

Handleiding *therascreen*[®] BRAF RGQ PCR-kit



Versie 2

IVD

Voor diagnostisch gebruik in vitro

Voor gebruik met de Rotor-Gene[®] Q MDx-apparaten

CE

REF

870211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

DUITSLAND

R2

MAT

1072802NL



QIAGEN monster- en assaytechnologieën

QIAGEN is de toonaangevende leverancier van innovatieve monster- en assaytechnologieën voor de isolatie en detectie van bestanddelen van ieder biologisch monster. Met onze geavanceerde producten en diensten van hoge kwaliteit is succes verzekerd, van monster tot resultaat.

QIAGEN zet de toon voor:

- Zuivering van DNA, RNA en eiwitten
- Nucleïnezuur- en eiwitassays
- Onderzoek met microRNA en RNAi
- Automatisering van monster- en assaytechnologieën

Wij stellen ons ten doel ervoor te zorgen dat u uitstekende resultaten en doorbraken kunt bereiken. Kijk voor meer informatie op onze website: www.qiagen.com.

Inhoudsopgave

Beoogd gebruik	5
Samenvatting en uitleg	5
Principe van de procedure	6
Assays	7
Controles	7
Meegeleverde materialen	9
Inhoud van de kit	9
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	10
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	11
Veiligheidsinformatie	11
Algemene voorzorgsmaatregelen	11
Bewaren en hanteren van reagentia	12
Bewaren en hanteren van monsters	13
Procedure	14
Extractie en voorbereiding van DNA	14
Protocol:	
■ monsterbeoordelingen	15
■ detectie van BRAF-mutaties	28
Interpretatie van de resultaten (automatisch)	40
Problemen oplossen	41
Waarschuwingsberichten in het <i>therascreen</i> BRAF Assay Package	42
Kwaliteitscontrole	52
Beperkingen	52
Prestatiekenmerken	53
Blanco bovengrens (limit of blank; LOB), werkbereik en limietwaarden	53
Nauwkeurigheid: vergelijking met de analytische referentiemethode	53
Effect van DNA in het uitgangsmateriaal op de ΔC_T -waarden	54
Kruisreactiviteit	55
Waarden voor de detectielimiet (limit of detection; LOD)	56

Effect van melanine op prestaties van de kit	57
Herhaalbaarheid	58
Reproduceerbaarheid	58
Symbolen	60
Bijlage I: Protocol voor handmatige analyse met de <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-kit	61
Algemene informatie	61
Protocol: een temperatuurprofiel aanmaken	62
Procedure (handmatig)	74
Protocol:	
■ monsterbeoordeling (handmatig)	74
■ detectie van BRAF-mutaties (handmatig)	75
■ instellen van de <i>therascreen</i> BRAF PCR RGQ	76
Interpretatie van de resultaten (handmatig)	81
Software-instellingen voor analyse	81
Gegevensanalyse van monsterbeoordelingen	82
Gegevensanalyse voor detectie van BRAF-mutaties	84
Bijlage II: Installatie van het <i>therascreen</i> BRAF Assay Package	93
Procedure (download)	93
Procedure (cd)	93
Contactgegevens	96
Bestelinformatie	97

Beoogd gebruik

De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit is een in-vitro-diagnostische test voor de detectie van vijf somatische mutaties die kunnen voorkomen in het BRAF-gen, en biedt een kwalitatieve beoordeling van de mutatiestatus. Met de kit wordt DNA geïsoleerd uit met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE-) tumorweefsel. Het DNA wordt vervolgens geanalyseerd door middel van een polymerasekettingreactie (polymerase chain reaction; PCR) op een Rotor-Gene Q MDx-apparaat. De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit is bedoeld als hulpmiddel voor klinici bij de identificatie van kankerpatiënten die mogelijk baat zullen hebben bij therapie gericht tegen BRAF, zoals vemurafenib.

Tabel 1. Overzicht van mutaties en ID-nummers in COSMIC*

Mutatie	Baseverandering	ID COSMIC
V600E	GTG>GAG	476
V600E complex	GTG>GAA	475
V600D	GTG>GAT	473
V600K	GTG>AAG	474
V600R	GTG>AGG	477

*COSMIC ID's zijn overgenomen uit de Catalog of Somatic Mutations in Cancer: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

Samenvatting en uitleg

De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit is een gebruiksklare kit voor de detectie van vijf somatische mutaties in het BRAF-gen met behulp van real-time PCR (RT-PCR) op een Rotor-Gene Q MDx-apparaat.

Met behulp van de technologieën van ARMS[®] (Amplification Refractory Mutation System) en Scorpions[®] kunnen met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit de volgende mutaties worden gedetecteerd in codon 600 van het BRAF-oncogen te midden van wild-type genomisch DNA.

- V600E
- V600E complex (V600Ec)
- V600D
- V600K
- V600R

De gebruikte methoden zijn zeer selectief en stellen de gebruiker, afhankelijk van de totale hoeveelheid aanwezig DNA, in staat een laag percentage mutant te detecteren te midden van wild-type genomisch DNA. Deze selectiviteit en detectiegrenzen zijn beter dan bij technologieën als dye terminator sequencing.

Principe van de procedure

Bij de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit wordt voor de detectie van mutaties in real-time PCR gebruikgemaakt van twee technologieën: ARMS en Scorpions.

ARMS

Allel- of mutatiespecifieke amplificatie wordt uitgevoerd door middel van ARMS. *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) maakt effectief onderscheid tussen een exact gelijke sequentie (match) en een sequentie die niet exact gelijk is (mismatch) aan het 3'-uiteinde van een PCR-primer. Specifieke gemuteerde sequenties worden selectief geamplificeerd, zelfs in monsters waarin de mutatie niet voorkomt op het merendeel van de sequenties. Wanneer de primer volledig overeenkomt, verloopt de amplificatie met optimale efficiëntie. Wanneer de 3'-base niet exact overeenkomt, vindt alleen zwakke achtergrondamplificatie plaats.

Scorpions

Detectie van amplificatie gebeurt door middel van zogenaamde Scorpions. Scorpions zijn bifunctionele moleculen, met een PCR-primer die covalent gebonden is aan een fluorescent gelabelde probe. De fluorofoor in deze probe bevindt zich in de nabijheid van een quencher (die ook onderdeel is van de probe) die de fluorescentie deels uitdooft. Tijdens de PCR bindt de probe aan het amplicon en worden de fluorofoor en de quencher van elkaar gescheiden. Dit leidt tot een meetbaar sterkere fluorescentie vanuit het reageerbuisje.

Waaruit bestaat de kit?

De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit bestaat uit vijf assays:

- één controle-assay (controlereactiemengsel; CTRL)
- vier mutatie-assays (mutatie-reactiemengsels; V600E/Ec, V600D, V600K, V600R)

Met de V600E/Ec-assay worden zowel V600E-mutaties als V600Ec-mutaties gedetecteerd; er wordt in deze assay geen onderscheid gemaakt tussen deze twee mutaties.

Alle reactiemengsels zijn in tweevoud aanwezig en bevatten reagentia voor de detectie van doelsequenties, gelabeld met FAM™, en een interne controle, gelabeld met HEX™. De interne controle controleert op de aanwezigheid van remmers die fout-negatieve resultaten kunnen veroorzaken.

Assays

De procedure van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit bestaat uit twee stappen. In de eerste stap wordt de controle-assay uitgevoerd ter beoordeling van het totale amplificeerbare BRAF-DNA in het monster. In de tweede stap worden zowel de mutatie- als de controle-assay uitgevoerd om de aan- of afwezigheid van mutant-DNA vast te stellen.

Controle-assay

De controle-assay, gelabeld met FAM, wordt gebruikt voor het beoordelen van het totale amplificeerbare BRAF-DNA in een monster. Met de controle-assay wordt een gebied van exon 3 van het BRAF-gen geamplificeerd. De primers en probe in het Scorpion-molecuul zijn zodanig ontwikkeld dat ze de betreffende sequentie amplificeren ongeacht de eventuele aanwezigheid van bekende polymorfismen in het BRAF-gen.

Mutatie-assays

Iedere mutatie-assay bevat een Scorpion-probe gelabeld met FAM en een ARMS-primer om onderscheid te maken tussen wild-type DNA en DNA met een specifieke mutatie.

Controles

NB: In alle experimentele runs moeten positieve en negatieve controles worden meegenomen.

Positieve controle

In iedere run moet in buisjes 1-5 een positieve controle aanwezig zijn. De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit bevat een positieve controle voor BRAF (PC) als template-DNA voor de positieve controlereactie. De resultaten van de positieve controle worden gebruikt om te beoordelen of de kit voldoet aan de gestelde aanvaardbaarheidscriteria.

Negatieve controle

In iedere run moet in buisjes 9-13 een negatieve controle aanwezig zijn (run zonder template-DNA). De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit bevat water als template voor de negatieve controle zonder template-DNA (no template control; NTC). De negatieve controle zonder template wordt gebruikt om eventuele contaminatie tijdens het opzetten van de reacties op te sporen, en ter beoordeling van de werking van de interne controlereactie.

Beoordeling van de interne controlereactie

Ieder reactiemengsel bevat behalve de reagentia voor de doelreactie ook een interne controle. Als er een fout optreedt, kan dat een teken zijn dat er remmende stoffen aanwezig zijn waardoor de resultaten niet kloppen, of dat er bij het opzetten van de reactie iets fout is gegaan bij het betreffende buisje. Als de fout in de interne controle veroorzaakt wordt door remming van een reactie tijdens de PCR, kan het monster worden verdund om de invloed van remmers te verminderen. Bedenk echter wel dat het doel-DNA dan ook wordt verdund. In de kit wordt ook een buisje met water geleverd voor het verdunnen van monsters (Dil.). Als er monsters worden verdund, dient dit te gebeuren met het water voor het verdunnen van monsters (Dil.).

Monsterbeoordelingen

Het wordt ten sterkste aangeraden het controlereactiemengsel (CTRL) in de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit te gebruiken ter beoordeling van het totale aanwezige amplificeerbare BRAF-DNA in een monster. Met de controle-assay wordt een gebied van exon 3 van het BRAF-gen geamplificeerd. Het wordt aanbevolen monsters mee te nemen met alleen de controle-assay, met de positieve controle voor BRAF (PC) als positieve controle en water als de negatieve controle zonder template (NTC).

NB: De beoordeling van het aanwezige DNA gebeurt op basis van de PCR en kan afwijken van kwantificering op basis van absorptiemetingen. Er is extra controlereactiemengsel (CTRL) aanwezig om vóór analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit de kwaliteit en kwantiteit van het DNA in monsters te bepalen.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit			(24)
Catalogusnr.			870211
Aantal reacties			24
Control Reaction Mix (controlereactiemengsel)	Rood	1 CTRL	2 x 720 µl
V600E/Ec Reaction Mix (reactiemengsel)	Paars	2 V600E/Ec	720 µl
V600D Reaction Mix (reactiemengsel)	Oranje	3 V600D	720 µl
V600K Reaction Mix (reactiemengsel)	Roze	4 V600K	720 µl
V600R Reaction Mix (reactiemengsel)	Groen	5 V600R	720 µl
BRAF Positive Control (positieve controle voor BRAF)	Beige	PC	250 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA-polymerase)	Mintgroen	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Water for NTC (water voor NTC)	Wit	NTC	1,9 ml
Water for Sample Dilution (water voor verdunning van monsters)	Wit	Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit Handbook (Handleiding <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-kit) (Engels)			1

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (safety data sheets/SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Reagentia

- Kit voor DNA-extractie (zie "DNA ", pagina 14)
- Xyleen
- Ethanol (96–100%)*

Verbruiksartikelen

- Microcentrifugebuisjes van 1,5 ml of 2 ml (voor lysestappen)
- Microcentrifugebuisjes van 1,5 ml (voor elutiestappen) (verkrijgbaar bij Brinkmann [Safe-Lock, cat.nr. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, cat.nr. 0030 120.086] of Sarstedt [Safety Cap, cat.nr. 72.690])†
- Pipetten‡ (instelbaar) specifiek voor monsterbereiding
- Pipetten‡ (instelbaar) specifiek voor bereiding van de PCR-mastermix
- Pipetten‡ (instelbaar) specifiek voor het toevoegen van template-DNA
- Steriele pipetpunten met filters (om kruiscontaminatie te voorkomen raden wij aan gebruik te maken van pipetpuntjes met aerosolfilter)

Apparatuur

- Thermomixer, schudapparaat met verwarming, verwarmingsblok of waterbad met mogelijkheden voor incubatie bij 90 °C‡
- Tafelcentrifuge‡ met rotor voor reageerbuisjes van 2 ml
- Vortex‡

* Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

† Dit is geen volledige lijst van leveranciers.

‡ Zorg ervoor dat apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM[†]* met fluorescentiekanalen voor Cycling Green en Cycling Yellow (detectie van respectievelijk FAM en geel)
- Rotor-Gene Q-software, versie 2.3, met het BRAF Assay Package (versie 3.1.1) geïnstalleerd, voor automatische detectie van mutaties (zie "Bijlage II: Installatie van het *therascreen* BRAF Assay Package", pagina 93)

NB: De Rotor-Gene Q-software zonder BRAF Assay Package kan worden gebruikt voor handmatige mutatiedetectie. Zie "Bijlage I: Protocol voor handmatige analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit", pagina 61

- Buisjesstrips met buisjes van 0,1 ml en dopjes, voor gebruik in een rotor met 72 plaatsen
(QIAGEN, cat.nr. 981103 of 981106)
- Steriele microcentrifugebuisjes voor bereiding van de mastermixen
- Laadblok voor 72 buisjes van 0,1 ml, aluminium blok voor handmatig opzetten van de reactie met een single-channel pipet (QIAGEN, cat.nr. 9018901)

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor diagnostisch gebruik in vitro

Veiligheidsinformatie

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (SDS). Deze zijn als handige, compacte PDF-bestanden beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook de SDS voor elke QIAGEN-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrucken.

Algemene voorzorgsmaatregelen

De gebruiker dient altijd te letten op het volgende:

* Indien van toepassing kan in sommige landen de Rotor-Gene Q 5plex HRM met een productiedatum vanaf mei 2011 worden gebruikt. De productiedatum kunt u afleiden uit het serienummer aan de achterzijde van het apparaat. Het serienummer heeft de vorm "mmjjnnn", waarbij "mm" staat voor de cijfers van de productiemaand, "jj" voor de laatste twee cijfers van het productiejaar en "nnn" de unieke identificatiecode van het apparaat is.

- Positieve materialen (monsters en positieve controles) dienen apart van alle andere reagentia te worden opgeslagen en te worden geëxtraheerd en in een ruimtelijk gescheiden instelling aan het reactiemengsel te worden toegevoegd.
- Werk buitengewoon zorgvuldig om besmetting van PCR-materiaal met synthetisch controlemateriaal te voorkomen. Wij raden aan voor het opzetten van reactiemengsels en het toevoegen van DNA-template gebruik te maken van afzonderlijke pipetten die nergens anders voor worden gebruikt. Het bereiden en pipetteren van reactiemengsels moet worden uitgevoerd in een ruimte die gescheiden is van die waarin de template wordt toegevoegd. Open de Rotor-Gene Q-buisjes na afloop van de PCR-reactie niet. Zo voorkomt u contaminatie van het laboratorium met producten die tijdens PCR zijn gevormd.
- De reagentia voor de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit worden geleverd in de optimale verdunning. Verdere verdunning van reagentia wordt afgeraden, aangezien dat kan leiden tot slechtere prestaties van de kit. Het gebruik van reactievolumes kleiner dan 25 µl wordt afgeraden omdat dit de kans op fout-negatieve resultaten verhoogt.
- Alle reagentia in de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit zijn specifiek geformuleerd voor een optimale werking. Alle reagentia die geleverd worden in de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit zijn uitsluitend bedoeld voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit. Voor optimale prestaties van de kit dienen de reagentia in de kit niet door andere reagentia te worden vervangen.
- Gebruik uitsluitend de *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) die in de kit wordt geleverd. Vervang deze niet door *Taq* DNA-polymerase uit andere kits van dezelfde soort of van een andere soort, of door *Taq* DNA-polymerase van een andere leverancier.

Bewaren en hanteren van reagentia

De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit wordt op droogijs verzonden en moet bij aankomst nog steeds bevroren zijn. Als de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit bij aankomst niet bevroren is, als de buitenverpakking tijdens het vervoer open is geraakt of als de verzending geen pakbon, handleiding of reagentia bevat, neemt u contact op met een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN of met de lokale distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit dient meteen na ontvangst te worden opgeslagen bij -15 tot -30 °C in een vriezer met constante temperatuur en beschermd tegen licht – Scorpions moeten (zoals alle fluorescent gelabelde moleculen) beschermd worden tegen licht om photobleaching en verminderde prestaties te voorkomen.

Als de kit in de oorspronkelijke verpakking wordt bewaard bij de aanbevolen opslagomstandigheden, is deze stabiel tot de uiterste gebruiksdatum op het etiket. Vermijd herhaald ontdooien en invriezen. Houd een maximum aan van 6 cycli van invriezen en ontdooien.

Bewaren en hanteren van monsters

NB: Alle monsters dienen te worden behandeld als potentieel infectieus materiaal.

Monstermateriaal moet humaan genomisch DNA zijn dat is geëxtraheerd uit met formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel (FFPE-weefsel). Monsters dienen te worden vervoerd volgens de standaardmethoden voor pathologiemateriaal om de monsterkwaliteit te waarborgen.

Tumormonsters zijn niet-homogeen en gegevens afkomstig uit een bepaald tumormonster zijn mogelijk niet identiek aan die van andere coupes van dezelfde tumor. Tumormonsters kunnen ook niet-tumorweefsel bevatten. Naar verwachting zal DNA uit niet-tumorweefsel geen mutaties bevatten die met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit worden gedetecteerd.

Procedure

Extractie en voorbereiding van DNA

De prestatiekenmerken voor de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit zijn verkregen met DNA dat geëxtraheerd is met de QIAamp FFPE Tissue Kit (QIAGEN, cat.nr. 56404). Als de QIAamp FFPE Tissue Kit wordt gebruikt, voer de DNA-extractie dan uit volgens de instructies in de handleiding en let daarbij op het volgende:

- Breng de FFPE-coupes aan op objectglasjes.
- Schraap eventueel teveel aan paraffine weg rond de weefselcoupes met een nieuw, steriel scalpel.
- Schraap de weefselcoupes in microcentrifugebuisjes; gebruik daarbij voor elk te extraheren monster een nieuw scalpel.
- Elueer het gezuiverde genomische DNA in 120–200 µl buffer ATE (geleverd in de QIAamp DNA FFPE Tissue-kit). Bewaar gezuiverd genomisch DNA bij –15 tot –30 °C.

De beoordeling van het aanwezige DNA gebeurt op basis van het controlereactiemengsel (CTRL) dat is meegeleverd bij de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit en kan afwijken van kwantificering op basis van absorptiemetingen. Er is extra controlereactiemengsel (CTRL) aanwezig om vóór analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit de kwaliteit en kwantiteit van het DNA in monsters te bepalen.

NB: Om te zorgen dat er voldoende DNA is voor analyse, wordt aanbevolen in eerste instantie ten minste twee FFPE-coupes samen te extraheren en het DNA te beoordelen middels de controle-assay. Als er onvoldoende DNA is verkregen voor PCR, kunnen er nog meer coupes worden gebruikt voor DNA-extractie en kan het DNA worden samengevoegd.

NB: Om te zorgen dat er voldoende DNA is voor analyse dient de dikte van FFPE-coupes ten minste 5 µm te zijn.

Bij alle assays in de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit worden korte PCR-producten gegenereerd. De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit werkt echter niet als het DNA in het uitgangsmateriaal ernstig gefragmenteerd is.

Protocol: monsterbeoordelingen

Dit protocol wordt gebruikt voor de beoordeling van het totale amplificeerbare DNA in monsters volgens het vaste stramien van het 'BRAF CE Sample Assessment Locked Template' (Assay Package) voor geautomatiseerde beoordeling van monsters.

NB: Raadpleeg voor handmatige beoordeling "Bijlage I: Protocol voor handmatige analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit", op pagina 61.

Wat u moet weten voor u begint

- Lees voorafgaand aan de procedure "Algemene voorzorgsmaatregelen", op pagina 11.
- Neem de tijd om vertrouwd te raken met het Rotor-Gene Q MDx-apparaat voordat u met het protocol begint. Zie de gebruikershandleiding van het apparaat.
- *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) of mengsels met *Taq* DNA-polymerase mogen niet worden gevortexd, aangezien vortexen kan leiden tot inactivatie van het enzym.
- Plaats bij het pipetteren van *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) de pipetpunt net onder het vloeistofoppervlak zodat er zo weinig mogelijk enzym aan de buitenkant van de punt blijft zitten.
- Met het beschikbare controlereactiemengsel (CTRL) kunnen maximaal 24 monsters worden beoordeeld.

Wat u moet doen voor u begint

- Zorg dat de software van het *therascreen* BRAF Assay Package is geïnstalleerd voor het eerste gebruik van het Rotor-Gene Q-apparaat (zie "Bijlage II: Installatie van het *therascreen* BRAF Assay Package", op pagina 93).
- Voor ieder gebruik moeten alle reagentia ten minste 1 uur bij kamertemperatuur (15–25 °C) worden ontdooid, 10 keer worden omgedraaid om ze goed te mengen en kort worden gecentrifugeerd om de inhoud onder in het buisje te verzamelen.
- Zorg dat de *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) op kamertemperatuur is (15–25 °C) voor ieder gebruik. Centrifugeer het buisje kort zodat al het enzym zich onder in het buisje bevindt.

Procedure

1. **Ontdooi het controlereactiemengsel (CTRL), het water voor de negatieve controle zonder template (NTC) en de positieve controle (PC) gedurende ten minste 1 uur bij kamertemperatuur (15–25 °C). Meng de reagentia na ontdooien door elk buisje 10 keer om te draaien om concentratieverschillen van zouten in het buisje te voorkomen, en centrifugeer kort om de inhoud onder in het buisje te verzamelen.**
2. **Bereid voldoende mastermix (controlereactiemengsel (CTRL) plus *Taq* DNA-polymerase (*Taq*)) voor alle DNA-monsters, één positieve controlereactie en één controlereactie zonder template, volgens de volumes in Tabel 2. Ga bij het toevoegen van de reagentia uit van 1 extra monster zodat er voldoende is om de PCR op te zetten, waarbij altijd een beetje mix verloren gaat. De mastermix bevat alle bestanddelen die nodig zijn voor PCR, behalve het monster.**

Tabel 2. Bereiding van de mastermix voor de controle-assay*

Bestanddeel	Volume
Controlereactiemengsel (CTRL)	19,5 µl x (n+1)*
<i>Taq</i> DNA-polymerase (<i>Taq</i>)	0,5 µl x (n+1)*
Totaal volume	20,0 µl/reactie

* n = aantal reacties (monsters plus controles). Maak bij het bereiden van de mastermix genoeg voor 1 extra monster (n+1) zodat er voldoende is om de PCR op te zetten, waarbij altijd een beetje mix verloren gaat. De waarde van n mag niet groter zijn dan 26 (24 monsters plus 2 controles).

3. **Meng de mastermix grondig door hem voorzichtig 10 keer op en neer te pipetteren. Plaats het juiste aantal buisjesstrips in het laadblok, volgens het schema in Afbeelding 1. Pipetteer meteen 20 µl mastermix in elk PCR-buisje.** Laat de dopjes in de plastic container tot ze nodig zijn. Voeg voor de analyse van de monsters de mastermix toe aan één buisje voor de positieve controle, één buisje voor de negatieve controle en één buisje voor elk monster.

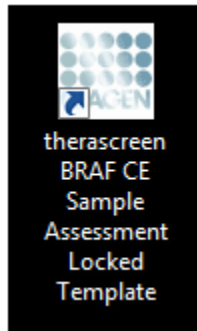
Assay									
Controle	1 (PC)	9	17	25	-	-	-	-	-
Controle	2 (NTC)	10	18	26	-	-	-	-	-
Controle	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Controle	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Controle	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Controle	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Controle	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Controle	8	16	24	-	-	-	-	-	-

Afbeelding 1. Indeling van het laadblok voor de beoordeling van monsters.

De getallen geven de posities in het laadblok en de uiteindelijke rotorpositie aan.

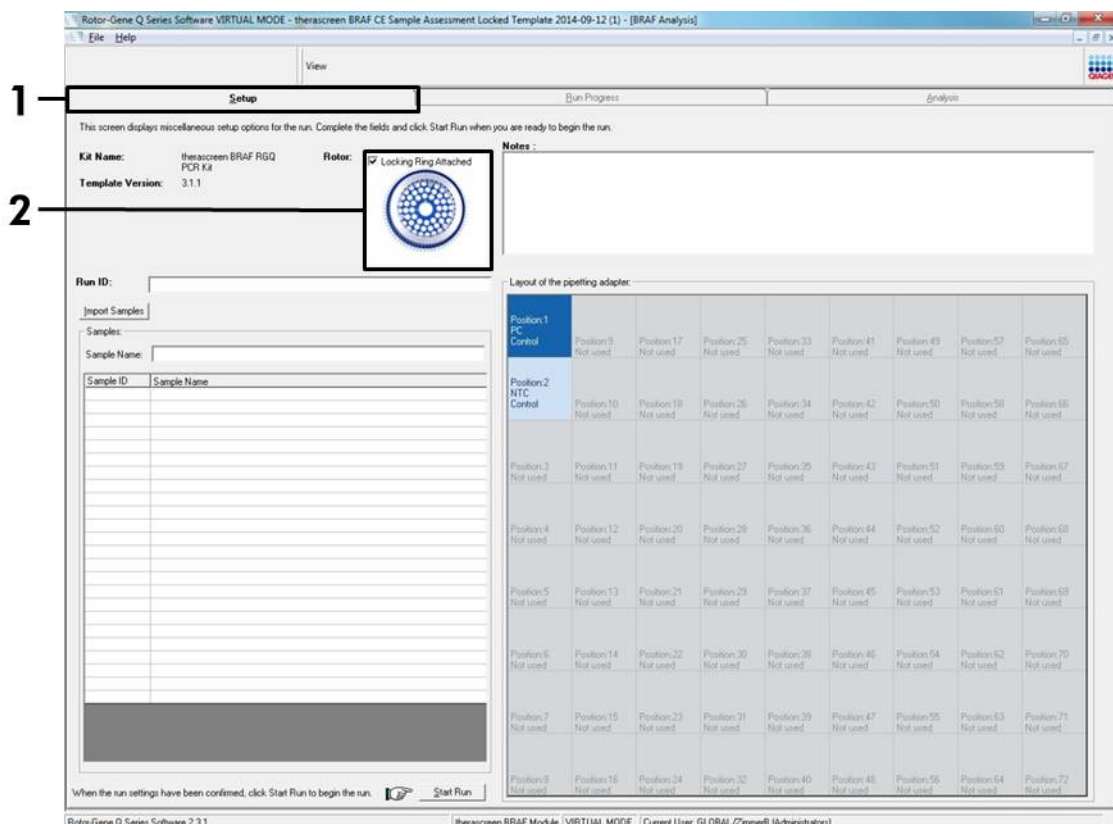
4. Doe meteen 5 µl water voor de controle zonder template (NTC) bij het buisje voor de negatieve controle zonder template (PCR-buisje nr. 2) en doe het dopje erop. Doe 5 µl monster bij de monsterbuisjes (PCR-buisjes nrs. 3-26) en doe de dopjes erop. Doe 5 µl positieve controle voor BRAF (PC) bij het buisje voor de positieve controle (PCR-buisje nr. 1) en doe het dopje erop. Markeer de dekseltjes van de buisjes om aan te geven waar ze in de Rotor-Gene Q MDx moeten worden geplaatst.
5. Kijk nadat de dopjes op alle PCR-buisjes zijn geplaatst of het vloeistofniveau in alle buisjes op het oog gelijk is, om te controleren of aan elk buisje monster is toegevoegd.
6. Draai alle PCR-buisjes 4 keer om, om de monsters en de reactiemengsels te mengen.
7. Zet de PCR-buisjes op de juiste positie in de rotor met 72 plaatsen (Afbeelding 1). Als niet alle plaatsen in de rotor bezet zijn, zet dan een leeg buisje met dop in elke lege plek.
8. Plaats de rotor met 72 plaatsen meteen in de Rotor-Gene Q MDx. Zorg ervoor dat de vergrendelingsring (hulpstuk bij het Rotor-Gene Q-apparaat) op de rotor is geplaatst zodat de buisjes gedurende de run op hun plaats worden gehouden.

9. Start de software van de Rotor-Gene Q door te dubbelklikken op het pictogram voor “*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template” op het bureaublad van de laptop waarop het Rotor-Gene Q MDx-apparaat is aangesloten (zie Afbeelding 2).



Afbeelding 2. Pictogram voor “*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template”.

10. Standaard verschijnt het tabblad “Setup” (Instelling) (Afbeelding 3). Controleer of de vergrendelingsring goed geplaatst is en vink het vakje “Locking Ring Attached” (Vergrendelingsring geplaatst) aan. Sluit het deksel van de Rotor-Gene Q.



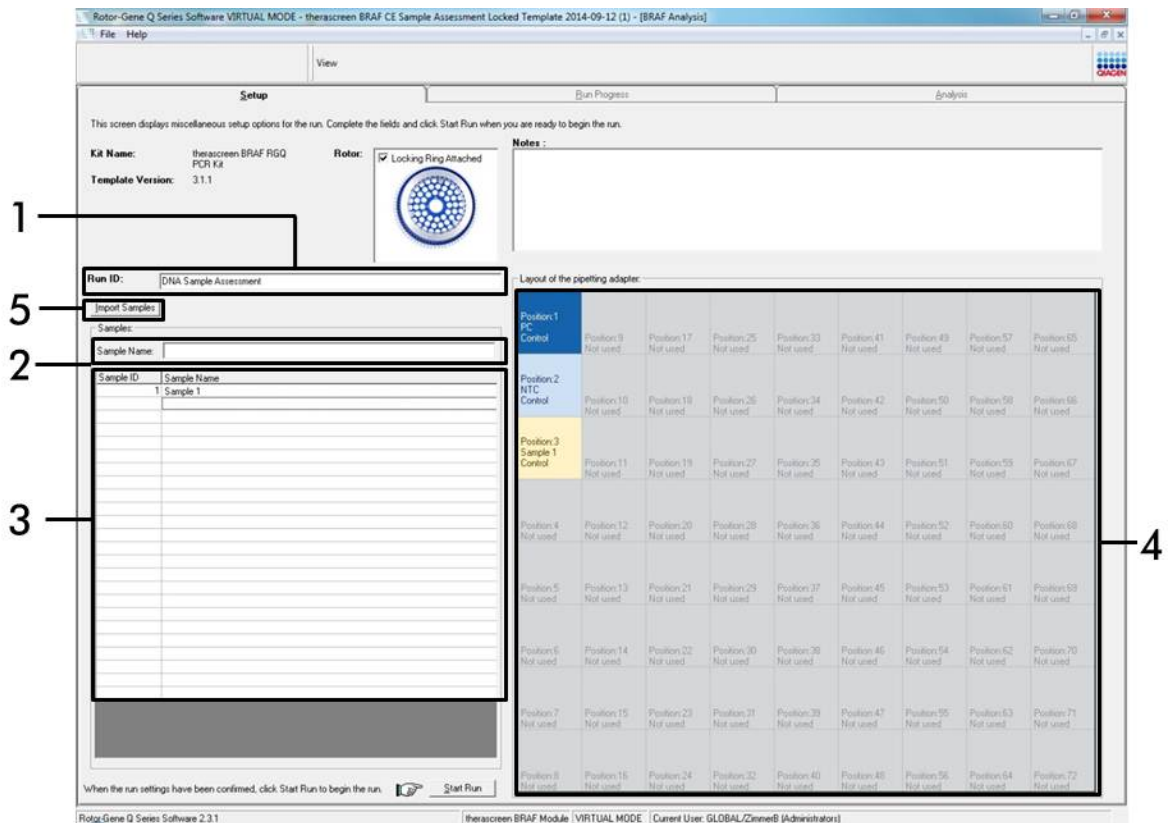
Afbeelding 3. Tabblad “Setup” (1) en het vakje “Locking Ring Attached” (2).

11. Voer in het veld "Run ID" (Run-ID) een identificatiecode voor de run in volgens de bij u gebruikte afspraken voor naamgeving. Voer in het veld "Sample Name" (Naam monster) de naam van het monster in volgens de bij u gebruikte afspraken voor naamgeving en druk op de toets "Enter". De naam van het monster wordt nu aan de lijst met monsters in het vak eronder toegevoegd en het monster krijgt een "Sample ID" (Monster-ID, 1, 2, 3 enzovoort). Ook wordt het paneel "Layout of the pipetting adapter" (Indeling met pipetteerschema) aan de rechterkant bijgewerkt met de naam van het monster (Afbeelding 4).

NB: Namen van monsters die als *.smp (monsterbestand bij de Rotor-Gene Q) of *.csv (comma separated values) -bestand zijn opgeslagen, kunnen ook worden geïmporteerd middels de knop "Import Samples" (Monsters importeren). Bij deze methode worden de namen van de monsters automatisch ingevuld.

NB: Controleer in het paneel "Layout of the pipetting adapter" of de naam van het zojuist toegevoegde monster is gemarkeerd door een verandering van de kleur en of de naam van het monster op de plaats van het monster staat (Afbeelding 4).

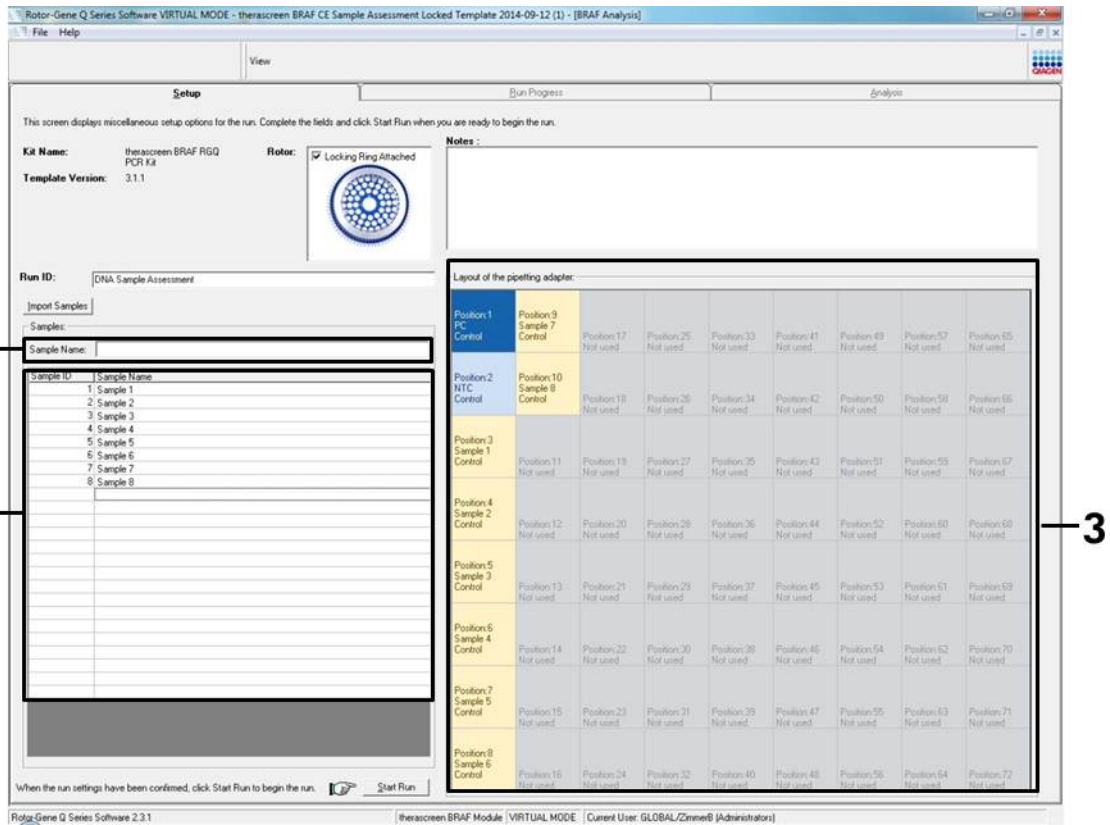
NB: Namen van monsters die uit meer dan 8 tekens bestaan, worden mogelijk niet volledig weergegeven in het paneel "Layout of the pipetting adapter".



Afbeelding 4. Invoeren van de "Run ID" en "Sample Name". (1 = dialoogveld "Run ID", 2 = dialoogveld "Sample Name", 3 = lijst met monsters, 4 = paneel "Layout of the pipetting adapter", 5 = knop "Sample Import" (Monster importeren)).

12. Herhaal stap 11 om de namen van alle overige monsters in te voeren (Afbeelding 5).

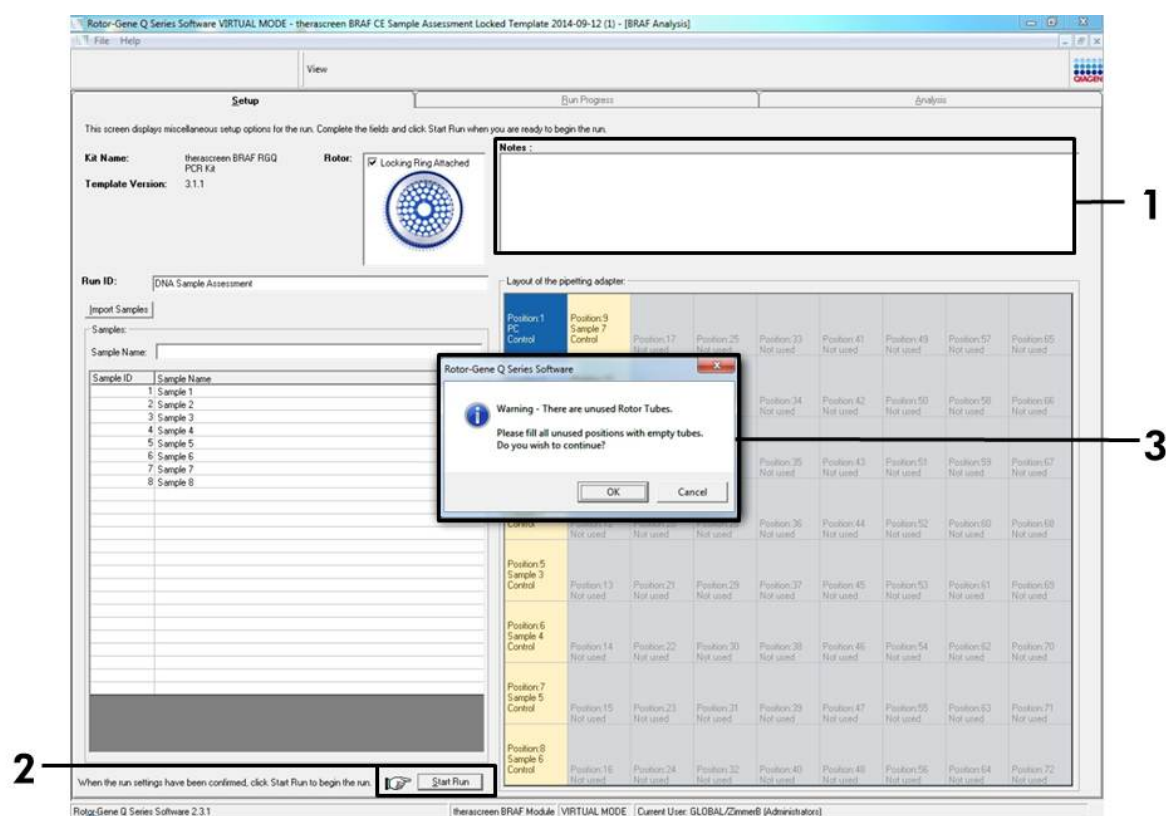
NB: Om de naam van een monster aan te passen, klikt u op "Sample Name" in de lijst met monsters. Het geselecteerde monster wordt getoond in het dialoogveld "Sample Name" boven aan het venster. Pas de naam van het monster aan volgens de bij u gebruikte afspraken voor naamgeving en druk op de toets "Enter" om de naam bij te werken.



Afbeelding 5. Invoeren van namen van overige monsters in het dialoogveld "Sample Name". (1 = dialoogveld "Sample Name", 2 = lijst met monsters, 3 = paneel "Layout of the pipetting adapter").

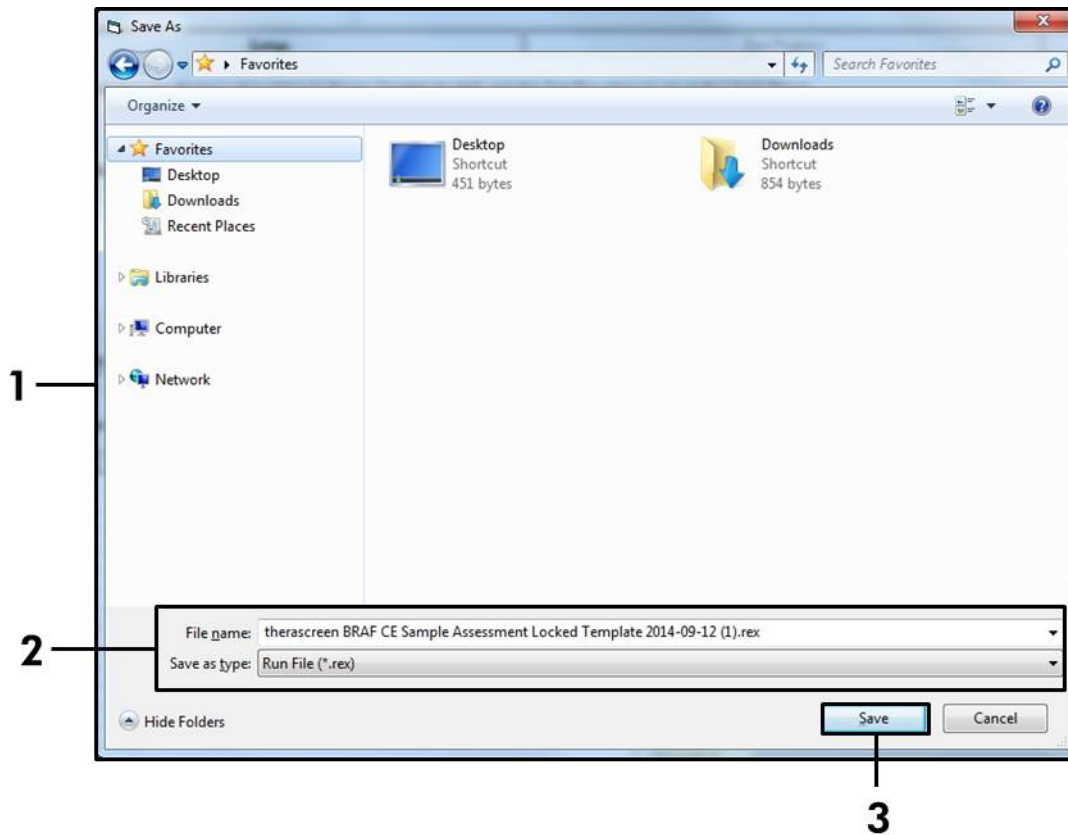
13. Controleer, nadat de namen van alle monsters zijn ingevoerd, of alle namen kloppen. Voer, indien gewenst, in het dialogveld "Notes" (Opmerkingen) eventuele aanvullende informatie in en klik op de knop "Start Run" (Run starten) (Afbeelding 6).

NB: Als er een plaats in de rotor niet bezet is, verschijnt het bericht "Warning" (Waarschuwing) in beeld (Afbeelding 6) om de gebruiker eraan te herinneren dat in alle ongebruikte posities een leeg buisje met dop moet worden geplaatst. Controleer of in alle ongebruikte plekken in de rotor een leeg buisje met dop aanwezig is en klik op "OK" (OK) om verder te gaan.



Afbeelding 6. Dialogveld "Notes" (1), knop "Start Run" (2) en "Warning" bij ongebruikte rotorposities (3).

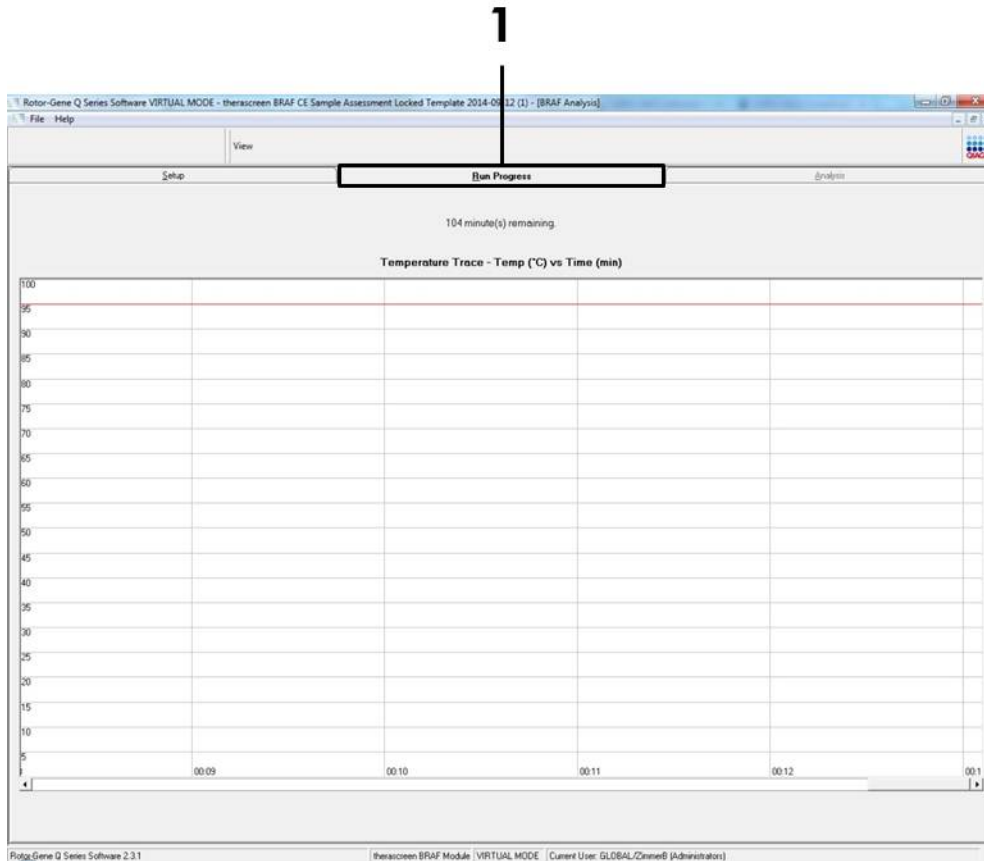
14. Het venster "Save As" (Opslaan als) verschijnt in beeld. Kies een geschikte naam en bestandslocatie voor het bestand en sla de PCR-run op als *.rex run-bestand door op "Save" (Opslaan) te klikken (Afbeelding 7).



Afbeelding 7. Opslaan van het run-bestand. (1 = venster "Save As", 2 = velden "File Name" (Bestandsnaam) en "Save as type" (Opslaan als type), 3 = knop "Save").

15. De PCR-run begint.

NB: Als de run begint, wordt automatisch het tabblad "Run Progress" (Voortgang van run) geopend, waarop het temperatuurverloop en de resterende tijd te zien zijn (Afbeelding 8).

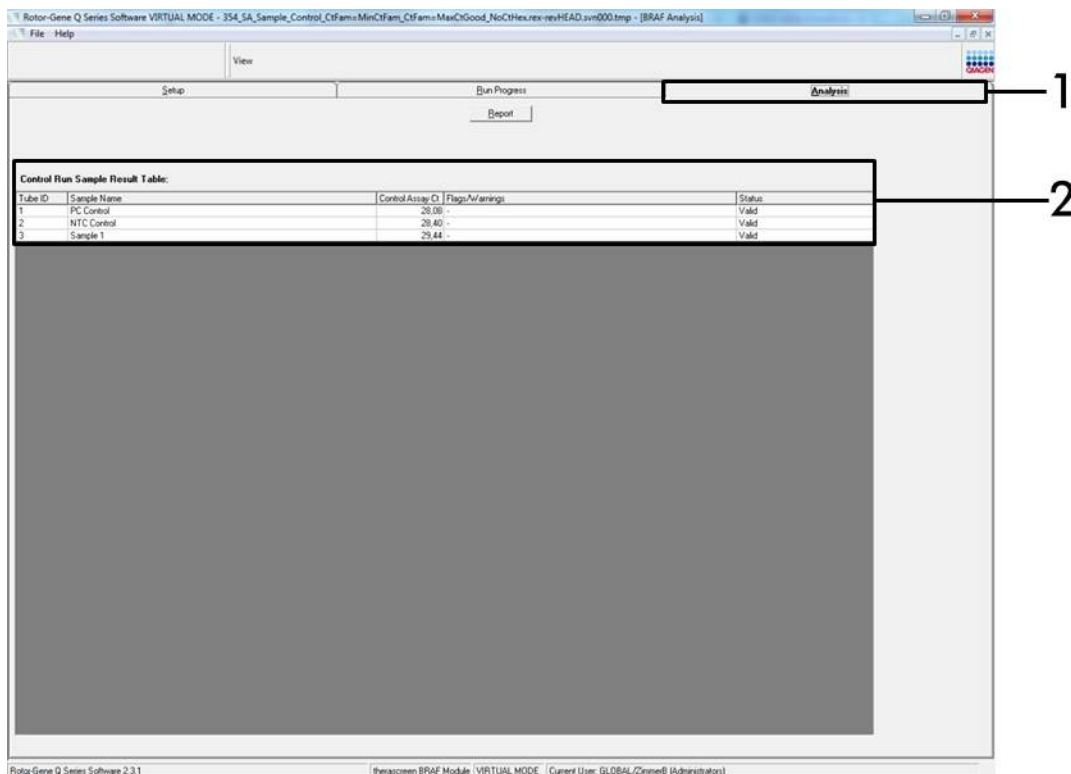


Afbeelding 8. Het tabblad "Run Progress".

16. Na afloop van de run wordt automatisch het tabblad “Analysis” (Analyse) geopend.

NB: Als het tabblad “Analysis” niet vanzelf wordt geopend, klik dan op het tabblad “Analysis” (Afbeelding 9).

NB: Onder het kopje “Interpretatie van de resultaten” op pagina 40 wordt uitleg gegeven over de gebruikte rekenmethode.



Afbeelding 9. Het tabblad “Analysis” en weergave van resultaten. (1 = tabblad “Analysis”, 2 = “Sample Result Table” (Tabel met resultaten van monsters).

17. De resultaten van controles worden als volgt weergegeven in de “Sample QC Result Table” (Tabel met resultaten van de kwaliteitscontrole) (Afbeelding 9).

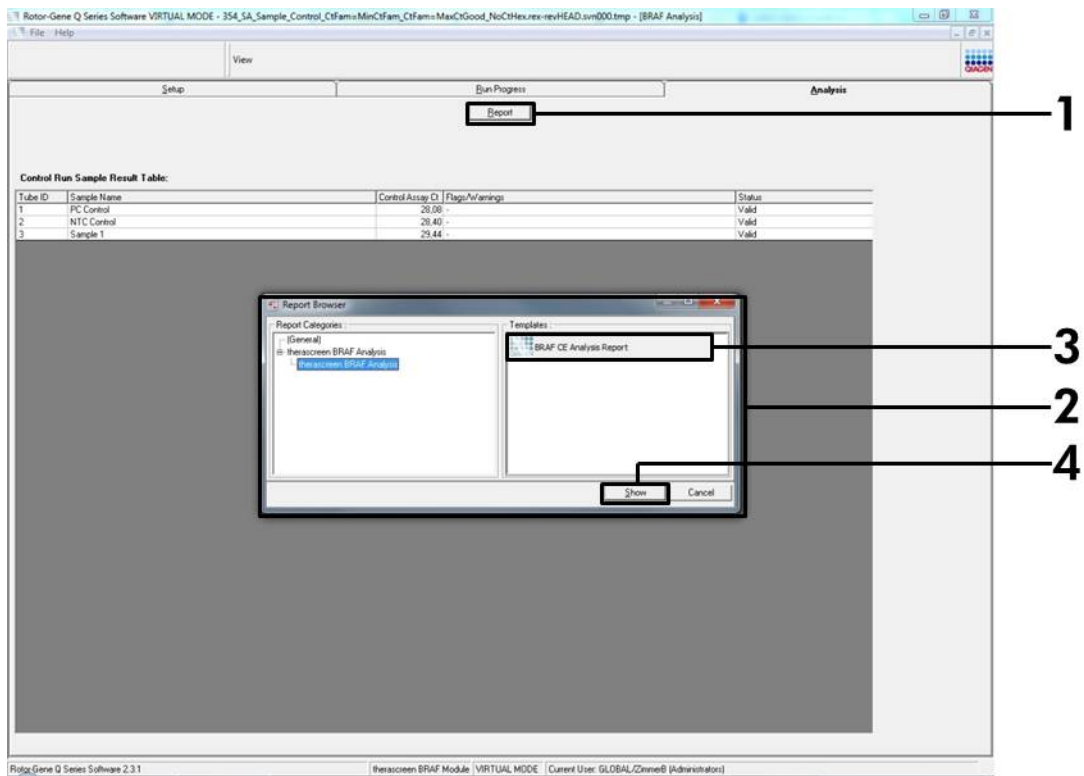
- **Controles van de run (positieve controle en negatieve controle zonder template, buisjes op respectievelijk posities 1 en 2).** Als de resultaten binnen het aanvaardbare bereik liggen, wordt bij beide “Valid” (Geldig) weergegeven. Zo niet, dan wordt als resultaat “Invalid” (Ongeldig) weergegeven.

- **Als bij de controlereactie van het monster een C_T -waarde $> 32,00$ wordt gevonden, wordt "Invalid" weergegeven.** De hoeveelheid DNA is niet voldoende voor mutatie-analyse. Test het monster opnieuw. Als de hoeveelheid DNA nog steeds onvoldoende is, voer dan een extractie uit op een grotere hoeveelheid tumorweefsel, indien beschikbaar (zie "Problemen oplossen" op pagina 41).
- **Als bij de controlereactie van het monster een C_T -waarde $< 21,95$ wordt gevonden, wordt "Invalid" weergegeven.** De DNA-concentratie is te hoog voor mutatie-analyse. Verdun het monster met nucleasevrij water voor verdunnen (Dil.) en test het opnieuw. Verdun het monster tot een C_T van 21,95–32,00. Een verdunning van 1:1 geeft een toename van de C_T -waarde van ongeveer 1,0.
- **Als bij de controlereactie van het monster de C_T -waarde tussen 21,95 en 32,00 ligt ($21,95 \leq \text{controle-}C_T \leq 32,00$), wordt "Valid" weergegeven.** De DNA-concentratie is geschikt voor mutatie-analyse.

NB: Herhaal bij eventuele nieuwe extractie of verdunning de controlereactie ter bevestiging dat de DNA-concentratie nu wel geschikt is voor gebruik.

18. Door op de knop "Report" (Rapport) te klikken, kunnen rapportagebestanden worden geproduceerd. Het venster "Report Browser" (Rapportagebrowser) verschijnt in beeld. Selecteer "BRAF CE Analysis Report" (BRAF CE-analyserapport) onder "Templates" (Sjablonen) en klik op de knop "Show" (Tonen) (Afbeelding 10).

NB: Rapportages kunnen op een andere locatie worden opgeslagen in Web Archives-vorm via de knop "Save As" links boven aan elk rapport.



Afbeelding 10. Selecteren van het "BRAF CE Analysis Report". (1 = knop "Report" (Rapport), 2 = "Report Browser", 3 = "BRAF CE Analysis Report", 4 = knop "Show").

Protocol: detectie van BRAF-mutaties

Dit protocol wordt gebruikt voor de detectie van BRAF-mutaties. Nadat een monster geschikt is bevonden voor analyse, kan het worden getest door middel van de BRAF-mutatie-assays met behulp van de geautomatiseerde software.

NB: Raadpleeg voor handmatige mutatiedetectie “Bijlage I: Protocol voor handmatige analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit”, op pagina 61.

Wat u moet weten voor u begint

- Lees voorafgaand aan de procedure “Algemene voorzorgsmaatregelen”, op pagina 11.
- Neem de tijd om vertrouwd te raken met de Rotor-Gene Q MDx voordat u met het protocol begint. Zie de gebruikershandleiding van het apparaat.
- *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) of mengsels met *Taq* DNA-polymerase mogen niet worden gevortexd, aangezien vortexen kan leiden tot inactivatie van het enzym.
- Groepeer, voor efficiënt gebruik van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit, de monsters in batches van ten minste 6. Bij kleinere groepen kunnen er minder monsters met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit worden getest.
- Plaats bij het pipetteren van *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) de pipetpunt net onder het vloeistofoppervlak zodat er zo weinig mogelijk enzym aan de buitenkant van de punt blijft zitten.

Wat u moet doen voor u begint

- Zorg dat de software van het *therascreen* BRAF Assay Package is geïnstalleerd voor het eerste gebruik van het Rotor-Gene Q-apparaat (zie “Bijlage I: Protocol voor handmatige analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit”, op pagina 61).
- Voor ieder gebruik moeten alle reagentia ten minste 1 uur bij kamertemperatuur (15–25 °C) worden ontdooid, 10 keer worden omgedraaid om ze goed te mengen en kort worden gecentrifugeerd om de inhoud onder in het buisje te verzamelen.
- Zorg dat de *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) op kamertemperatuur is (15–25 °C) voor ieder gebruik. Centrifugeer het buisje kort zodat al het enzym zich onder in het buisje bevindt.

Procedure

1. **Ontdooi de reactiemengsels, het water voor de negatieve controle zonder template (NTC) en de positieve controle voor BRAF (PC) gedurende ten minste 1 uur bij kamertemperatuur (15–25 °C). Meng de reagentia na ontdooien door elk buisje 10 keer om te draaien om concentratieverschillen van zouten in het buisje te voorkomen, en centrifugeer kort om de inhoud onder in het buisje te verzamelen.**
2. **Bereid voldoende mastermixen (reactiemengsel plus *Taq* DNA-polymerase (*Taq*)) voor alle DNA-monsters, één positieve controlereactie en één controlereactie zonder template, volgens de volumes in Tabel 3. Ga bij het toevoegen van de reagentia uit van 1 extra monster zodat er voldoende is om de PCR op te zetten, waarbij altijd een beetje mix verloren gaat.**
De mastermixen bevatten alle bestanddelen die nodig zijn voor PCR, behalve het monster.

Tabel 3. Bereiding van de mastermixen voor de assay*

Assay	Volume reactiemengsel	Volume <i>Taq</i> DNA-polymerase (<i>Taq</i>)
Controle	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
V600E/Ec	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
V600D	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
V600K	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)
V600R	19,5 µl x (n+1)	0,5 µl x (n+1)

* n = aantal reacties (monsters plus controles). Maak bij het bereiden van de mastermix genoeg voor 1 extra monster (n+1) zodat er voldoende is om de PCR op te zetten, waarbij altijd een beetje mix verloren gaat.

3. **Meng de mastermix grondig door hem voorzichtig 10 keer op en neer te pipetteren. Plaats het juiste aantal buisjesstrips in het laadblok, volgens het schema in Afbeelding 11. Pipetteer meteen 20 µl mastermix in elk PCR-buisje (niet meegeleverd).**

Laat de dopjes in de plastic container tot ze nodig zijn.

Assay	Controles		Monsternummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Controle	1	9	17	25	33	41	49	57	65
V600E/Ec	2	10	18	26	34	42	50	58	66
V600D	3	11	19	27	35	43	51	59	67
V600K	4	12	20	28	36	44	52	60	68
V600R	5	13	21	29	37	45	53	61	69
–	6	14	22	30	38	46	54	62	70
–	7	15	23	31	39	47	55	63	71
–	8	16	24	32	40	48	56	64	72

Afbeelding 11. Indeling van het laadblok met controles en mutatie-assays. De getallen geven de positie in het laadblok en de uiteindelijke rotorpositie aan.

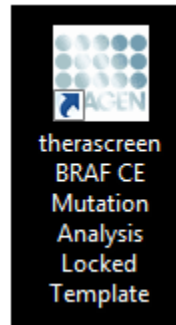
4. Doe meteen 5 µl water voor de controle zonder template (NTC) bij de PCR-buisjes voor de negatieve controle zonder template (PCR-buisje nr. 9–13) en doe de dopjes erop. Doe 5 µl van elk monster bij de monsterbuisjes (PCR-buisjes nrs. 17–21, 25–29, 33–37, 41–45, 49–53, 57–61 en 65–69) en doe de dopjes erop. Doe 5 µl positieve controle voor BRAF (PC) bij de buisjes voor de positieve controle (PCR-buisjes nr. 1–5) en doe de dopjes erop. Elk DNA-monster moet worden getest met zowel de controle- als alle mutatie-assays.

Markeer de dekseltjes van de buisjes om aan te geven waar ze in de Rotor-Gene Q MDx moeten worden geplaatst.

5. Kijk nadat de dopjes op alle PCR-buisjes zijn geplaatst of het vloeistofniveau in alle buisjes op het oog gelijk is, om te controleren of aan elk buisje monster is toegevoegd.
6. Draai alle PCR-buisjes 4 keer om, om de monsters en de reactiemengsels te mengen.
7. Zet de PCR-buisjes op de juiste positie in de rotor met 72 plaatsen (Afbeelding 11).

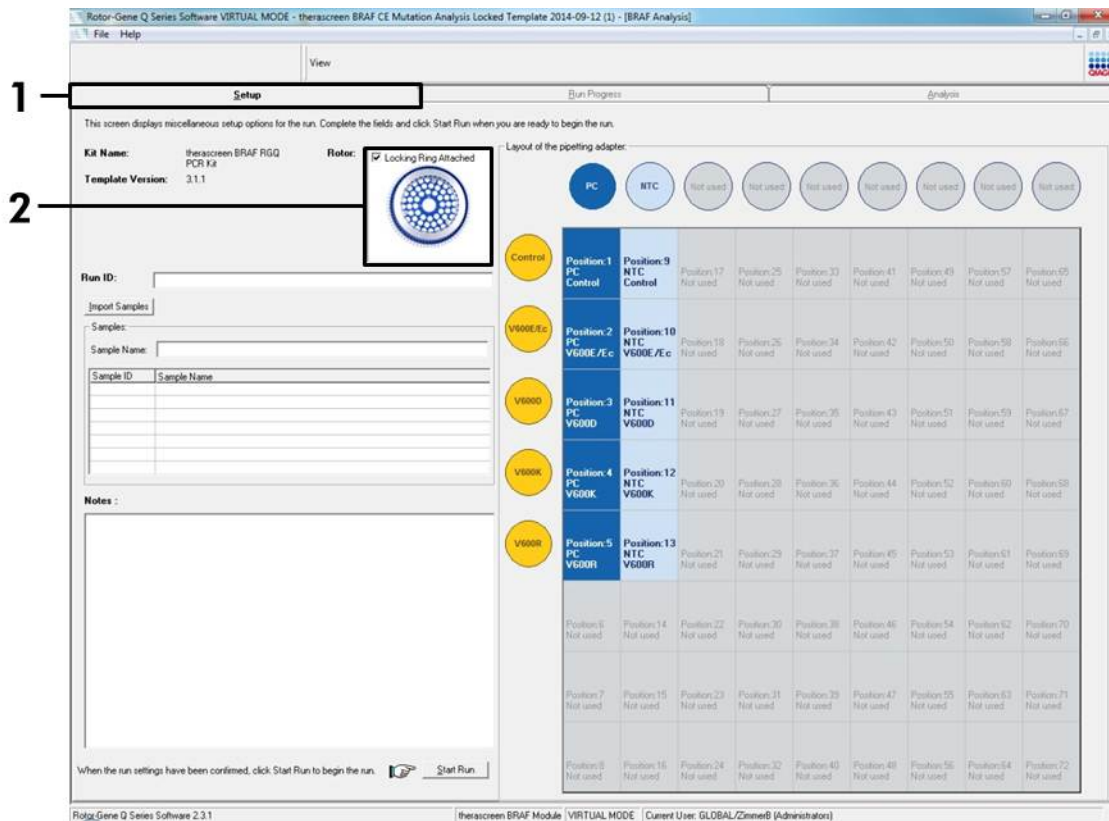
Per PCR-run kunnen er maximaal 7 monsters worden meegenomen. Als niet alle plaatsen in de rotor bezet zijn, zet dan een leeg buisje met dop in elke lege plek.

8. Plaats de rotor met 72 plaatsen meteen in de Rotor-Gene Q MDx. Zorg ervoor dat de vergrendelingsring (hulpstuk bij het Rotor-Gene Q-apparaat) op de rotor is geplaatst zodat de buisjes gedurende de run op hun plaats worden gehouden.
9. Start de software van de Rotor-Gene Q en open tegelijkertijd de template door te dubbelklikken op het pictogram voor "*therascreen* BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" op het bureaublad van de laptop waarop het Rotor-Gene Q-apparaat is aangesloten (Afbeelding 12).



Afbeelding 12. Pictogram voor "*therascreen* BRAF CE Mutation Analysis Locked Template".

10. Standaard verschijnt het tabblad "Setup" (Afbeelding 13). Controleer of de vergrendelingsring goed geplaatst is en vink het vakje "Locking Ring Attached" aan. Sluit het deksel van de Rotor-Gene Q.



Afbeelding 13. Tabblad "Setup" (1) en het vakje "Locking Ring Attached" (2).

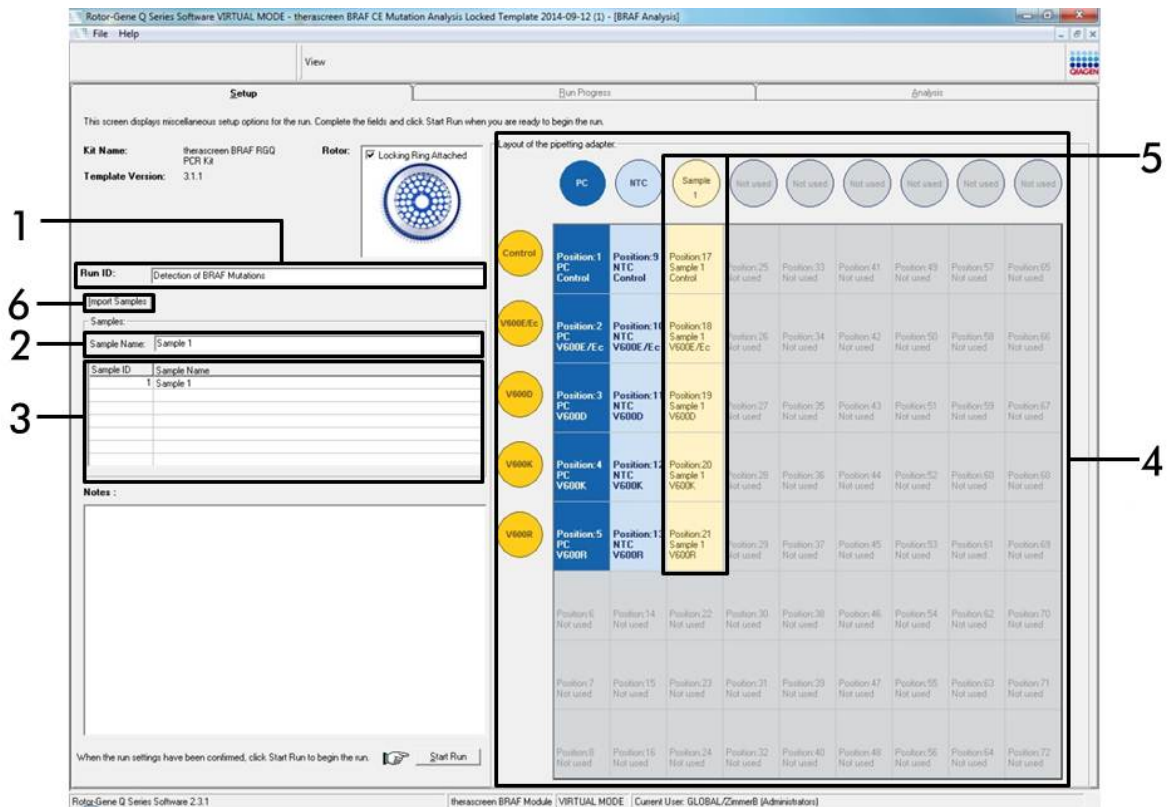
11. Voer in het veld "Run ID" een identificatiecode voor de run in volgens de bij u gebruikte afspraken voor naamgeving. Voer in het veld "Sample Name" de naam van het monster in volgens de bij u gebruikte afspraken voor naamgeving en druk op de toets "Enter". De naam van het monster wordt nu aan de lijst met monsters in het vak eronder toegevoegd en het monster krijgt een "Sample ID" (1, 2, 3 enzovoort). Ook wordt het paneel "Layout of the pipetting adapter" aan de rechterkant bijgewerkt met de naam van het monster (Afbeelding 14).

NB: Namen van monsters die als *.smp (monsterbestand bij de Rotor-Gene Q) of *.csv (comma separated values) -bestand zijn opgeslagen, kunnen ook worden geïmporteerd middels de knop "Import Samples". Bij deze methode worden de namen van de monsters automatisch ingevuld.

NB: Controleer in het paneel "Layout of the pipetting adapter" of de naam van het monster is gemarkeerd door een verandering van de kleur en of alle assays in de kolom onder de cirkel met het monster gemarkeerd zijn (Afbeelding 14).

NB: Er kunnen maximaal 7 monsters worden toegevoegd. Automatisch wordt aan elk monster een identificatienummer van 1 tot en met 7 toegekend (in de cirkels die horen bij de monsters).

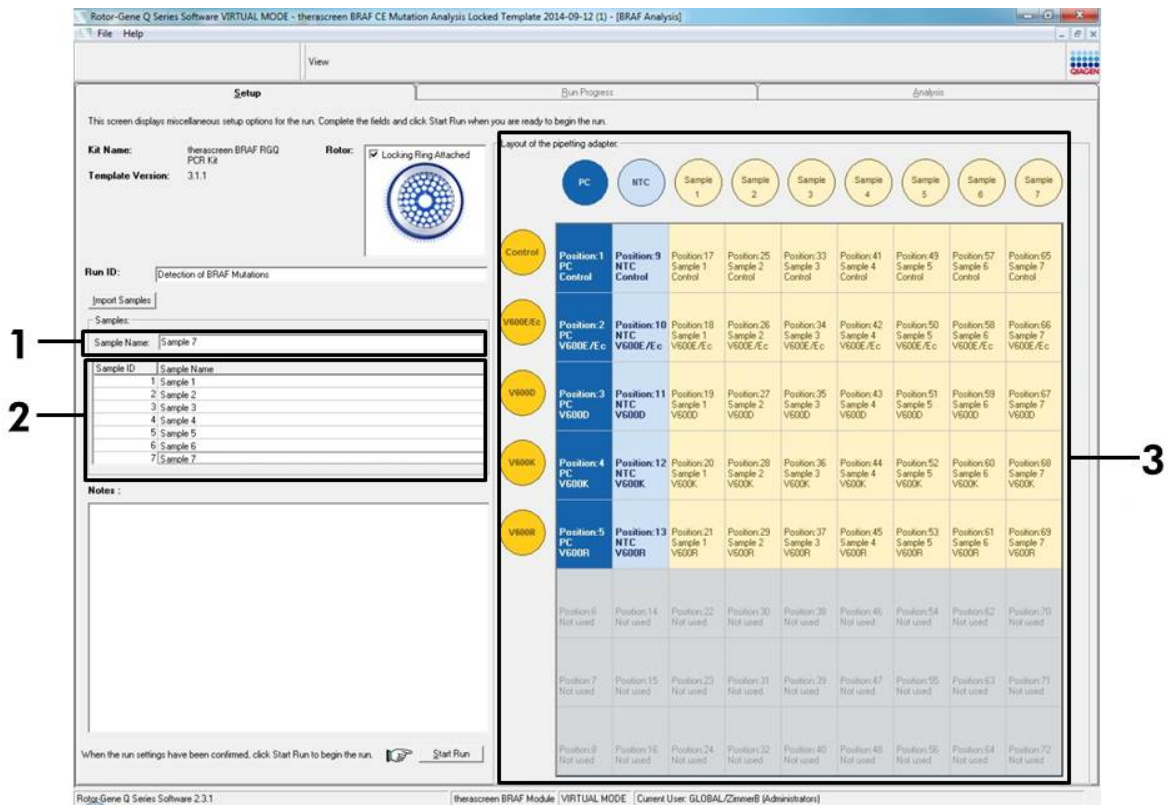
NB: Namen van monsters die uit meer dan 8 tekens bestaan, worden mogelijk niet volledig weergegeven in het paneel "Layout of the pipetting adapter".



Afbeelding 14. Invoeren van de "Run ID" en "Sample Name". (1 = dialoogveld "Run ID", 2 = dialoogveld "Sample Name", 3 = lijst met monsters, 4 = paneel "Layout of the pipetting adapter", 5 = gemarkeerde cirkel van monster en kolom van 5 assays onder paneel, 6 = knop "Sample Import").

12. Herhaal stap 11 om de namen van alle overige monsters in te voeren (Afbeelding 15).

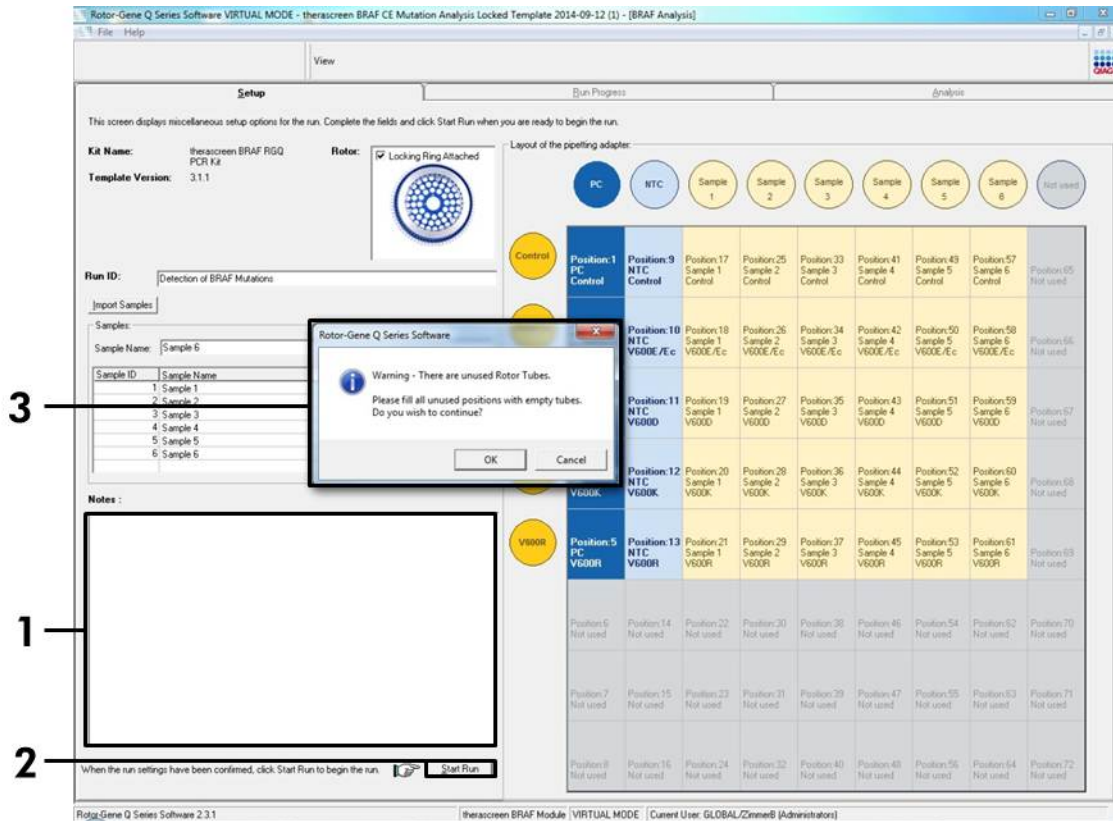
NB: Om de naam van een monster aan te passen, klikt u op "Sample Name" in de lijst met monsters. Het geselecteerde monster wordt getoond in het dialoogveld "Sample Name" boven aan het venster. Pas de naam van het monster aan volgens de bij u gebruikte afspraken voor naamgeving en druk op de toets "Enter" om de naam bij te werken.



Afbeelding 15. Invoeren van namen van overige monsters in het dialoogveld "Sample Name". (1 = dialoogveld "Sample Name", 2 = lijst met monsters, 3 = "Layout of the pipetting adapter").

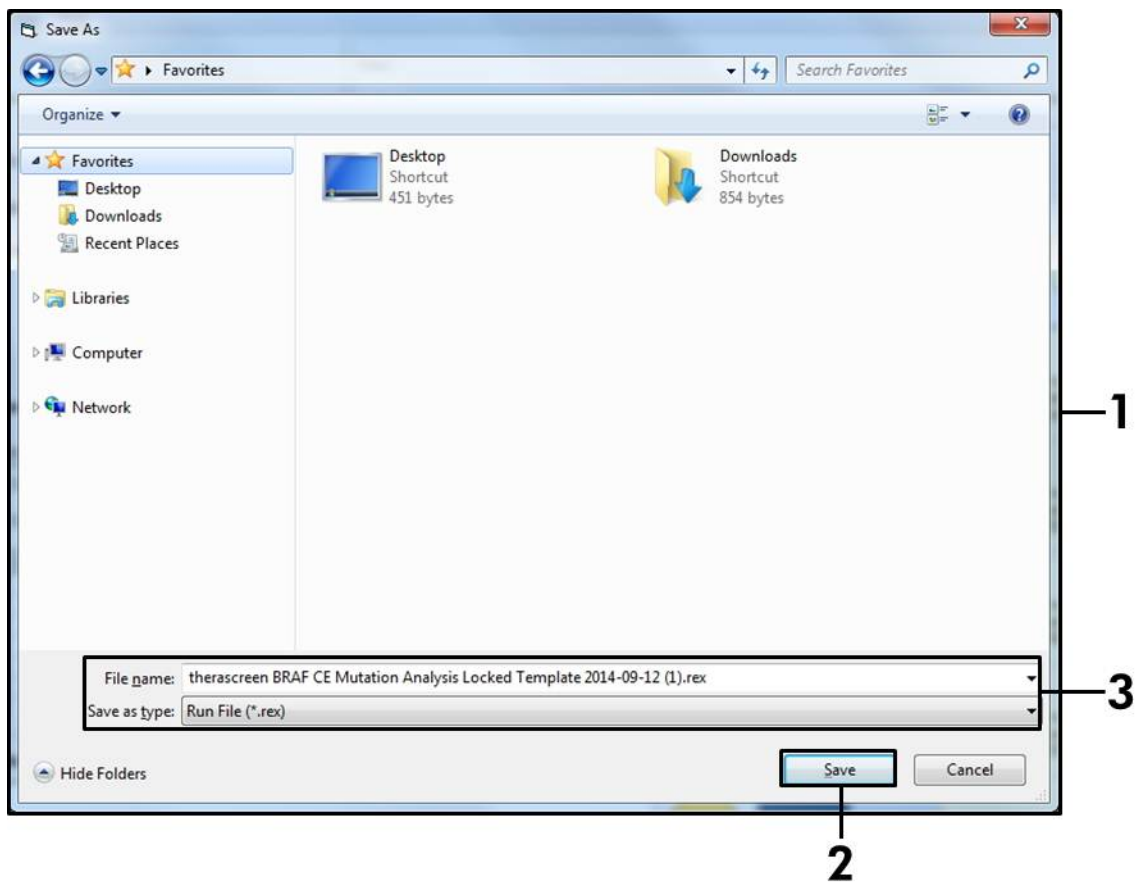
13. Controleer, nadat de namen van alle monsters zijn ingevoerd, of alle namen kloppen. Voer, indien gewenst, in het dialoogveld "Notes" eventuele aanvullende informatie in en klik op de knop "Start Run" (Afbeelding 16).

NB: Als er een plaats in de rotor niet bezet is, verschijnt het bericht "Warning" in beeld (Afbeelding 16) om de gebruiker eraan te herinneren dat in alle ongebruikte posities een leeg buisje met dop moet worden geplaatst. Controleer of in alle ongebruikte plekken in de rotor een leeg buisje met dop aanwezig is en klik op "OK" om verder te gaan.



Afbeelding 16. Dialogveld “Notes” (1), knop “Start Run” (2) en “Warning” bij ongebruikte rotorposities (3).

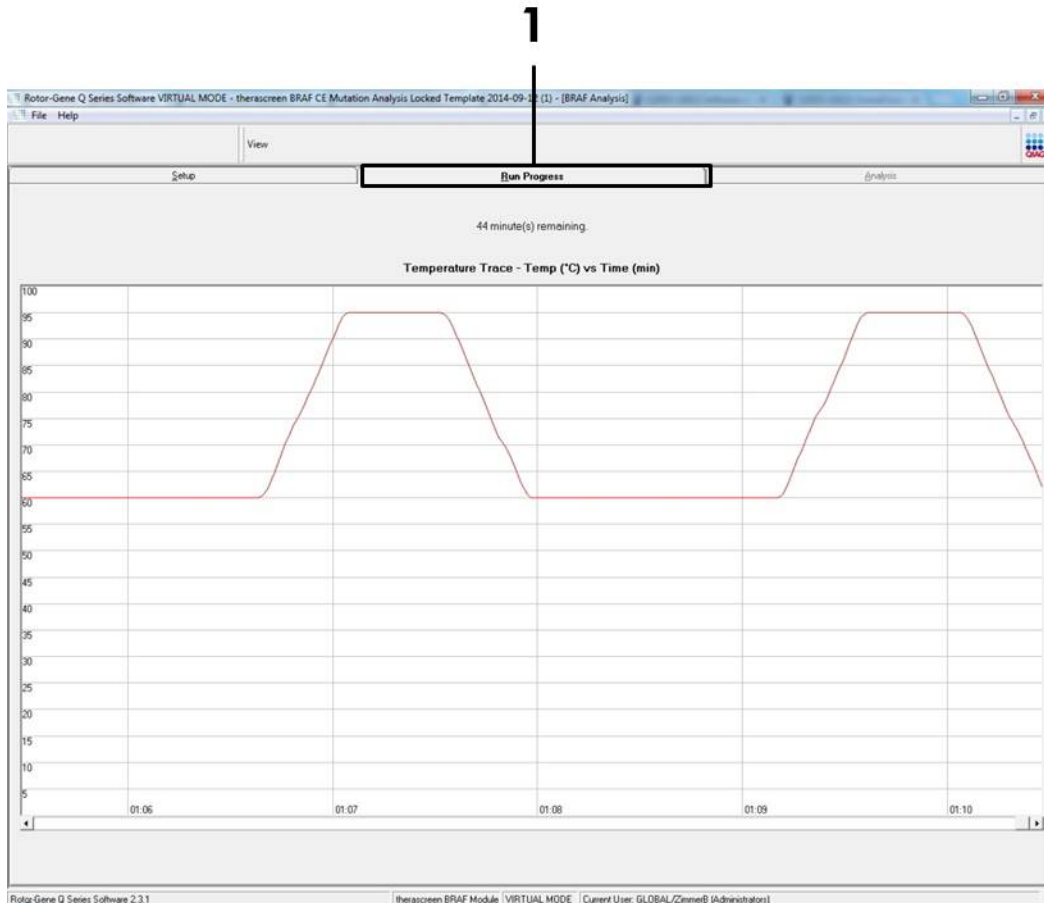
14. Het venster "Save As" verschijnt in beeld. Kies een geschikte naam en bestandslocatie voor het bestand en sla de PCR-run op als *.rex run-bestand (Afbeelding 17).



Afbeelding 17. Opslaan van het run-bestand. (1 = venster "Save As", 2 = velden "File Name" en "Save as type", 3 = knop "Save").

15. De PCR-run begint.

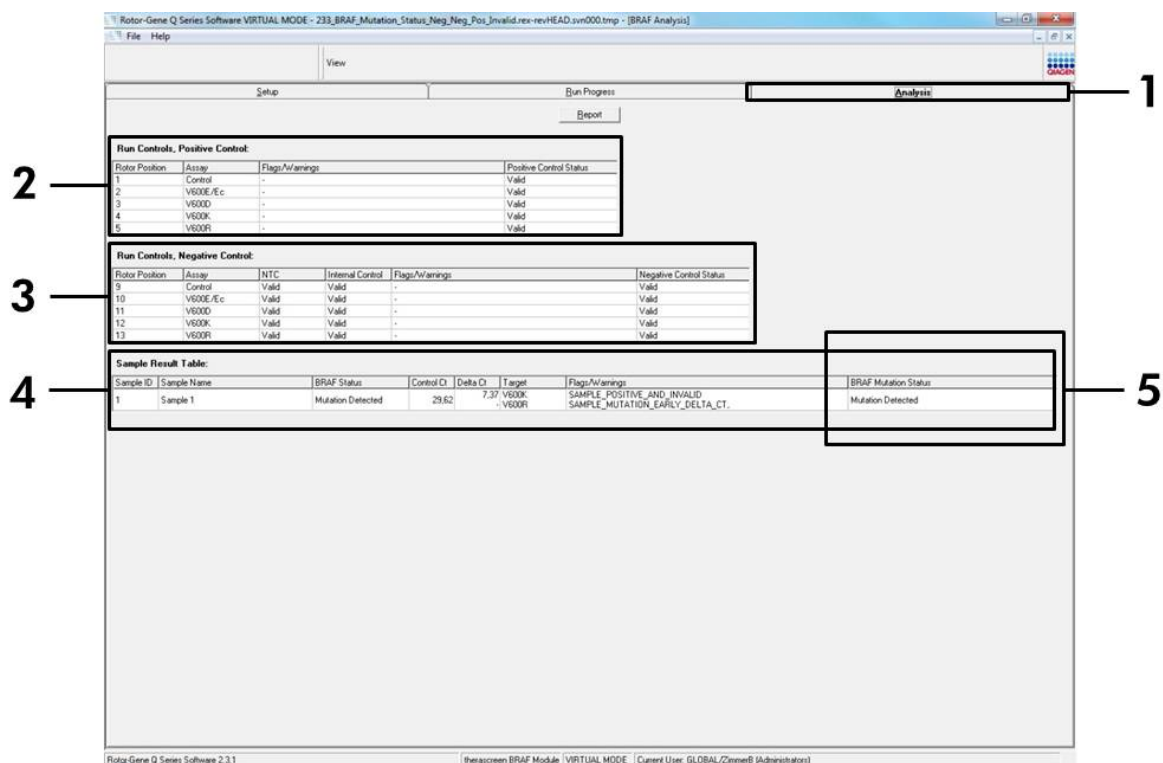
NB: Als de run begint, wordt automatisch het tabblad "Run Progress" geopend, waarop het temperatuurverloop en de resterende tijd te zien zijn (Afbeelding 18).



Afbeelding 18. Het tabblad "Run Progress" (1).

16. Na afloop van de run wordt automatisch het tabblad “Analysis” geopend.
NB: Als het tabblad “Analysis” niet vanzelf wordt geopend, klik dan op het tabblad “Analysis” (Afbeelding 19).

NB: Onder het kopje “Interpretatie van de resultaten” op pagina 40 wordt uitleg gegeven over de gebruikte rekenmethode.



Afbeelding 19. Het tabblad “Analysis” en weergave van resultaten. (1 = tabblad “Analysis”, 2 = paneel “Run Controls, Positive Controls” (Controles van run, positieve controles), 3 = paneel “Run Controls, Negative Controls” (Controles van run, negatieve controles), 4 = “Sample Result Table”, 5 = paneel “Mutation Status” (Mutatiestatus)).

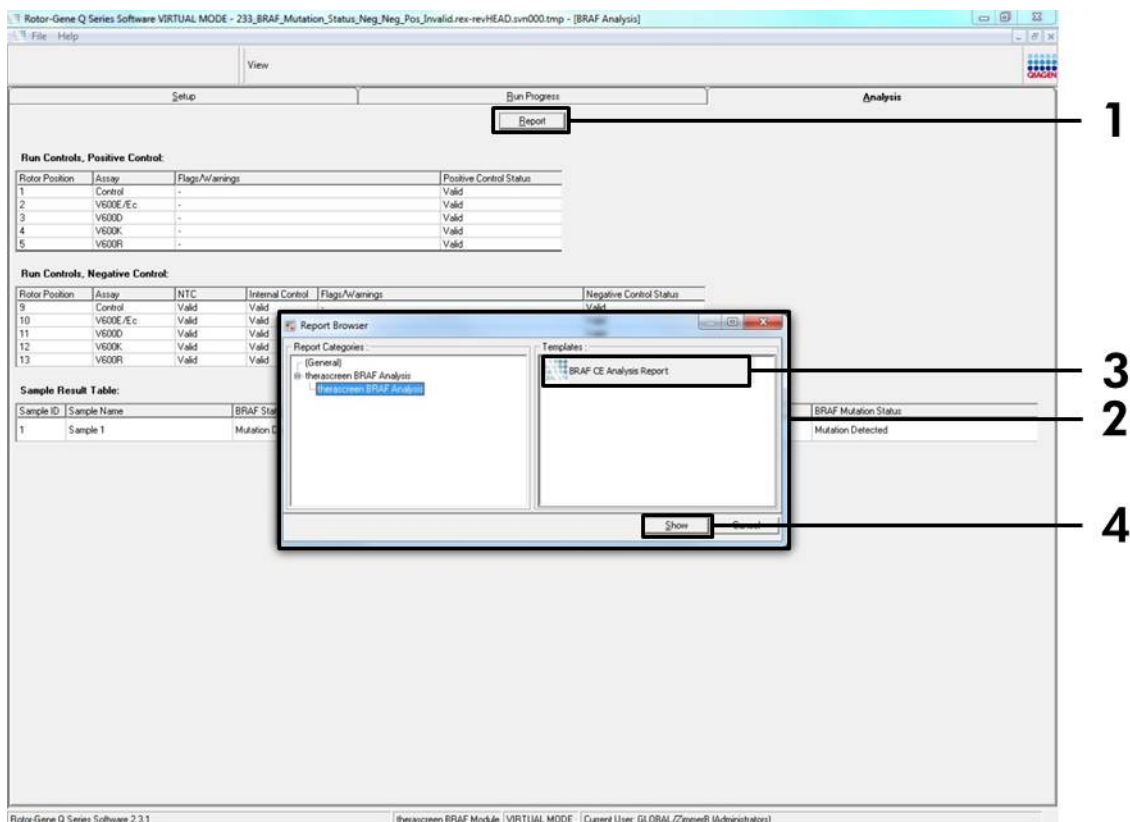
17. De resultaten van de assays worden als volgt weergegeven (Afbeelding 19):

- **Het paneel “Run Controls, Positive Controls”.** Als de resultaten binnen het aanvaardbare bereik liggen, wordt bij “Positive Control Status” (Status van positieve controle) “Valid” weergegeven. Zo niet, dan wordt als resultaat “Invalid” weergegeven.
- **Het paneel “Run Controls, Negative Controls”.** Als de resultaten van zowel “NTC” als “Internal Control” (Interne Controle) binnen het aanvaardbare bereik liggen, wordt bij “Negative Control Status” (Status negatieve controle) “Valid” weergegeven. Zo niet, dan wordt als resultaat “Invalid” weergegeven.

- Het paneel **“Sample Result Table”**. In de kolom **“BRAF Mutation Status”** (BRAF-mutatiestatus) worden specifieke mutaties weergegeven voor de monsters met een mutatie.

18. Door op de knop “Report” te klikken, kunnen rapportagebestanden worden geproduceerd. Het venster “Report Browser” verschijnt in beeld. Selecteer “BRAF CE Analysis Report” onder “Templates” en klik op de knop “Show” (Afbeelding 20).

NB: Rapportages kunnen op een andere locatie worden opgeslagen in Web Archives-vorm via de knop **“Save As”** links boven aan elk rapport.



Afbeelding 20. Selecteren van het “BRAF CE Analysis Report”. (1 = knop “Report”, 2 = paneel “Report Browser”, 3 = knop “BRAF CE Analysis Report”, 4 = knop “Show”).

Interpretatie van de resultaten (automatisch)

Na afloop van een run worden de resultaten automatisch geanalyseerd en mutaties geïdentificeerd door het *therascreen* BRAF Assay Package. Hieronder wordt uitgelegd hoe het *therascreen* BRAF Assay Package te werk gaat tijdens de analyse en de identificatie van de mutaties.

NB: Raadpleeg voor handmatige analyse “Bijlage I: Protocol voor handmatige analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit”, op pagina 61.

De PCR-cyclus waarbij de fluorescentie van een reactie een vastgestelde drempelwaarde overschrijdt, is gedefinieerd als de C_T -waarde. De C_T -waarde is een maat voor de hoeveelheid specifiek DNA in het uitgangsmateriaal. Een lage C_T -waarde duidt op een hogere concentratie DNA in het uitgangsmateriaal en een hoge C_T -waarde geeft aan dat er weinig DNA in het uitgangsmateriaal aanwezig is. Reacties waarbij een C_T -waarde wordt gevonden, worden geclassificeerd als reacties met positieve amplificatie.

In de software van de Rotor-Gene Q worden de fluorescentiesignalen tussen twee gemeten waarden geïnterpoleerd. De C_T -waarden kunnen daarom elk reëel getal zijn tussen 0 en 40, en zijn niet beperkt tot gehele getallen.

Voor de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit zijn de drempelwaarden voor het groene en het gele kanaal ingesteld op respectievelijk 0,15 en 0,05 relatieve fluorescentie-eenheden. Deze waarden worden automatisch ingesteld in het *therascreen* BRAF Assay Package.

De controles van de run (positieve controle, negatieve controle zonder template en interne controles) worden beoordeeld om te controleren of de C_T -waarden binnen het aanvaardbare bereik liggen en of de reacties naar behoren hebben plaatsgevonden.

Voor iedere mutatie-assay worden de ΔC_T -waarden van het monster berekend met behulp van de volgende vergelijking:

$$\Delta C_T = [C_T\text{-waarde van de mutatie-assay}] - [C_T\text{-waarde van de controle-assay}]$$

Monsters worden geclassificeerd als positief voor een mutatie als de ΔC_T -waarde lager is dan of gelijk is aan de bovengrens voor de ΔC_T -waarde voor die assay. Boven die waarde bevat het monster minder dan het percentage van de mutatie die door de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit gedetecteerd kan worden (buiten de limiet van de assays) of is er in het monster geen mutatie aanwezig, wat in de rapportage wordt vermeld als “No Mutation Detected” (Geen mutatie gevonden).

Als er in mutatiereacties geen amplificatie heeft plaatsgevonden, wordt dit weergegeven als "No Mutation Detected". Berekende ΔC_T -waarden ten opzichte van achtergrondamplificatie zullen waarschijnlijk hoger zijn dan de bovengrens voor de ΔC_T -waarde en het monster wordt dan geclassificeerd als "No Mutation Detected".

De resultaten van de assays worden weergegeven als "Mutation Detected" (Mutatie gevonden), "No Mutation Detected", "Invalid" of "Run Control Failed" (Controle van run mislukt) als er een fout is opgetreden in de controlereactie van de run. Voor de monsters waarbij een mutatie is gedetecteerd wordt gemeld welke mutaties er aanwezig zijn volgens de waarheidstabel ten aanzien van kruisreactiviteit in "Tabel 8. Bepalen van de mutatiestatus van een monster" op pagina 55. Andere mogelijke resultaten die kunnen worden weergegeven, worden besproken onder "Protocol: monsterbeoordelingen" op pagina 15, "Protocol: detectie van BRAF-mutaties" op pagina 28 en "

Waarschuwingsberichten in het therascreen BRAF Assay Package" op pagina 42 in deze handleiding.

In zeldzame gevallen kunnen er in een tumor meerdere mutaties aanwezig zijn. In die gevallen wordt de BRAF-status in het rapport weergegeven als "Mutation Detected", maar worden alle positieve mutaties weergegeven met het waarschuwingsbericht "SAMPLE_POSITIVE_AND_UNCLASSIFIABLE" (Monster positief en niet-classificeerbaar).

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de lijst met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de technische diensten (Technical Services) van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en protocollen in deze handleiding of over monster- en assaytechnologieën (zie voor contactgegevens de achterzijde van deze handleiding of ga naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties

Ongeldige resultaten

- | | |
|--|--|
| a) De bewaarcondities voor een of meer bestanddelen voldeden niet aan de instructies in "Bewaren en hanteren van reagentia", pagina 12 | Controleer de bewaarcondities en de uiterste gebruiksdatum (zie het etiket) van de verpakking en gebruik indien nodig een nieuwe kit. |
| b) De uiterste gebruiksdatum van de <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-kit is verstreken | Controleer de bewaarcondities en de uiterste gebruiksdatum (zie het etiket van de kit) van de verpakking en gebruik indien nodig een nieuwe <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-kit. |

Waarschuwingsberichten in het *therascreen* BRAF Assay Package

In tabel 4 staan de mogelijke waarschuwingsberichten die kunnen voorkomen in het *therascreen* BRAF Assay Package, wat ze betekenen en welke maatregelen er genomen moeten worden.

Tabel 4. Waarschuwingsberichten in het *therascreen* BRAF Assay Package

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Ongeldige PCR-run – C _T -waarde voor FAM voor positieve controle in controlereactie buiten bereik.	Herhaal de gehele PCR-run.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Ongeldige PCR-run – fluorescentiegegevens in positieve controle (controlereactie) kunnen niet worden geïnterpreteerd.	Herhaal de gehele PCR-run.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Ongeldige PCR-run – C _T -waarde voor FAM voor een of meer mutatiereacties buiten bereik.	Herhaal de gehele PCR-run.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Ongeldige PCR-run – fluorescentiegegevens in positieve controle (mutatiereactie) kunnen niet worden geïnterpreteerd.	Herhaal de gehele PCR-run.
NTC_INVALID_DATA	Ongeldige PCR-run – fluorescentiegegevens in negatieve controle kunnen niet worden geïnterpreteerd.	Herhaal de gehele PCR-run.
NTC_ASSAY_CT_INVALID	Ongeldige PCR-run – FAM ongeldig (lager dan ondergrens) voor negatieve controle.	Herhaal de gehele PCR-run.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Ongeldige PCR-run – interne controle boven bereik voor negatieve controle.	Herhaal de gehele PCR-run.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	Ongeldige PCR-run – interne controle onder bereik voor negatieve controle.	Herhaal de gehele PCR-run.

Vervolg tabel op de volgende pagina

Tabel 4 - vervolg

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Monster ongeldig – fluorescentiegegevens in monstercontrole kunnen niet worden geïnterpreteerd.	Zet een nieuwe PCR-run in om de betreffende monsters te herhalen.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Monster ongeldig – C_T -waarde voor FAM te laag in monstercontrole.	Verdun het monster voor een hogere C_T -waarde van de controle. Ga er bij het berekenen van de verdunning vanuit dat een verdunning van 1:1 met het water dat in de kit is geleverd, zorgt voor een toename van de C_T -waarde met 1,0; zet na verdunning van het monster een nieuwe PCR-run in met het verdunde monster.
SAMPLE_CTRL_LOW_CONC	Monster geldig – lage concentratie in monstercontrole (waarschuwing, geen fout).	Geen maatregelen nodig.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Monster ongeldig – C_T -waarde voor FAM te hoog in monstercontrolereactie.	Zet een nieuwe PCR-run in om het monster te herhalen. Als het monster bij een herhaalde PCR-run weer een ongeldig resultaat geeft, voer dan een nieuwe extractie uit op een of meer verse FFPE-coupees. Zet een nieuwe PCR-run in om het nieuw gezuiverde monster te testen. Als het resultaat weer ongeldig is, herhaal dan deze tweede extractie. Als er na deze run nog steeds geen geldig resultaat is verkregen, krijgt het monster de mutatiestatus 'onbepaald' en wordt het niet verder getest.

Vervolg tabel op de volgende pagina

Tabel 4 - vervolg

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
SAMPLE_CTRL_ INT_CTRL_EARLY_ CT	Monster ongeldig – C _T -waarde voor HEX te laag voor monster (interne controle).	Zet een nieuwe PCR-run in om het monster te herhalen. Als het monster bij een herhaalde PCR-run weer een ongeldig resultaat geeft, voer dan een nieuwe extractie uit op een of meer verse FFPE-coupes. Zet een nieuwe PCR-run in om het nieuw gezuiverde monster te testen. Als het resultaat weer ongeldig is, herhaal dan deze tweede extractie. Als er na deze run nog steeds geen geldig resultaat is verkregen, krijgt het monster de mutatiestatus 'onbepaald' en wordt het niet verder getest.
SAMPLE_CTRL_ INT_CTRL_FAIL	C _T -waarde te hoog (of geen C _T -waarde) voor interne controle (HEX) en C _T -waarde te hoog (of geen C _T -waarde) voor de controle-assay (FAM).	Zet een nieuwe PCR-run in om het monster te herhalen. Als het monster bij een herhaalde PCR-run weer een ongeldig resultaat geeft, voer dan een nieuwe extractie uit op een of meer verse FFPE-coupes. Zet een nieuwe PCR-run in om het nieuw gezuiverde monster te testen. Als het resultaat weer ongeldig is, herhaal dan deze tweede extractie. Als er na deze run nog steeds geen geldig resultaat is verkregen, krijgt het monster de mutatiestatus 'onbepaald' en wordt het niet verder getest.

Vervolg tabel op de volgende pagina

Tabel 4 - vervolg

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T -waarde te hoog (of geen C _T -waarde) voor interne controle (HEX) en geen C _T -waarde voor de mutatie-assay (FAM).	<p>Als het monster de status "mutation detected" heeft – geen maatregelen nodig.</p> <p>Als het monster de status "invalid" heeft, zet dan een nieuwe PCR-run in om het monster te herhalen.</p> <p>NB: Als de fout in de interne controle veroorzaakt wordt door remming van een reactie tijdens de PCR, kan het monster worden verdund om de invloed van remmers te verminderen. Bedenk echter wel dat het doel-DNA dan ook wordt verdund. In de kit zit een buisje met water voor het verdunnen van monsters (Dil.).</p> <p>Als het monster bij een herhaalde PCR-run weer een ongeldig resultaat geeft, voer dan een nieuwe extractie uit op een of meer verse FFPE-coupes. Zet een nieuwe PCR-run in om het nieuw gezuiverde monster te testen. Als het resultaat weer ongeldig is, herhaal dan deze tweede extractie. Als er na deze run nog steeds geen geldig resultaat is verkregen, krijgt het monster de mutatiestatus 'onbepaald' en wordt het niet verder getest.</p>

Vervolg tabel op de volgende pagina

Tabel 4 - vervolg

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutatiebuisje ongeldig – C _T -waarde voor HEX te laag voor monster (interne controle).	<p>Als het monster een geldige status “mutation detected” heeft – geen maatregelen nodig.</p> <p>Als het monster de status “invalid” heeft, zet dan een nieuwe PCR-run in om het monster te herhalen. Als het monster bij een herhaalde PCR-run weer een ongeldig resultaat geeft, voer dan een nieuwe extractie uit op een of meer verse FFPE-coupes. Zet een nieuwe PCR-run in om het nieuw gezuiverde monster te testen. Als het resultaat weer ongeldig is, herhaal dan deze tweede extractie. Als er na deze run nog steeds geen geldig resultaat is verkregen, krijgt het monster de mutatiestatus 'onbepaald' en wordt het niet verder getest.</p>

Vervolg tabel op de volgende pagina

Tabel 4 - vervolg

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutatiebuisje ongeldig – fluorescentiegegevens in interne controle kunnen niet worden geïnterpreteerd.	<p>Als het monster een geldige status “mutation detected” heeft – geen maatregelen nodig.</p> <p>Als het monster de status “invalid” heeft, zet dan een nieuwe PCR-run in om het monster te herhalen. Als het monster bij een herhaalde PCR-run weer een ongeldig resultaat geeft, voer dan een nieuwe extractie uit op een of meer verse FFPE-coupes. Zet een nieuwe PCR-run in om het nieuw gezuiverde monster te testen. Als het resultaat weer ongeldig is, herhaal dan deze tweede extractie. Als er na deze run nog steeds geen geldig resultaat is verkregen, krijgt het monster de mutatiestatus 'onbepaald' en wordt het niet verder getest.</p>

Vervolg tabel op de volgende pagina

Tabel 4 - vervolg

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
SAMPLE_ MUTATION_ EARLY_DELTA_CT	Mutatiebuisje ongeldig – C _T -waarde voor FAM te laag voor monster.	<p>Als het monster een geldige status "mutation detected" heeft – geen maatregelen nodig.</p> <p>Als het monster de status "invalid" heeft, zet dan een nieuwe PCR-run in om het monster te herhalen. Als het monster bij een herhaalde PCR-run weer een ongeldig resultaat geeft, voer dan een nieuwe extractie uit op een of meer verse FFPE-coupes. Zet een nieuwe PCR-run in om het nieuw gezuiverde monster te testen. Als het resultaat weer ongeldig is, herhaal dan deze tweede extractie. Als er na deze run nog steeds geen geldig resultaat is verkregen, krijgt het monster de mutatiestatus 'onbepaald' en wordt het niet verder getest.</p>

Vervolg tabel op de volgende pagina

Tabel 4 - vervolg

Waarschuwings-bericht	Betekenis	Te nemen maatregelen
SAMPLE_POSITIVE_A ND_INVALID	<p>Resultaat geldig – een of meer mutatiebuisjes voor een monster zijn geldig en positief, maar tegelijkertijd zijn er een of meer mutatiebuisjes voor hetzelfde monster ongeldig (waarschuwing; geen fout).</p> <p>Het monster krijgt het predicaat “mutation detected” aangezien er een mutatie aanwezig is. De kans bestaat echter dat de specifieke mutatie die in het rapport staat, niet de mutatie is die in werkelijkheid aanwezig is vanwege kruisreactiviteit van de assays. Daarom krijgt het monster de aanduiding “mutation detected”.</p>	Geen maatregelen nodig.
SAMPLE_POSITIVE_A ND_ UNCLASSIFIABLE	<p>Resultaat geldig – er is meer dan één mutatiebuisje met een geldig resultaat voor hetzelfde monster. De combinatie komt niet overeen met een te verwachten patroon van kruisreactiviteit. Zie tabel 8. Het komt zelden voor, maar er kunnen in een monster meerdere mutaties aanwezig zijn.</p>	Geen maatregelen nodig.

Kwaliteitscontrole

In overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN wordt elke partij van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit getest ten opzichte van vooraf vastgestelde specificaties om consistente productkwaliteit te garanderen.

Beperkingen

De resultaten van het product moeten worden geïnterpreteerd met inachtneming van alle relevante klinische en laboratoriumbevindingen en mogen niet op zichzelf worden gebruikt voor diagnose.

In de uitgevoerde verificatie-onderzoeken is gewerkt met menselijk DNA dat geëxtraheerd was uit met formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde tumormonsters, en indien passend voor de individuele onderzoeken, met synthetische standaarden.

De werking van het product is getest met de QIAamp DNA FFPE Tissue Kit van QIAGEN.

Het product is uitsluitend bedoeld voor gebruik met Rotor-Gene Q MDx-apparaten.

Voor optimale resultaten dienen de aanwijzingen in de *handleiding theascreen BRAF RGQ PCR-kit* strikt te worden opgevolgd. Verdere verdunning van de reagentia dan de verdunning zoals die in deze handleiding wordt aangegeven, wordt niet aanbevolen en leidt tot slechtere prestaties.

Het is van belang de hoeveelheid en de kwaliteit van het DNA in het monster te bepalen voordat het monster wordt geanalyseerd met behulp van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit. De kit bevat extra controlemix om te bepalen of de C_T-waarde aanvaardbaar is voor de assay. Gebruik hiervoor geen absorptiemetingen. De resultaten daarvan correleren niet met de C_T-waarden bij monsters waarvan het DNA gefragmenteerd is.

Let goed op de vervaldatum en bewaarcondities die staan vermeld op het etiket van de doos en op de etiketten van de componenten. Gebruik geen componenten waarvan de vervaldatum is verstreken of die onjuist zijn opgeslagen.

Prestatiekenmerken

Blanco bovengrens (limit of blank; LOB), werkbereik en limietwaarden

In totaal zijn in een onderzoek 143 FFPE-monsters getest volgens de richtlijnen in document EP17-A (2004) van de NCCLS voor het bepalen van de LOB en limietwaarden voor elke mutatie-assay. Daarnaast werd ook het werkbereik voor de controle-assay bepaald. De limietwaarden zijn vastgesteld en zijn weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5. Vastgestelde limietwaarden voor elke mutatie-assay

	Mutant-analyse (ΔC_T)			
	V600E/Ec	V600D	V600K	V600R
Limietwaarde (ΔC_T)	$\leq 7,0$	$\leq 6,9$	$\leq 6,0$	$\leq 7,0$

Het bereik voor de C_T -waarde van de controlereactie is vastgesteld op een C_T -waarde tussen 21,95 en 32,00.

De limietwaarden en het werkbereik voor de assays zijn geverifieerd met behulp van standaarden en nog 102 andere, unieke FFPE-monsters. Tijdens de verificatie zijn de limietwaarden beoordeeld op het vermogen de juiste mutatie te onderscheiden te midden van wild-type DNA door iedere assay te beoordelen met een hoog gehalte genomisch DNA in het uitgangsmateriaal en een hoog gehalte mutatie in het uitgangsmateriaal (zie "Kruisreactiviteit", pagina 55). Ook werd het effect van het DNA in het uitgangsmateriaal op het vinden en vaststellen van de mutatie beoordeeld (zie "Effect van DNA in het uitgangsmateriaal op de ΔC_T -waarden", pagina 53).

Nauwkeurigheid: vergelijking met de analytische referentiemethode

In een onderzoek is aangetoond dat de mutatiestatus die met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit werd gevonden, overeenkomt met de bidirectionele Sanger-sequentieanalyse. In dit onderzoek werden 126 FFPE-monsters getest met gebruikmaking van statistische maatstaven voor overeenstemming/afwijking ten opzichte van richtlijn EP12-A2 (2008) van het CLSI. Voor 102 van de FFPE-monsters werden geldige resultaten verkregen voor zowel de *therascreen* BRAF

RGQ PCR-kit als de bidirectionele Sanger-sequentieanalyse. De mutatiestatus werd bevestigd door middel van Pyrosequencing[®] wanneer de gevonden mutatiestatus met bidirectionele Sanger-sequentieanalyse niet overeenkwam met die van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit.

In Tabel 6 wordt de analyse van overeenstemming tussen de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit en Sanger-sequentieanalyse getoond.

Tabel 6. Analyse van overeenstemming

	Mate van overeenstemming	Frequentie (%)
Score	Totale overeenstemming	96,08
	Positieve overeenstemming	100,00
	Negatieve overeenstemming	95,29

De frequentie van negatieve overeenstemming wordt veroorzaakt door mutatiedetectie voor 4 monsters, die bij sequentieanalyse als wild-type werden beoordeeld en met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit positief werden bevonden voor mutatie V600E/Ec. Dit komt door de hogere gevoeligheid van de technieken met Scorpions en ARMS.

Effect van DNA in het uitgangsmateriaal op de ΔC_T -waarden

Als onderdeel van het onderzoek ter verificatie van de limietwaarden en het werkbereik van de assays is ook het effect van de totale DNA-concentratie in het uitgangsmateriaal op het vaststellen van de mutatiestatus met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit onderzocht. Dit gebeurde om te controleren of het vinden van mutaties door de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit niet beïnvloed werd door verschillende DNA-concentraties in het uitgangsmateriaal binnen het werkbereik.

Mutatiestandaarden met een hoog, middelhoge en laag percentage mutatie (respectievelijk 100%, 50% en 3 x LOD%) te midden van wild-type DNA werden bereid met een hoge, middelhoge en lage concentratie DNA in het uitgangsmateriaal. In totaal werden er dus voor iedere mutatie-assay 9 mutatiestandaarden getest. De resultaten voor alle assays zijn weergegeven in Tabel 7.

De geschatte verschillen tussen de gemiddelde ΔC_T -waarden van elke twee DNA-concentraties in het uitgangsmateriaal, geschat met behulp van lineaire regressieanalyse, liggen allemaal binnen $\pm 1 C_T$. Alle 4 mutatie-assays werden

daarom beschouwd als gelijkwaardig bij hoge, middelhoge en lage concentraties DNA in het uitgangsmateriaal.

Tabel 7. Geschatte verschillen tussen DNA-uitgangskonzentraties

Assay	Parameter (uitgangskonzentratie DNA)	Geschat verschil (ΔC_T)	95% betrouwbaarheidsinterval (ondergrens; bovengrens)
V600E (E)	Hoog – middelhoog	0,56	0,22; 0,90
V600E (E)	Laag – middelhoog	0,01	-0,33; 0,35
V600E (Ec)	Hoog – middelhoog	0,48	0,12; 0,84
V600E (Ec)	Laag – middelhoog	0,26	-0,10; 0,62
V600D	Hoog – middelhoog	-0,32	-0,58; -0,06
V600D	Laag – middelhoog	-0,43	-0,69; -0,17
V600K	Hoog – middelhoog	0,10	-0,10; 0,30
V600K	Laag – middelhoog	-0,33	-0,53; -0,13
V600R	Hoog – middelhoog	-0,12	-0,28; 0,04
V600R	Laag – middelhoog	-0,62	-0,78; -0,46

Kruisreactiviteit

Standaarden met een hoge concentratie DNA in het uitgangsmateriaal met een hoog mutatiegehalte (100%) zijn getest ter beoordeling van de eventuele kruisreactiviteit van iedere assay. Met de resultaten wat betreft kruisreactiviteit kon de mutatiestatus worden uitgezet in een waarheidstabel, weergegeven in Tabel 8. In het BRAF CE Assay Package wordt voor het vaststellen van de mutatiestatus gebruikgemaakt van logica met betrekking tot kruisreactiviteit.

Tabel 8. Bepalen van de mutatiestatus van een monster

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutatiestatus
Positief	Negatief	Negatief	Negatief	Positief voor V600E of V600Ec
Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief voor V600Ec of V600K
Positief	Positief	Negatief	Negatief	Positief voor V600D
Negatief	Positief	Negatief	Negatief	Positief voor V600D
Negatief	Negatief	Positief	Negatief	Positief voor V600K
Negatief	Negatief	Negatief	Positief	Positief voor V600R

Waarden voor de detectielimiet (limit of detection; LOD)

Er is een onderzoek uitgevoerd om de LOD te bepalen van elk van de 4 mutatiespecifieke reacties die onderdeel uitmaken van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit. In dit onderzoek werd de LOD gedefinieerd als de kleinste hoeveelheid mutant-DNA te midden van wild-type DNA waarbij in een monster met mutatie in 95% van de testresultaten een positief resultaat voor de mutatie wordt gevonden (C_{95}).

Om de LOD voor iedere assay te bepalen, werden mutatiestandaarden met verschillende percentages bereid met een middelhoge uitgangconcentratie DNA, die vervolgens werden getest met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit. Voor iedere assay werd de LOD berekend door middel van logistische regressie. Ter controle van de LOD voor iedere assay werden mutatiestandaarden bereid op de vastgestelde LOD. Er werden zestig herhalingen getest en het percentage positieve resultaten werd geverifieerd.

De geverifieerde LOD bij een middelhoge uitgangconcentratie DNA staat in tabel 9. Bij hogere DNA-concentraties in het uitgangsmateriaal zullen de LOD-waarden naar verwachting lager zijn dan de waarden zoals vermeld in Tabel 9.

Tabel 9. LOD-waarden voor elke mutatie-assay (middelhoge uitgangskoncentratie)

Assay (mutatie)*	LOD C₉₅ bij middelhoge uitgangskoncentratie DNA (percentage mutant-DNA in wild-type DNA)
V600E (E)	1,82%
V600E (Ec)	4,31%
V600D	3,19%
V600K	4,34%
V600R	4,85%

* Detectielimiet voor de assay voor V600E is berekend voor zowel de mutatie V600E als V600Ec.

Effect van melanine op prestaties van de kit

Het doel van dit onderzoek was het evalueren van de invloed van melanine, een bekende PCR-remmer die voorkomt in monsters van melanomen, op de prestaties van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit. Dit werd gedaan door verschillende concentraties melanine (uiteenlopend van 0 tot 250 ng/reactie) rechtstreeks toe te voegen aan DNA-monsters voordat deze werden getest met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit en het effect daarvan te bepalen op de ΔC_T -waarden en de mutatiestatus van de onderzochte monsters.

Uit de resultaten blijkt dat een lage concentratie melanine geen effect heeft op de ΔC_T -waarde en dat een middelhoge concentratie melanine een minimaal effect heeft op de ΔC_T -waarde. Bij lage en middelhoge concentraties had melanine dan ook geen invloed op het vermogen van de assays om mutaties te detecteren. Bij 180 ng/reactie werkte de interne controle niet, wat wijst op de aanwezigheid van een remmende stof en wat betekent dat remmers kunnen worden gedetecteerd alvorens er een effect is op het vaststellen van de aan- of afwezigheid van een mutatie.

Melanineconcentraties die naar verwachting zullen voorkomen bij normaal gebruik zijn niet van invloed op het vermogen van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit om onderscheid te maken tussen monsters met en zonder mutatie.

De resultaten zijn samengevat in Tabel 10.

Tabel 10. Hoeveelheid melanine getest in iedere assay

Concentratie melanine (ng/reactie)	Verandering in ΔC_T	Status van interne controle (geslaagd/mislukt)
0	0	Geslaagd
60	-0,20	Geslaagd
100	-0,61	Geslaagd
150	-1,21	Geslaagd
180	-2,15	Mislukt

Herhaalbaarheid

Voor de opzet van het onderzoek werd gebruikgemaakt van een matrix om de onderzoeker, de dag, de indeling van de plaat en het apparaat te variëren om zo de precisie van de assay zowel binnen een run als tussen verschillende runs vast te stellen. De herhaalbaarheid voor mutatie-assays werd aangetoond bij een lage uitgangskoncentratie DNA van 3 x LOD. Daarnaast werd voor iedere assay het percentage resultaten vastgesteld dat positief werd bevonden voor een mutatie bij testen met de betreffende specifieke mutatiestandaard. Bij iedere mutatie-assay werd 100% van de monsters positief bevonden voor de mutatie.

De precisiewaarden worden vermeld in Tabel 11.

Reproduceerbaarheid

Voor de opzet van het onderzoek werd gebruikgemaakt van een matrix ter beoordeling van de reproduceerbaarheid van de assay door standaarden te testen in 3 verschillende laboratoria (locaties), met 3 partijen *therascreen* BRAF RGQ PCR-kits (2 per locatie), met 2 onderzoekers per locatie, op 2 apparaten per locatie, gedurende 4 verschillende dagen. De reproduceerbaarheid werd aangetoond bij een lage uitgangskoncentratie mutant-DNA (3 x LOD) voor mutatie-assays en een lage uitgangskoncentratie wild-type DNA voor de controle-assay. Voor iedere assay werd de precisie berekend over de 3 locaties, en ook werd een schatting berekend voor 95% precisie (Tabel 12).

Tabel 11. Schattingen voor precisie van de herhaalbaarheid

Assay	Precisie (tussen runs)	95% betrouwbaarheids- interval (ondergrens; bovengrens)	Precisie (binnen een run)	95% betrouwbaarheids- interval (ondergrens; bovengrens)
Controle	0,30	0,25; 0,39	0,16	0,13; 0,20
V600E (E)	0,74	0,61; 0,94	0,57	0,46; 0,74
V600E (Ec)	0,79	0,64; 1,01	0,76	0,62; 0,99
V600D	0,47	0,38; 0,60	0,46	0,38; 0,60
V600K	0,37	0,31; 0,48	0,37	0,30; 0,49
V600R	0,44	0,36; 0,56	0,44	0,36; 0,58

Tabel 12. Schattingen voor precisie van de reproduceerbaarheid

Assay	Precisie	95% betrouwbaarheidsinterval (ondergrens; bovengrens)
Controle	0,54	0,42; 0,76
V600E (E)	0,87	0,67; 1,22
V600E (Ec)	0,86	0,66; 1,21
V600D	0,80	0,62; 1,14
V600K	0,61	0,47; 0,86
V600R	0,63	0,49; 0,89

Symbolen



Bevat voldoende reagentia voor <24> reacties



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer



Componenten



Bevat



Nummer



Global Trade Item Number



Temperatuurbepering



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Weghouden van zonlicht



Voorzichtig

Bijlage I: Protocol voor handmatige analyse met de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit

Dit hoofdstuk bevat instructies voor het gebruik van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit met de open gebruiksmodus van versie 2.3 van de RGQ-software (dus zonder gebruik van het BRAF Assay Package).

Algemene informatie

- De benodigde materialen vindt u op pagina 9.
- Kijk voor uitgebreide instructies voor de bereiding van monsters en de indeling van het laadblok onder kopjes "Protocol: monsterbeoordelingen", pagina 15, en "Protocol: detectie van BRAF-mutaties", pagina 28.

Protocol: een temperatuurprofiel aanmaken

Maak voordat u begint een temperatuurprofiel aan voor de BRAF-analyse. Voor de monsterbeoordelingen en de mutatiebeoordelingen worden dezelfde cyclusparameters gebruikt.

Procedure

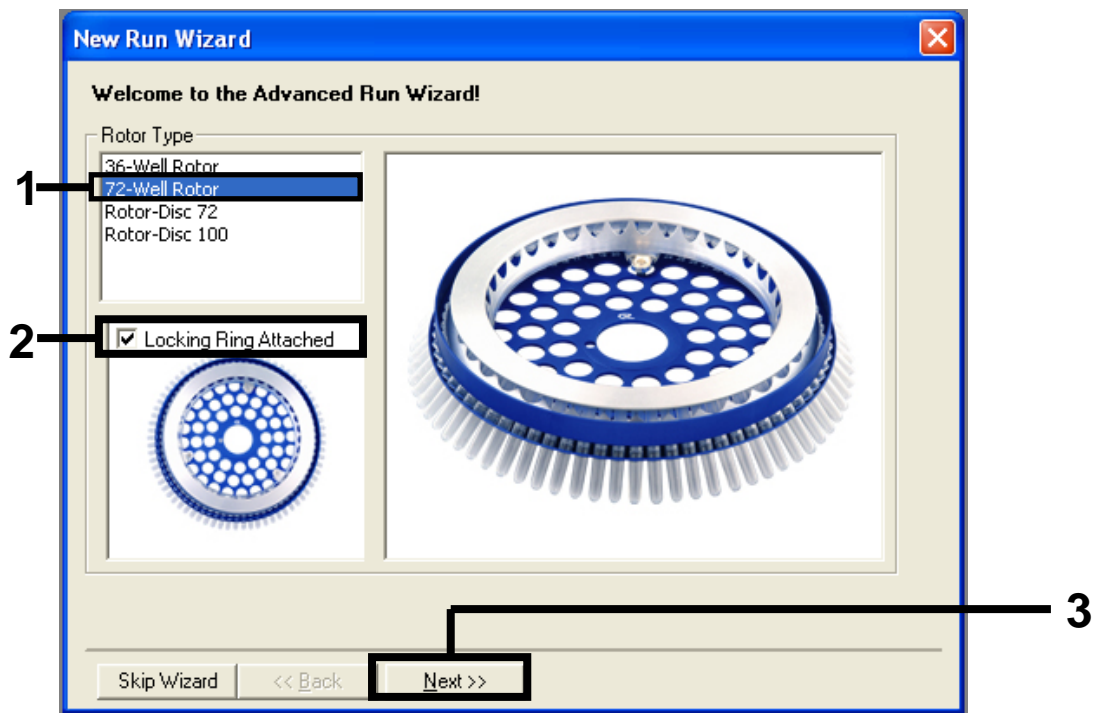
De cyclusparameters zijn hieronder beknopt weergegeven:

Tabel 13. Cyclusparameters

Cycli	Temperatuur	Tijd	Gegevensregistratie
1	95 °C	15 minuten	Geen
40	95 °C	30 seconden	Geen
	60 °C	60 seconden	Groen en geel

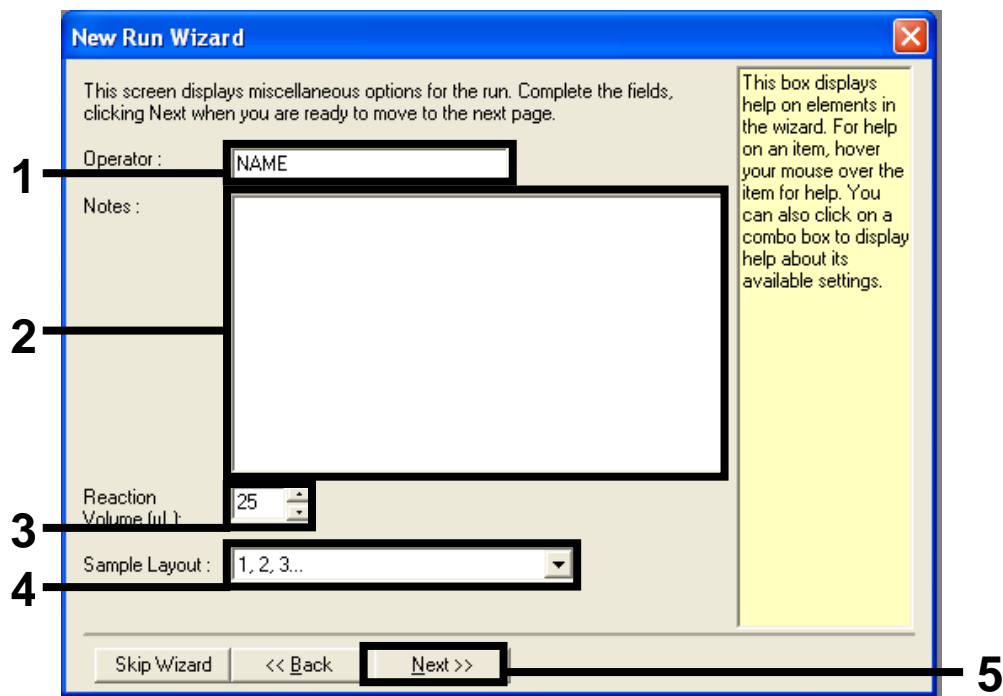
1. Dubbelklik op het pictogram voor versie 2.3 van de Rotor-Gene Q-software op het bureaublad van de laptop waarop het Rotor-Gene Q MDx-apparaat is aangesloten.
2. Om een nieuwe template aan te maken, selecteert u "Empty Run" (Lege run) en vervolgens "New" (Nieuw). U wordt nu stap voor stap door het proces geleid via de "New Run Wizard" (Wizard voor nieuwe run).

3. Selecteer bij het rotortype de rotor met 72 plaatsen. Controleer of de vergrendelingsring geplaatst is en vink het vakje "Locking Ring Attached" aan. Klik op "Next" (Volgende) (afbeelding 21).



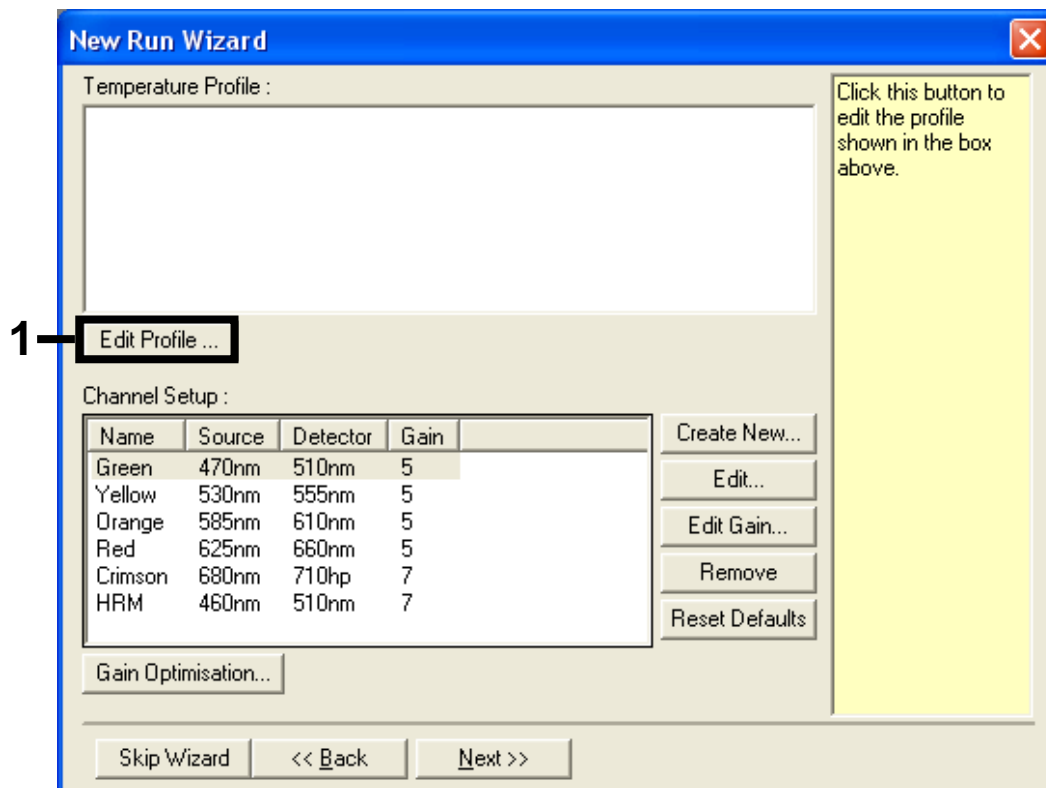
Afbeelding 21. Het dialoogvenster "New Run Wizard". (1 = "Rotor type" (Rotortype), 2 = vakje "Locking Ring Attached", 3 = knop "Next").

4. Voer de naam van de gebruiker in. Voer eventuele opmerkingen in en voer voor het reactievolume 25 in. Controleer of achter "Sample Layout" (Indeling van monsters) "1, 2, 3..." staat. Klik op "Next" (afbeelding 22).



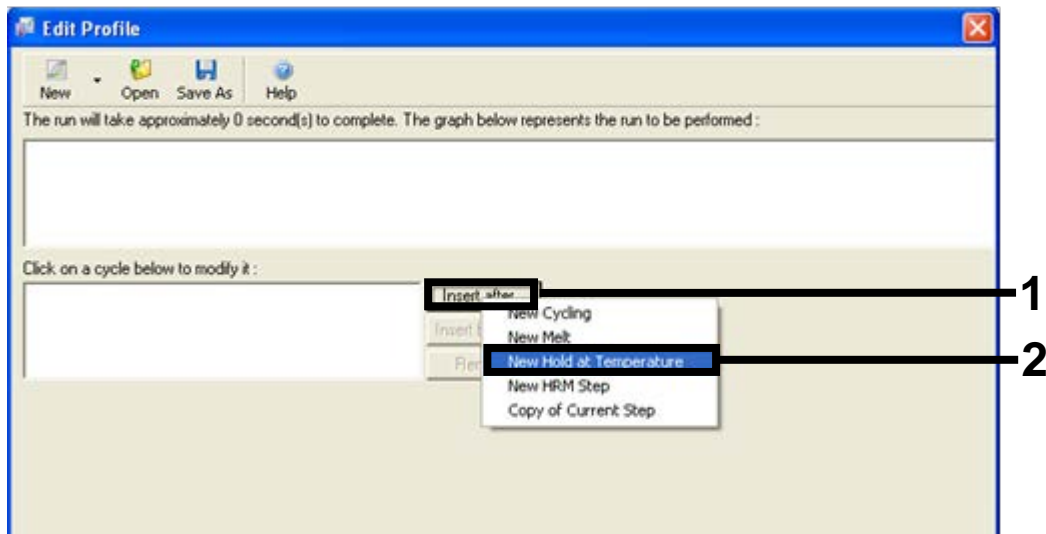
Afbeelding 22. Invoeren van de naam van de gebruiker en het reactievolume.
(1 = dialogveld "Operator" (Gebruiker), 2 = dialogveld "Notes", 3 = veld "Reaction Volume" (Reactievolume), 4 = veld "Sample Layout", 5 = knop "Next").

5. Klik op de knop "Edit Profile" (Profiel bewerken) in het dialoogvenster "New Run Wizard" (afbeelding 23) en controleer de parameters van de run door middel van de volgende stappen.



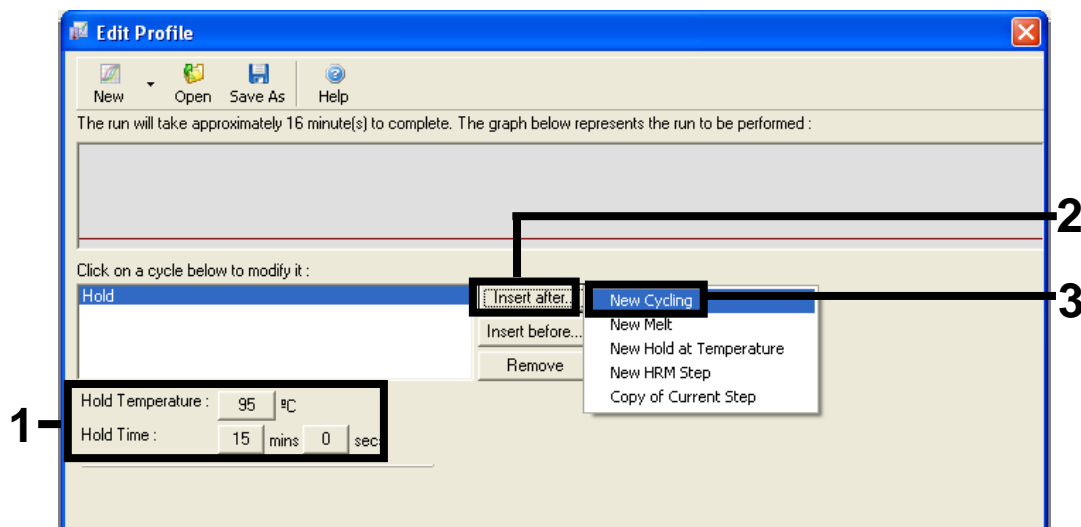
Afbeelding 23. Bewerken van het profiel (1).

6. Klik op de knop "Insert after" (Invoegen na) en selecteer "New Hold at Temperature" (Nieuwe constante temperatuur) (afbeelding 24).



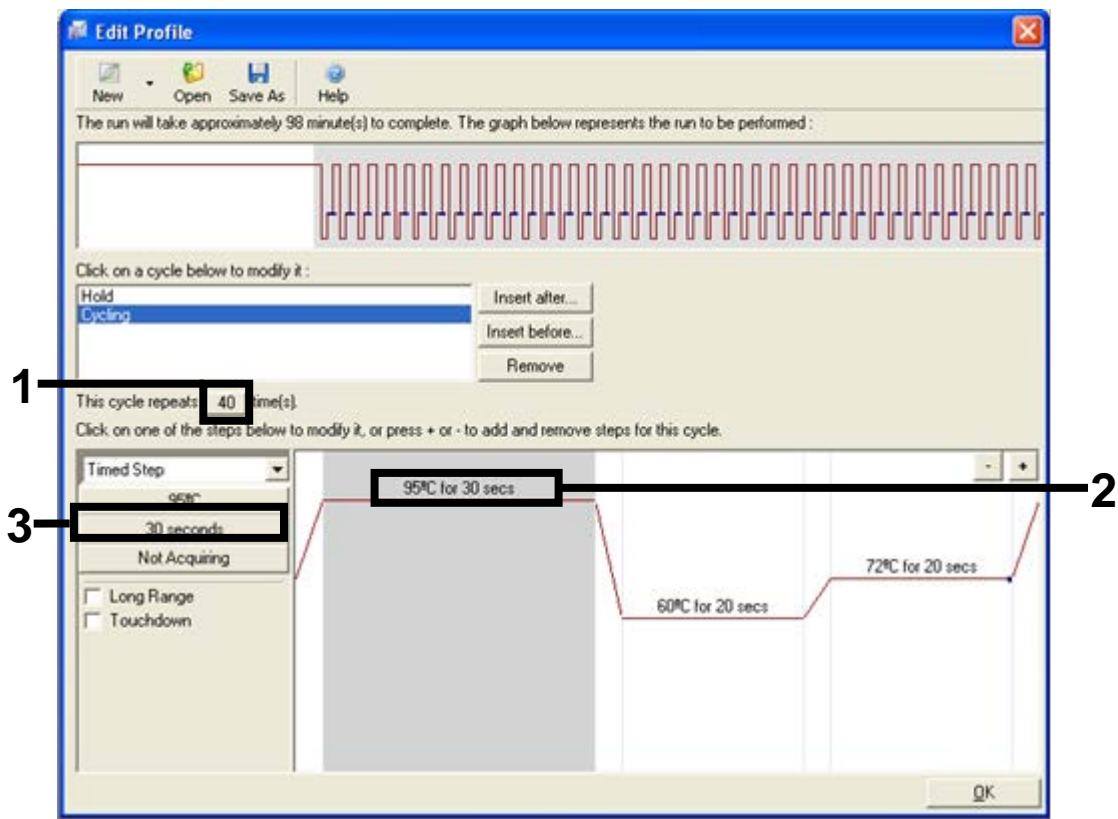
Afbeelding 24. Instellen van de eerste incubatiestap. (1 = knop "Insert after", 2 = "New Hold at Temperature").

7. Stel "Hold Temperature" (Constante temperatuur) in op 95 °C en "Hold Time" (Duur van stap) op 15 min. 0 sec. Klik op de knop "Insert after" en selecteer "New Cycling" (Nieuwe cyclus) (afbeelding 25).



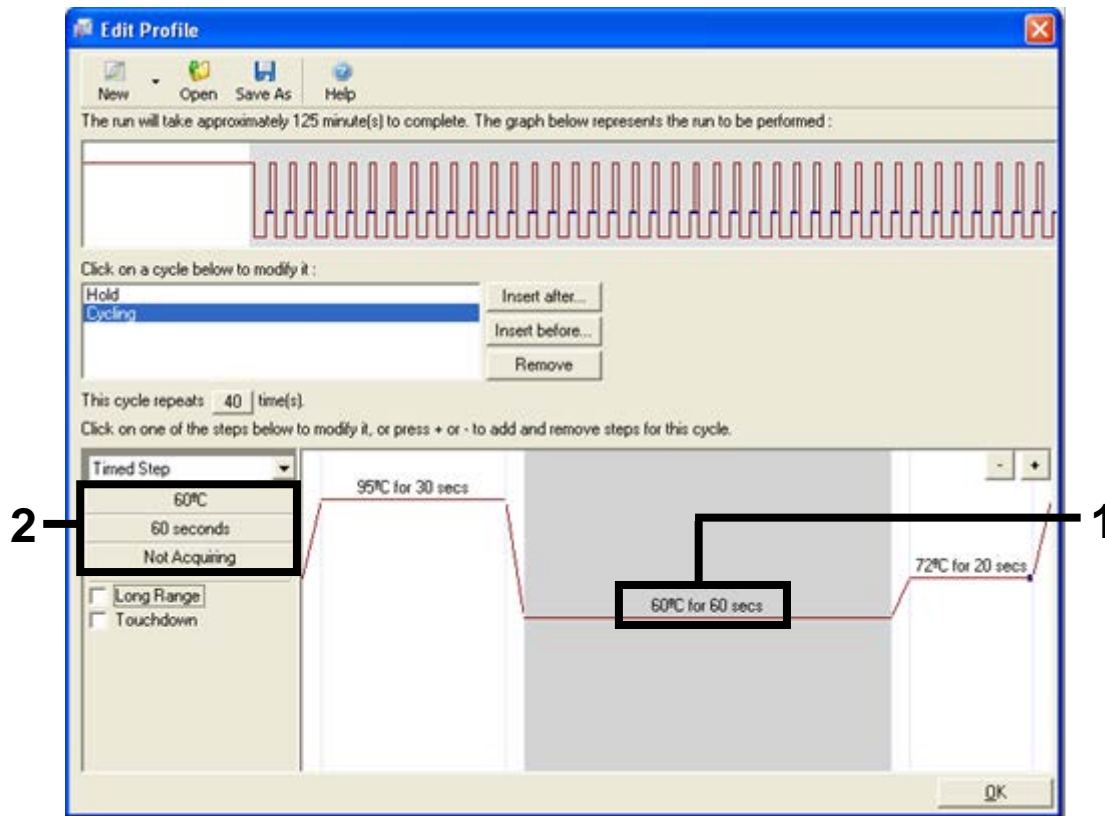
Afbeelding 25. Eerste incubatiestap bij 95 °C. (1 = knoppen "Hold Temperature" en "Hold Time", 2 = knop "Insert after", 3 = "New Cycling").

8. Zet het aantal herhalingen van de cyclus op 40. Selecteer de eerste stap en stel de parameters in op 95 °C gedurende 30 seconden (afbeelding 26).



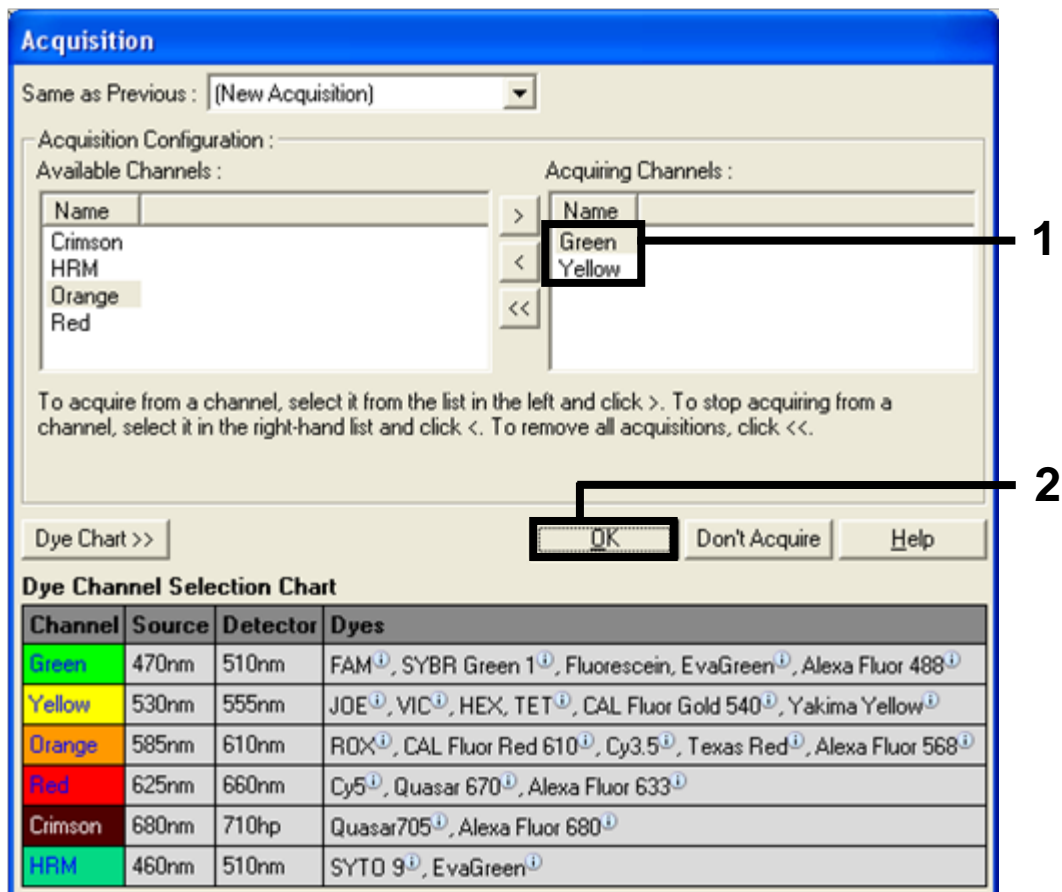
Afbeelding 26. Cyclusstap bij 95 °C. (1 = vakje "Cycle repeats" (Herhalingen van cyclus), 2 = temperatuurinstelling voor eerste stap, 3 = tijdstelling voor eerste stap).

9. Markeer de tweede stap en stel de parameters in op 60 °C gedurende 60 seconden. Zorg dat tijdens deze stap gegevens kunnen worden geregistreerd door de knop "Not Acquiring" (Geen registratie) te selecteren (afbeelding 27).



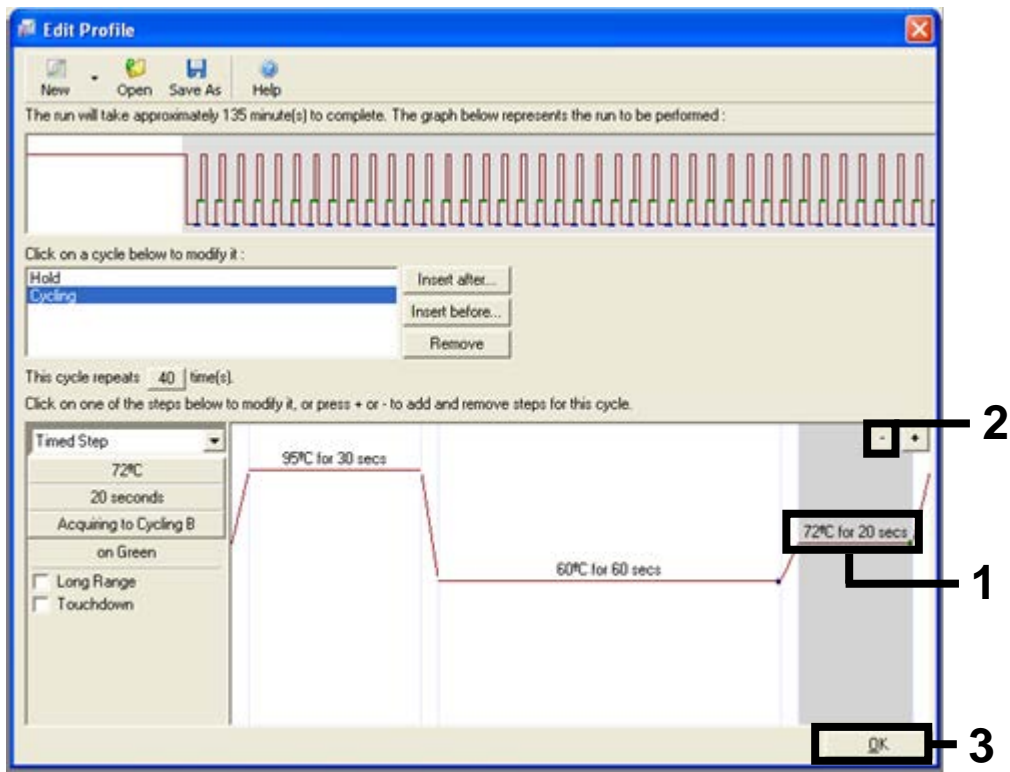
Afbeelding 27. Cyclusstap bij 60 °C. (1 = instellingen voor tijd en temperatuur van tweede stap, 2 = knop "Not Acquiring").

10. Stel de groene en de gele kanalen in als registratiekanalen door met behulp van de knop ">" de kanalen "Green" (Groen) en "Yellow" (Geel) vanuit de lijst "Available Channels" (Beschikbare kanalen) over te zetten. Klik op "OK" (afbeelding 28).



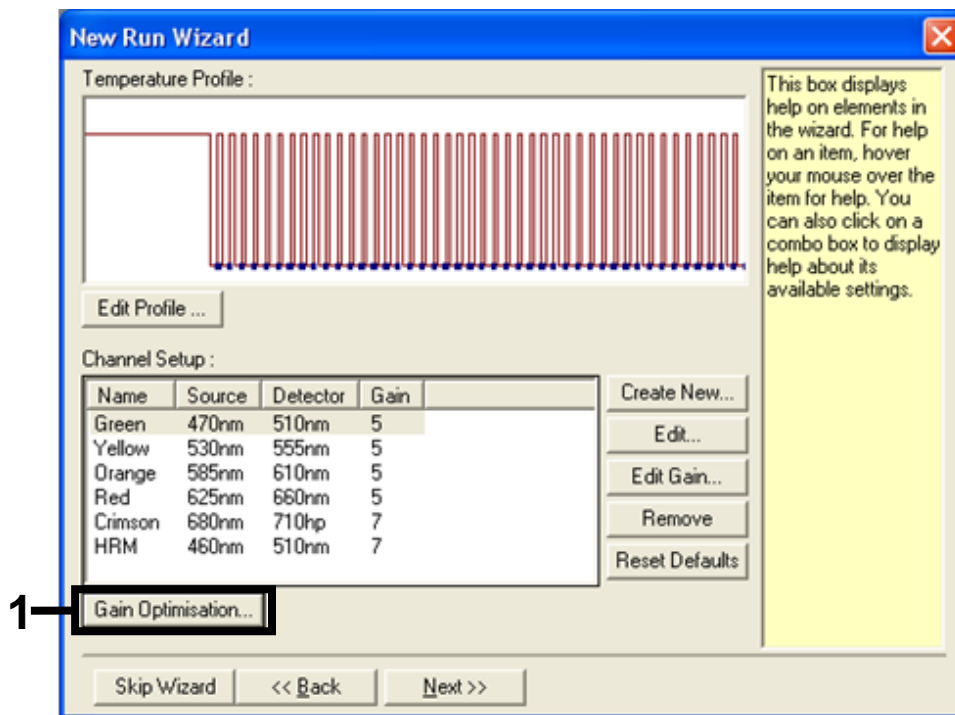
Afbeelding 28. Registratie tijdens de cyclusstap bij 60 °C. (1 = geselecteerde kanalen, 2 = knop "OK").

11. Markeer de derde stap en klik op de knop “-” om deze stap te verwijderen. Klik op “OK” (afbeelding 29).



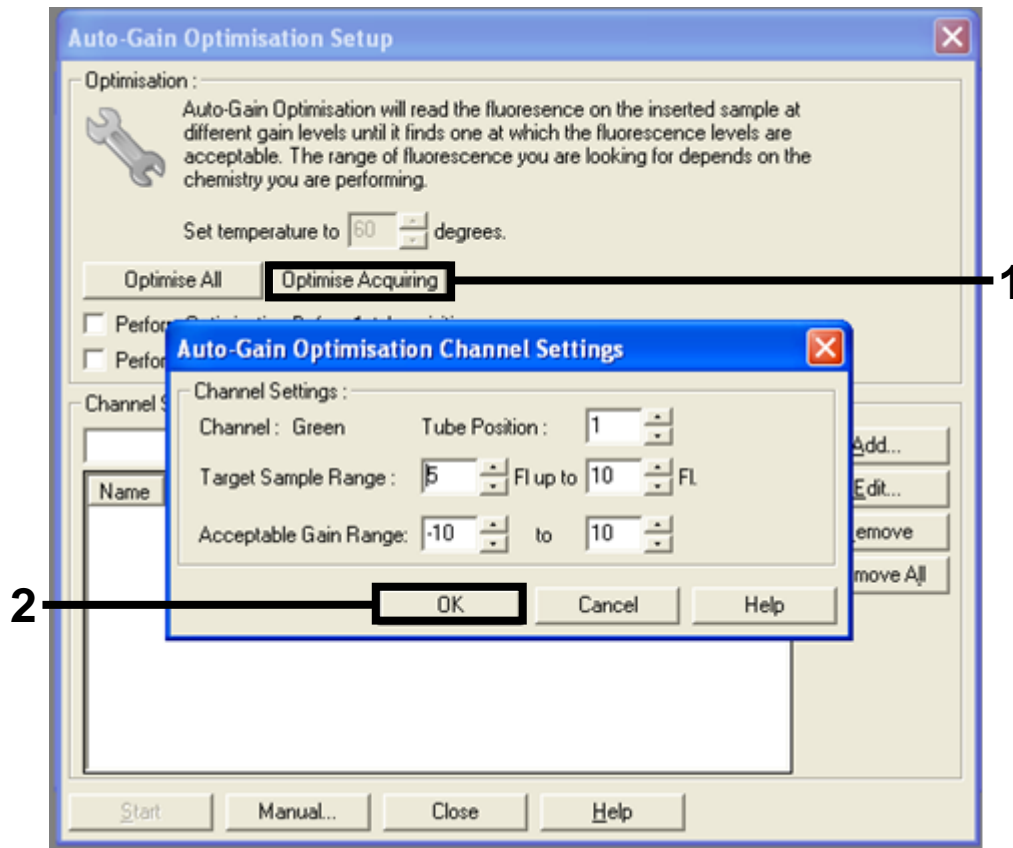
Afbeelding 29. Verwijderen van de extensiestap. (1 = derde stap, 2 = knop voor verwijderen, 3 = knop “OK”).

12. Klik in het volgende dialoogvenster op de knop "Gain Optimisation" (Gain-optimalisatie) (afbeelding 30).



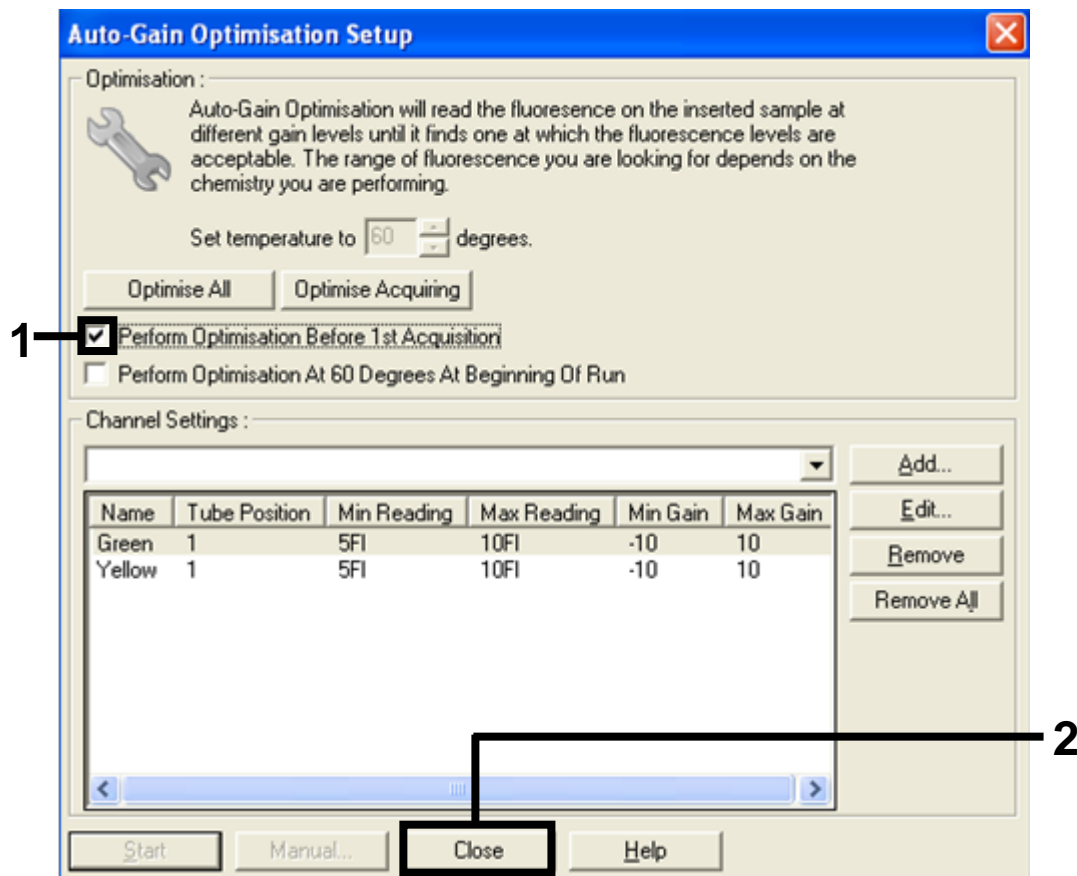
Afbeelding 30. "Gain Optimisation" (1).

13. Klik op de knop "Optimise Acquiring" (Registratie optimaliseren). De instellingen van de verschillende kanalen worden per kanaal getoond. Klik voor beide kanalen op "OK" om deze standaardinstellingen te accepteren (afbeelding 31).



Afbeelding 31. Automatische gain-optimalisatie voor het groene kanaal.
(1 = knop "Optimise Acquiring", 2 = knop "OK").

14. Vink het vakje "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Optimalisatie vóór 1e registratie uitvoeren) aan en klik vervolgens op "Close" (Sluiten) om terug te gaan naar de wizard (afbeelding 32).



Afbeelding 32. Selectie van het groene en het gele kanaal. (1 = vakje "Perform Optimisation Before 1st Acquisition", 2 = knop "Close").

15. Klik op "Next" om vervolgens via "Save Template" (Template opslaan) de template op een geschikte locatie op te slaan.

Procedure (handmatig)

Protocol: monsterbeoordeling (handmatig)

Dit protocol wordt gebruikt voor de beoordeling van het totale amplificeerbare DNA in monsters. Het moet worden doorlopen voorafgaand aan de BRAF-mutatie-analyse.

- Bereid de monsters zoals beschreven in "Protocol: monsterbeoordelingen" op pagina 15.
- Zet de PCR-run op de Rotor-Gene Q MDx op volgens de beschrijving in "Protocol: instellen van de *therascreen* BRAF PCR RGQ" op pagina 76.
- Analyseer na afloop van de run de gegevens volgens de instructies in "Gegevensanalyse van monsterbeoordelingen" op pagina 82.

Protocol: detectie van BRAF-mutaties (handmatig)

Nadat een monster geschikt is bevonden voor analyse, kan het worden getest op eventuele BRAF-mutaties.

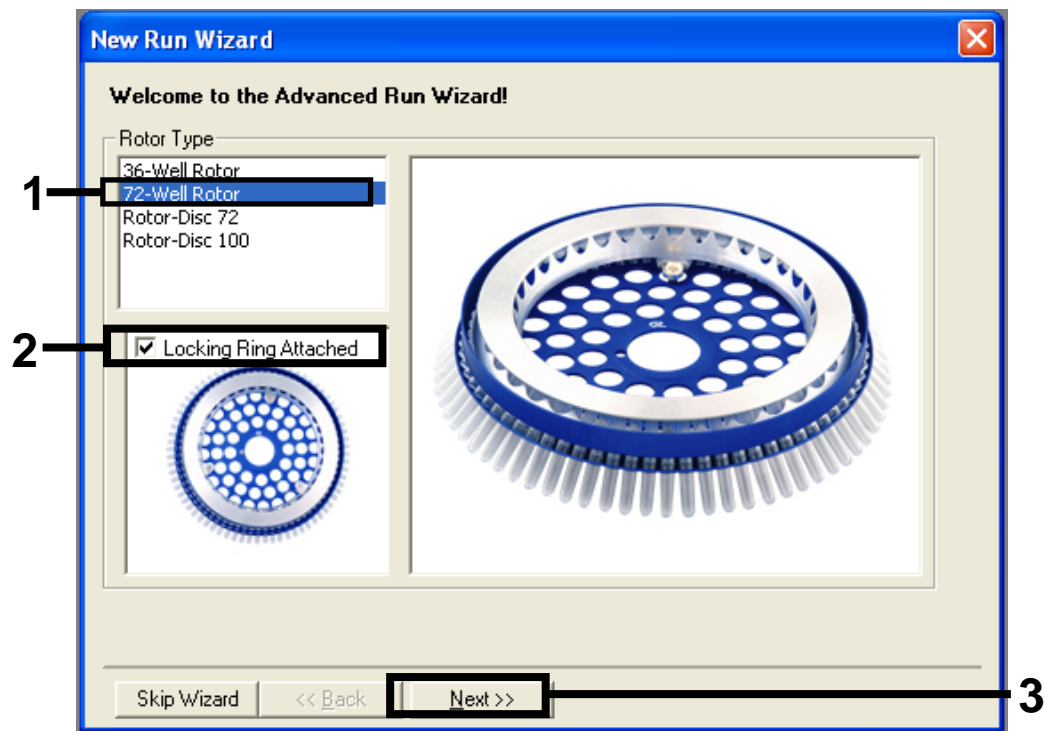
- Bereid de monsters zoals beschreven in "Protocol: detectie van BRAF-mutaties" op pagina 28.
- Zet de PCR-run op de Rotor-Gene Q MDx op volgens de beschrijving in "Protocol: *instellen* van de theascreen BRAF PCR RGQ" op pagina 76.
- Analyseer na afloop van de run de gegevens volgens de instructies in "Gegevensanalyse voor detectie van BRAF-mutaties" op pagina 84.

Protocol: instellen van de *therascreen* BRAF PCR RGQ

1. Open de Rotor-Gene Q-software (2.3) en open het gewenste temperatuurprofiel (.ret-bestand).

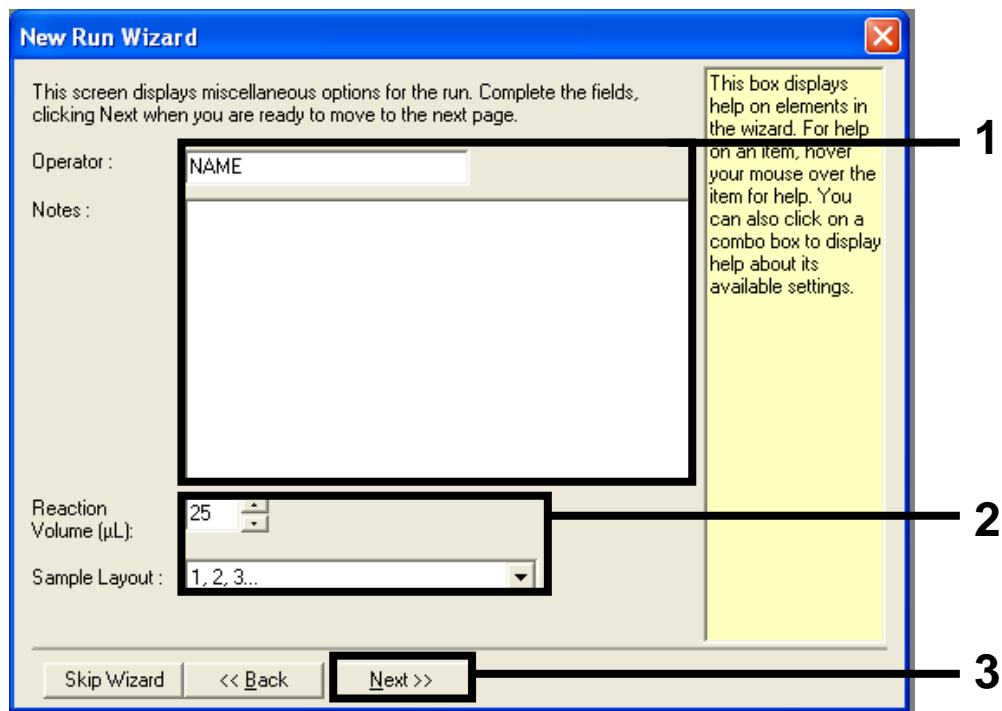
Instructies voor het aanmaken van het temperatuurprofiel en het controleren van de parameters voor de run zijn te vinden in "Protocol: een temperatuurprofiel aanmaken" op pagina 62.

2. Controleer of de juiste rotor is geselecteerd en vink het vakje aan om te bevestigen dat de vergrendelingsring geplaatst is. Klik op "Next" (Afbeelding 33).



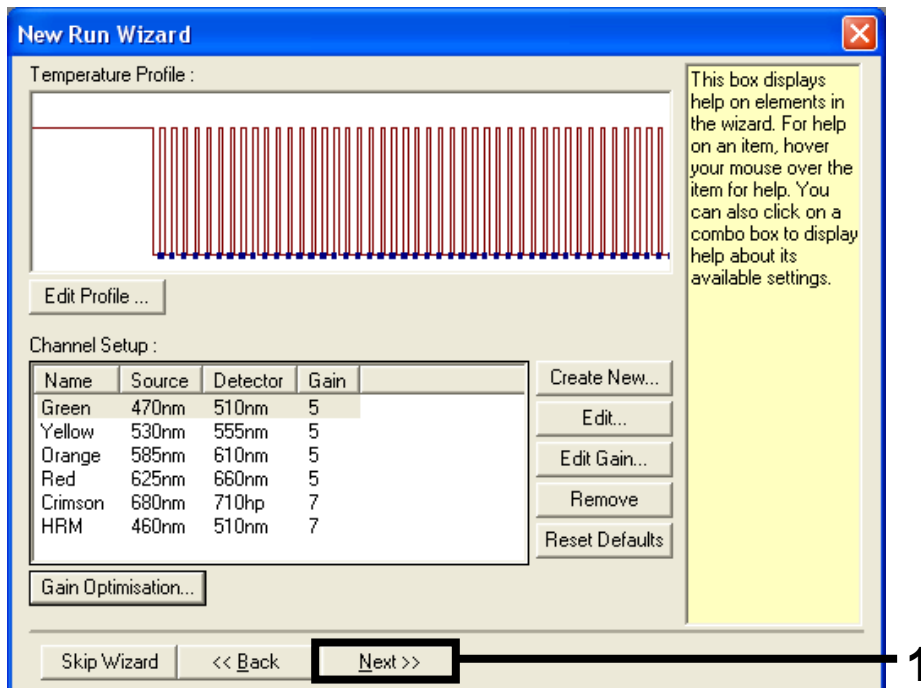
Afbeelding 33. Het dialoogvenster "New Run Wizard" en beginscherm.
(1 = "Rotor type", 2 = vakje "Locking Ring Attached", 3 = knop "Next").

3. Voer de naam van de gebruiker in. Voer eventuele opmerkingen in en controleer of het reactievolume is ingesteld op 25 en of achter "Sample Layout" "1, 2, 3..." staat. Klik op "Next" (afbeelding 34).



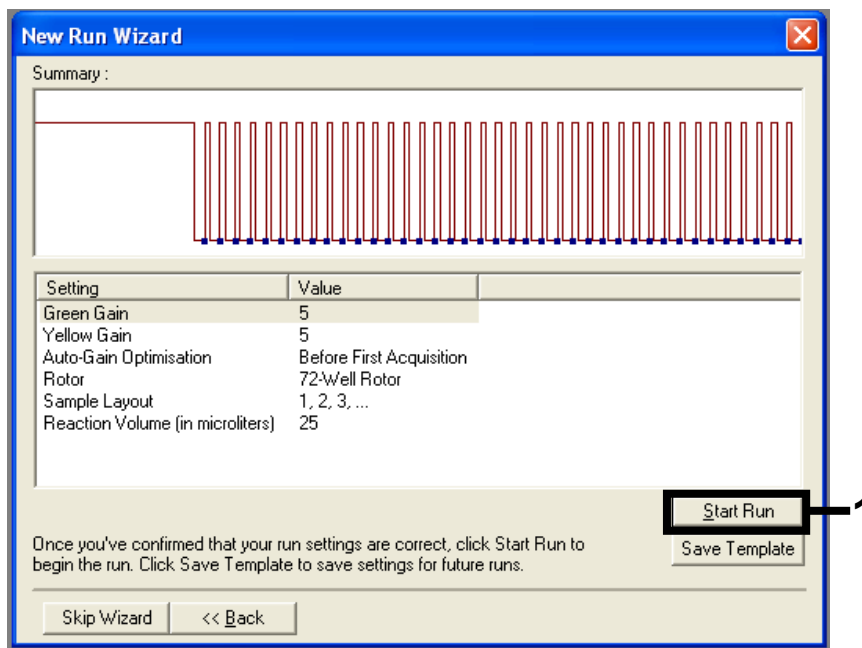
Afbeelding 34. Keuzescherf van de "New Run Wizard". (1 = velden "Operator" en "Notes", 2 = velden "Reaction Volume" en "Sample Layout", 3 = knop "Next").

4. In het volgende venster kan het temperatuurprofiel worden aangepast. Er zijn geen aanpassingen nodig, omdat het temperatuurprofiel al is aangemaakt volgens de instructies in "Protocol: een temperatuurprofiel aanmaken", pagina 62. Klik op "Next" (afbeelding 35).



Afbeelding 35. Het dialoogvenster "New Run Wizard" en het scherm voor aanpassen van de temperatuur. (1 = knop "Next").

5. Controleer of de gegevens in het overzicht kloppen en klik op "Start Run" om het run-bestand op te slaan en de run te starten (afbeelding 36).



Afbeelding 36. Het dialoogvenster "New Run Wizard" en het overzichtsscherm.
(1 = knop "Start Run").

6. Als de run is begonnen, verschijnt er een nieuw venster waarin u de namen van de monsters meteen kunt invoeren. U kunt ook op "Finish" (Voltooien) klikken en de namen later invoeren door tijdens de run of na afloop daarvan de knop "Sample" te selecteren.

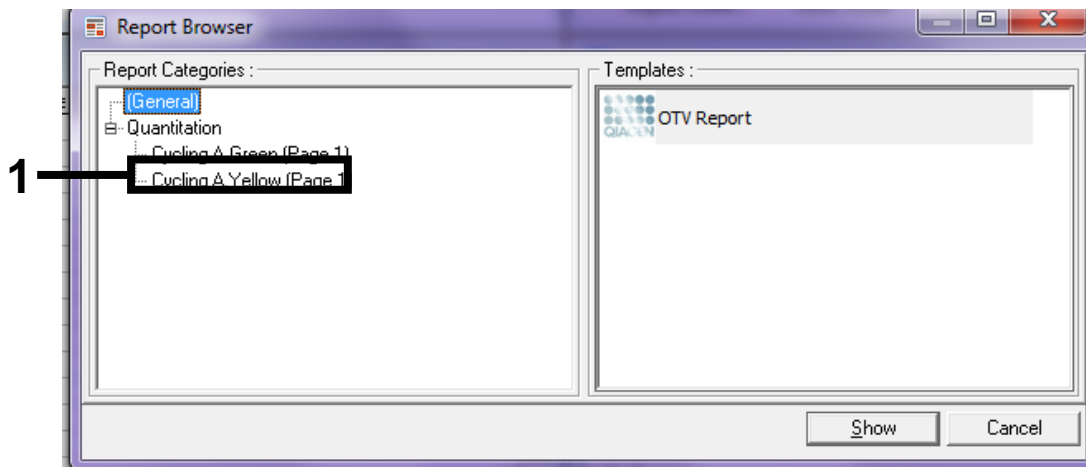
Als u op "Finish and Lock Samples" (Voltooien en monsters vergrendelen) klikt, kunnen de namen van de monsters niet meer worden aangepast.

De gebruiker dient bijzonder zorgvuldig te werk te gaan bij het invoeren van namen van monsters, zodat op alle monsters de juiste tests en analyses worden uitgevoerd.

NB: Laat bij het invoeren van de namen de ruimte in kolom "Name" (Naam) leeg voor plekken zonder monster.

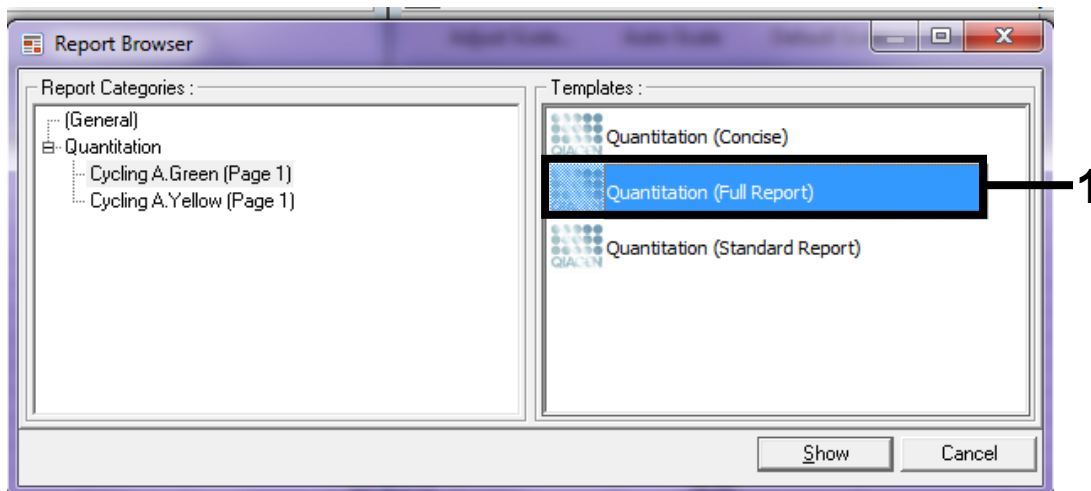
7. Analyseer na afloop van de run de gegevens volgens de betreffende instructies, namelijk "Gegevensanalyse van monsterbeoordelingen", pagina 82, of "Gegevensanalyse voor detectie van BRAF-mutaties", pagina 84.
8. Als er kwantificeringsrapporten gewenst zijn, klik dan op het pictogram "Reports" (Rapporten) op de werkbalk van het Rotor-Gene Q-run-bestand.

9. Klik in de rapportagebrowser op "Cycling A Green (page 1)" (Cyclus A Groen (pagina 1)) onder "Report Categories" (Rapportcategorieën) (afbeelding 37).



Afbeelding 37. Rapportagebrowser. (1 = knop "Cycling A. Green (Page 1)").

10. Selecteer "Quantitation (Full Report)" (Kwantificering (volledig rapport)) onder "Templates" (afbeelding 38).



Afbeelding 38. "Quantitation report (Full Report)" (1).

11. Klik op "Show" om het rapport aan te maken.
12. Klik op "Save As" om een elektronische versie op te slaan.
13. Herhaal deze stappen voor "Cycling A Yellow (Page1)" (Cyclus A Geel (pagina)).

Interpretatie van de resultaten (handmatig)

Analyseer de gegevens na afloop van de run voor monsterbeoordeling of voor mutatie-analyse als volgt:

Software-instellingen voor analyse

1. Open het betreffende bestand met behulp van de Rotor-Gene Q-software (2.3).
2. Als u de namen van de monsters niet van tevoren hebt ingevoerd, klik dan op "Edit Samples" (Monsters bewerken).
3. Vul de namen van uw monsters in, in de kolom "Name".
NB: Vul niets in voor eventuele plekken zonder monster.
4. Klik op "Analysis" (Analyse). Klik op "Cycling A. Yellow" (Cyclus A. Geel) op de analysepagina om de gegevens van het gele kanaal te bekijken.
5. Klik op "Named On" (Naam ingevoerd).
NB: Zo worden er geen plekken zonder monster in de analyse meegenomen.
6. Selecteer "Dynamic tube" (Dynamisch buisje).
7. Selecteer "Slope correct" (Correctie voor helling).
8. Selecteer "Linear scale" (Lineaire schaal).
9. Selecteer "Take off Adj" (Aanp. ijkpunt) en voer in het bovenste vakje ("If take off point was calculated before cycle" (Als ijkpunt vóór cyclus is berekend)) de waarde 15,01 in en in het onderste vakje ("then use the following cycle and take off point" (gebruik dan volgende cyclus en ijkpunt)) de waarde 20,01.
10. Stel de drempelwaarde in op 0,05.
11. Stel "Eliminate Cycles before" (Cycli vooraf niet meerekenen) in op 15.
12. Controleer de C_T -waarden voor het gele kanaal.
13. Klik op "Cycling A. Green" (Cyclus A. Groen) op de analysepagina om de gegevens van het groene kanaal te bekijken.
14. Selecteer "Named On".
15. Selecteer "Dynamic tube".
16. Selecteer "Slope correct".
17. Selecteer "Linear scale".
18. Selecteer "TOA" en voer in het bovenste vakje ("If take off point was calculated before cycle") de waarde 15,01 in en in het onderste vakje ("then use the following cycle and take off point") de waarde 20,01.

19. Stel de drempelwaarde in op 0,15.
20. Stel "Eliminate Cycles before" in op 15.
21. Controleer de C_T-waarden voor het groene kanaal.

Gegevensanalyse van monsterbeoordelingen

Analyse van de controlereactie van de run

Analyseer na afloop van de run de gegevens als volgt:

- **Negatieve controle:** Om er zeker van te zijn dat er geen contaminatie van monsters met template-DNA heeft plaatsgevonden, mag de C_T-waarde van de negatieve controle zonder template in het groene kanaal (FAM) niet lager zijn dan 40. Om er zeker van te zijn dat de run goed is opgezet, moet er in de negatieve controle zonder template amplificatie zijn opgetreden met een waarde tussen 32,53–38,16 in het gele kanaal (HEX). De gespecificeerde waarden moeten binnen deze waarden vallen.
- **Positieve controle:** Voor de positieve controle voor BRAF (PC) moet bij de controle-assay een C_T-waarde in het groene kanaal (FAM) zijn verkregen van 30,37–36,38. De gespecificeerde waarden moeten binnen deze waarden vallen. Als de verkregen waarde buiten dit bereik ligt, wijst dat op een probleem met de uitvoering van de assay en is de run mislukt.

De gegevens van de monsters mogen niet worden gebruikt als één van deze twee runcontroles mislukt is.

Als beide runcontroles geldig zijn, moet de C_T-waarde van ieder monster in het groene kanaal binnen het bereik van 21,95–32,00 liggen. Als de waarde voor een monster buiten dit bereik ligt, volg dan de aanwijzingen hieronder op.

Monsteranalyse – controle-assay

- **C_T-waarde van controle-assay van monster < 21,95:** Monsters met een C_T-waarde voor de controle-assay < 21,95 moeten worden verdund, aangezien dit de laagste waarde is waarvoor het assay gevalideerd is. Om in ieder monster ook mutaties die een laag percentage van het DNA uitmaken te kunnen detecteren, moeten monsters met een te hoge DNA-concentratie worden verdund zodat de waarde binnen het bovengenoemde bereik valt. De vuistregel daarbij is dat bij een twee keer zo hoge verdunningsfactor de C_T-waarde met 1 toeneemt. Als de waarde van het monster in de buurt van 21,95 ligt, wordt aangeraden het monster te verdunnen om er zeker van te zijn dat er bij testen van het monster (voor detectie van BRAF-mutaties) een geldig resultaat wordt verkregen. Gebruik voor het verdunnen van monsters het water voor verdunnen uit de kit (Dil.).
- **C_T-waarde van controle-assay van monster > 32,00:** Het wordt aangeraden het monster opnieuw te extraheren, omdat er onvoldoende DNA-template in het uitgangsmateriaal aanwezig is voor het detecteren van alle mutaties bij de aangegeven limietwaarden voor de assay.

Gegevensanalyse voor detectie van BRAF-mutaties

Analyse van de controlereactie van de run

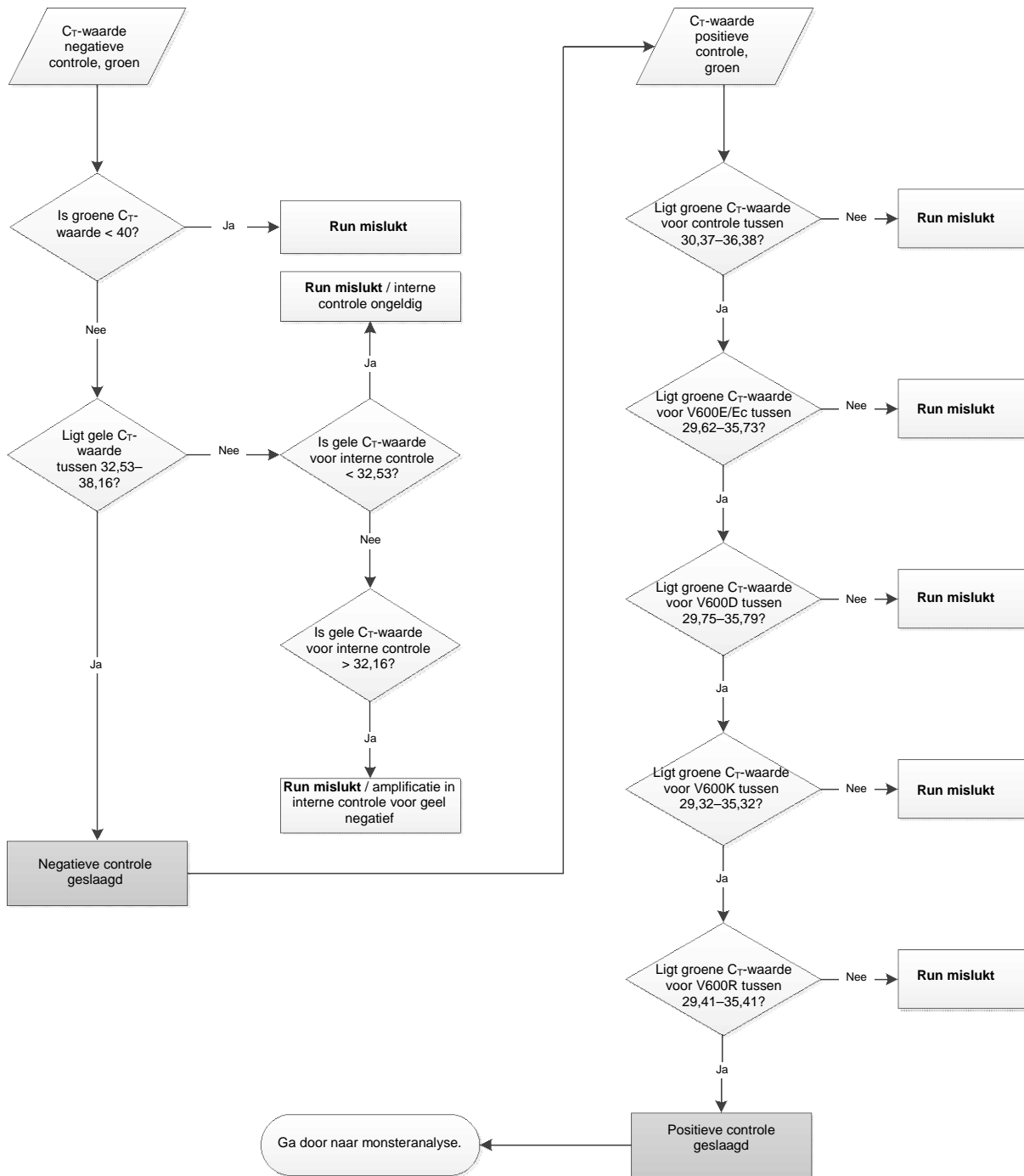
Zie het stroomschema voor analyse van de runcontrole in Afbeelding 39.

- **Negatieve controle:** Om er zeker van te zijn dat er geen contaminatie van monsters met template-DNA heeft plaatsgevonden, mag de C_T -waarde van de negatieve controle zonder template in het groene kanaal (FAM) niet lager zijn dan 40. Om er zeker van te zijn dat de run goed is opgezet, moet er in de negatieve controle zonder template amplificatie zijn opgetreden met een waarde tussen 32,53–38,16 in het gele kanaal (HEX). De gespecificeerde waarden moeten binnen deze waarden vallen.
- **Positieve controle:** Voor de positieve controle voor BRAF (PC) moet voor iedere BRAF-assay een C_T -waarde in het groene kanaal worden verkregen zoals in Tabel 14 is aangegeven. De gespecificeerde waarden moeten binnen deze waarden vallen. Als de verkregen waarde buiten dit bereik ligt, wijst dat op een probleem met de uitvoering van de assay en is de run mislukt.

NB: De gegevens van de monsters mogen niet worden gebruikt als één van deze twee runcontroles mislukt is.

Tabel 14. Aanvaardbaar bereik van C_T -waarden voor reactiecontroles.

Reactiemengsel	Monster	Kanaal	C_T -bereik
Controle	PC	Groen	30,37–36,38
V600E/Ec	PC	Groen	29,62–35,73
V600D	PC	Groen	29,75–35,79
V600K	PC	Groen	29,32–35,32
V600R	PC	Groen	29,41–35,41



Afbeelding 39. Stroomschema voor analyse van de runcontrole.

Monsteranalyse – groene C_T-waarde monstercontrole

Zie het stroomschema voor analyse van de monsters in Afbeelding 40.

Als beide runcontroles voor de controle-assay geldig zijn, moet de C_T-waarde van iedere monstercontrole in het groene kanaal binnen het bereik van 21,95–32,00 liggen.

Als de waarde voor een monster buiten dit bereik ligt, volg dan de aanwijzingen hieronder op.

- **C_T-waarde van controle-assay van monster < 21,95:** Monsters met een C_T-waarde voor de controle-assay < 21,95 hebben een te hoge concentratie voor de mutatie-assay en moeten worden verdund. Om in ieder monster ook mutaties die een laag percentage van het DNA uitmaken te kunnen detecteren, moeten monsters met een te hoge DNA-concentratie worden verdund zodat de waarde binnen het bovengenoemde bereik valt. De vuistregel daarbij is dat bij een twee keer zo hoge verdunningsfactor de C_T-waarde met 1 toeneemt. Gebruik voor het verdunnen van monsters het water voor verdunnen uit de kit (Dil.).
- **C_T-waarde van controle-assay van monster > 32,00:** Het wordt aangeraden het monster opnieuw te extraheren, omdat er onvoldoende DNA-template in het uitgangsmateriaal aanwezig is voor het detecteren van alle mutaties bij de aangegeven limietwaarden voor de assay.

Monsteranalyse – gele C_T-waarde voor interne controle van monsters bij mutatie-assays

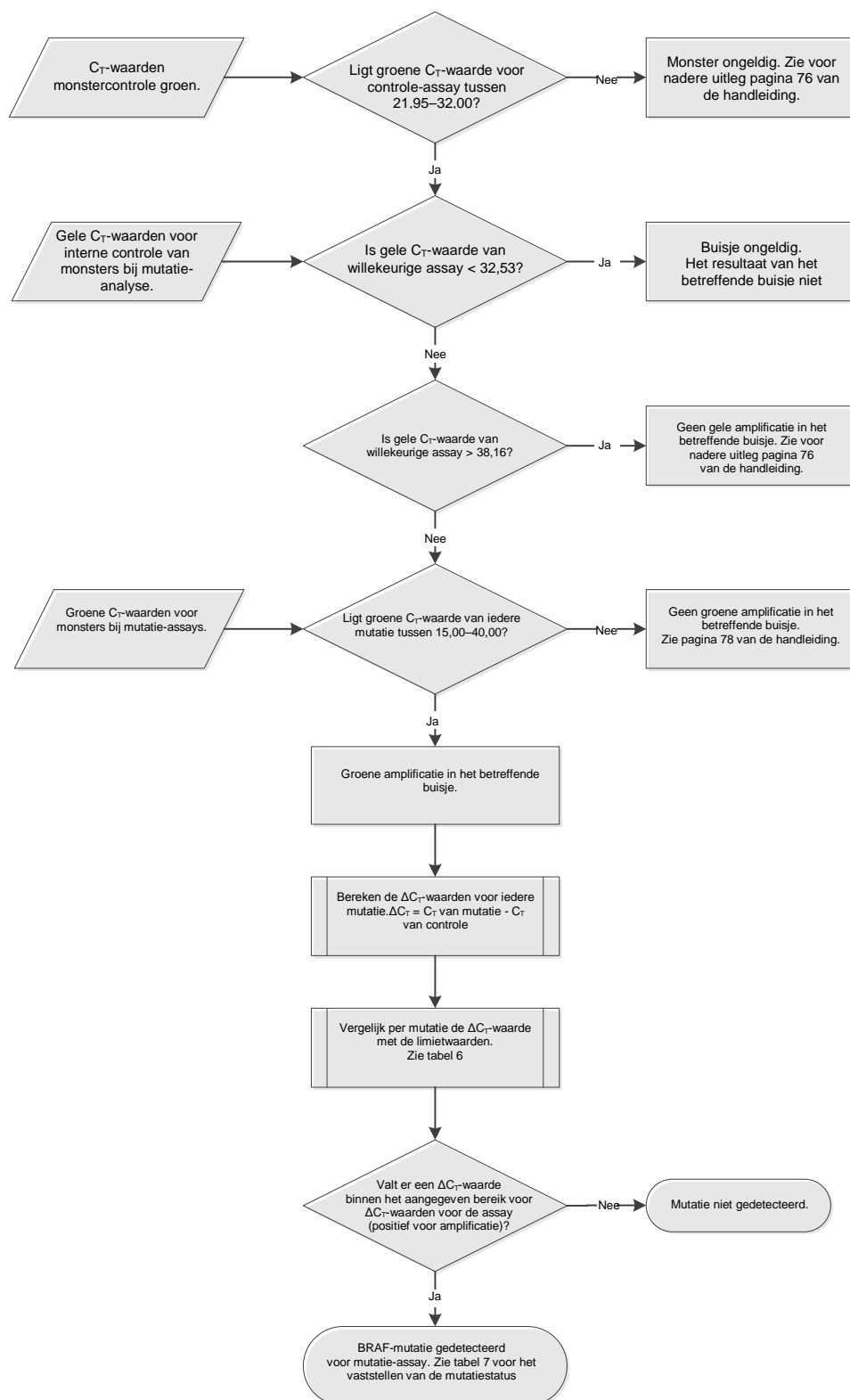
Zie het stroomschema voor analyse van de monsters in Afbeelding 40.

Van ieder monster moeten alle wells worden geanalyseerd. Controleer of er voor elke well een HEX-sigitaal is waargenomen in het gele kanaal van de interne controle. Er zijn 3 mogelijke uitkomsten:

- Als de C_T-waarde van de interne controle binnen het aangegeven bereik valt (32,53–38,16), heeft er tijdens de reactie amplificatie van de gele sequentie plaatsgevonden en is het buisje geldig.
- Als de C_T-waarde van de interne controle hoger is dan het aangegeven bereik (> 38,16), heeft er in het buisje geen amplificatie van de gele sequentie plaatsgevonden. Als er voor datzelfde buisje wel amplificatie plaatsvindt in het groene kanaal, is de gele amplificatie geldig. Als er voor het buisje geen amplificatie in het groene kanaal is opgetreden, is de gele amplificatie ongeldig.

- Als de C_T -waarde van de interne controle lager is dan het aangegeven bereik ($< 32,53$), is het betreffende buisje ongeldig.

Als de fout in de interne controle veroorzaakt wordt door remming van een reactie tijdens de PCR, kan het monster worden verdund om de invloed van remmers te verminderen. Bedenk echter wel dat het doel-DNA dan ook wordt verdund. In de kit zit een buisje met water voor het verdunnen van monsters (Dil.).



Afbeelding 40. Stroomschema voor monsteranalyse.

Monsteranalyse – groene C_T-waarde voor monsters bij mutatie-assays

Voor de 4 reactiemengsels dient steeds de waarde van het groene kanaal te worden vergeleken met de waarden in Tabel 15.

Tabel 15. Aanvaardbare waarden voor mutatiereacties van monsters (groen kanaal)*

Assay	Aanvaardbaar bereik van C_T-waarden	ΔC_T-bereik
V600E/E _c	15,00–40,00	≤ 7,0
V600D	15,00–40,00	≤ 6,9
V600K	15,00–40,00	≤ 6,0
V600R	15,00–40,00	≤ 7,0

* Aanvaardbare waarden moeten binnen deze waarden vallen.

- Als de C_T-waarde voor het groene kanaal binnen het aangegeven bereik valt, is het buisje positief voor FAM-amplificatie.
- Als de C_T-waarde voor het groene kanaal hoger is dan het aangegeven bereik of als er geen amplificatie is, is het groene kanaal negatief voor amplificatie.

Bereken de ΔC_T-waarde voor ieder mutatie-buisje dat positief is voor FAM-amplificatie als volgt. Let er daarbij goed op dat de C_T-waarden van de mutatie-assay en de controle afkomstig zijn van hetzelfde monster.

$$\Delta C_T = C_T \text{ van mutatie} - C_T \text{ van controle}$$

Vergelijk de ΔC_T-waarde van het monster met de limietwaarde voor de betreffende assay (Tabel 15) en let erop dat voor iedere assay de juiste limietwaarde wordt gebruikt.

De limietwaarde is de waarde waarboven een positief signaal mogelijk veroorzaakt kan zijn door achtergrondsignaal van de ARMS-primer op wild-type DNA. Als de ΔC_T-waarde van het monster hoger is dan de limietwaarde, wordt het geclassificeerd als negatief of overschrijdt het de detectielimieten van de kit.

Aan ieder monster kan op basis van de volgende criteria voor elke mutatiereactie een status worden toegekend, te weten: mutatie gedetecteerd; mutatie niet gedetecteerd; of ongeldig.

■ **Mutatie gedetecteerd:**

Groene waarde positief voor amplificatie en de ΔC_T -waarden zijn gelijk aan of lager dan de limietwaarde. Als er meerdere mutaties zijn gedetecteerd, ga dan voor het toekennen van de mutatiestatus te werk volgens Tabel 16.

■ **Mutatie niet gedetecteerd:**

Groene waarde positief voor amplificatie en de ΔC_T -waarden zijn hoger dan de limietwaarde.

Groene waarde negatief voor amplificatie en gele waarde (interne controle) positief voor amplificatie.

■ **Ongeldig:**

Gele waarde (interne controle) is ongeldig.

Groene waarde is negatief voor amplificatie en gele waarde is negatief voor amplificatie.

Zie voor nadere uitleg het stroomschema (Afbeelding 40). Als een monster negatief is voor amplificatie in het gele kanaal in een bepaald buisje, maar positief is voor amplificatie in het groene kanaal in een ander buisje, kan een resultaat 'mutatie gedetecteerd' in het tweede buisje nog steeds als geldig worden beschouwd, maar de betreffende mutatie die geïdentificeerd is kan dan niet met zekerheid worden toegekend.

Als een monster negatief is voor amplificatie in het gele kanaal en positief is voor amplificatie in het groene kanaal in hetzelfde buisje, dient een resultaat 'mutatie gedetecteerd' als geldig te worden beschouwd.

Als het gele kanaal (interne controle) van een buisje ongeldig is, mag het resultaat van dat buisje niet worden gebruikt.

Monsteranalyse – toekennen van de mutatiestatus van monsters

Nadat alle buisjes in de mutatiereactie zijn beoordeeld, wordt de mutatiestatus van het monster als volgt vastgesteld:

- **Mutatie gedetecteerd:** Eén of meer van de 4 mutatiereacties zijn positief. Als er meerdere mutaties zijn gedetecteerd, dient de mutatiestatus te worden toegekend volgens het schema in Tabel 16 (zie volgende pagina).
- **Mutatie niet gedetecteerd:** Alle 4 mutatiereacties zijn negatief.
- **Ongeldig:** Er zijn geen positieve mutatiereacties en 1 of meer mutatiereacties zijn ongeldig.

Tabel 16. Bepalen van de mutatiestatus van een monster

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutatiestatus
Positief	Negatief	Negatief	Negatief	Positief voor V600E of V600Ec
Positief	Negatief	Positief	Negatief	Positief voor V600Ec of V600K
Positief	Positief	Negatief	Negatief	Positief voor V600D
Negatief	Positief	Negatief	Negatief	Positief voor V600D
Negatief	Negatief	Positief	Negatief	Positief voor V600K
Negatief	Negatief	Negatief	Positief	Positief voor V600R

NB: De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit is bedoeld voor de detectie van mutaties in het BRAF-gen in een DNA-monster. Als een monster de status 'BRAF-mutatie gedetecteerd' heeft, is er in principe maar één mutatie gerapporteerd. Als er meerdere mutaties zijn gedetecteerd, dient de mutatiestatus te worden toegekend volgens het schema in Tabel 16.

Er doet zich soms enige kruisreactiviteit voor tussen mutatiereacties. Zo kan bijvoorbeeld bij het assay voor V600E/Ec een positief resultaat worden gevonden als er een V600D-mutatie aanwezig is. Bij het assay voor V600E/Ec kan een positief resultaat worden gevonden als er een V600K-mutatie aanwezig is. En bij het assay voor V600K kan een positief resultaat worden gevonden als er een complexe V600E-mutatie aanwezig is. De mutatiestatus kan echter worden bepaald met behulp van Tabel 16.

De kruisreactiviteit wordt veroorzaakt door de detectie van andere mutaties met een vergelijkbare sequentie door de ARMS-primer. Als een tweede mutatie-assay een positief resultaat oplevert, is dat waarschijnlijk het gevolg van kruisreactiviteit. Dubbele mutanten kunnen weliswaar voorkomen, maar zijn zeldzaam.

In zeldzame gevallen kunnen er daardoor combinaties van positieve resultaten worden gedetecteerd die niet voorkomen in Tabel 16. Het monster kan in dat geval nog steeds de status 'BRAF-mutatie gedetecteerd' krijgen. Vanwege kruisreactiviteit kan er echter geen specifieke mutatie worden onderscheiden. Van het monster kan daarom alleen worden gesteld dat er een BRAF-mutatie is gedetecteerd.

Als er één of meer mutatiereacties ongeldig zijn maar er zijn ook één of meer reacties positief, kan het monster nog steeds de status 'BRAF-mutatie gedetecteerd' krijgen, aangezien er een mutatie aanwezig is. Het is echter mogelijk dat de gemelde specifieke BRAF-mutatie niet juist is, maar het resultaat is van kruisreactiviteit. Van het monster kan daarom alleen worden gesteld dat er een BRAF-mutatie is gedetecteerd.

Bijlage II: Installatie van het *therascreen* BRAF Assay Package

De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit is ontworpen voor gebruik met het Rotor-Gene Q MDx-apparaat met een rotor met 72 plaatsen. Het *therascreen* BRAF Assay Package kan worden gedownload op de betreffende productpagina van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit op www.qiagen.com. De downloadinformatie staat in het gedeelte "Product Resources" (Informatiebronnen producten) op tabblad "Supplementary Protocols" (Aanvullende protocollen). De Assay Packages zijn ook te bestellen op cd (QIAGEN, cat.nr. 9023820).

Het assaypakket bevat de programma's "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template" en "*therascreen* BRAF CE Mutation Analysis Locked Template".

NB: Het *therascreen* BRAF Assay Package is uitsluitend geschikt voor gebruik met Rotor-Gene Q-software versie 2.3. Zorg, alvorens het *therascreen* BRAF Assay Package te installeren, dat de juiste versie van de Rotor-Gene Q-software is geïnstalleerd. Als er op uw Rotor-Gene Q MDx-apparaat bij levering een eerdere softwareversie aanwezig was, kunt u eenvoudig een upgrade uitvoeren door softwareversie 2.3 te downloaden van de productpagina van de Rotor-Gene Q MDx op www.qiagen.com. U vindt de nieuwe software in het betreffende gedeelte "Product Resources" op tabblad "Operating Software" (Besturingssoftware).

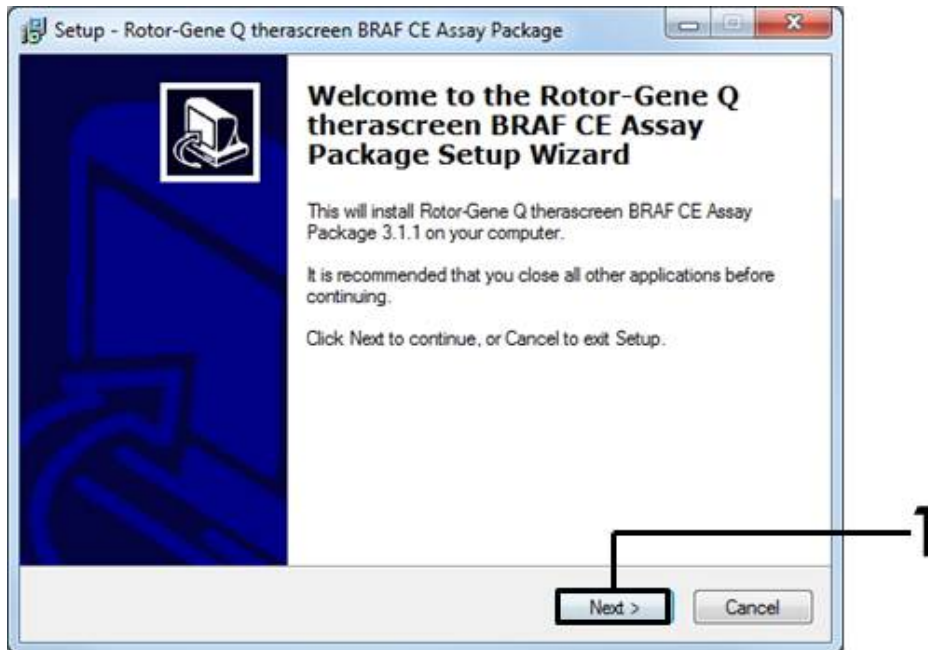
Procedure (download)

1. Download het *therascreen* BRAF RGQ Assay Package CE op de betreffende productpagina van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit op www.qiagen.com.
2. Open het gedownloade zip-bestand door erop te dubbelklikken en het ingepakte bestand uit te pakken.
3. Start de installatie door te dubbelklikken op het uitgepakte bestand `therascreen_BRAF_Assay_Package_3.1.1.exe`.

Procedure (cd)

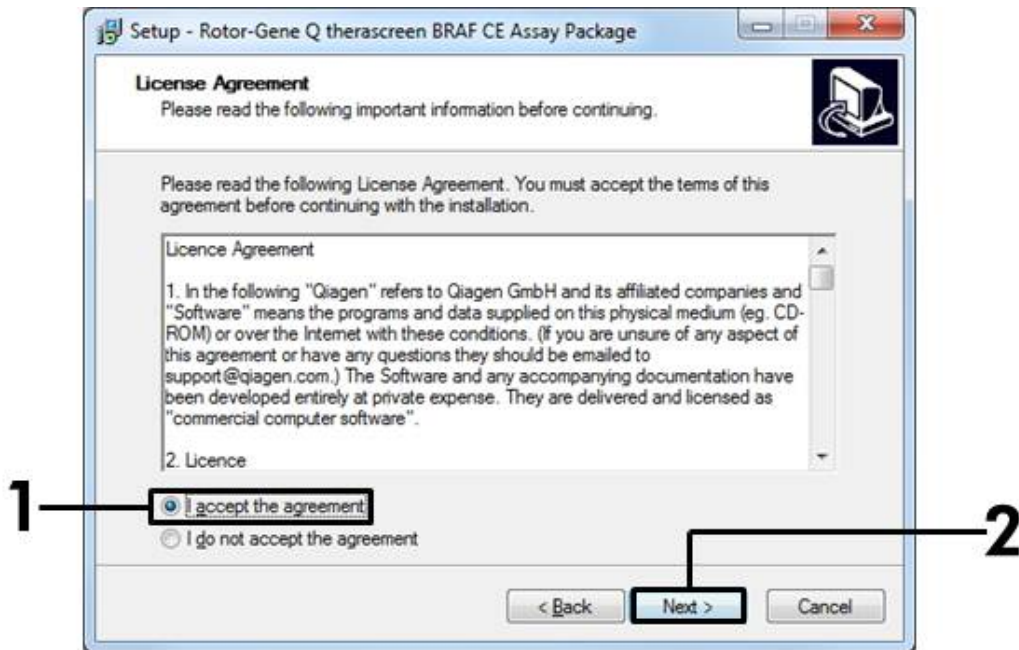
1. Bestel de cd met het *therascreen* BRAF RGQ Assay Package CE, die als afzonderlijk product beschikbaar is, bij QIAGEN (QIAGEN, cat.nr. 9023820).
2. Plaats de cd in het cd-station van de laptop die verbonden is met het Rotor-Gene Q-apparaat.

3. Start de installatie door te dubbelklikken op het bestand *therascreen_BRAF_Assay_Package_3.1.1.exe* als de cd automatisch wordt opgestart. Zo niet, zoek dan het uitvoerbare bestand op in de bestandsbrowser op de laptop.
4. De installatiewizard verschijnt in beeld. Klik op "Next" om verder te gaan (Afbeelding 41).



Afbeelding 41. Het dialoogvenster "Setup" (Instelling). (1 = knop "Next").

5. Lees de licentieovereenkomst in het dialoogvenster "License Agreement" (Licentieovereenkomst) en vink het antwoord "I accept the agreement" (Ik ga akkoord met deze overeenkomst) aan om akkoord te gaan met de overeenkomst. Klik op "Next" om verder te gaan (Afbeelding 42).



Afbeelding 42. Het dialoogvenster "License Agreement". (1 = knop voor akkoord, 2 = knop "Next").

6. De template-instelling wordt automatisch gestart. Na afloop hiervan verschijnt een afsluitend dialoogvenster "Setup". Klik op "Finish" om de installatiewizard af te sluiten (Afbeelding 43).



Afbeelding 43. Voltooien van de installatiewizard. (1 = knop "Finish").

7. Start de computer opnieuw op. Er worden automatisch snelkoppelingen naar de programma's "thetascreen BRAF CE Sample Assessment Locked Template" en "thetascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" aangemaakt en op het bureaublad geplaatst.

Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via www.qiagen.com/Support. Ook kunt u bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Bestelinformatie

Product	Inhoud	Cat.nr.
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-kit (24)	Voor 24 reacties: Controle-assay, 4 mutatie-assays, positieve controle, <i>Taq</i> DNA-polymerase, water voor negatieve controle zonder template en water voor monsterverdunning	870211
Rotor-Gene Q en overige accessoires		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR-cycler en uitsmeltanalyse met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding niet inbegrepen	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR-cycler en uitsmeltanalyse met hoge resolutie met 5 kanalen (groen, geel, oranje, rood, paars) plus HRM-kanaal, laptop, software, accessoires, 1 jaar garantie op onderdelen en werk, installatie en opleiding	9002033
<i>therascreen</i> BRAF Assay Package CD	Cd met <i>therascreen</i> BRAF CE Sample Assessment Locked Template en <i>therascreen</i> BRAF CE Mutation Analysis Locked Template.	9023820
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminium blok voor handmatig opzetten van reacties met een single-channel pipet in 72 buisjes van 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 1000 reacties	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 strips met 4 buisjes en dopjes voor 10.000 reacties	981106

Product	Inhoud	Cat.nr.
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – voor het zuiveren van genomisch DNA uit in paraffine ingebed weefsel		56404
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Voor 50 DNA-bereidingen: 50 QIAamp MinElute®-kolommen, proteïnase K, buffers, afnamebuisjes (2 ml)	

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten.

Deze pagina is met opzet leeg gelaten.

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

*Niet voor gebruik voor het vaststellen van de kans op het ontwikkelen van endometriose

Beperkte licentieovereenkomst

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van de *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. De *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit mag alleen worden gebruikt in overeenstemming met de Handleiding *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit en voor toepassing met uitsluitend de componenten die in de kit zitten. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten componenten van deze kit te gebruiken of samen te stellen met componenten die niet bij de kit zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de Handleiding *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de componenten ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen of niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie voor actuele licentievoorwaarden www.qiagen.com.

HB-1273-005 © 2016 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

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

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

