. Tuttavia, al fine di confermare la presenza di cfDNA mutato a un livello basso, si raccomanda di ripetere il test due volte.
	< 20	Eccesso di DNA template → diluire il campione e ripetere il test
	> 37 o N.A.	Il campione è negativo per EGFR c.2369C>T (p.T790M). I segnali FAM $C_q > 37$ rappresentano frammenti di EGFR di tipo selvatico coamplificato.
I campioni che rispondono <b>sia</b> ai suddetti requisiti <b>sia</b> alla condizione $\Delta C_q (C_{q\ EGFR} - C_{q\ EC}) \leq 8$ sono <b>positivi</b> alla mutazione EGFR c.2369C>T (p.T790M). Un $\Delta C_q > 8$ indica la coamplificazione dell'EGFR di tipo selvatico, il campione va considerato <b>negativo</b> per l'EGFR c.2369C>T (p.T790M).		

Esempi per l'interpretazione dei risultati		
Valori $C_q$	Valutazione	Interpretazione
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 30$	Entrambi i segnali compresi nell'intervallo e $\Delta C_q = 6$	Il campione è <b>positivo</b> per l'EGFR c.2369C>T.
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 23$	Entrambi i segnali compresi nell'intervallo e $\Delta C_q = -1$	
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 32$	Entrambi i segnali compresi nell'intervallo e $\Delta C_q = 8$	
HEX $C_q = 29$ and FAM $C_q = 36$	Segnale HEX compreso nell'intervallo. Segnale FAM > $C_q$ 35. $\Delta C_q = 7$	<b>Testare nuovamente</b> il campione per confermare la mutazione dell'EGFR c.2369C>T a basso livello.
HEX $C_q = 30$ and FAM $C_q = 37.5$	Segnale HEX compreso nell'intervallo. Segnale FAM fuori intervallo.	Il campione è <b>negativo</b> per l'EGFR c.2369C>T. FAM $C_q > 37$ indica una coamplificazione dell'EGFR di tipo selvatico.
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 33$	Entrambi i segnali compresi nell'intervallo e $\Delta C_q = 9$	Il campione è <b>negativo</b> per l'EGFR c.2369C>T ( $\Delta C_q > 8$ ).
HEX $C_q = 29$ and FAM $C_q = N.A.$	Segnale HEX compreso nell'intervallo. Nessun segnale FAM.	Il campione è <b>negativo</b> per l'EGFR c.2369C>T.
HEX $C_q = 32.5$ and FAM $C_q = N.A.$	Il segnale HEX è fuori dall'intervallo. Nessun segnale FAM.	<b>Ripetere</b> il test con altro DNA.

## 10. Informazioni importanti

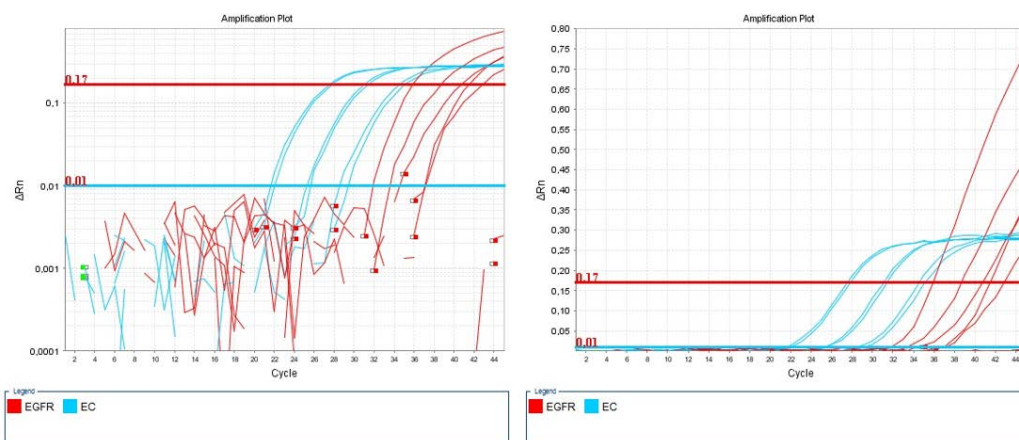
- L'analisi dei dati è valida soltanto per i test effettuati sul cfDNA. Non è possibile avvalersi dei parametri per valutare il DNA estratto da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).
- Valori  $C_q < 22$  per EC (HEX) o  $< 20$  per EGFR (FAM) possono essere causati da un eccesso di DNA nella reazione oppure da prodotti della PCR contaminanti.
- Deviazioni dal protocollo, per es. una variazione dei volumi di reazione o una modifica del programma della PCR, possono incidere sull'impostazione automatica dei valori soglia e/o dei valori  $C_q$ , producendo così risultati falsi positivi o falsi negativi.
- Si consiglia all'utente di ispezionare visivamente le curve generate dal software e di verificare la correttezza dell'impostazione automatica della soglia. Ciò nonostante, la regolazione manuale dei valori di soglia e di base va eseguita soltanto nel caso in cui si renda necessario un intervento (cfr. Impostazione Corretta della Soglia).

### Impostazione **Corretta** della Soglia (vista logaritmica e lineare)



La soglia automatica è impostata correttamente nella fase esponenziale delle curve di amplificazione

### Impostazione **Errata** della Soglia (vista logaritmica e lineare)



La soglia automatica del Controllo (curva blu) è stata impostata a un valore eccessivamente basso. La soglia dell'EGFR (curva rossa) è stata impostata a un valore eccessivamente alto.  
→ L'utente deve posizionare individualmente entrambi i valori di soglia nella fase esponenziale della curva di amplificazione.

## 11. Avvertenze e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Indossare sempre guanti monouso senza polvere e un camice da laboratorio appropriato quando si maneggiano campioni e reagenti.
- Allestire la reazione in un'area separata da quella della preparazione dell'acido nucleico e dell'analisi del prodotto della PCR.
- Utilizzare pipette dedicate soltanto all'allestimento della PCR, avvalersi di punte per pipette provviste di barriera antiaerosol.
- Utilizzare contenitori di reazione compatibili con lo strumento provvisti di tappi otticamente trasparenti o di pellicole sigillanti.
- Non mescolare reagenti di lotti diversi.
- Non utilizzare kit, o componenti di kit, scaduti.

# EGFR T790M RealFast™ Assay

REF 8-110 / 8-113  $\Sigma$  100 / 32 reacciones  
-30°C -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Aplicación

El EGFR T790M RealFast™ Assay es un test en tiempo real basado en la PCR, para la detección cualitativa de la mutación somática c.2369C>T (p.T790M) en el exón 20 del gen humano del *receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)*. El kit está pensado para identificar la mutación de resistencia en el ADN (cfADN) humano circulante y libre de células, derivado del plasma de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). El test es un método de diagnóstico complementario para la selección de pacientes con NSCLC elegibles para la terapia con inhibidores de la Tirosina quinasa (TKI) del EGFR con osimertinib (TAGRISSO™). Para pacientes no aptos para la biopsia tumoral, se sugiere la evaluación del estado del EGFR T790M en el cfADN del plasma.  
Secuencia de referencia: NM\_005228.3; HGVS: c.2369C>T (p.T790M); Cosmic ID: 6240.

## 2. Introducción

El EGFR desempeña un papel decisivo en la proliferación y el crecimiento celular mediante la activación de la vía Ras-Raf-MAPK. Las mutaciones del EGFR en los exones 18, 19, 20 y 21 se observan con una prevalencia de entre el 10% y el 30% en pacientes con NSCLC. Las principales mutaciones que activan el EGFR son deleciones del exón 19, y en el caso de la mutación L858R, del exón 21. Los pacientes que padecen NSCLC con mutaciones que activan el EGFR, pueden beneficiarse de la terapia con el EGFR TKI. Sin embargo, alrededor del 50% de los pacientes con NSCLC que adquieren una resistencia a los TKI (por ejemplo erlotinib), presentan la mutación T790M. Según algunos estudios clínicos, el tratamiento con osimertinib es una opción/terapia alternativa para pacientes positivos de T790M.

## 3. Componentes del kit

100 / 32 Rxn

RealFast™ 2x Probe Mix	1 vial □ tapón blanco	1000 / 320 µl
EGFR T790M Assay Mix	1 vial ■ tapón violeta	550 / 550 µl
EGFR T790M Positive Control	1 vial ■ tapón verde	75 / 75 µl

El RealFast™ 2x Probe Mix contiene HotStart Taq DNA polymerase y dNTPs en un óptimo sistema de tampón o buffer. El EGFR T790M Assay Mix consta de primers específicos del gen de sondas de hidrólisis de doble marcado para el EGFR, y de un gen de control endógeno (EC), de un supresor del EGFR de tipo salvaje, y de uracil-N-glicosilasa, para minimizar el riesgo de productos de la PCR contaminantes cruzados. Además, en el kit también hay un control sintético positivo a la mutación EGFR T790M, que representa el EGFR mutado y el gen EC.

El kit contiene reactivos para 100 / 32 reacciones con cada 20 µl de volumen final.

## 4. Almacenamiento y estabilidad

El EGFR T790M RealFast™ Assay se suministra sobre bloques de enfriamiento. Conserve el kit de -30 a -15°C después de su recepción. Alternativamente para su utilización en el espacio de un mes a 2 hasta 8°C. Los reactivos sobreviven sin pérdida de actividad hasta 20 ciclos de congelación/ descongelación. Evite la exposición prolongada a la luz directa. Cuando se conserva correctamente, el kit mantiene su funcionalidad hasta la fecha de caducidad indicada.

## 5. Descripción del producto

### 5.1. Principio de la prueba

La prueba basada en el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica, también conocido como el ensayo TaqMan®-Assay. Cada reacción contiene pares de primers específicos de gen para la amplificación de un fragmento 92 pb en el gen EGFR exon 20 y de un fragmento 147 pb en el gen de control endógeno (EC). Otros componentes son dos sondas de hidrólisis específicamente de gen, doblemente marcadas (**FAM-marcada EGFR-Sonda** y **HEX-marcada EC-Sonda**), que se enlazan a las secuencias de objetivo de los fragmentos amplificados. La proximidad del 5' reporter de fluorescente y 3' colorante de quencher reprime la fluorescencia de la sonda intacta. Durante la etapa de extensión de PCR, la actividad 5' - 3' exonucleasa de la polimerasa de ADN Taq escinde el reporter de la sonda híbrida. La separación espacial del fluoróforo del quencher ocasiona una señal de fluorescencia en tiempo real, la cual es proporcional a la cantidad de producto de PCR.

El EC sirve de control positivo de la PCR, y de parámetro para evaluar la positividad del EGFR c.2369C>T (p.T790M) en el rango de valores, o mediante la determinación de un valor  $\Delta C_q$  ( $C_{q_{EGFR}} - C_{q_{EC}} \leq 8$ )

### 5.2. Compatibilidad con aparatos PCR en tiempo real

El EGFR T790M RealFast™ Assay su uso está autorizado con el aparato AB 7500 Fast.

El kit es compatible con diferentes aparatos usuales de PCR en tiempo real, que puedan detectar fluorescencia FAM y HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** RealFast Variant Detection Guías rápidas para la programación y evaluación de ensayos RealFast™ Assays están disponibles para su descarga en [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

¡ Cuando se usa AB 7500 Fast, StepOne™ o Mx3005P establece el colorante de referencia pasivo en "ROX"! «

El kit se suministra con **bajo ROX**. El uso de dispositivos de PCR en tiempo real, que requieren una alta concentración de ROX para normalizar los datos (por.ej.: Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), ROX tiene que ser añadido a una concentración final de 1 µM al 2x Probe Mix.

### 5.3. Especificaciones de la prueba

La determinación de la **sensibilidad** se realizó en 24 muestras que dieron positivo en la mutación EGFR T790M, con un método de referencia. El EGFR T790M RealFast™ Assay determinó la positividad de 22 muestras, lo que equivale a un porcentaje de verdaderos positivos del 91,7%.

La determinación de la **especificidad** se realizó en 32 muestras que dieron negativo en la mutación EGFR T790M, con un método de referencia. El EGFR T790M RealFast™ Assay determinó la negatividad de las 31 muestras, lo que equivale a un porcentaje de verdaderos negativos del 96,9%.

Límite de detección: 8 copias mutantes de EGFR T790M en un fondo de 2.5 ng de cfADN de tipo salvaje por reacción.

Concentración de ADN recomendada: de 0.5 a 10 ng/µl de cfADN.

## 6. Materiales necesarios, pero no proporcionados

El aparato PCR en tiempo real con FAM (520 nm) y el filtro HEX (556 nm), recipientes PCR ópticos compatibles con aparatos, guantes desechables sin polvo, vórtex, mini centrífuga para 2.0 ml tubos, bastidor de tubos, juego de micro pipetas calibradas (0.5 - 1000 µl), puntas

de pipeta estériles con filtros de aerosol, agua de gran pureza, sistema de extracción de ADN, refrigerador o congelador, contenedor de residuos. Equipo para extracción de sangre, preparación de plasma y aislamiento de ADNcf.

## 7. Manejo de muestras y extracción del cfADN:

Las muestras deben constar del cfADN obtenido de plasma humano **fresco o congelado**.

### 7.1. Preparación del plasma

Recoger 9 ml de sangre periférica en tubos EDTA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Evitar agitar el tubo innecesariamente, a fin de reducir la degradación del cfADN y la lisis leucocitaria. Proceder con la preparación del plasma EDTA, como máximo **antes de una hora** después de la extracción de la sangre, según el siguiente protocolo:

- Centrifugar durante 10 minutos a 1.600 x g en una centrifuga de rotor oscilante.
- Trasladar la fracción del plasma (sobrenadante) a tubos aptos para la centrifugación de alta velocidad.

» **Nota:** Evitar el arrastre de células, dado que los leucocitos contaminantes pueden aumentar el fondo del ADN genómico, diluyendo así el cfADN diana. «

- Centrifugar el plasma durante 10 minutos a 16.000 x g, en una centrifuga de rotor de ángulo fijo.
- Trasladar el sobrenadante a tubos nuevos, evitando el contacto y el posible traslado del *pellet*.
- Congelar el plasma a una temperatura que va entre -40°C y -80°C, o proceder inmediatamente a la extracción del cfADN.

» **Nota:** Si se utilizan tubos para la recogida de sangre distintos de los tubos EDTA, por ejemplo tubos PAXgene® Blood ccfDNA o tubos STRECK Cell-Free DNA BCT®, seguir las instrucciones del productor para la extracción de la sangre, las condiciones de almacenamiento y la preparación del plasma. «

### 7.2. Extracción del ADN

Los reactivos para la extracción de ADN no están incluidos en el kit.

Para extraer el cfADN de 4 ml de plasma centrifugado dos veces, se aconseja el ViennaLab Plasma cfDNA Extraction Kit [REF 2-040]. EGFR T790M RealFast™ Assay requiere 2.5 – 50 ng de cfADN por reacción. Normalmente, la concentración de cfADN en el plasma humano es muy baja. Por lo tanto, para cuantificar el cfADN se aconseja utilizar un método muy sensible (por ejemplo el Qubit dsDNA HS Assay).

Asegurarse de que el ADN extraído sea apto para la amplificación por lo que respecta a concentración, pureza e integridad. El arrastre accidental de cantidades residuales de los tampones de lavado durante la extracción de ADN, puede interferir con el análisis del cfADN. Para realizar un análisis fiable, la concentración del cfADN de la muestra debe ser equivalente al menos a 0,5 ng/μl.

» **Nota:** El UV-VIS o la cuantificación del cfADN basada en la fluorescencia por debajo de 0.2 ng/μl, es propensa a errores y, por lo tanto, puede ser imprecisa. Sin embargo, en el caso del EGFR T790M RealFast™ Assay, las muestras que presentan un  $C_{q\ EC\ [HEX]} \leq 32$  son elegibles para el análisis. «

## 8. Instrucciones

### 8.1. Controles PCR

Incluya en cada ejecución **siempre un No Template Control (NTC)** para controlar la posibilidad de una contaminación potencial. Se recomienda utilizar el NTC (agua ultra pura en lugar de ADN) como duplicado.

Incluya en cada serie **siempre el EGFR T790M Positive Control** como una señal de referencia positiva para las muestras desconocidas.

» **Nota:** Las pruebas de control representan un fuente de contaminación en potencia y por lo tanto deben manejarse con mucho cuidado. «

### 8.2. Preparación de EGFR T790M RealFast™ Master-Mix

Descongele completamente todas las soluciones, mezclar suavemente y centrifugar brevemente. La preparación de la PCR debe llevarse a cabo a temperatura ambiente. Preparar suficiente **Master-Mix** (mezcla maestra) para el número total del depósito de PCR planificado (pruebas N + controles positivos + controles negativos), y calcular al menos una reacción adicional para nivelar inexactitudes del pipeteando:

Componentes	por reacción	p.ej. 24+1 reacciones
RealFast™ 2x Probe Mix	10 μl	250 μl
EGFR T790M Assay Mix	5 μl	125 μl
<b>Master Mix</b>	<b>15 μl</b>	<b>375 μl</b>

Coloque previamente **15 μl Master-Mix** en cada recipiente. Pipetee **5 μl de ADN** purificado o de **Control** Template en él con el fin de alcanzar el volumen final de 20 μl de ADN.

Para minimizar el riesgo de contaminación de las muestras de la pipeta en este orden: en primer lugar NTC, a continuación sus muestras, por último los controles positivos. Cerrar inmediatamente los recipientes de reacción.

» **Nota:** Evite las burbujas de aire en la mezcla de PCR y las huellas dactilares sobre las superficies ópticas de los recipientes de reacción. Las dos cosas pueden afectar la medición de fluorescencia. «

### 8.3. Programa PCR

Programa su aparato PCR en tiempo real según lo especificado por el fabricante para los experimentos en la "cuantificación". Fije los depósitos de PCR en el termociclador y ejecute el siguiente programa:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P** y **otros aparatos** basados en el bloque de calentamiento Peltier:

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	37°C	10 min	Degradación del ADN que tiene uracilo
1	95°C	2 min	Desnaturalización inicial
	95°C	5 seg	Desnaturalización
45	60°C	30 seg	Annealing/Extensión – <b>registro de datos</b> en el canal FAM y HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Ciclos	Temp	Tiempo	Paso
1	37°C	10 min	Degradación del ADN que tiene uracilo
1	95°C	2 min	Desnaturalización inicial
	95°C	5 seg	Desnaturalización
45	60°C *)for 36-well rotor: 56°C	30 seg	Annealing/Extensión - <b>registro de datos</b> en el canal Green y Yellow

## 9. Análisis de datos / Interpretación de los resultados

La amplificación exitosa de una muestra, puede comprobarse mediante una señal positiva del EC en el canal HEX. La presencia o ausencia de una mutación del EGFR c.2369C>T (p.T790M) en la muestra, se define por la aparición de una señal en el canal FAM dentro de ciertos límites (véase la tabla del Análisis de datos).

Las muestras de cfADN **negativas** para EGFR c.2369C>T muestran una amplificación solo en el canal HEX.

Las muestras de cfADN **positivas** para EGFR c.2369C>T muestran una amplificación en los canales FAM y HEX, y presentan un  $\Delta C_q$  ( $C_q$  EGFR [FAM] -  $C_q$  EC [HEX]) calculado  $\leq 8$ .

La fluorescencia y las correspondientes curvas de amplificación se representan automáticamente en los gráficos de amplificación del software PCR en tiempo real.

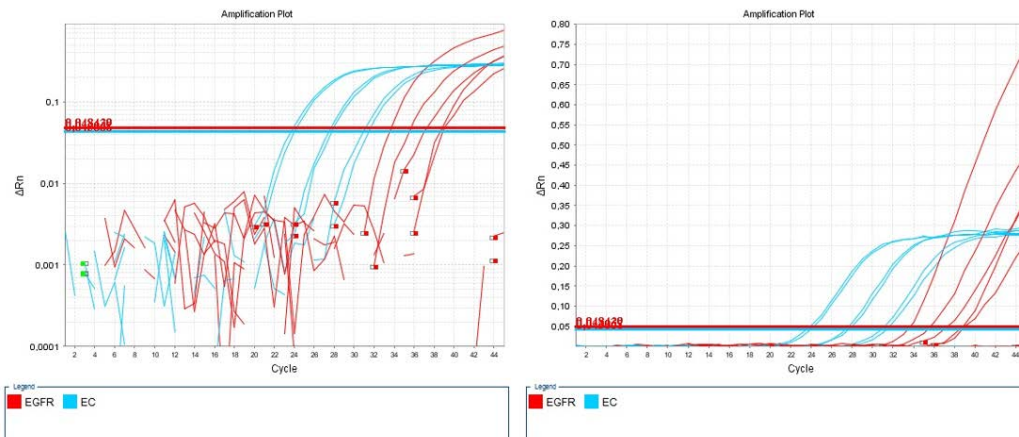
Análisis de datos		
El software del aparato PCR en tiempo real realiza automáticamente el análisis de los datos, seleccionando los <b>valores límites automáticos</b> y la <b>configuración básica</b> . No obstante, el usuario debe comprobar la configuración correcta de los valores límite y de base → véase sección 10. Información importante.		
Objetivo	$C_q$	Interpretación
EC [HEX]	22 - 32	La muestra está dentro del rango del análisis → ADN tampón suficiente (> 0.5ng / reacción)
	< 22	Exceso de ADN tampón → diluir la muestra y repetir el test
	> 32	Cantidades insuficientes de cfADN, o presencia de inhibidores de la PCR → se aconseja la purificación en columna, y la concentración de la muestra del ADN
	N.A.	La muestra no contiene ningún ADN tampón
EGFR c.2369C>T (p.T790M) [FAM]	20 - 37	La muestra está dentro del rango del análisis → efectuar el cálculo de $\Delta C_q$
	35 - 37	La muestra está dentro del rango del análisis. Sin embargo, a fin de confirmar la presencia de cfADN mutado a bajo nivel, se aconseja repetir el test dos veces
	< 20	Exceso de ADN tampón → diluir la muestra y repetir el test
	> 37 o N.A.	La muestra es negativa para EGFR c.2369C>T (p.T790M) Las señales FAM $C_q > 37$ representan fragmentos de EGFR de tipo salvaje coamplificado
Las muestras que cumplen dichos requisitos y la condición $\Delta C_q$ ( $C_q$ EGFR - $C_q$ EC) $\leq 8$ son <b>positivas</b> para la mutación EGFR c.2369C>T (p.T790M). Un $\Delta C_q > 8$ indica una coamplificación del EGFR de tipo salvaje. La muestra debe considerarse <b>negativa</b> para el EGFR c.2369C>T (p.T790M).		

Ejemplos para interpretar los resultados		
Valores $C_q$	Evaluación	Interpretación
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 30$	Ambas señales dentro del rango y $\Delta C_q = 6$	La muestra es <b>positiva</b> para el EGFR c.2369C>T.
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 23$	Ambas señales dentro del rango y $\Delta C_q = -1$	
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 32$	Ambas señales dentro del rango y $\Delta C_q = 8$	
HEX $C_q = 29$ and FAM $C_q = 36$	Señal HEX dentro del rango. Señal FAM > $C_q$ 35. $\Delta C_q = 7$	<b>Repetir el test</b> de la muestra, para confirmar la mutación del EGFR c.2369C>T a bajo nivel.
HEX $C_q = 30$ and FAM $C_q = 37.5$	Señal HEX dentro del rango. Señal FAM fuera del rango.	La muestra es <b>negativa</b> para el EGFR c.2369C>T. La señal FAM $C_q > 37$ indica una coamplificación del EGFR de tipo salvaje.
HEX $C_q = 24$ and FAM $C_q = 33$	Ambas señales dentro del rango y $\Delta C_q = 9$	La muestra es <b>negativa</b> para el EGFR c.2369C>T ( $\Delta C_q > 8$ ).
HEX $C_q = 29$ and FAM $C_q =$ N.A.	Señal HEX dentro del rango. Ninguna señal FAM.	La muestra es <b>negativa</b> para el EGFR c.2369C>T.
HEX $C_q = 32.5$ and FAM $C_q =$ N.A.	Señal HEX fuera del rango. Ninguna señal FAM.	<b>Repetir</b> el test con más ADN.

## 10. Información importante

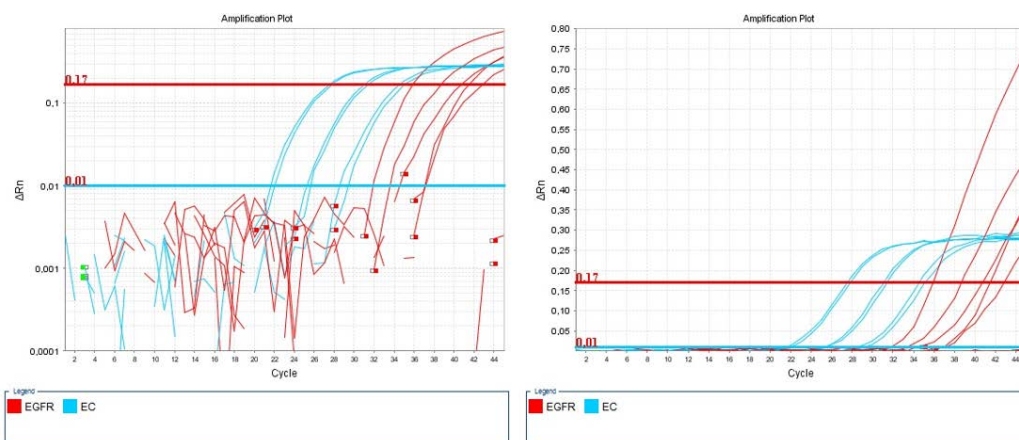
- El análisis de los datos solo es válido para los test del cfADN. Los parámetros no pueden usarse para evaluar el ADN extraído de muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE).
- Valores  $C_q < 22$  por EC (HEX) o  $< 20$  por EGFR (FAM) pueden deberse a un exceso de ADN en la reacción, o a productos de la PCR contaminantes.
- Desviaciones del protocolo, como por ejemplo una variación del volumen de reacción, o una modificación del programa de la PCR, pueden afectar a la configuración automática de los valores límite y/o de los valores  $C_q$ , produciendo, así, resultados falsos positivos o falsos negativos.
- Se aconseja que el usuario inspeccione visualmente las curvas generadas por el software, y que compruebe el correcto ajuste automático de los valores límite. Sin embargo, el ajuste manual de los valores límite y de base, hay que efectuarlo tan solo si es necesaria una intervención (véase Ajuste correcto de los valores límite).

### Ajuste **correcto** de los valores límite (vista logarítmica y lineal)



El valor límite automático se ajusta correctamente en la fase exponencial de las curvas de amplificación.

### Ajuste **incorrecto** de los valores límite (vista logarítmica y lineal)



El valor límite automático del Control (curva azul) se ha fijado para un valor demasiado bajo. El valor límite del EGFR (curva roja) se ha fijado para un valor demasiado alto.

→ El usuario debe poner ambos valores límite individualmente en la fase exponencial de la curva de amplificación.

## 11. Indicaciones y medidas de seguridad

- El kit se destina únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Al manipular muestras y reactivos utilice siempre guantes desechables sin polvo y vestimenta adecuada de laboratorio.
- Entre las áreas para la extracción de ADN y el depósito PCR Master Mix debe mantener un espacio de separación estricto
- Utilice solamente un set de pipetas propio sólo para el depósito de PCR y utilice puntas de pipeta con filtro de aerosol.
- Utilice únicamente recipientes de paredes finas, recipientes de PCR compatibles con los aparatos para mediciones ópticas cierre adecuado.
- No mezclar reactivos con números de lotes diferentes.
- No utilizar kits o componentes del kit caducados.



# EGFR T790M RealFast™ Assay



ViennaLab Diagnostics GmbH

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

REF 8-110 / 8-113  $\Sigma$  100 / 32 reações

-30°C / -15°C



## 1. Utilização prevista

O EGFR T790M RealFast™ Assay é um teste de PCR em tempo real para a deteção qualitativa da mutação somática c.2369C>T (p.T790M) no exão 20 do gene humano do *receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)*. O kit foi concebido para identificar a mutação de resistência em ADN circulante sem células (cfADN) proveniente de plasma humano de doentes com cancro do pulmão de células não pequenas (NSCLC). O teste pretende ser um meio de diagnóstico auxiliar para servir de base à seleção de doentes com NSCLC elegíveis para terapêutica com o inibidor da tirosina cinase (TKI) do EGFR osimertinib (TAGRISSO™). Sugere-se a avaliação do estado da mutação T790M do EGFR em cfADN plasmático em doentes cuja biópsia do tumor não possa ser realizada. Sequência de referência: NM\_005228.3; HGVS: c.2369C>T (p.T790M); Cosmic ID: 6240.

## 2. Introdução

O EGFR desempenha um papel vital no crescimento e na proliferação celular da via Ras-Raf-MAPK. As mutações do EGFR nos exões 18, 19, 20 e 21 têm uma prevalência de 10% a 30% em doentes com NSCLC. As mutações de ativação do EGFR mais salientes são as deleções no exão 19 e L858R no exão 21. Os doentes com NSCLC com mutações ativantes do EGFR podem beneficiar da terapêutica com TKI do EGFR. Contudo, cerca de 50% dos doentes com NSCLC que adquirem resistência a estes TKI (como o erlotinib) exibem a mutação T790M. Com base em estudos clínicos, o tratamento com osimertinib é uma terapêutica opcional/alternativa para doentes positivos quanto à mutação T790M.

## 3. Conteúdo do kit

		100 / 32 Rxn	
RealFast™ 2x Probe Mix	1 ampola <input type="checkbox"/> tampa branca	1000 / 320 µl	
EGFR T790M Assay Mix	1 ampola <input type="checkbox"/> tampa roxa	550 / 550 µl	
EGFR T790M Positive Control	1 ampola <input type="checkbox"/> tampa verde	75 / 75 µl	

A RealFast™ 2x Probe Mix inclui HotStart Taq DNA polymerase e dNTP num sistema tampão otimizado. A mistura do EGFR T790M Assay consiste em iniciadores específicos do gene, sondas de hidrólise com dupla marcação para o EGFR e o gene de controlo endógeno (*endogenous control*, EC), um supressor de tipo natural do EGFR e uracilo-N-glicosilase para minimizar o risco de contaminação cruzada com produtos de PCR. Um controlo positivo sintético da mutação T790M do EGFR representante do EGFR mutante e o gene EC são fornecidos com o kit.

O kit contém reagentes para 100 / 32 reações, num volume final de 20 µl cada.

## 4. Armazenamento e estabilidade

O EGFR T790M RealFast™ Assay é enviado em blocos de arrefecimento. Após a receção, armazene o kit de -30 a -15°C. Em alternativa, armazene entre 2 e 8°C para utilização a curto prazo, dentro de um mês. O kit suporta até 20 ciclos de congelamento/descongelamento sem ocorrer perda de atividade. Evitar a exposição prolongada a luz intensa. Se for armazenado corretamente, o kit permanece totalmente ativo até à data de validade indicada no rótulo.

## 5. Descrição do produto

### 5.1. Princípio do teste

O teste utiliza o ensaio fluorogénico 5' nuclease, também conhecido como ensaio TaqMan®. Cada reação contém pares de iniciadores específicos do gene, que amplificam um fragmento de 92 pb do exão 20 do gene EGFR e um fragmento de gene EC (*endogenous control*) de 147 bp. Existem outros componentes com sondas de hidrólise específicas para o gene e de marcação dupla (a sonda EGFR marcada com FAM e a sonda EC marcada com HEX), que se hibridam em sequências internas dos fragmentos amplificados. A proximidade do gene repórter fluorescente 5' e o corante supressor 3' em sondas intactas impede a fluorescência do gene repórter. Durante a fase de extensão da PCR, a atividade da exonuclease 5' – 3' da Taq DNA polimerase cliva o gene repórter fluorescente 5' da sonda hibridada. A separação física do fluoróforo do corante supressor produz um sinal fluorescente em tempo real, que é proporcional ao produto de PCR acumulado.

O gene EC funciona como controlo positivo da PCR e como parâmetro de avaliação da positividade da mutação c.2369C>T (p.T790M) do EGFR dentro do intervalo e por determinação de um valor de  $\Delta C_q (C_{q,EGFR} - C_{q,EC}) \leq 8$ .

### 5.2. Compatibilidade entre PCR em tempo real e equipamento

O EGFR T790M RealFast™ Assay está validado para a utilização com o instrumento AB 7500 Fast.

O kit é compatível com vários equipamentos comuns de PCR em tempo real com capacidade de registar fluorescência FAM e HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ AB StepOne™ (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ MIC qPCR Cycloer (bms)
- ✓ Mx3005P (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

» **Nota:** É possível transferir os RealFast™ Variant Detection QuickGuides para informações sobre a configuração e análise de experiências com diferentes tipos de instrumentos em [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com).

«Ao usar o AB 7500 Fast, o StepOne™ ou o Mx3005P ajusta o corante de referência passiva para "ROX"! «

O kit é fornecido com baixo ROX. Para a utilização com instrumentos de PCR em tempo real que exijam ROX elevado para a normalização dos dados (por exemplo, instrumentos Applied Biosystems® StepOne™, 7300, 7900/7900HT), adicione ROX a uma concentração final de 1 µM à 2x Probe Mix.

### 5.3. Especificações de desempenho do ensaio

A determinação da **sensibilidade** foi efetuada em 24 amostras com resultado positivo quanto à mutação T790M do EGFR utilizando um método de referência. O EGFR T790M RealFast™ Assay determinou 22 amostras como positivas, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 91,7%.

A determinação da **especificidade** foi efetuada em 32 amostras com resultado negativo quanto à mutação T790M do EGFR utilizando um método de referência. O EGFR T790M RealFast™ Assay determinou 31 amostras como negativas, o que correspondeu a uma taxa de verdadeiros positivos de 96,9%.

Limite de deteção: 8 cópias mutantes de T790M do EGFR numa base de 2.5 ng de cfADN natural por reação.

Concentração de ADN recomendada: 0.5 a 10 ng/µl de cfADN.

## 6. Materiais necessários, mas não fornecidos

Instrumento de PCR em tempo real com filtros FAM (520 nm) e HEX (556 nm), recipientes de reação compatíveis com o instrumento, luvas sem talco descartáveis, vórtex, minicentrífugadora para tubos de 2.0 ml, suportes para tubos, conjunto de micropipetas calibradas (0.5 – 1000 µl), pontas estéreis com filtro de barreira de aerossóis, água de grau molecular, sistema de extração de ADN, congelador, recipiente para resíduos de risco biológico. Equipamento para desenho de sangue, preparação de plasma e isolamento de cfDNA.

## 7. Manuseamento das amostras e extração de cfADN:

O material da amostra tem de ser cfADN isolado de plasma humano **fresco ou congelado**.

### 7.1. Preparação do plasma

Recolha 9 ml de sangue periférico para tubos EDTA segundo as instruções do fabricante. Evite a agitação desnecessária para reduzir a degradação do cfADN e a lise dos leucócitos. Continue com a preparação do plasma em EDTA no **prazo de uma hora** após a colheita de sangue, de acordo com o protocolo que se segue:

- Centrifugue durante 10 minutos a 1600 x g numa centrífuga de rotor basculante.
- Transfira a fração de plasma (sobrenadante) para tubos adequados à centrifugação de alta velocidade.

» **Nota:** Evite arrastar células, pois os leucócitos contaminantes podem aumentar o fundo de ADN genómico e, assim, diluir o cfADN alvo. «

- Centrifugue durante 10 minutos a 16,000 x g numa centrífuga de rotor de ângulo fixo.
- Transfira o sobrenadante para tubos novos, evitando o contacto com o sedimento e, assim, a sua potencial transferência.
- Congele o plasma a -40°C a -80°C ou proceda imediatamente à extração de cfADN.

» **Nota:** Caso se utilizem tubos para colheita de sangue que não sejam tubos com EDTA, tais como tubos PAXgene® Blood ccfDNA ou tubos STRECK Cell-Free DNA BCT®, siga as instruções do fornecedor sobre a colheita de sangue, as condições de armazenamento e a preparação do plasma. «

### 7.2 Extração do ADN

Os reagentes de extração do ADN **não são fornecidos** com o kit.

Para a extração de cfADN de 4 ml de plasma centrifugado duas vezes, recomenda-se o uso do Plasma cfDNA Extraction Kit [REF 2-040] da Viennalab. O EGFR T790M RealFast™ Assay requer 2.5 a 50 ng de cfADN por reação. A concentração de cfADN no plasma humano costuma ser muito baixa. Consequentemente, recomenda-se a utilização de um método altamente sensível (p. ex., o Qubit dsDNA HS Assay) para a quantificação do cfADN.

Certifique-se de que o ADN extraído é adequado para a amplificação em termos de concentração, pureza e integridade. O transporte acidental de quantidades residuais dos tampões de lavagem durante a extração do ADN pode interferir na análise do cfADN. Para uma análise fiável, a concentração de cfADN na amostra deve ser, pelo menos, de 0.5 ng/µl.

» **Nota:** A quantificação de cfADN por UV-VIS ou por fluorescência abaixo de 0.2 ng/µl está sujeita a erros, tornando-a inexata. Contudo, com o EGFR T790M RealFast™ Assay, as amostras com  $C_{q\ EG[HEX]} \leq 32$  são elegíveis para análise. «

## 8. Protocolo experimental

### 8.1. Controlos de PCR

Inclua **sempre um No Template Control (NTC)** em cada experiência para confirmar a ausência de potencial contaminação. Recomenda-se a análise do NTC (utilizando água de grau para PCR em vez de ADN) em duplicado.

Inclua **sempre** o EGFR T790M **Positive Control** como sinal positivo de referência para as suas amostras desconhecidas.

» **Nota:** As amostras de controlo são potenciais fontes de contaminação. Manuseie com cautela. «

### 8.2. Preparação da EGFR T790M RealFast™ Master-Mix

Agite lentamente no vórtex e centrifugue rapidamente todas as soluções após o descongelamento. Configure a PCR à temperatura ambiente. Prepare **Master-Mix** (mistura principal) suficiente para todas as reações (amostras N + controlos positivos + controlos negativos) e pelo menos mais uma reação adicional para compensar erros de pipetagem:

Componente	por reação	p. ex. 24+1 reações
RealFast™ 2x Probe Mix	10 µl	250 µl
EGFR T790M Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

Coloque **15 µl** de **Master-Mix** em cada poço. Adicione **5 µl** de **ADN** purificado ou modelo de **Controlo** para obter um volume de reação final de 20 µl.

Para minimizar o risco de contaminação, pipete sempre modelos pela seguinte ordem: primeiro o NTC, seguido das amostras e, por último, os controlos positivos. Feche imediatamente os recipientes de reação.

» **Nota:** Evite a formação de bolhas na mistura de reação final e evite tocar na superfície ótica da tampa ou na película de vedação sem luvas. Isto pode interferir com as medições de fluorescência. Se necessário, centrifugue brevemente. «

### 8.3. Programa de PCR

Programa o instrumento de PCR em tempo real de acordo com as instruções do fabricante para experiências de quantificação. Coloque as amostras no termociclador e execute o seguinte programa:

**AB 7500 Fast, StepOne™, CFX96™, LightCycler® 480, Mx3005P e outros instrumentos** de bloco de calor Peltier:

Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	37°C	10 min	Degradação de ADN contendo uracilo
1	95°C	2 min	Desnaturação inicial
	95°C	5 sec	Desnaturação
45	<b>60°C</b>	30 sec	Hibridação/Extensão– <b>Aquisição de dados</b> no canal FAM e HEX

**MIC qPCR Cycler, Rotor-Gene® 6000\*):**

Ciclos	Temperatura	Tempo	Passos
1	37°C	10 min	Degradação de ADN contendo uracilo
1	95°C	2 min	Desnaturação inicial
	95°C	5 sec	Desnaturação
45	<b>60°C</b> *)for 36-well rotor: <b>56°C</b>	30 sec	Hibridação/Extensão– <b>Aquisição de dados</b> no canal Green e Yellow

## 9. Análise dos dados / interpretação dos resultados

A amplificação bem-sucedida de uma amostra pode ser verificada através de um sinal positivo do EC no canal HEX. A presença ou ausência de uma mutação c.2369C>T (p.T790M) do EGFR na amostra define-se pela ocorrência de um sinal no canal FAM dentro de certos limites (ver análise dos dados da tabela).

As amostras de cfADN **negativas** relativamente a EGFR c.2369C>T apenas exibem amplificação no canal HEX.

As amostras de cfADN **positivas** relativamente a c.2369C>T do EGFR exibem amplificação nos canais FAM e HEX e um valor calculado de  $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR [FAM]} - C_q \text{ EC [HEX]}) \leq 8$ .

Os níveis de fluorescência e as correspondentes curvas de amplificação são automaticamente apresentados em gráficos de amplificação pelo software da PCR em tempo real.

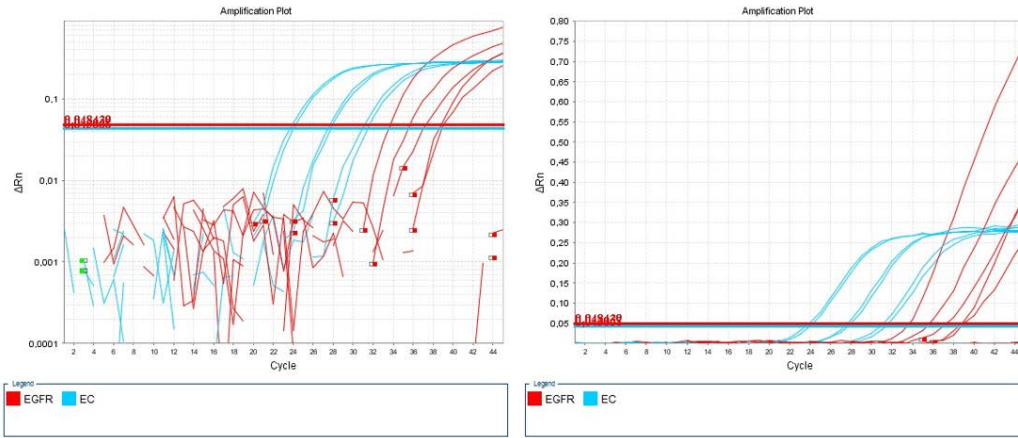
Análise		
A análise de dados é realizada automaticamente pelo software do equipamento de PCR em tempo real, selecionando <b>limiar automático e definições de base</b> . Contudo, o utilizador tem de verificar as definições corretas do limiar e de base → ver secção 10. Informações importantes.		
Target	C <sub>q</sub>	Interpretação
EC [HEX]	22 - 32	A amostra está dentro do intervalo de análise → modelo de ADN suficiente (> 0.5 ng/reacção)
	< 22	Excesso de modelo de ADN → diluir a amostra e repetir o teste
	> 32	Quantidade insuficiente de cfADN ou presença de inibidor da PCR → purificação em coluna e concentração do ADN da amostra
	N.A.	A amostra não contém modelo de ADN
EGFR c.2369C>T (p.T790M) [FAM]	20 - 37	A amostra está dentro do intervalo de análise → efetuar o cálculo de $\Delta C_q$
	35 - 37	A amostra está dentro do intervalo de análise. Contudo, para confirmar a presença de concentrações baixas de cfADN mutante, recomenda-se repetir o teste em duplicado
	< 20	Excesso de modelo de ADN → diluir a amostra e repetir o teste
	> 37 ou N.A.	A amostra é negativa quanto a c.2369C>T (p.T790M) do EGFR. Sinais FAM C <sub>q</sub> > 37 representam fragmentos de EGFR natural coamplificados.
As amostras que cumprem os requisitos acima E a condição $\Delta C_q (C_q \text{ EGFR} - C_q \text{ EC}) \leq 8$ são <b>positivas</b> quanto a c.2369C>T (p.T790M) do EGFR. $\Delta C_q > 8$ indica a coamplificação de EGFR natural, a amostra tem de ser considerada <b>negativa</b> quanto a c.2369C>T (p.T790M) do EGFR.		

Exemplos para interpretação de resultados		
Valores de C <sub>q</sub>	Avaliação	Interpretação
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 30	Ambos os sinais dentro do intervalo e $\Delta C_q = 6$	A amostra é <b>positiva</b> quanto a c.2369C>T do EGFR.
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 23	Ambos os sinais dentro do intervalo e $\Delta C_q = -1$	
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 32	Ambos os sinais dentro do intervalo e $\Delta C_q = 8$	
HEX C <sub>q</sub> = 29 and FAM C <sub>q</sub> = 36	Sinal HEX dentro do intervalo. Sinal FAM > C <sub>q</sub> 35. $\Delta C_q = 7$	<b>Repita</b> o teste da amostra para confirmar níveis baixos da mutação c.2369C>T do EGFR.
HEX C <sub>q</sub> = 30 and FAM C <sub>q</sub> = 37.5	Sinal HEX dentro do intervalo. Sinal FAM fora do intervalo.	A amostra é <b>negativa</b> quanto a c.2369C>T (p.T790M) do EGFR. FAM C <sub>q</sub> > 37 sugere a coamplificação de fragmentos de EGFR natural.
HEX C <sub>q</sub> = 24 and FAM C <sub>q</sub> = 33	Ambos os sinais dentro do intervalo e $\Delta C_q = 9$	A amostra é <b>negativa</b> quanto a c.2369C>T do EGFR ( $\Delta C_q > 8$ ).
HEX C <sub>q</sub> = 29 and FAM C <sub>q</sub> = N.A.	Sinal HEX dentro do intervalo. Sem sinal FAM.	A amostra é <b>negativa</b> quanto a c.2369C>T do EGFR.
HEX C <sub>q</sub> = 32.5 and FAM C <sub>q</sub> = N.A.	Sinal HEX fora do intervalo. Sem sinal FAM.	<b>Repita</b> o teste com mais ADN.

## 10. Informações importantes

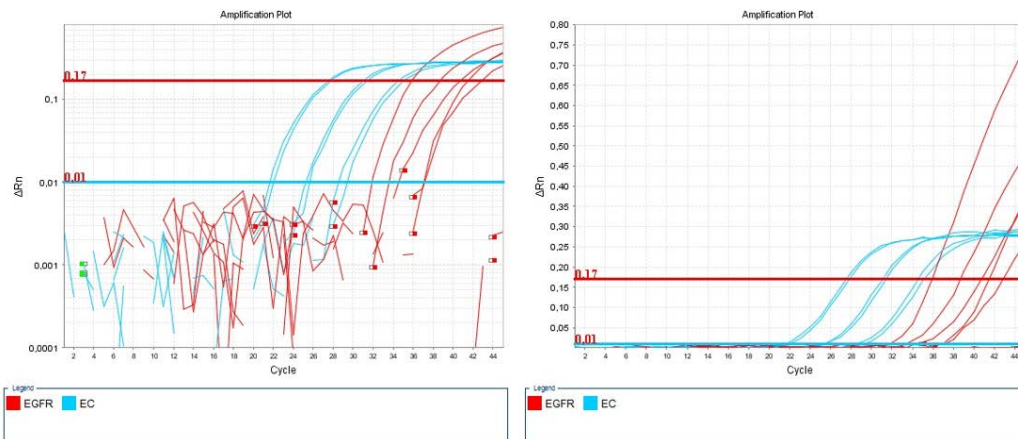
- A análise de dados só é válida para o teste de cfADN. Os parâmetros não podem ser utilizados para avaliar ADN extraído de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE).
- Valores de C<sub>q</sub> < 22 de EC (HEX) ou < 20 de EGFR (FAM) podem resultar de um excesso de ADN na reação ou contaminação com produtos de PCR.
- Os desvios ao protocolo, tais como a variação dos volumes de reação ou a modificação do programa de PCR, podem afetar a definição automática do limiar e/ou os valores de C<sub>q</sub>, levando a resultados positivos falsos ou negativos falsos.
- O utilizador é aconselhado a inspecionar visualmente as curvas geradas pelo software e a verificar se a definição automática do limiar está correta. Contudo, o ajuste manual dos limiares e valores basais só pode ser realizado se for necessária uma intervenção (ver Definição correta do limiar).

### Definição **correta** do limiar (vista logarítmica e vista linear)



O limiar automático é definido corretamente na fase exponencial das curvas de amplificação.

### Definição **incorreta** do limiar (vista logarítmica e vista linear)



O limiar automático do Controlo (linha azul) está definido para um valor demasiado baixo. O limiar do EGFR (linha vermelha) está definido para um valor demasiado elevado.

→ Ambos os limiares têm de ser estabelecidos individualmente pelo utilizador na fase exponencial das curvas de amplificação.

## 11. Avisos e precauções

- Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.
- Utilizar sempre luvas sem talco descartáveis e vestuário de laboratório adequado ao manusear as amostras e os reagentes.
- Preparar a reação numa área separada da preparação de ácidos nucleicos e da análise do produto de PCR.
- Utilizar pipetas dedicadas apenas à configuração da PCR e pontas de pipeta com filtro de barreira de aerossóis.
- Utilizar recipientes de reação compatíveis com o instrumento e com tampas ou vedantes transparentes.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes.
- Não utilizar kits ou componentes do kit que estejam fora do prazo de validade.