

# *therascreen*<sup>®</sup> BRAF RGQ PCR -sarjan käsikirja



Versio 2

**IVD**

In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx -laitteiden kanssa

**CE**

**REF**

870211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSA

R2

**MAT**

1072802FI



## QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN on johtava innovatiivisten näyte- ja määrittystekniikoiden toimittaja. QIAGENin tuotteet mahdollistavat kaikkien biologisten näytteiden sisällön eristämisen ja tunnistamisen. Pitkälle kehitetyt ja laadukkaat tuotteemme ja palvelumme takaavat onnistuneet lopputulokset aina näytteenotosta analysointiin asti.

### **QIAGENin urauurtavan toiminnan ydinalueita ovat**

- DNA:n, RNA:n ja proteiinien puhdistus
- nukleiinihappojen ja proteiinien määritykset
- microRNA-tutkimus ja RNAi
- näyte- ja määrittystekniikoiden automatisointi.

Tavoitteenamme on toimittaa tuotteita, joiden avulla asiakkaamme saavuttavat menestystä ja läpimurtoja. Katso lisätietoja osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

<b>Sisältö</b>	
<b>Käyttötarkoitus</b>	<b>5</b>
<b>Tiivistelmä ja kuvaus</b>	<b>5</b>
<b>Menetelmän periaate</b>	<b>6</b>
Testit	7
Kontrollit	7
<b>Toimitetut materiaalit</b>	<b>9</b>
Sarjan sisältö	9
<b>Tarvittavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen</b>	<b>10</b>
<b>Varoitukset ja huomautukset</b>	<b>11</b>
Turvallisuustiedot	11
Yleiset varotoimet	11
<b>Reagenssien säilytys ja käsittely</b>	<b>12</b>
<b>Näytteiden säilytys ja käsittely</b>	<b>13</b>
<b>Toimenpide</b>	<b>14</b>
DNA:n uuttaminen ja valmistaminen	14
Protokolla:	
■ Näytteen arviointi	15
■ Protokolla: BRAF-mutaation tunnistaminen	26
<b>Tulosten tulkinta (automaattinen)</b>	<b>38</b>
Ongelmien ratkaisu	39
<i>therascreen</i> BRAF -testipakkauksen merkinnät	40
<b>Laadunvarmistus</b>	<b>49</b>
<b>Rajoitukset</b>	<b>49</b>
<b>Suoritusarvot</b>	<b>50</b>
LOB (Limit of blank), toiminta-alue ja raja-arvot	50
Tarkkuus: Vertailu analyttiseen vertailumenetelmään	51
Input-DNA:N vaikutus $\Delta C_T$ -arvoihin	51
Ristireagoivuus	53
Havaitsemisraja (LOD) -arvot	54

Melaniinin vaikutus sarjan suorituskykyyn	55
Toistettavuus	56
Uusittavuus	56
<b>Symbolit</b>	<b>58</b>
<b>Liite I: <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR -sarjan manuaalin protokolla</b>	<b>59</b>
<b>Yleistä</b>	<b>59</b>
Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen	60
<b>Toimenpide (manuaalinen)</b>	<b>72</b>
Protokolla:	
■ Näytteen arviointi (manuaalinen)	72
■ Protokolla: BRAF-mutaation tunnistaminen (manuaalinen)	73
■ Protokolla: <i>therascreen</i> BRAF PCR RGQ -testin suorittaminen	74
<b>Tulosten tulkinta (manuaalinen)</b>	<b>79</b>
Ohjelmiston analyysiasetukset	79
Näytteen arviointitietojen analyysi	80
BRAF-mutaation tunnistamisen tietojen analysointi	81
<b>Liite II: <i>therascreen</i> BRAF -testipaketin asennus</b>	<b>88</b>
Toimenpide (lataus)	88
Toimenpide (CD)	89
<b>Yhteystiedot</b>	<b>91</b>
<b>Tilaustiedot</b>	<b>92</b>

## Käyttötarkoitus

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja on diagnostinen in vitro -testi, jonka avulla pystytään tunnistamaan viisi BRAF-geenistä löydettyä somaattista mutaatiota ja tekemään mutaatiostatuksesta kvalitatiivinen arviointi. DNA-näyte uutetaan formaliini-fiksoidusta parafiiniin valetusta (FFPE) kasvainkudoksesta ja testataan reaaliaikaisella polymeraasiketjureaktiomenetelmällä (PCR) Rotor-Gene Q MDx -laitteita käyttäen. *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja on tarkoitettu auttamaan klinikoita tunnistamaan syöpäpotilaat, jotka voisivat hyötyä BRAF:n estäjähoidosta, kuten vemurafenibistä.

**Taulukko 1. Mutaatioluettelo ja COSMIC-tunnisteet\***

Mutaatio	Emäsjärjestyksen muutos	COSMIC-tunniste
V600E	GTG > GAG	476
V600E-kompleksi	GTG > GAA	475
V600D	GTG > GAT	473
V600K	GTG > AAG	474
V600R	GTG > AGG	477

\*COSMIC-tunnisteet on otettu COSMIC-luettelosta (Catalog of Somatic Mutations in Cancer): ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

## Tiivistelmä ja kuvaus

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja on käyttövalmis sarja viiden BRAF-geenin somaattisen mutaation tunnistamiseen reaaliaikaisen polymeraasiketjureaktiomenetelmän (PCR) avulla Rotor-Gene Q MDx -laitetta käyttäen.

ARMS<sup>®</sup>-(Amplification Refractory Mutation System) -järjestelmän ja Scorpions<sup>®</sup>-tekniikoiden avulla *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja mahdollistaa seuraavien mutaation tunnistamisen BRAF-syöpägeenin kodoni 600:ssa villityypin genomisessa DNA:ssa.

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

Käytetyt menetelmät ovat erittäin selektiivisiä ja – DNA:n kokonaismäärästä riippuen – mahdollistavat alhaisen tason mutaatioiden havaitsemisen villigyyppin genomisessa DNA:ssa. Annetut selektiivisyys- ja tunnistamisrajat ovat tehokkaampia kuin väriaineeseen perustuva sekvensointi.

## Menetelmän periaate

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja tunnistaa mutaatioita kahden tekniikan – ARMS ja Scorpions – avulla reaaliaikaista polymeraasiketjureaktiomenetelmää (PCR) käyttäen.

### ARMS

Alleeli- tai mutaatiokohtainen monistus saadaan aikaan ARMS-tekniikan avulla. *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) erottaa tehokkaasti vastaavuudet ja poikkeamat PCR-alukkeen 3'-päässä. Spesifiset mutaation läpikäyneet sekvenssit monistetaan tasaisesti näytteissä, joissa suurimmassa osasta sekvenssejä mutaatiota ei ole. Kun alukkeen vastaavuus on täydellinen, monistus jatkuu täydellä teholla. Kun 3'-pään emäs ei ole vastaava, ilmenee vain matalan tason taustan monistusta.

### Scorpions

Monistuksen tunnistamisessa käytetään Scorpions-tekniikkaa. Scorpionit ovat bifunktionaalisia molekyyliä, jotka sisältävät PCR-aluketta, joka on kovalenttisesti kiinnitetty fluoresoivaan koettimeen. Koettimen fluorofori liittyy koettimessa olevaan sammuttajaan, joka vähentää fluoresenssia. PCR:n aikana, kun koetin sitoutuu amplikoniin, fluorofori ja sammuttaja irtoavat toisistaan. Tämä johtaa mitattavissa olevaan fluoresenssin nousuun reaktioputkesta.

### Sarjan rakenne

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjaan sisältyy viisi testiä:

- yksi kontrollitesti (kontrollireaktioseos; CTRL)
- neljä mutaatiotestiä (mutaatioreaktioseokset; V600E/Ec, V600D, V600K, V600R).

V600E/Ec-testi tunnistaa sekä V600E- että V600Ec-mutaatiot, mutta ei erota niitä toisistaan.

Kaikki reaktioseokset ovat kaksiosaisia, ja ne sisältävät reagensseja, jotka tunnistavat FAM<sup>™</sup>-kohteen ja sisäisen kontrollin, jonka tunnus on HEX<sup>™</sup>. Sisäinen kontrollitesti kontrolloi inhibiittoreita, jotka voivat johtaa väriin negatiivisiin tuloksiin.

## Testit

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja koostuu kaksivaiheisesta toimenpiteestä. Ensimmäisessä vaiheessa suoritetaan kontrollitesti näytteen monistettavissa olevan BRAF DNA:n arvioimiseksi. Toisessa vaiheessa suoritetaan sekä mutaatio- että kontrollitesti DNA:n mutaation läsnäolon vahvistamiseksi/poissulkemiseksi.

### Kontrollitesti

Kontrollitestillä, FAM-testillä, arvioidaan näytteen monistettavissa oleva BRAF DNA. Kontrollitesti monistaa BRAF-geenin eksoni 3 -alueen. Alukkeet ja Scorpion-koetin on suunniteltu monistamaan itsenäisesti mitä tahansa tunnettuja BRAF-polymorfismeja.

### Mutaatiotestit

Jokaisessa mutaatiotestissä on FAM-merkitty Scorpion-koetin ja ARMS-alue, joilla erotetaan villityypin DNA ja erityinen DNA:n mutaatio.

## Kontrollit

**Huomautus:** Kaikissa testierissä on oltava mukana positiiviset ja negatiiviset kontrollit.

### Positiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana positiivinen kontrolli putkissa 1–5. *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja sisältää BRAF-positiivisen kontrollin (PC), jota käytetään templaattina positiivisessa kontrollireaktiossa. Positiiviset kontrollitulokset arvioidaan, jotta voidaan varmistaa, että sarja toimii mainittujen hyväksyntäkriteerien vaatimusten mukaisesti.

### Negatiivinen kontrolli

Jokaisessa testierässä on oltava mukana negatiivinen kontrolli (NTC) putkissa 9–13. *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja sisältää vettä NTC:tä varten (NTC), jota käytetään templaattina NTC:ssä. NTC:tä käytetään arvioimaan mahdollinen kontaminaatio erän valmistelun aikana ja arvioimaan sisäisen kontrollireaktion toimintaa.

## Sisäisen kontrollireaktion arviointi

Jokainen reaktioseos sisältää kohdereaktion lisäksi sisäisen kontrollin. Epäonnistuminen osoittaa, että läsnä saattaa olla inhibiittoreita, jotka voivat johtaa epätarkkaan tulokseen tai kyseessä saattaa olla testin suorittajan virheellinen putken käsittely erän valmistelun aikana. Jos sisäisen kontrollin virhe johtuu PCR-inhibitiosta, näytteen laimentaminen saattaa vähentää inhibiittorien vaikutusta. Tässä tapauksessa on kuitenkin huomattava, että tällöin myös kohde-DNA laimenee. Sarjaan sisältyy myös vesiputki näytteen laimentamista varten (Dil.). Näytteiden laimentaminen on suoritettava sarjan mukana toimitettua laimentamiseen tarkoitettua vettä (Dil.) käyttäen.

## Näytteen arviointi

On erittäin suositeltavaa käyttää *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan mukana toimitettua kontrollireaktioseosta (CTRL) näytteen monistettavissa olevan BRAF DNA:n arvioimiseksi. Kontrollitesti monistaa BRAF-geenin eksoni 3 -alueen. On suositeltavaa valmistaa näytteitä, joissa käytetään ainoastaan kontrollitestiä käyttäen BRAF-positiivista kontrollia (PC) positiivisena kontrollina ja NTC:hen tarkoitettua vettä NTC:nä.

**Huomautus:** DNA:n arvioinnin tulisi perustua PCR:ään, ja se saattaa erota absorbanssilukemiin perustuvasta kvantifikaatiosta. Sarjan mukana toimitetaan myös ylimääräinen kontrollireaktioseos (CTRL), jonka avulla voidaan arvioida näytteiden DNA:n laatu ja määrä ennen *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjalla suoritettavaa analyysia.



# Toimitetut materiaalit

## Sarjan sisältö

<b><i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>Luettelonumero</b>			<b>870211</b>
<b>Reaktioiden määrä</b>			<b>24</b>
Control Reaction Mix (kontrollireaktioseos)	Punainen	1 CTRL	2 x 720 µl
V600E/Ec Reaction Mix (V600E/Ec-reaktioseos)	Purppura	2 V600E/Ec	720 µl
V600D Reaction Mix (V600D-reaktioseos)	Oranssi	3 V600D	720 µl
V600K Reaction Mix (V600K-reaktioseos)	Vaaleanpunainen	4 V600K	720 µl
V600R Reaction Mix (V600R-reaktioseos)	Vihreä	5 V600R	720 µl
BRAF Positive Control (BRAF-positiivinen kontrolli)	Beige	PC	250 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase ( <i>Taq</i> DNA -polymeraasi)	Mintunvihreä	<i>Taq</i>	2 x 80 µl
Water for NTC (vesi NTC:tä varten)	Valkoinen	NTC	1,9 ml
Water for Sample Dilution (vesi näytteen laimentamista varten)	Valkoinen	Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit Handbook (englanninkielinen käsikirja)			1

## Tarvittavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

### Reagenssit

- DNA:n uuttosarja (katso "DNA:n uutaminen ja valmistaminen", sivu 14)
- Ksyleeni
- Etanoli (96–100 %)\*

### Kulutustavarat

- 1,5 ml:n tai 2 ml:n mikrosentrifugiputkia (lyysivaiheisiin)
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia (eluutiovaiheisiin) (saatavana mm. seuraavilta: Brinkmann [Safe-Lock, luettelonro 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, luettelonro 0030 120.086] ja Sarstedt [Safety Cap, luettelonro 72.690])†
- Tarkoitukseen sopivia pipettejä‡ (säädettäviä) näytteen valmisteluun
- Tarkoitukseen sopivia pipettejä‡ (säädettäviä) PCR-pääseoksen valmisteluun
- Tarkoitukseen sopivia pipettejä‡ (säädettäviä) templaatti-DNA:n annosteluun
- Steriilejä, suodattimella varustettuja pipetin kärkiä (ristikontaminaation välttämiseksi suosittelemme käyttämään pipetin kärkiä, joissa on aerosoliesteet)

### Laitteisto

- Lämpösekoitin, kuumennettava ravistava inkubaattori, kuumennuslohko tai vesihaude, joka mahdollistaa inkuboinnin 90 °C:ssa‡
- Pöytämallinen sentrifugi‡, jossa on roottori 2 ml:n reaktioputkia varten
- Vortex-sekoittaja‡
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM‡\*, jossa on vihreä ja keltainen fluoresenssikanava (FAM:n ja keltaisen tunnistamiseen)

\* Älä käytä denaturoitua alkoholia, joka sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

† Toimittajaluettelo ei ole kattava.

‡ Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

- Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio 2.3 BRAF-testisarjan kanssa (versio 3.1.1) on valmiiksi asennettu automatisoitua mutaatioiden havaitsemista varten (katso "Liite II: *therascreen* BRAF -testipaketin asennus", sivu 88)

**Huomautus:** Rotor-Gene Q -ohjelmistoa voidaan käyttää ilman BRAF-testisarjaa manuaaliseen mutaatioiden tunnistamiseen. Katso kohta "Liite I: *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan manuaalin protokolla", sivulla 59.

- 0,1 ml:n liuskaputkia ja korkkeja käytettäväksi 72-kuoppaisen roottorin kanssa (QIAGEN, luettelonro 981103 tai 981106)
- Steriilejä mikrosentrifugiputkia pääseosten valmistamiseen
- Latauslohko, jossa on 72 x 0,1 ml:n putkea, alumiinilohko manuaaliseen reaktion valmisteluun, sis. Yksikanavainen pipetti (QIAGEN, luettelonro 9018901)

## Varoitukset ja huomautukset

In vitro -diagnostiikkaan

### Turvallisuustiedot

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), jossa voidaan tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustietoita.

### Yleiset varotoimet

Käyttäjän on aina huomioitava alla mainitut varotoimet.

- Säilytä ja uuta positiiviset materiaalit (näytteet ja positiiviset kontrollit) erillään, poissa kaikkien muiden reagenssien läheisyydestä ja lisää ne reaktioseokseen erillisessä tilassa.
- Varmista huolellisesti, etteivät PCR:t pääse kontaminoitumaan synteettisestä kontrollimateriaalista. Suosittelemme käyttämään reaktioseosten valmistuksessa ja DNA-templaatin lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä.

---

\* Joissakin maissa voidaan tilanteesta riippuen käyttää Rotor-Gene Q 5plex HRM -instrumenttia, jonka valmistuspäivä on toukokuussa 2011 tai myöhemmin. Valmistuspäivä on nähtävissä laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

Reaktioseosten valmistaminen ja annostelu on suoritettava eri paikassa kuin templaatin lisääminen. Rotor-Gene Q -putkia ei saa avata PCR-ajon on päättymisen jälkeen. Syynä on laboratoriokontaminoitumisen estäminen PCR-ajon jälkeen.

- *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan reagenssit on laimennettu optimaaliseen vahvuuteen. Emme suosittele laimentamaan reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen. Suosittelemme yhdellä kertaa käytettävän reagenssin vähimmäismääräksi 25 µl, koska muutoin väriin positiivisten tulosten riski kasvaa.
- Kaikki *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan reagenssit on suunniteltu sarjan optimaalista suorituskykyä ajatellen. Kaikki *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Sarjan reagensseja ei saa korvata muilla reagensseilla, jos halutaan säilyttää sarjan optimaalinen suorituskyky.
- Käytä ainoastaan sarjan mukana toimitettua *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*). Älä korvaa *Taq* DNA -polymeraasia muiden saman- tai toisentyyppisten sarjojen polymeraaseilla tai muiden toimittajien *Taq* DNA -polymeraaseilla.

## Reagenssien säilytys ja käsittely

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja toimitetaan pakattuna hiilihappojäähän, ja sen on oltava jäässä toimitushetkellä. Jos *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja ei ole toimitushetkellä jäässä, ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai toimituspakkaus ei sisällä lähetysluettelo, käsikirjaa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin paikalliseen tekniseen tukipalveluun tai jälleenmyyjään (katso yhteystiedot takakannesta tai osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja on asetettava välittömästi toimituksen vastaanottamisen jälkeen tasalämpöiseen pakastimeen, jonka lämpötila on -15...-30 °C ja suojattava valolta. Scorpions (samoin kuin kaikki fluoresenssimerkityt molekyylit) on suojattava valolta haalistumisen ja suorituskyvyn heikkenemisen estämiseksi.

Alkuperäispakkauksessaan suositelluissa säilytysolosuhteissa säilytetty sarja on käyttökelpoinen etiketissä mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti. Sarjan toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään kuusi.

## Näytteiden säilytys ja käsittely

**Huomautus:** Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti infektoituneena materiaalina.

Näytemateriaalin on oltava formaliini-fiksoidusta parafiiniin valetusta (FFPE) kudoksesta uutettua ihmisen genomista DNA:ta. Näytteet on kuljetettava tavanomaisia patologian käytäntöjä noudattaen näytteen hyväksyttävän laadun varmistamiseksi.

Kasvainnäytteet ovat ei-homogeenisiä, ja kasvainnäytteen tiedot eivät välttämättä ole yhdenmukaisia saman kasvaimen muiden osien tietojen kanssa.

Kasvainnäytteet saattavat sisältää kasvaimen lisäksi myös muuta kudosta. Muun kudoksen kuin kasvainkudoksen DNA:n ei oleteta sisältävän *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan havaitsemissa mutaatioita.

# Toimenpide

## DNA:n uutaminen ja valmistaminen

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan suoritusarvot on saatu aikaan käyttämällä QIAamp FFPE Tissue -sarjan avulla uutettua DNA:ta (QIAGEN, luettelonro 56404). Jos käytössä on QIAamp FFPE Tissue -sarja, suorita DNA:n uutaminen käsikirjan ohjeiden mukaisesti huomioiden myös alla esitetyt ohjeet.

- Ota FFPE-näytteet näytelevyille.
- Raaputa ylimääräinen parafiini pois kudoksesta käyttämättömällä, steriilillä skalpellilla.
- Raaputa kudoksenäytteet mikrosentrifugiputkiin käyttämällä jokaisen uutettavan näytteen kohdalla käyttämätöntä skalpellia.
- Puhdistettua genomista DNA:ta on uutettava 120–200 µl:ssa Buffer ATE -puskuria (sisältyy QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjaan). Säilytä puhdistettu genomisen DNA -15...-30 °C:n lämpötilassa.

DNA:n arvioinnin on perustuttava *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan mukana toimitettuun kontrollireaktioseokseen (CTRL), ja se saattaa erota absorbanssilukemiin perustuvasta kvantifioinnista. Sarjan mukana toimitetaan myös ylimääräinen kontrollireaktioseos (CTRL), jonka avulla voidaan arvioida näytteiden DNA:n laatu ja määrä ennen *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjalla suoritettavaa analyysia.

**Huomautus:** Jotta voitaisiin varmistaa riittävä DNA:n määrä analyysia varten, on suositeltavaa uuttaa vähintään kaksi FFPE-levyä ensimmäisessä vaiheessa ja arvioida ne kontrollitestillä. Jos PCR:ää varten on saatu riittävästi DNA:ta, lisälevyjä voidaan uuttaa ja ottaa DNA-poolit.

**Huomautus:** Jotta voitaisiin varmistaa riittävä DNA:n määrä analyysia varten, FFPE-näytteiden paksuuden on oltava vähintään 5 µm.

Kaikki *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan testit tuottavat lyhyitä PCR-tuotteita. *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja ei kuitenkaan toimi voimakkaasti fragmentoituneen DNA:n kanssa.

## Protokolla: Näytteen arviointi

Tämän protokollan avulla arvioidaan näytteiden monistettavissa olevan DNA:n kokonaismäärä käyttäen BRAF CE Sample Assessment Locked Template -templaattia (testitipakkausta) automatisoituun näytteen arviointiin.

**Huomautus:** Katso lisätietoja manuaalisesta näytteen arvioinnista kohdasta "Liite I: *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan manuaalin protokolla" sivulta 59.

### Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Lue ennen toimenpiteen aloittamista kohta "Yleiset varotoimet", sivulta 11.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Katso laitteen käyttöopas.
- Älä sekoita *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*) tai mitään *Taq* DNA -polymeraasia sisältävää seosta, sillä sekoittaminen saattaa inaktivoida entsyymiä.
- Pipetoi *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) asettamalla pipetin kärki aivan nestepinnan alapuolelle, jotta kärkeen ei pääse liikaa entsyymiä.
- Kontrollireaktioseoksen (CTRL) avulla voidaan arvioida enintään 24 näytettä.

### Ennen aloittamista suoritettava valmistelut

- Varmista, että *therascreen* BRAF -testipaketin ohjelmisto on asennettu ennen Rotor-Gene Q -laitteen ensimmäistä käyttökertaa (katso "Liite II: *therascreen* BRAF -testipaketin asennus", sivu 88).
- Ennen reagenssien jokaista käyttökertaa kaikkia reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ajan, käännettävä 10 kertaa ja sentrifugoitava hetken aikaa putken pohjalla olevan sisällön sekoittumiseksi.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) on huoneenlämpöistä (15–25 °C). Sentrifugoi putkea hetken aikaa putken pohjalla olevien entsyymien sekoittumiseksi.

### Toimenpide

- 1. Sulata kontrollireaktioseosta (CTRL), NTC:tä varten tarkoitettua vettä (NTC) ja positiivista kontrollia (PC) huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ajan. Kun reagenssit ovat sulaneet, sekoita ne kääntelemällä jokaista putkea 10 kertaa, jotta paikallisia suolakertymiä ei pääse muodostumaan, ja sentrifugoi sen jälkeen hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva materiaali sekoittuu.**

2. Valmista riittävä määrä pääseoksia (kontrollireaktioseos [CTRL] sekä *Taq* DNA -polymeraasi [*Taq*]) DNA-näytteitä varten, yksi positiivinen kontrollireaktio ja yksi NTC-reaktio noudattaen taulukossa 2 annettuja määriä koskevia ohjeita. Sisällytä mukaan reagensseja yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten.

Pääseos sisältää kaikki PCR:ää varten tarvittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

Taulukko 2. Kontrollitestin pääseoksen valmistaminen\*

Komponentti	Määrä
Kontrollireaktioseos (CTRL)	19,5 µl × (n + 1)*
<i>Taq</i> DNA -polymeraasi ( <i>Taq</i> )	0,5 µl × (n + 1)*
<b>Kokonaismäärä</b>	<b>20,0 µl/reaktio</b>

\* n = reaktioiden määrä (näytteet plus kontrollit). Valmista pääseosta valmistaessasi riittävä määrä seosta yhtä ylimääräistä näytettä varten (n+1), jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten. Arvo n ei saa olla yli 26 (24 näytettä plus 2 kontrollia).

3. Sekoita pääseos huolellisesti pipetoimalla sitä varovasti 10 kertaa ylös ja alas. Aseta sopiva määrä liuskaputkia latauslohkoon kuvassa 1 esitetyllä tavalla. Lisää välittömästi 20 µl pääseosta jokaiseen PCR-liuskaputkeen.

Pidä korkit muovisäiliössä myöhempää käyttöä varten. Näytteen arviointia varten lisää kontrollitestin pääseosta yhteen positiiviseen kontrollikuoppaan, yhteen negatiiviseen kontrollikuoppaan ja kunkin näytteen yhteen kuoppaan.

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

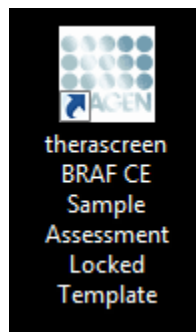
Kuva 1. Latauslohkossa olevien näytteiden arviointi. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.



4. Lisää välittömästi 5 µl NTC:hen tarkoitettua vettä NTC-putkeen (PCR-putki numero 2) ja aseta putken korkki paikalleen. Lisää 5 µl vettä jokaiseen näyteputkeen (PCR-putkiin numero 3–26) ja aseta putkien korkit paikoilleen. Lisää 5 µl BRAF-positiivista kontrollia (PC) positiiviseen kontrolliputkeen (PCR-putki numero 1) ja aseta putken korkki paikalleen.

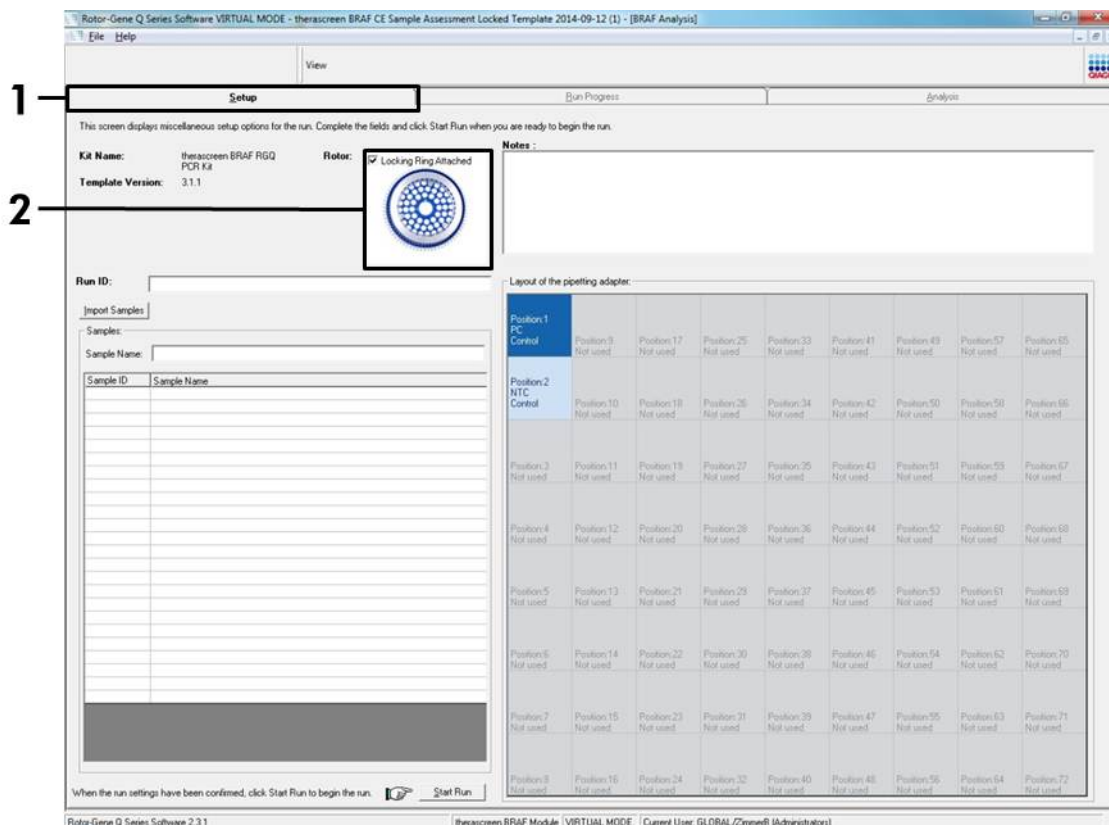
Merkitse putkien korkkeihin suunta, jota noudattaen putket ladataan Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen.

5. Kun kaikkien PCR-putkien korkit on asetettu paikoilleen, tarkista näyteputkien täyttötasot silmämääräisesti, jotta voit varmistaa, että näyte on lisätty kaikkiin putkiin.
6. Kääntele kaikkia PCR-putkia (4 kertaa), jotta näytteet ja reaktioseokset sekoittuvat.
7. Aseta PCR-liuskaputket oikeisiin kohtiinsa 72-kuoppaiseen roottoriin (kuva 1). Jos roottori ei ole täynnä, kaikkiin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan.
8. Aseta välittömästi 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen. Varmista, että lukkorengas (Rotor-Gene Q -laitteen varuste) on asetettu roottorin päälle, jotta putket pysyvät paikoillaan ajon aikana.
9. Käynnistä Rotor-Gene Q -sarjan ohjelmisto kaksoisnapsauttamalla Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn kannettavan tietokoneen näytössä näkyvää "therascreen BRAF CE Sample Assessment Locked Template" (therascreen BRAF CE -näytteen arvioinnin lukitus) -kuvaketta (katso kuva 2).



Kuva 2. "therascreen BRAF CE Sample Assessment Locked Template" (therascreen BRAF CE -näytteen arvioinnin lukitus) -kuvake.

10. "Setup" (Asennus) -välilehti tulee oletuksena näkyviin (kuva 3). Varmista, että lukkorengas on kunnolla paikallaan ja laita rasti "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Sulje Rotor-Gene Q -laitteen kansi.



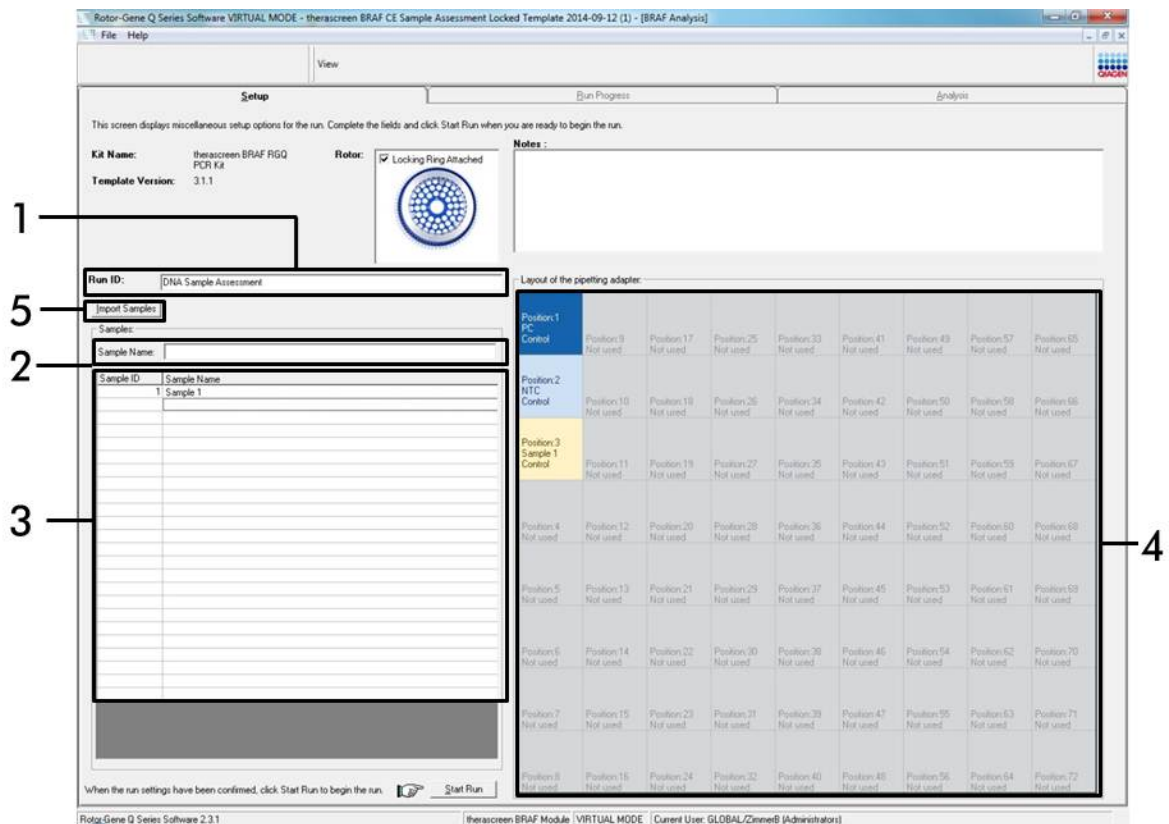
Kuva 3. "Setup" (Asennus) -välilehti (1) ja "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu (2).

11. Anna "Run ID" (Ajon tunniste) -kenttään ajon tunniste oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Anna "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään näytteen nimi oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Tällöin näytteen nimi lisätään alla olevaan näyteluetteloon ja näytteelle annetaan "Sample ID" (Näytteen tunniste) -nimi (1, 2, 3 jne.). Lisäksi näytteen nimi päivitetään oikealla puolella näkyvään "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeliin (kuva 4).

**Huomautus:** Vaihtoehtoisesti \*.smp (Rotor-Gene Q -näytetiedosto) -muodossa tai \*.csv (CSV-tiedosto) -muodossa tallennetut näytteet voidaan tuoda valitsemalla "Import Samples" (Tuo näytteet) -painike. Näytteiden nimet täytetään automaattisesti tätä menetelmää käyttäen.

**Huomautus:** Tarkista "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa, että lisätty näytteen nimi on korostettu eri värillä kuin muut nimet ja että näytteen nimi on näytekohdassa (kuva 4).

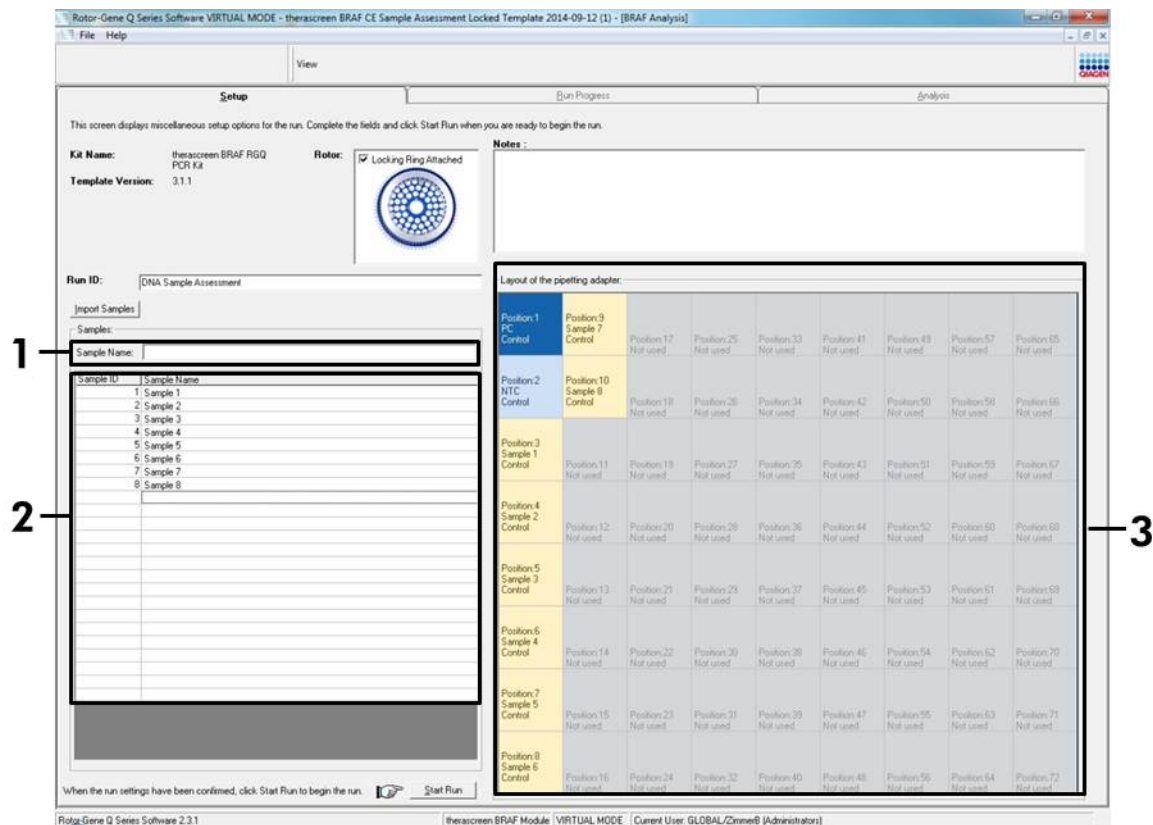
**Huomautus:** Jos näytteen nimessä on yli kahdeksan merkkiä, nimi ei mahdollisesti näy "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa kokonaan.



**Kuva 4. "Run ID" (Ajon tunniste)- ja "Sample Name" (Näytteen nimi) -tietojen antaminen.**  
 (1 = "Run ID" [Ajon tunniste] -kenttä, 2 = "Sample Name" [Näytteen nimi] -kenttä, 3 = Sample List [Näyteluettelo], 4 = "Layout of the pipetting adapter" [Pipetointiadapterin asettelu] -paneeli, 5 = "Sample Import" [Näytteen tuonti] -painike).

## 12. Anna muiden näytteiden nimet toistamalla vaihe 11 (kuva 5).

**Huomautus:** Voit muokata näytteen nimeä napsauttamalla näyteluettelossa kohtaa "Sample Name" (Näytteen nimi), jolloin valittu näyte tulee edellä mainittuun "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään. Muokkaa nimeä oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti ja päivitä nimi painamalla Enter.

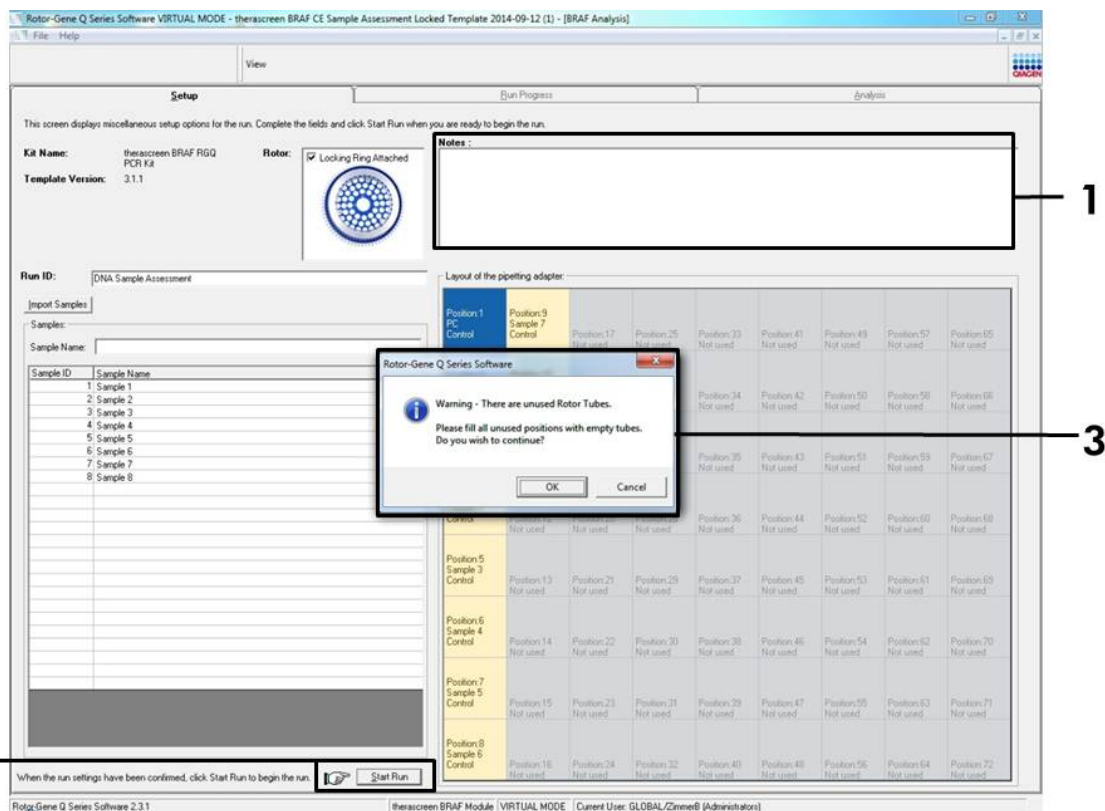


**Kuva 5. Muiden näytteiden nimien lisääminen "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään.**

(1 = "Sample Name" [Näytteen nimi] -kenttä, 2 = Sample List [Näyteluettelo], 3 = "Layout of the pipetting adapter" [Pipetointiadapterin asettelu] -paneeli).

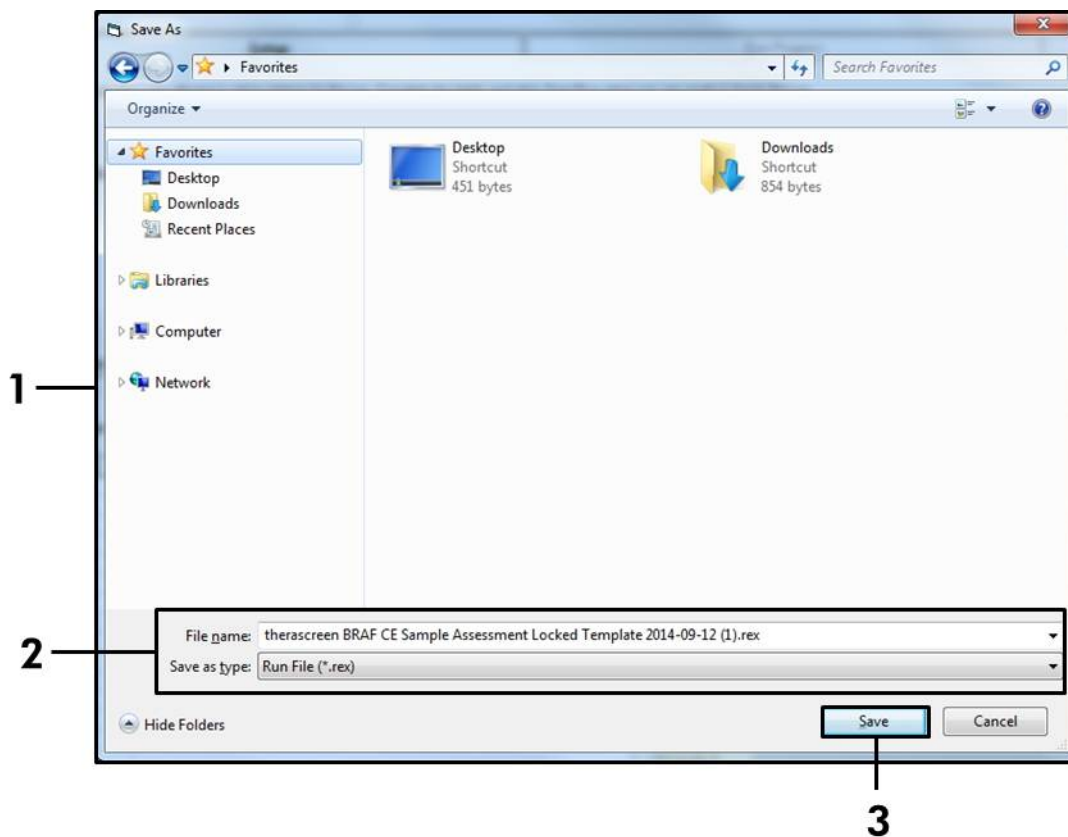
13. Kun kaikkien näyttöiden nimet on annettu, varmista, että ne ovat oikein. Lisää tarvittaessa lisätietoja "Notes" (Huomautukset) -kenttään ja napsauta "Start Run" (Käynnistä ajo) -painiketta (kuva 6).

**Huomautus:** Jos jokin roottorin paikka on tyhjä, näkyviin tulee "Warning" (Varoitus) (kuva 6), jolla käyttäjää muistutetaan siitä, että kaikkiin roottorin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjä korkilla suljettu putki. Tarkista, että kaikissa roottorin tyhjiissä kohdissa on tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan, ja jatka napsauttamalla "OK".



Kuva 6. "Notes" (Huomautukset) -kenttä (1), "Start Run" (Käynnistä ajo) -painike (2) ja tyhjiä roottorin paikkoja koskeva "Warning" (Varoitus) (3).

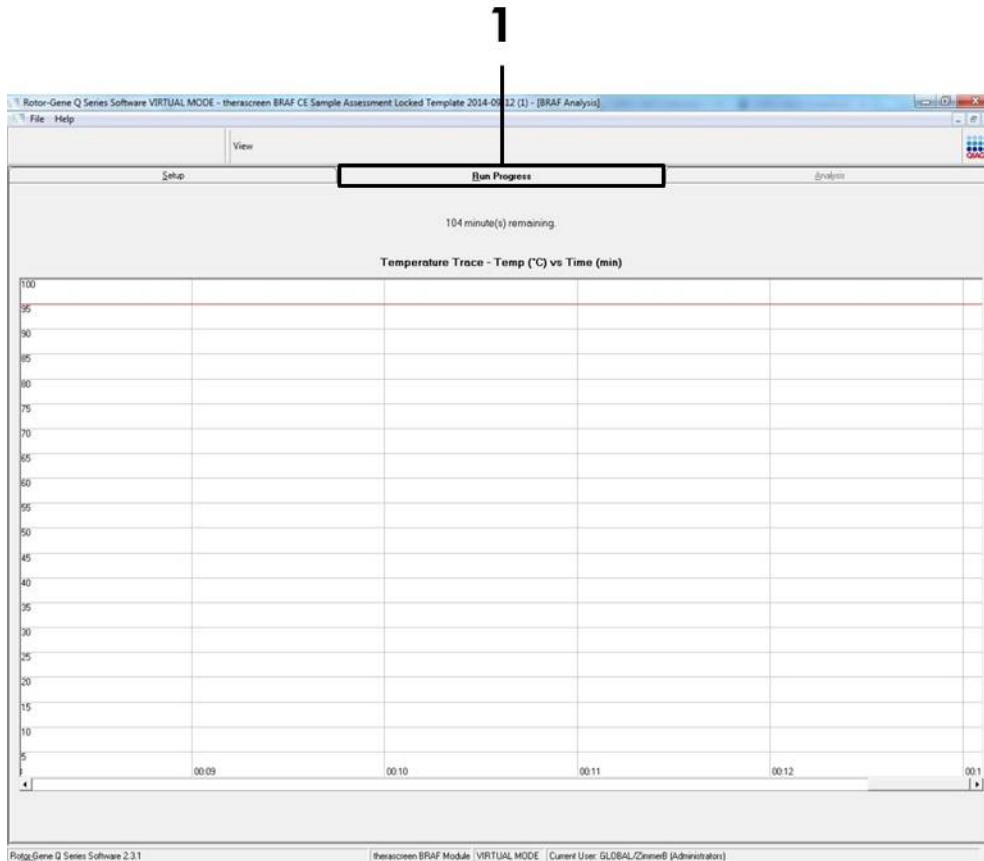
14. "Save As" (Tallenna nimellä) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse haluamasi tiedostonimi ja tallenna PCR-ajo \*.rex-tiedostona valittuun sijaintiin ja napsauta "Save" (Tallenna) -painiketta (kuva 7).



**Kuva 7. Ajotiedoston tallentaminen.** (1 = "Save As" [Tallenna nimellä] -ikkuna, 2 = "File Name" [Tiedostonimi]- ja "Save as type" (Tallenna tyyppinä) -kentät, 3 = "Save" [Tallenna] -painike).

## 15. PCR-ajo käynnistyy.

**Huomautus:** Kun ajo käynnistyy, "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti avautuu automaattisesti, ja siinä näkyvät lämpötilatiedot ja jäljellä oleva ajoaika (kuva 8).

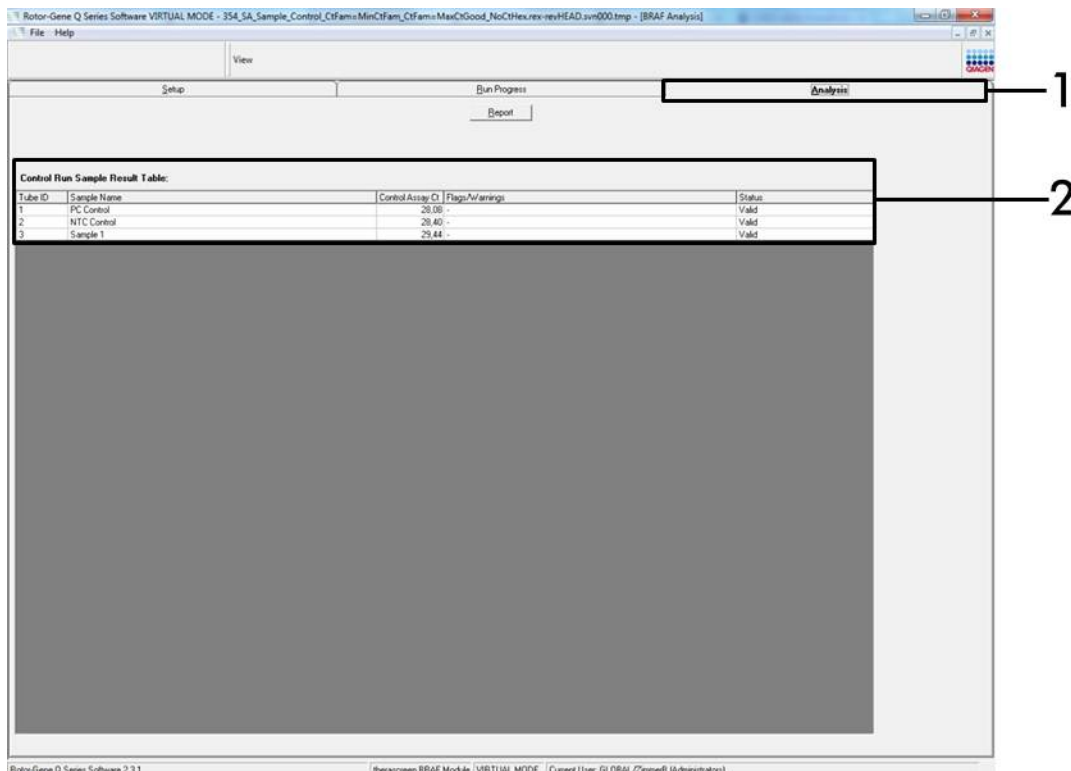


Kuva 8. "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti.

## 16. Kun ajo on suoritettu loppuun, "Analysis" (Analyysi) -välilehti avautuu automaattisesti.

**Huomautus:** Jos "Analysis" (Analyysi) -välilehti ei avaudu, napsauta "Analysis" (Analyysi) -välilehteä (kuva 9).

**Huomautus:** Laskentamenetelmä on selitetty osassa "Tulosten tulkinta" sivulla 38.



**Kuva 9.** "Analysis" (Analyysi) -välilehti ja tulosten raportointi. (1 = "Analysis" [Analyysi] -välilehti, 2 = "Sample Result Table" [Näytteen tulostaulukko]).

## 17. Kontrollitulokset raportoidaan, kuten kohdassa "Sample QC Result Table" (Näytteen QC-tulostaulukko) (kuva 9) on esitetty.

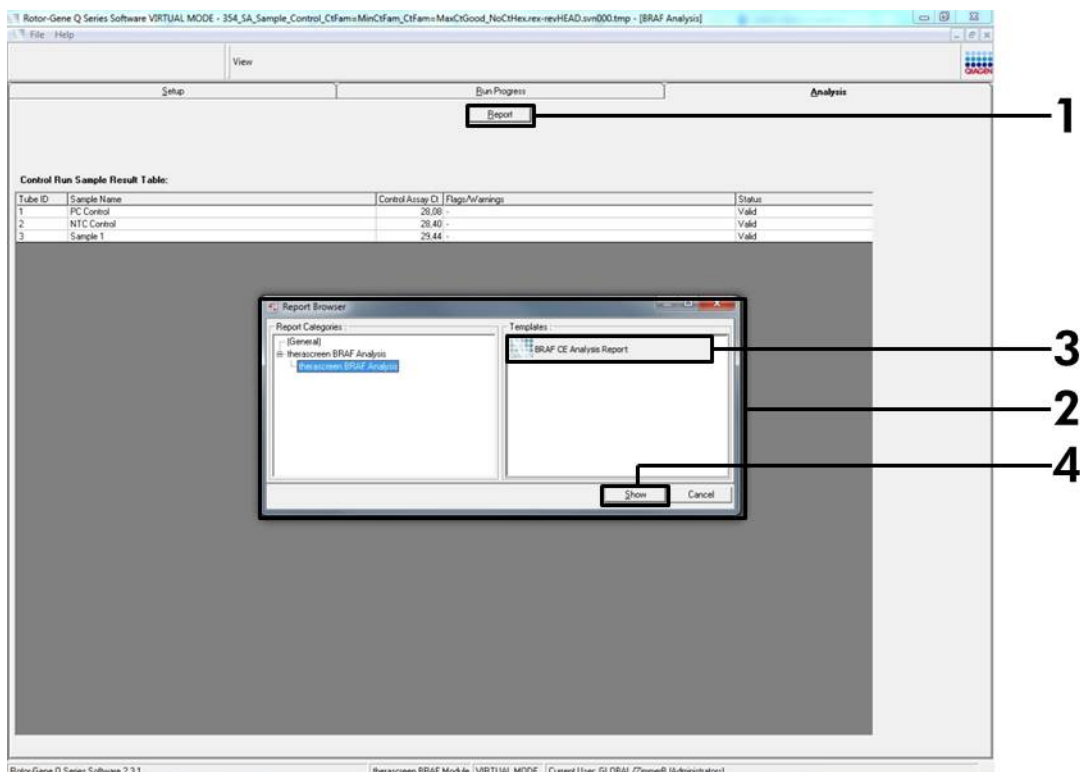
- **Aja kontrollit (PC ja NTC, putkien sijainnit 1 ja 2).** Jos tulokset ovat hyväksyttävän alueen rajoissa, kummassakin kohdassa näkyy teksti "Valid" (Hyväksytty). Muussa tapauksessa tulokseksi tulee teksti "Invalid" (Virheellinen).
- **Näytteen kontrollireaktion  $C_T > 32,00$  kohdalle tulee teksti "Invalid" (Virheellinen).** DNA:n määrä ei ole riittävä mutaatioanalyysia varten. Testaa näyte uudelleen. Jos DNA:n määrä on edelleen riittämätön, uuta lisää kudoksenäytettä, jos sitä on saatavilla (katso "Ongelmien ratkaisu", sivu 39).



- **Näytteen kontrollireaktion  $C_T < 21,95$  kohdalle tulee teksti "Invalid" (Virheellinen).** DNA:n konsentraatio on liian korkea mutaatioanalyysia varten. Laimenna nukleasittomalla laimentamiseen tarkoitetulla vedellä (Dil.) ja suorita testi uudelleen. Laimenna pitoisuuteen  $C_T 21,95-32,00$ . Laimennussuhde 1:1 kasvattaa  $C_T$ -arvoa 1.0:lla.
- **Näytteen kontrollireaktion  $C_T$ -arvon  $21,95-32,00$ , ( $21,95 \leq$  kontrolli  $C_T \leq 32,00$ ) kohdalle tulee teksti "Valid" (Hyväksytty).** DNA:n konsentraatio on sopiva mutaatioanalyysia varten.

**Huomautus:** Jos uudelleen uuttaminen tai laimennus on tarpeellinen, toista kontrollireaktio, jotta voit varmistaa, että DNA:n konsentraatio on sopiva käyttöä varten.

- 18. Raporttiedostot voidaan luoda napsauttamalla "Report" (Raportti) -painiketta. "Report Browser" (Raporttiselain) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse kohdasta "Templates" (Mallit) kohta "BRAf CE Analysis Report" (BRAf CE -analyysiraportti) ja napsauta sen jälkeen "Show" (Näytä) -painiketta (kuva 10).Huomautus:** Raportit voidaan tallentaa Web Archives (Verkkoarkisto) -muodossa toiseen sijaintiin napsauttamalla kunkin raportin vasemmassa yläkulmassa "Save As" (Tallenna nimellä) -painiketta.



**Kuva 10. "BRAf CE Analysis Report" (BRAf CE -analyysiraportti) -kohdan valitseminen.** (1 = "Report" [Raportti] -painike, 2 = "Report Browser" [Raporttiselain], 3 = "BRAf CE Analysis Report" [BRAf CE -analyysiraportti], 4 = "Show" [Näytä] -painike).

## Protokolla: BRAF-mutaation tunnistaminen

Tämä protokolla koskee BRAF-mutaatioiden tunnistamista. Kun näyte on läpäissyt näytteen arvioinnin, se voidaan testata BRAF-mutaatiotesteillä automatisoitua ohjelmistoa käyttäen.

**Huomautus:** Katso lisätietoja manuaalisesta mutaatioiden tunnistamisesta kohdasta "Liite I: theascreen BRAF RGQ PCR -sarjan manuaalin protokolla" sivulta 59.

### Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Lue ennen toimenpiteen aloittamista kohta "Yleiset varotoimet", sivulta 11.
- Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Katso laitteen käyttöopas.
- Älä sekoita *Taq* DNA -polymeraasia (*Taq*) tai mitään *Taq* DNA -polymeraasia sisältävää seosta, sillä sekoittaminen saattaa inaktivoida entsyymien.
- *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan tehokkaan toiminnan takaamiseksi näytteet on jaettava vähintään kuuden kappaleen eriin. Jos eräkokko on pienempi, *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjalla voidaan testata pienempi määrä näytteitä.
- Pipetoi *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) asettamalla pipetin kärki aivan nestepinnan alapuolelle, jotta kärkeen ei pääse liikaa entsyymiä.

### Ennen aloittamista suoritettava valmistelut

- Varmista, että *therascreen* BRAF -testipaketin ohjelmisto on asennettu ennen Rotor-Gene Q -laitteen ensimmäistä käyttökertaa (katso "Liite I: theascreen BRAF RGQ PCR -sarjan manuaalin protokolla", sivu 59).
- Ennen reagenssien jokaista käyttökertaa kaikkia reagensseja on sulatettava huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ajan, käännettävä 10 kertaa ja sentrifugoitava hetken aikaa putken pohjalla olevan sisällön sekoittumiseksi.
- Varmista ennen jokaista käyttökertaa, että *Taq* DNA -polymeraasi (*Taq*) on huoneenlämpöistä (15–25 °C). Sentrifugoi putkea hetken aikaa putken pohjalla olevien entsyymien sekoittumiseksi.

## Toimenpide

1. Sulata reaktioseoksia, NTC:tä varten tarkoitettua vettä (NTC) ja BRAF-positiivista kontrollia (PC) huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään yhden tunnin ajan. Kun reagenssit ovat sulaneet, sekoita ne kääntelemällä jokaista putkea 10 kertaa, jotta paikallisia suolakertymiä ei pääse muodostumaan, ja sentrifugoi sen jälkeen hetken aikaa, jotta putken pohjalla oleva materiaali sekoittuu.
2. Varmista riittävä määrä pääseoksia (reaktioseos sekä Taq DNA -polymeraasi [Taq]) DNA-näytteitä varten, yksi positiivinen kontrollireaktio ja yksi NTC-reaktio noudattaen taulukossa 3 annettuja määriä koskevia ohjeita. Sisällytä mukaan reagensseja yhtä ylimääräistä näytettä varten, jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten.

Pääseokset sisältävät kaikki PCR:ää varten tarvittavat komponentit näytettä lukuun ottamatta.

### Taulukko 3. Testin pääseosten\* valmistaminen

Testi	Reaktioseoksen määrä	Taq DNA -polymeraasin (Taq) määrä
Kontrolli	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
V600E/Ec	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
V600D	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
V600K	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)
V600R	19,5 µl × (n + 1)	0,5 µl × (n + 1)

\* n = reaktioiden määrä (näytteet plus kontrollit). Valmista pääseosta valmistaessasi riittävä määrä seosta yhtä ylimääräistä näytettä varten (n+1), jotta mahdollistat riittävän kattavuuden PCR-määrittystä varten.

3. Sekoita pääseos huolellisesti pipetoimalla sitä varovasti 10 kertaa ylös ja alas. Aseta sopiva määrä liuskaputkia latauslohkoon kuvassa 11 esitetyllä tavalla. Lisää välittömästi 20 µl pääseosta jokaiseen PCR-liuskaputkeen (eivät sisälly toimitukseen).

Pidä korkit muovisäiliössä myöhempää käyttöä varten.

Testi	Kontrollit		Näytteen numero						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Kontrolli	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

Kuva 11. Latauslohkossa olevien kontrolli- ja mutaatiotestien arviointi. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

4. Lisää välittömästi 5 µl NTC:hen tarkoitettua vettä NTC-putkiin (PCR-putket numero 9–13) ja aseta putkien korkit paikoilleen. Lisää 5 µl vettä jokaiseen näyteputkeen (PCR-putkiin numero 17–21, 25–29, 33–37, 41–45, 49–53, 57–61 ja 65–69) ja aseta putkien korkit paikoilleen. Lisää 5 µl BRAF-positiivista kontrollia (PC) positiivisiin kontrolliputkiin (PCR-putket numero 1–5) ja aseta putkien korkit paikoilleen. Kaikki DNA-näytteet on testattava sekä kontrollilla että kaikilla mutaatiotesteillä.

Merkitse putkien korkkeihin suunta, jota noudattaen putket ladataan Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen.

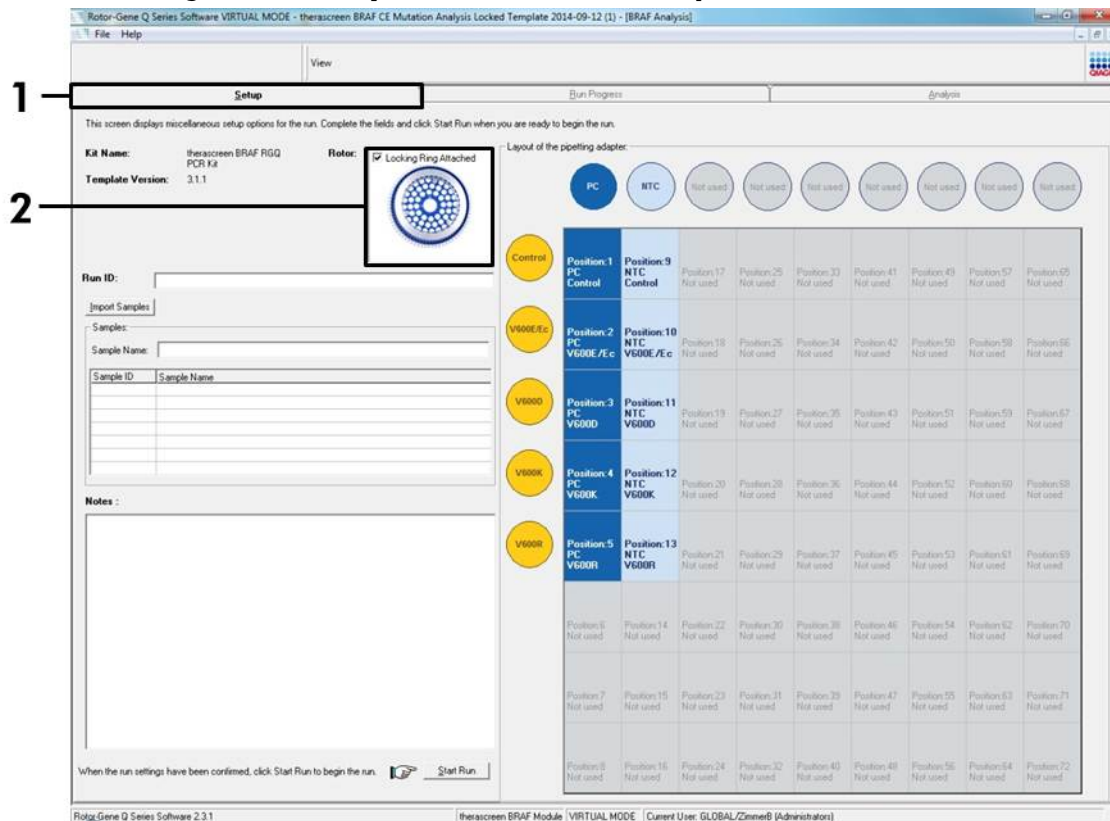
5. Kun kaikkien PCR-putkien korkit on asetettu paikoilleen, tarkista näyteputkien täyttötasot silmämääräisesti, jotta voit varmistaa, että näyte on lisätty kaikkiin putkiin.
6. Kääntele kaikkia PCR-putkia (4 kertaa), jotta näytteet ja reaktioseokset sekoittuvat.

7. **Aseta PCR-liuskaputket oikeisiin kohtiinsa 72-kuoppaiseen roottoriin (kuva 11).**  
Yhdessä PCR-ajossa voi olla mukana enintään seitsemän näytettä. Jos roottori ei ole täynnä, kaikkiin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan.
8. **Aseta välittömästi 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen. Varmista, että lukkorengas (Rotor-Gene Q -laitteen varuste) on asetettu roottorin päälle, jotta putket pysyvät paikoillaan ajon aikana.**
9. **Käynnistä Rotor-Gene Q -ohjelmisto ja avaa samalla malli kaksoisnapsauttamalla Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn kannettavan tietokoneen näytössä näkyvää "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" (therascreen BRAF CE -mutaatioanalyysin lukitus) -kuvaketta (katso kuva 12).**



Kuva 12. "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" (therascreen BRAF CE -mutaatioanalyysin lukitus) -kuvake.

10. "Setup" (Asennus) -välilehti tulee oletuksena näkyviin (kuva 13). Varmista, että lukkorengas on kunnolla paikallaan ja laita rasti "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Sulje Rotor-Gene Q -laitteen kansi.



Kuva 13. "Setup" (Asennus) -välilehti (1) ja "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutu (2).

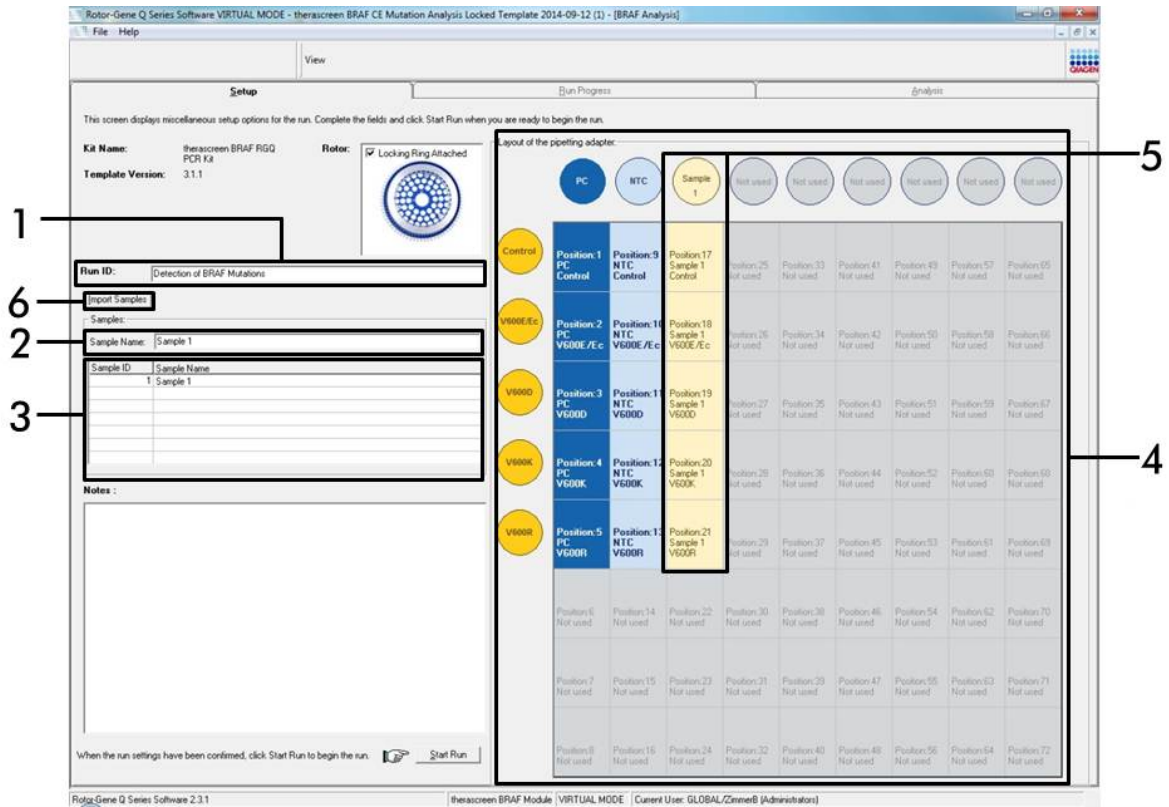
11. Anna "Run ID" (Ajon tunniste) -kenttään ajon tunniste oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Anna "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään näytteen nimi oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti. Tällöin näytteen nimi lisätään alla olevaan näyteluetteloon ja näytteelle annetaan "Sample ID" (Näytteen tunniste) -nimi (1, 2, 3 jne.). Lisäksi näytteen nimi päivitetään oikealla puolella näkyvään "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneeliin (kuva 14).

**Huomautus:** Vaihtoehtoisesti \*.smp (Rotor-Gene Q -näytetiedosto) -muodossa tai \*.csv (CSV-tiedosto) -muodossa tallennetut näytteet voidaan tuoda valitsemalla "Import Samples" (Tuo näytteet) -painike. Näytteiden nimet täytetään automaattisesti tätä menetelmää käyttäen.

**Huomautus:** Tarkista "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa, että näytteen nimi on korostettu eri värillä kuin muut nimet ja että kaikki testit näyteympyrän alapuolella on korostettu (kuva 14).

**Huomautus:** Lisättävien näytteiden enimmäismäärä on seitsemän. Näytteiden tunnistet (näyteympyröihin) annetaan automaattisesti käyttäen numeroita 1–7.

**Huomautus:** Jos näytteen nimessä on yli kahdeksan merkkiä, nimi ei mahdollisesti näy "Layout of the pipetting adapter" (Pipetointiadapterin asettelu) -paneelissa kokonaan.



**Kuva 14. "Run ID" (Ajon tunniste)- ja "Sample Name" (Näytteen nimi) -tietojen antaminen.** (1 = "Run ID" [Ajon tunniste] -kenttä, 2 = "Sample Name" [Näytteen nimi] -kenttä, 3 = Sample List [Näyteluettelo], 4 = "Layout of the pipetting adapter" [Pipetointiadapterin asettelu] -paneeli, 5 = Korostettu näyteympyrä ja 5 testin sarake paneelin alapuolella, 6 = "Sample Import" [Näytteen tuonti] -painike).

## 12. Anna muiden näytteiden nimet toistamalla vaihe 11 (kuva 15).

**Huomautus:** Voit muokata näytteen nimeä napsauttamalla näyteluettelossa kohtaa "Sample Name" (Näytteen nimi), jolloin valittu näyte tulee edellä mainittuun "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään. Muokkaa nimeä oman laitoksesi nimeämiskäytäntöjen mukaisesti ja päivitä nimi painamalla Enter.

The screenshot shows the 'Rotor-Gene Q Series Software VIRTUAL MODE - thetascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template 2014-09-12 (1) - [BRAF Analysis]' window. The 'Setup' tab is active, displaying various configuration options. The 'Samples' table is highlighted with a red box and labeled '1'. The 'Layout of the pipetting adapter' grid is also highlighted with a red box and labeled '3'. A red number '2' points to the 'Sample Name' field in the 'Samples' table.

Sample ID	Sample Name
1	Sample 1
2	Sample 2
3	Sample 3
4	Sample 4
5	Sample 5
6	Sample 6
7	Sample 7

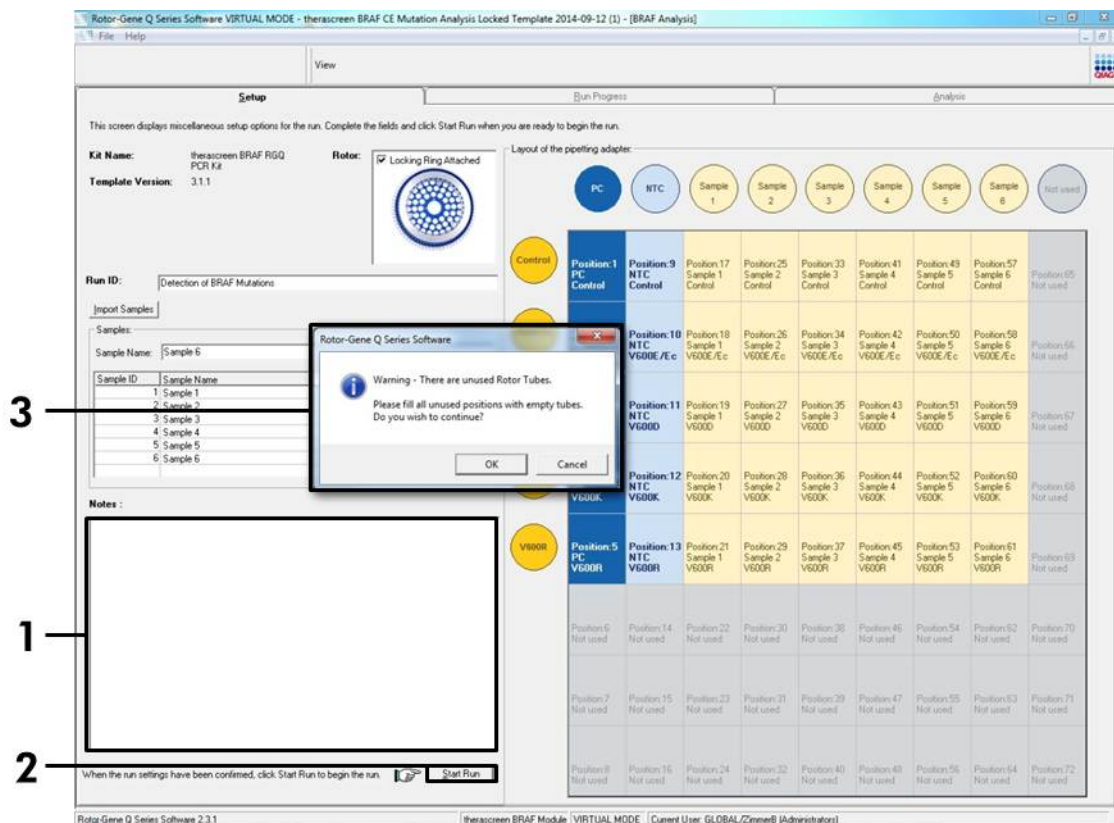
Control	Position: 1 PC V600E/Ec	Position: 9 NTC Control	Position: 17 Sample 1 V600E/Ec	Position: 25 Sample 2 V600E/Ec	Position: 33 Sample 3 V600E/Ec	Position: 41 Sample 4 V600E/Ec	Position: 49 Sample 5 V600E/Ec	Position: 57 Sample 6 V600E/Ec	Position: 65 Sample 7 V600E/Ec
V600E/Ec	Position: 2 PC V600E/Ec	Position: 10 NTC V600E/Ec	Position: 18 Sample 1 V600E/Ec	Position: 26 Sample 2 V600E/Ec	Position: 34 Sample 3 V600E/Ec	Position: 42 Sample 4 V600E/Ec	Position: 50 Sample 5 V600E/Ec	Position: 58 Sample 6 V600E/Ec	Position: 66 Sample 7 V600E/Ec
V600D	Position: 3 PC V600D	Position: 11 NTC V600D	Position: 19 Sample 1 V600D	Position: 27 Sample 2 V600D	Position: 35 Sample 3 V600D	Position: 43 Sample 4 V600D	Position: 51 Sample 5 V600D	Position: 59 Sample 6 V600D	Position: 67 Sample 7 V600D
V600K	Position: 4 PC V600K	Position: 12 NTC V600K	Position: 20 Sample 1 V600K	Position: 28 Sample 2 V600K	Position: 36 Sample 3 V600K	Position: 44 Sample 4 V600K	Position: 52 Sample 5 V600K	Position: 60 Sample 6 V600K	Position: 68 Sample 7 V600K
V600R	Position: 5 PC V600R	Position: 13 NTC V600R	Position: 21 Sample 1 V600R	Position: 29 Sample 2 V600R	Position: 37 Sample 3 V600R	Position: 45 Sample 4 V600R	Position: 53 Sample 5 V600R	Position: 61 Sample 6 V600R	Position: 69 Sample 7 V600R
	Position: 6 Not used	Position: 14 Not used	Position: 22 Not used	Position: 30 Not used	Position: 38 Not used	Position: 46 Not used	Position: 54 Not used	Position: 62 Not used	Position: 70 Not used
	Position: 7 Not used	Position: 15 Not used	Position: 23 Not used	Position: 31 Not used	Position: 39 Not used	Position: 47 Not used	Position: 55 Not used	Position: 63 Not used	Position: 71 Not used
	Position: 8 Not used	Position: 16 Not used	Position: 24 Not used	Position: 32 Not used	Position: 40 Not used	Position: 48 Not used	Position: 56 Not used	Position: 64 Not used	Position: 72 Not used

**Kuva 15. Muiden näytteiden nimien lisääminen "Sample Name" (Näytteen nimi) -kenttään. (1 = "Sample Name" [Näytteen nimi] -kenttä, 2 = Sample List [Näyteluettelo], 3 = "Layout of the pipetting adapter" [Pipetointiadapterin asettelu]).**



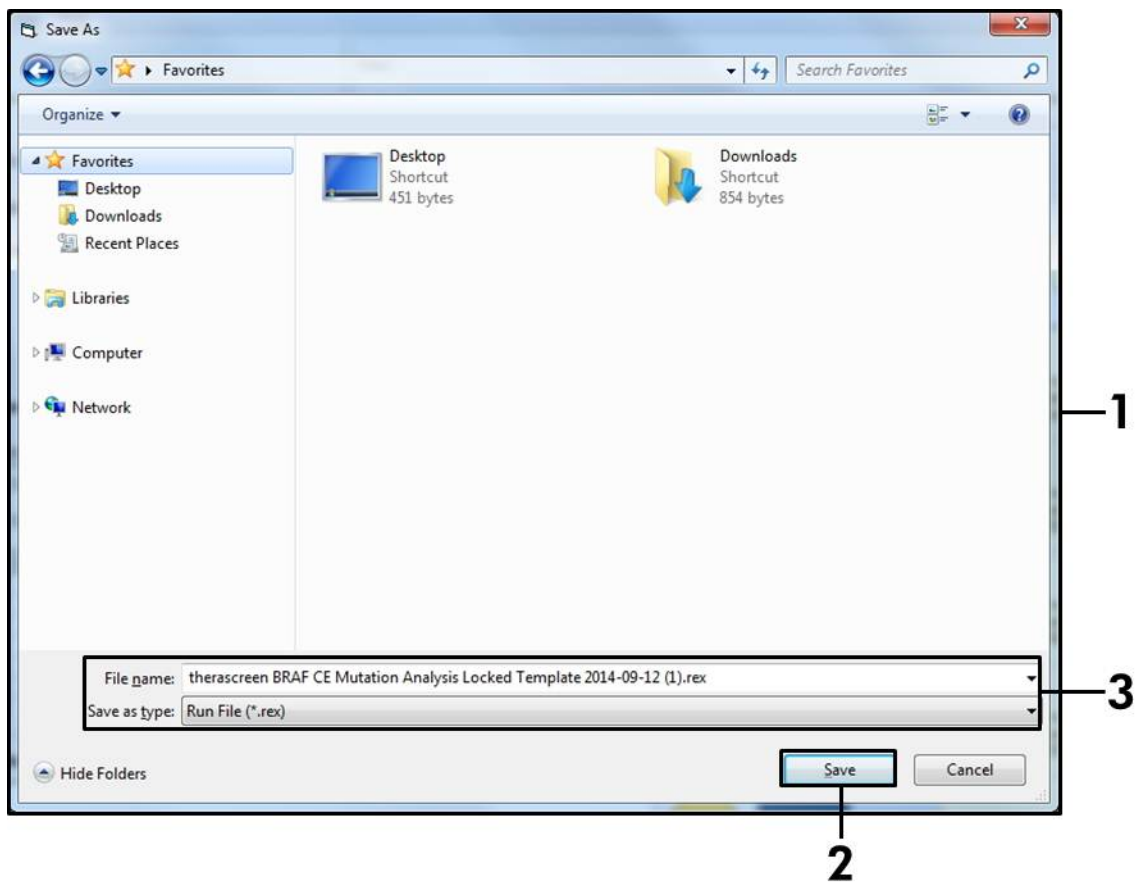
13. Kun kaikkien näyttöiden nimet on annettu, varmista, että ne ovat oikein. Lisää tarvittaessa lisätietoja "Notes" (Huomautukset) -kenttään ja napsauta "Start Run" (Käynnistä ajo) -painiketta (kuva 16).

**Huomautus:** Jos jokin roottorin paikka on tyhjä, näkyviin tulee "Warning" (Varoitus) (kuva 16), jolla käyttäjää muistutetaan siitä, että kaikki roottorin tyhjiin kohtiin on lisättävä tyhjä korkilla suljettu putki. Tarkista, että kaikissa roottorin tyhjiissä kohdissa on tyhjä putki, jonka korkki on paikallaan, ja jatka napsauttamalla "OK".



Kuva 16. "Notes" (Huomautukset) -kenttä (1), "Start Run" (Käynnistä ajo) -painike (2) ja tyhjiä roottorin paikkoja koskeva "Warning" (Varoitus) (3).

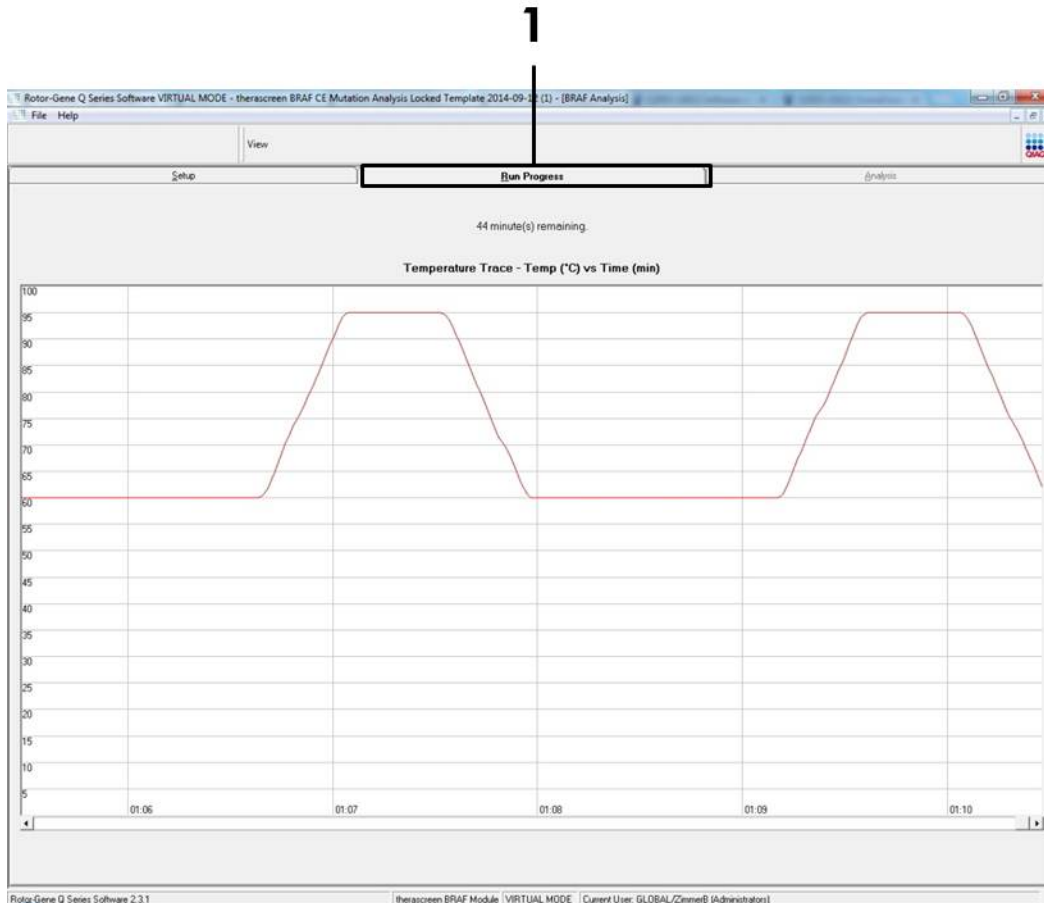
14. "Save As" (Tallenna nimellä) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse haluamasi tiedostonimi ja tallenna PCR-ajo \*.rex-tiedostona valittuun sijaintiin (kuva 17).



**Kuva 17. Ajotiedoston tallentaminen.** (1 = "Save As" [Tallenna nimellä] -ikkuna, 2 = "File Name" [Tiedostonimi]- ja "Save as type" (Tallenna tyyppinä) -kentät, 3 = "Save" [Tallenna] -painike).

## 15. PCR-ajo käynnistyy.

**Huomautus:** Kun ajo käynnistyy, "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti avautuu automaattisesti, ja siinä näkyvät lämpötilatiedot ja jäljellä oleva ajoaika (kuva 18).

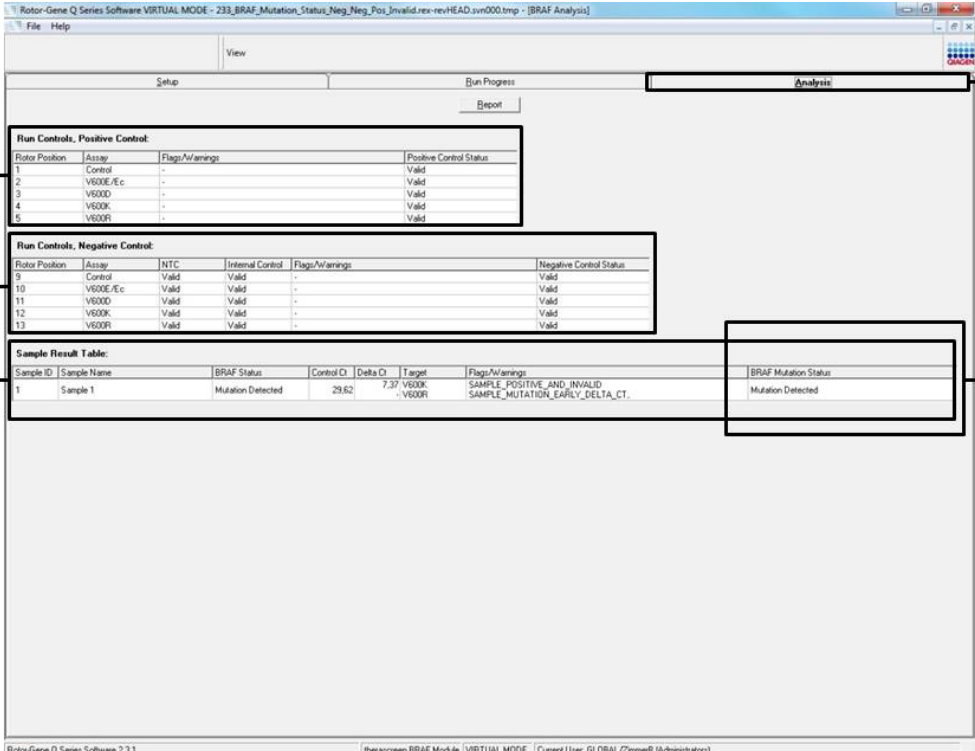


**Kuva 18.** "Run Progress" (Ajon edistyminen) -välilehti (1).

## 16. Kun ajo on suoritettu loppuun, "Analysis" (Analyysi) -välilehti avautuu automaattisesti.

**Huomautus:** Jos "Analysis" (Analyysi) -välilehti ei avaudu, napsauta "Analysis" (Analyysi) -välilehteä (kuva 19).

**Huomautus:** Laskentamenetelmä on selitetty osassa "Tulosten tulkinta" sivulla 38.



1 = Analysis

2 = Run Controls, Positive Control

Rotor Position	Assay	Flags/Warnings	Positive Control Status
1	Control	-	Valid
2	V600E/Ec	-	Valid
3	V600D	-	Valid
4	V600K	-	Valid
5	V600T	-	Valid

3 = Run Controls, Negative Control

Rotor Position	Assay	NTC	Internal Control	Flags/Warnings	Negative Control Status
10	V600E/Ec	Valid	Valid	-	Valid
11	V600D	Valid	Valid	-	Valid
12	V600K	Valid	Valid	-	Valid
13	V600T	Valid	Valid	-	Valid

4 = Sample Result Table

Sample ID	Sample Name	BRAF Status	Control Ct	Delta Ct	Target	Flags/Warnings	BRAF Mutation Status
1	Sample 1	Mutation Detected	29.62	7.37	V600K -V600T	SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID SAMPLE_MUTATION_EARLY_DELTA_CT	Mutation Detected

5 = Mutation Status

**Kuva 19. "Analysis" (Analyysi) -välilehti ja tulosten raportointi.** (1 = "Analysis" [Analyysi] -välilehti 2 = "Run Controls, Positive Control" [Ajon kontrollit, positiivinen kontrolli] -paneeli, 3 = "Run Controls, Negative Control" [Ajon kontrollit, negatiivinen kontrolli] -paneeli, 4 = "Sample Result Table" [Näytteen tulostaulukko], 5 = "Mutation Status" [Mutaatiostatus] -paneeli).

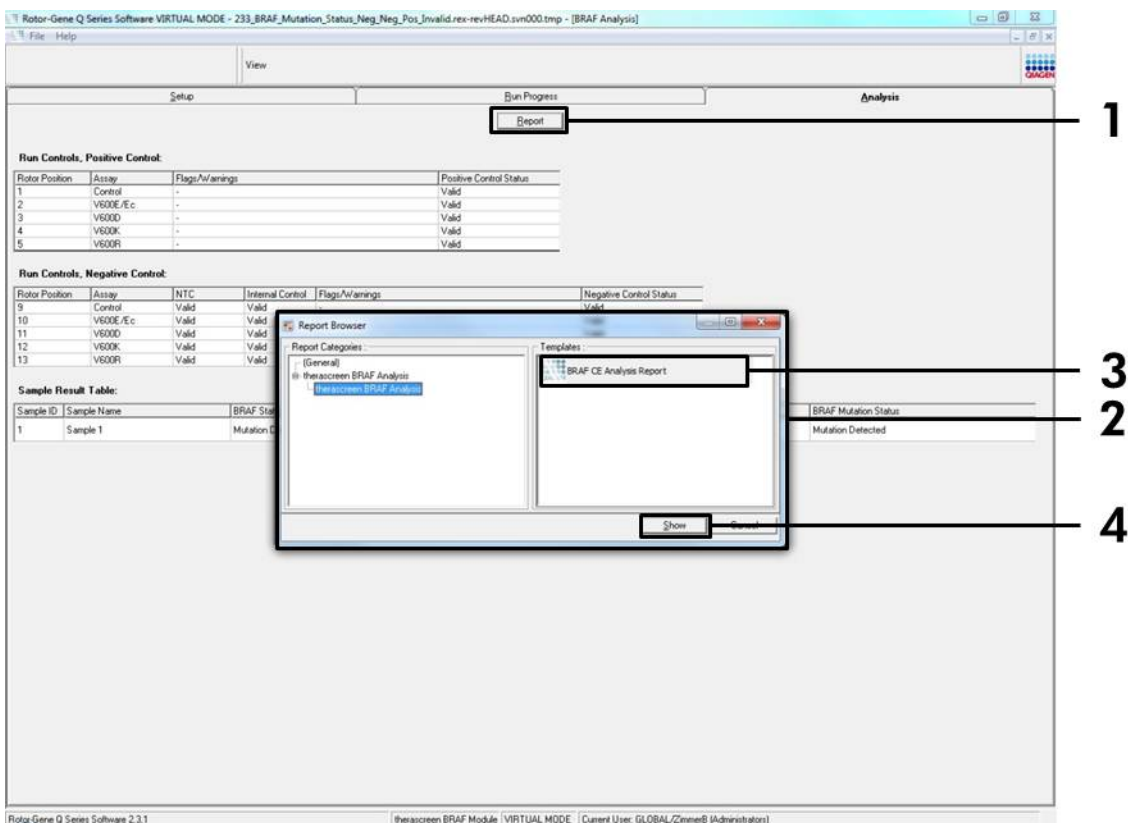
## 17. Testin tulokset raportoidaan seuraavasti (kuva 19):

- **"Run Controls, Positive Control" (Ajon kontrollit, positiivinen kontrolli) -paneeli.** Jos tulokset ovat hyväksyttävän alueen rajoissa, näytössä näkyy teksti "Valid" (Hyväksytty). Muussa tapauksessa näyttöön tulee teksti "Invalid" (Virheellinen).
- **"Run Controls, Negative Control" (Ajon kontrollit, negatiivinen kontrolli) -paneeli.** Jos sekä "NTC"- että "Internal Control" (Sisäinen kontrolli) -tulokset ovat hyväksyttävän alueen rajoissa, "Negative Control Status" (Negatiivisen kontrollin status) -kohdalla näkyy teksti "Valid" (Hyväksytty). Muussa tapauksessa näyttöön tulee teksti "Invalid" (Virheellinen).

- **“Sample Result Table” (Näytteen tulostaulukko) -paneeli.** Spesifiset mutaatiot raportoidaan mutaatioposiitivisten näytteiden taulukossa “BRAF Mutation Status” (BRAF-mutaatiostatus) -sarakkeessa.

**18. Raporttiedostot voidaan luoda napsauttamalla “Report” (Raportti) -painiketta.** “Report Browser” (Raporttiselain) -ikkuna tulee näyttöön. Valitse kohdasta “Templates” (Mallit) kohta **“BRAF CE Analysis Report” (BRAF CE -analyysiraportti)** ja napsauta sen jälkeen **“Show” (Näytä) -painiketta** (kuva 20).

**Huomautus:** Raportit voidaan tallentaa Web Archives (Verkkoarkisto) -muodossa toiseen sijaintiin napsauttamalla kunkin raportin vasemmassa yläkulmassa **“Save As” (Tallenna nimellä) -painiketta.**



**Kuva 20. “BRAF CE Analysis Report” (BRAF CE -analyysiraportti) -kohdan valitseminen.** (1 = “Report” [Raportti] -painike, 2 = “Report Browser” [Raporttiselain] -paneeli, 3 = “BRAF CE Analysis Report” [BRAF CE -analyysiraportti] -painike, 4 = “Show” [Näytä] -painike).

## Tulosten tulkinta (automaattinen)

*therascreen* BRAF -testipaketti suorittaa ajon lopuksi automaattisesti analyysin ja mutaation tunnistuksen. Alla on kuvattu, miten *therascreen* BRAF -testipaketti suorittaa analyysin ja mutaation tunnistuksen.

**Huomautus:** Katso lisätietoja manuaalisesta analyysin suorittamisesta kohdasta "Liite I: *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan manuaalin protokolla" sivulta 59.

PCR-jakso, jossa tietyn reaktion fluoresenssi ylittää raja-arvon, on määritetty  $C_T$ -arvoksi.  $C_T$ -arvot ilmaisevat spesifisen input-DNA:n määrän. Matalat  $C_T$ -arvot merkitsevät korkeampia input-DNA:n tasoja ja korkeat  $C_T$ -arvot merkitsevät matalia input-DNA:n tasoja.  $C_T$ -arvon reaktiot luokitellaan positiiviseksi monistukseksi.

Rotor-Gene Q -ohjelmisto interpoloi fluoresenssisignaalit minkä tahansa kahden tallennetun arvon välillä.  $C_T$ -arvot voivat näin ollen olla mitä tahansa reaalilukuja (ei pelkkiä kokonaislukuja) alueella 0–40.

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjassa vihreän ja keltaisen kanavan kynnysarvoiksi on asetettu 0,15 ja 0,05 suhteellista fluoresenssiyksikköä tässä järjestyksessä. Nämä arvot on konfiguroitu *therascreen* BRAF -testipakettiin automaattisesti.

Ajon kontrollit (positiivinen kontrolli, NTC ja sisäiset kontrollit) arvioidaan, jotta voidaan varmistaa, että hyväksytyt  $C_T$ -arvot on saavutettu ja että reaktiot on suoritettu oikein.

Näytteen  $\Delta C_T$ -arvot lasketaan jokaisessa mutaatiotestissä seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$\Delta C_T = [\text{mutaatiotestin } C_T\text{-arvo}] - [\text{kontrollitestin } C_T\text{-arvo}]$$

Näytteet luokitellaan mutaatioposiivisiksi, jos niiden  $\Delta C_T$ -arvo on pienempi tai yhtä suuri kuin kyseisen testin  $\Delta C_T$ -raja-arvo. Tämän arvon ylittäviltä osin näyte voi sisältää mutaation, jonka prosenttiosuus on pienempi kuin *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan tunnistama prosenttiosuus (testausrajan alapuolella) tai näyte on mutaationegatiivinen, jolloin testin tulokseksi raportoidaan "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu).

Jos mutaatioreaktioissa ei ilmene monistuksia, tuloksena on "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu).  $\Delta C_T$ -arvojen, jotka on laskettu taustan monistuksesta, oletetaan olevan suurempia kuin  $\Delta C_T$ -raja-arvojen ja näytteen tulokseksi raportoidaan "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu).

Testitulokset ovat seuraavat: "Mutation Detected" (Mutaatio havaittu), "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu), "Invalid" (Virheellinen) tai, jos ajon kontrolli epäonnistuu, "Run Control Failed" (Ajon kontrolli epäonnistui).

Mutaatioposiitivisten näytteiden kohdalla spesifiset mutaatiot raportoidaan ristireaktiivisuuslogiikan mukaisesti, katso "Taulukko 8. Näytteen mutaatiostatuksen tunnistaminen" sivulla 53. Muut mahdollisesti näytettävät tulokset on esitetty tämän käsikirjan kohdassa "Protokolla: Näytteen arviointi" sivulla 15, kohdassa "Protokolla: BRAF-mutaation tunnistaminen" sivulla 26 ja kohdassa "*therascreen* BRAF -testipakkauksen merkinnät" sivulla 40.

Kasvain saattaa harvoin sisältää useamman kuin yhden mutaation. Tällaisissa tapauksissa raportissa näkyy BRAF-statuksena "Mutation Detected" (Mutaatio havaittu). Kaikki positiiviset mutaatiot kuitenkin luetellaan varoitusmerkin yhteydessä "SAMPLE\_POSITIVE\_AND\_UNCLASSIFIABLE" (Näyte positiivinen, ei luokiteltavissa).

## Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisuopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevilla ongelmilla. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustoltamme usein kysytyjen kysymysten osiosta: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja testeihin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän käsikirjan takakannesta tai osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Kommentteja ja ehdotuksia

---

#### Virheelliset tulokset

- |                                                                                                                                             |                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Yhtä tai useampaa komponenttia ei ole säilytetty kohdassa "Reagenssien säilytys ja käsittely", sivu 12, esitettyjen ohjeiden mukaisesti. | Tarkista säilytysolosuhteet ja pakkauksen viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja käytä tarvittaessa uutta sarjaa.                                  |
| b) <i>therascreen</i> BRAF CE RGQ PCR -sarja on vanhentunut.                                                                                | Tarkista säilytysolosuhteet ja pakkauksen viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja käytä tarvittaessa uutta <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR -sarjaa. |

## **therascreen BRAF -testipakkauksen merkinnät**

Taulukossa 4 on esitetty *therascreen* BRAF -testipakkauksessa mahdollisesti käytetyt merkinnät, niiden merkitys ja suoritettavat toimenpiteet.

**Taulukko 4. *therascreen* BRAF -testipakkauksen merkinnät**

<b>Merkintä</b>	<b>Merkitys</b>	<b>Suoritettava toimenpide</b>
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-ajo virheellinen – FAM C <sub>T</sub> -arvo kontrollireaktion positiivisen kontrollin sallitun alueen ulkopuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR-ajo virheellinen – positiivisen kontrollin (kontrollireaktio) fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR-ajo virheellinen – FAM C <sub>T</sub> -arvo sallitun alueen ulkopuolella yhdessä tai useammassa mutaatioreaktiossa.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR-ajo virheellinen – positiivisen kontrollin (mutaatioreaktio) fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INVALID_DATA	PCR-ajo virheellinen – negatiivisen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_ASSAY_CT_INVALID	PCR-ajo virheellinen – negatiivisen kontrollin FAM virheellinen (rajan alapuolella).	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla



## Taulukko 4 jatkuu

<b>Merkintä</b>	<b>Merkitys</b>	<b>Suoritettava toimenpide</b>
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR-ajo virheellinen – negatiivisen kontrollin sisäinen kontrolli rajan yläpuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR-ajo virheellinen – negatiivisen kontrollin sisäinen kontrolli rajan alapuolella.	Suorita koko PCR-ajo uudelleen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Näyte virheellinen – näytteen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	Suorita uusi PCR-ajo tarvittavien näytteiden osalta uudelleen.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Näyte virheellinen – näytteen kontrollin FAM C <sub>T</sub> liian alhainen.	Laimenna näytettä, jotta kontrollin C <sub>T</sub> -arvo suurenee. Laimennussuhde on laskettava siten, että oletuksena on, että kun näytettä laimennetaan sarjan mukana toimitetulla vedellä suhteessa 1:1, arvo nousee C <sub>T</sub> 1.0:llä. Kun näyte on laimennettu, suorita näytteelle uusi PCR-ajo.
SAMPLE_CTRL_LOW_CONC	Näyte hyväksytty – näytteen kontrollissa matala konsentraatio (varoitusta, ei virhettä).	Ei toimenpiteitä.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

## Taulukko 4 jatkuu

<b>Merkintä</b>	<b>Merkitys</b>	<b>Suoritettava toimenpide</b>
SAMPLE_CTRL_FAIL	Näyte virheellinen – näytteen kontrollin FAM C <sub>T</sub> liian korkea.	Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on virheellinen, uuta näyte uusista FFPE-näytteistä. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos tulos on virheellinen, toista toinen näytteenotto uudelleen. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.
SAMPLE_CTRL_INT_CTRL_EARLY_CT	Näyte virheellinen – näytteen (sisäinen kontrolli) HEX C <sub>T</sub> on liian alhainen.	Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on virheellinen, uuta näyte uusista FFPE-näytteistä. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos tulos on virheellinen, toista toinen näytteenotto uudelleen. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

## Taulukko 4 jatkuu

<b>Merkintä</b>	<b>Merkitys</b>	<b>Suoritettava toimenpide</b>
SAMPLE_CTRL_ INT_CTRL_FAIL	Sisäisen kontrollin (HEX) C <sub>T</sub> liian korkea (tai C <sub>T</sub> puuttuu) ja kontrollitestin (FAM) C <sub>T</sub> liian korkea (tai C <sub>T</sub> puuttuu).	Suorita näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on virheellinen, uuta näyte uusista FFPE-näytteistä. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos tulos on virheellinen, toista toinen näytteenotto uudelleen. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

## Taulukko 4 jatkuu

Merkintä	Merkitys	Suoritettava toimenpide
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	Sisäisen kontrollin (HEX) C <sub>T</sub> liian korkea (tai C <sub>T</sub> puuttuu) ja mutaatiotestin (FAM) C <sub>T</sub> puuttuu.	<p>Jos näytteelle annetaan "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tila – toimenpiteitä ei vaadita.</p> <p>Jos näytteelle annetaan "Invalid" (Virheellinen) -tila, tee näytteelle uusi PCR-ajo.</p> <p><b>Huomautus:</b> Jos sisäisen kontrollin virhe johtuu PCR-inhibitiosta, näytteen laimentaminen saattaa vähentää inhibiittorien vaikutusta. Tässä tapauksessa on kuitenkin huomattava, että tällöin myös kohde-DNA laimenee. Sarjaan sisältyy vesiputki näytteen laimentamista varten (Dil.).</p> <p>Jos myös uuden PCR-ajon tulos on virheellinen, uuta näyte uusista FFPE-näytteistä. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos tulos on virheellinen, toista toinen näytteenotto uudelleen. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.</p>

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

## Taulukko 4 jatkuu

<b>Merkintä</b>	<b>Merkitys</b>	<b>Suoritettava toimenpide</b>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutaatioputki virheellinen – näytteen (sisäinen kontrolli) C <sub>T</sub> HEX on liian alhainen.	<p>Jos näytteelle annetaan hyväksytty "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tila – toimenpiteitä ei vaadita.</p> <p>Jos näytteelle annetaan "Invalid" (Virheellinen) -tila, tee näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on virheellinen, uuta näyte uusista FFPE-näytteistä. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos tulos on virheellinen, toista toinen näytteenotto uudelleen. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.</p>

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

## Taulukko 4 jatkuu

<b>Merkintä</b>	<b>Merkitys</b>	<b>Suoritettava toimenpide</b>
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutaatioputki virheellinen – sisäisen kontrollin fluoresenssitietoja ei voida tulkita.	<p>Jos näytteelle annetaan hyväksytty "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tila – toimenpiteitä ei vaadita.</p> <p>Jos näytteelle annetaan "Invalid" (Virheellinen) -tila, tee näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on virheellinen, uuta näyte uusista FFPE-näytteistä. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos tulos on virheellinen, toista toinen näytteenotto uudelleen. Jos näytteen tulos ei ole hyväksytty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.</p>

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

## Taulukko 4 jatkuu

<b>Merkintä</b>	<b>Merkitys</b>	<b>Suoritettava toimenpide</b>
SAMPLE_ MUTATION_ EARLY_DELTA_CT	Mutaatioputki virheellinen – näytteen C <sub>T</sub> FAM liian alhainen.	Jos näytteelle annetaan hyväksyty ”Mutation detected” (Mutaatio havaittu) -tila – toimenpiteitä ei vaadita.  Jos näytteelle annetaan ”Invalid” (Virheellinen) -tila, tee näytteelle uusi PCR-ajo. Jos myös uuden PCR-ajon tulos on virheellinen, uuta näyte uusista FFPE- näytteistä. Suorita uudelle näytteelle uusi PCR-ajo. Jos tulos on virheellinen, toista toinen näytteenotto uudelleen. Jos näytteen tulos ei ole hyväksyty vielä tämänkään ajon jälkeen, näytteelle määritetään määrittämätön mutaatiostatus, eikä sille tule suorittaa enää lisätestejä.

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

## Taulukko 4 jatkuu

Merkintä	Merkitys	Suoritettava toimenpide
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	<p>Tulos hyväksytty – yksi tai useampi näytteen mutaatioputkista on hyväksytty ja positiivinen ja yksi tai useampi saman näytteen mutaatioputkista on virheellinen (varoitusta, ei virhe).</p> <p>Näytteelle annetaan "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tila, koska näytteessä on todettu mutaatio. Raportissa mainittu mutaatio ei kuitenkaan välttämättä edusta todellista näytteessä olevaa mutaatiota testien ristireagoinnista johtuen. Näin ollen näytteen tilaksi on määritettävä "Mutation detected" (Mutaatio havaittu).</p>	Ei toimenpiteitä.
SAMPLE_POSITIVE_AND_UNCLASSIFIABLE	<p>Tulos hyväksytty – saman näytteen yksi tai useampi mutaatioputki on hyväksytty. Tämä yhdistelmä ei ole yhteensopiva odotettujen ristireaktioiden kanssa. Katso taulukko 8. Kasvain saattaa harvoin sisältää useamman kuin yhden mutaation.</p>	Ei toimenpiteitä.



## Laadunvarmistus

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

## Rajoitukset

Tuotteella saatujen tulosten tulkinnassa on otettava huomioon kaikki asianmukaiset kliinisten löydökset ja laboratoriolöydökset, eikä diagnoosia saa tehdä yksin testitulosten pohjalta.

Varmistustutkimuksia suoritettiin käyttäen formaliini-fiksoidusta parafiiniin valetuista (FFPE) kudospäätteistä uutettua ihmisen DNA:ta sekä synteettisiä standardiliuoksia erillisten tutkimusten vaatimusten mukaisesti.

Tuote on verifioitu QIAGENin QIAamp DNA FFPE Tissue -sarjaa käyttäen.

Tuote on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan Rotor-Gene Q MDx -laitteiden kanssa.

Optimaalisten tulosten saavuttaminen edellyttää kaikkien *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan käsikirjassa annettujen ohjeiden huolellista noudattamista.

Reagenssien muu laimentaminen kuin mitä tässä käsikirjassa on määritetty, ei ole suositeltavaa, ja se johtaa suorituskyvyn heikkenemiseen.

On tärkeää, että näytteen sisältämän DNA:n määrä ja laatu arvioidaan ennen näytteen analysointia *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjaa käyttäen. Testiin vaadittava hyväksyttävä C<sub>T</sub>-arvo voidaan määrittää sarjan mukana toimitettavaa ylimääräistä kontrolliseosta käyttäen. Absorbanssilukemien käyttö ei ole hyväksyttävää, sillä ne eivät korreloi DNA:n C<sub>T</sub>-arvojen kanssa.

Kaikki kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

## Suoritusarvot

### LOB (Limit of blank), toiminta-alue ja raja-arvot

Yhteensä 143 FFPE-näytettä testattiin tutkimuksessa NCCLS EP17-A -ohjeiden (2004) mukaisesti LOB-arvojen ja raja-arvojen määrittämiseksi kussakin mutaatiotestissä. Lisäksi määritettiin kontrollitestin toiminta-alue. Luodut raja-arvot on esitetty taulukossa 5.

**Taulukko 5. Mutaatiotesteille luodut raja-arvot**

	Mutaatioanalyysi ( $\Delta C_T$ )			
	V600E/Ec	V600D	V600K	V600R
Raja-arvo ( $\Delta C_T$ )	$\leq 7,0$	$\leq 6,9$	$\leq 6,0$	$\leq 7,0$

Kontrollireaktion  $C_T$ -alueeksi määritettiin 21,95–32,00  $C_T$ .

Testin raja-arvot ja toiminta-alue varmistettiin standardiliuosten avulla sekä lisäksi (uniikilla) 102 FFPE-näytteellä. Varmistuksen aikana raja-arvoista arvioitiin niiden kyky erottaa oikea mutaatio villityypin DNA:ssa arvioimalla jokainen testi suurella genomisella input-DNA:lla ja suurella mutaatiomäärällä (katso ”

Ristireagoivuus”, sivu 53). Myös input-DNA:n vaikutus mutaation tunnistukseen arvioitiin (katso ”Input-DNA:N vaikutus  $\Delta C_T$ -arvoihin”, sivu 51).

## Tarkkuus: Vertailu analyttiseen vertailumenetelmään

Tutkimuksessa ilmeni *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan korrelaatio mutaatiostatuksen suhteen kaksisuuntaisen Sanger-sekvensoinnin kanssa. Tässä tutkimuksessa testattiin 126 FFPE-näytettä tilastollisia yhtäpitävyyden menetelmiä käyttäen, CLSI EP12-A2 Guidance (2008). 102 FFPE-näytettä antoi hyväksyttävän tuloksen sekä *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjaa että kaksisuuntaista Sanger-sekvensointia käytettäessä. Pyrosequencing®-menetelmää käytettiin mutaatiostatuksen vahvistamisessa tilanteissa, joissa näytteen mutaatiostatuksen tunnistus ei ollut yhdenmukainen kaksisuuntaisen Sanger-sekvensoinnin ja *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan välillä.

Taulukossa 6 on esitetty *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan ja sekvensoinnin yhtäpitävyyden arviointi.

### Taulukko 6. Yhtäpitävyyden arviointi

	Yhtäpitävyyden arvio	Tiheys (%)
Tulos	Yleinen yhtäpitävyys	96,08
	Positiivinen yhtäpitävyys	100,00
	Negatiivinen yhtäpitävyys	95,29

Negatiivisen yhtäpitävyyden esiintyvyys on johtuen mutaation havaitsemisesta neljässä näytteessä, jotka olivat villityypin sekvensointeja, ja *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjalla saadun tuloksen mukaan V600E/Ec-mutaatiopositivisia. Tämä johtuu Scorpions- ja ARMS-tekniikoiden paremmasta herkkyydestä.

### Input-DNA:N vaikutus $\Delta C_T$ -arvoihin

Kaikkien input-DNA:n tasojen vaikutusta mutaatiostatuksen määrittämiseen *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjaa käyttäen arvioitiin osana Verification of Assay Cut Offs and Working Range -tutkimusta. Tämän arvioinnin tarkoituksena oli varmistaa, että *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan luomat mutaatioiden tunnistukset ovat yhdenmukaisia erilaisilla input-DNA:n tasoilla koko työskentelyalueella.

Mutaatioliuokset, joiden mutaatiosisältö oli korkea, keskitaso tai matala (100 %, 50 % ja 3 x LOD %, tässä järjestyksessä) villityypin DNA:ssa valmistettiin siten, että niiden input-DNA:n taso oli korkea, keskitaso tai matala. Näin ollen kustakin mutaatiotestistä testattiin yhteensä 9 mutaatiostandardiliuosta. Kaikkien testien tulokset on esitetty taulukossa 7.

Arvioidut erot keskimääräisessä  $\Delta C_T$ -arvossa kunkin input-DNA:n tason välillä lineaarisen regressioanalyysin mukaisesti ovat kaikki  $\pm 1 C_T$ . Kaikkia neljää mutaatiotestiä pidettiin näin ollen vastaavina korkean, keskitason tai matalan input-DNA:n tasolla.

**Taulukko 7. Arvioidut erot input-DNA:n tasojen välillä**

Testi	Parametri (input-DNA:n taso)	Arvioitu ero ( $\Delta C_T$ )	95 %:n luottamusväli (matalampi, korkeampi)
V600E (E)	Korkea – keskitaso	0,56	0,22; 0,90
V600E (E)	Matala – keskitaso	0,01	- 0,33; 0,35
V600E (Ec)	Korkea – keskitaso	0,48	0,12; 0,84
V600E (Ec)	Matala – keskitaso	0,26	- 0,10; 0,62
V600D	Korkea – keskitaso	- 0,32	- 0,58; - 0,06
V600D	Matala – keskitaso	- 0,43	- 0,69; - 0,17
V600K	Korkea – keskitaso	0,10	- 0,10; 0,30
V600K	Matala – keskitaso	- 0,33	- 0,53; - 0,13
V600R	Korkea – keskitaso	- 0,12	- 0,28; 0,04
V600R	Matala – keskitaso	- 0,62	- 0,78; - 0,46

## Ristireagoivuus

Suuren mutaatisiällön pitoisuudeltaan runsaat input-DNA-liuokset (100%) testattiin kunkin testin mahdollisen ristireagoivuuden testaamiseksi.

Ristireagoivuustulokset mahdollistivat mutaatiostatuslogiikan laadinnan, joka on esitetty taulukossa 8. BRAF CE -testipaketissa käytetään ristireagoivuuslogiikkaa, jonka avulla määritetään mutaatiostatus.

**Taulukko 8. Näytteen mutaatiostatuksen tunnistaminen**

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutaatiostatus
Positiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen	V600E- tai V600Ec-positiivinen
Positiivinen	Negatiivinen	Positiivinen	Negatiivinen	V600Ec- tai V600K-positiivinen
Positiivinen	Positiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen	V600D-positiivinen
Negatiivinen	Positiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen	V600D-positiivinen
Negatiivinen	Negatiivinen	Positiivinen	Negatiivinen	V600K-positiivinen
Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen	Positiivinen	V600R-positiivinen

## Havaitsemisraja (LOD) -arvot

Tutkimus suoritettiin havaitsemisrajan määrittämiseksi jokaisessa neljässä *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjaan sisältyvässä mutaatiopesifisessä reaktiossa. Tässä tutkimuksessa havaitsemisraja määritettiin alhaisimmaksi määräksi mutaatio-DNA:ta villityypin DNA:ssa, jolla mutaationäyte antaa 95 prosentissa testituloksista mutaatiopositiivisen tuloksen ( $C_{95}$ ).

Havaitsemisrajan määrittämiseksi kustakin testistä valmistettiin mutaatiostandardeja, joiden mutaatiosisältö oli erilainen ja joiden input-DNA oli keskitasoa. Standardit testattiin *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjalla. Kunkin testin havaitsemisraja laskettiin logistisella regressiolla. Kunkin testin havaitsemisrajan määrittämiseksi valmistettiin mutaatiostandardit määritetyn havaitsemisrajan mukaisesti. 60 replikaattia testattiin ja positiivisten testin osuus varmistettiin.

Varmistettu havaitsemisraja keskitason input-DNA-konsentraatiossa on esitetty taulukossa 9. Suuremmissa input-DNA-konsentraatioissa odotettujen havaitsemisrajan arvojen odotetaan olevan alhaisempia kuin taulukossa 9 esitetyt arvot.

**Taulukko 9. Kunkin mutaatiotestin havaitsemisrajan arvot (keskitason input)**

Testi (mutaatio)*	Havaitsemisraja $C_{95}$ keskitason input-DNA:ssa (mutaatio-DNA:n prosenttiosuus villityypin DNA:ssa)
V600E (E)	1,82 %
V600E (Ec)	4,31 %
V600D	3,19%
V600K	4,34 %
V600R	4,85 %

\* V600E-testin havaitsemisrajat laskettiin sekä V600E- että V600Ec-mutaatioille.

## Melaniinin vaikutus sarjan suorituskykyyn

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli arvioida melaniinin, melanoomanäytteissä havaitun tunnetun PCR-inhibiittorin, vaikutusta *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan suorituskykyyn. Arviointi suoritettiin annostelemalla melaniinia suoraan DNA-näytteisiin ennen näytteiden testaamista *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjalla erilaisilla konsentraatioilla (0–250 ng/reaktio) ja arvioimalla vaikutusta testinäytteiden  $\Delta C_T$ -arvoihin ja mutaatiostatukseen.

Tulokset osoittivat, että matalalla melaniinikonsentraatiolla ei ollut vaikutusta  $\Delta C_T$ -arvoon ja minimaalinen vaikutus  $\Delta C_T$ -arvoon melaniinikonsentraation keskitasolla. Näin ollen matalilla ja keskitason melaniinitasoilla ei ollut vaikutusta testien kykyyn havaita mutaatioita. Tasolla 180 ng/reaktio sisäinen kontrolli epäonnistui ja osoitti inhibiittorin läsnäolon ja mahdollisesti siten inhibiittorien tunnistuksen ennen vaikutusta mutaation tunnistamiseen.

Tavanomaisessa käytössä ilmeneväksi odotetut melaniinikonsentraatiot eivät vaikuta *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan kykyyn erottaa mutaatioposiitiviset ja mutaationegatiiviset näytteet toisistaan.

Tulosten yhteenveto on esitetty taulukossa 10.

**Taulukko 10. Kussakin testissä testatun melaniinin määrä**

Melaniinikonsentraatio (ng/reaktio)	Muutos $\Delta C_T$ -arvossa	Sisäisen kontrollin status (hyväksytty/hylätty)
0	0	Hyväksytty
60	- 0,20	Hyväksytty
100	- 0,61	Hyväksytty
150	- 1,21	Hyväksytty
180	- 2,15	Hylätty

## Toistettavuus

Matriisitutkimus toteutettiin eri testajaa, päiviä, levyasettelua ja laitetta käyttäen, jotta voitiin määrittää testin tarkkuus sekä ajon aikana että ajojen välillä.

Toistettavuus osoitettiin matalalla input-DNA-tasolla 3 x LOD mutaatiotesteissä.

Lisäksi kustakin testistä arvioitiin mutaatiopositivisten tunnistusten prosentuaalinen osuus testattaessa niitä spesifisellä mutaatiostandardiliuoksella. Kukin mutaatiotesti antoi 100 % positiivisia mutaatioiden tunnistuksia.

Tarkkuusarvot on esitetty taulukossa 11.

## Uusittavuus

Matriisitutkimus toteutettiin tarkoituksena arvioida testin uusittavuutta testaamalla standardeja kolmessa laboratoriossa (tutkimuspaikassa) käyttäen kolmea *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan erää (kaksi erää kussakin paikassa) käyttäen kahta testajaa/tutkimuspaikka ja kahta instrumenttia/tutkimuspaikka, neljän peräkkäisen päivän aikana. Uusittavuus osoitettiin mutaatiotestien alhaisella mutaatiotasolla (3 x LOD) ja kontrollitestin villityypin matalalla inputilla. Kunkin testin tarkkuus laskettiin kolmessa tutkimuspaikassa 95 prosentin tarkkuusarvioita käyttäen (taulukko 12).

**Taulukko 11. Toistettavuuden tarkkuusarviot**

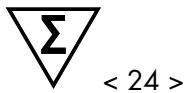
Testi	Tarkkuus (ajojen välillä)	95 %:n luottamusväli (matalampi, korkeampi)	Tarkkuus (ajon aikana)	95 %:n luottamusväli (matalampi, korkeampi)
Kontrolli	0,30	0,25; 0,39	0,16	0,13; 0,20
V600E (E)	0,74	0,61; 0,94	0,57	0,46; 0,74
V600E (Ec)	0,79	0,64; 1,01	0,76	0,62; 0,99
V600D	0,47	0,38; 0,60	0,46	0,38; 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



**Taulukko 12. Uusittavuuden tarkkuusarviot**

<b>Testi</b>	<b>Tarkkuus</b>	<b>95 %:n luottamusväli (matalampi, korkeampi)</b>
Kontrolli	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

## Symbolit



Sisältää reagensseja, jotka riittävät < 24 > reaktioon



Viimeinen käyttöpäivä



Diagnostinen in vitro -lääkintälaite



Luettelonumero



Eränumero



Materialinumero



Komponentit



Sisältö



Numero



GTIN-numero



Lämpötilarajoitus



Valmistaja



Katso käyttöohjeet



Säilytettävä auringonvalolta suojattuna



Huomio

## **Liite I: *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan manuaalin protokolla**

Tässä osassa annetaan ohjeet *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan ja RGQ-ohjelmistoversion 2.3 käyttöön avoimessa tilassa (eli ilman BRAF-testipakettia).

### **Yleistä**

- Katso tarvittavien materiaalien luettelo sivulta 9.
- Katso yksityiskohtaiset ohjeet näytteen valmistelusta ja asettelusta osasta "Protokolla: Näytteen arviointi" sivulta 15 ja osasta "Protokolla: BRAF-mutaation tunnistaminen" sivulta 26.

## Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen

Luo ennen aloittamista lämpötilaprofiili BRAF-analyysia varten. Jakson parametrit ovat samat sekä näytteen että mutaation arvioinnissa.

### Toimenpide

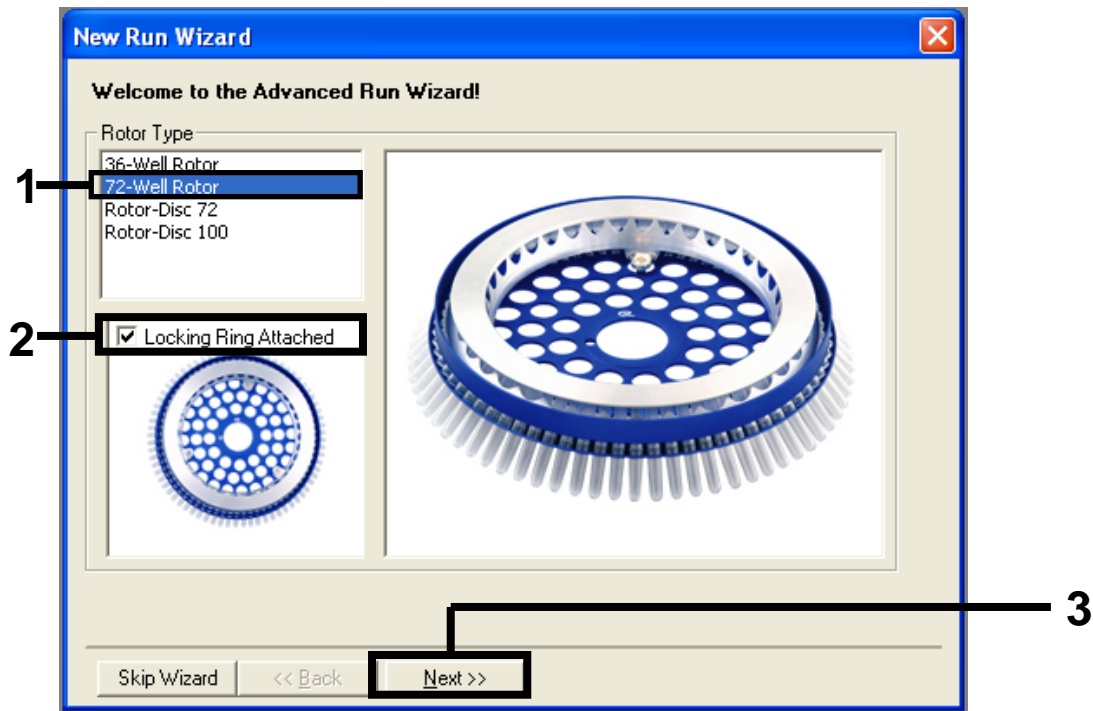
Jakson parametrit ovat lyhyesti kuvattuna seuraavat:

**Taulukko 13. Jakson parametrit**

Jaksot	Lämpötila	Aika	Tiedonkeruu
1	95 °C	15 minuuttia	Ei mitään
40	95 °C	30 sekuntia	Ei mitään
	60 °C	60 sekuntia	Vihreä ja keltainen

1. Kaksoisnapsauta Rotor-Gene Q Series Software 2.3 -ohjelmistokuvaketta Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen liitetyn kannettavan tietokoneen työpöydällä.
2. Luo uusi malli valitsemalla "Empty Run" (Tyhjä ajo), napsauta "New" (Uusi) ja käynnistä "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo).

3. Valitse roottorityypiksi "72-Well Rotor" (72-kuoppainen roottori). Varmista, että lukkorengas on paikallaan ja laita rasti "Locking Ring Attached" (Lukkorengas kiinnitetty) -valintaruutuun. Napsauta "Next" (Seuraava) (kuva 21).



**Kuva 21.** "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu. (1 = "Rotor type" [Roottorityyppi], 2 = "Locking Ring Attached" [Lukkorengas kiinnitetty] -valintaruutu, 3 = "Next" (Seuraava) -painike).

4. Anna testaajan nimi. Lisää mahdolliset huomautukset ja anna reaktiomääräksi 25. Varmista, että "Sample Layout" (Näytteen asettelu) -kohdassa lukee "1, 2, 3...". Napsauta "Next" (Seuraava) (kuva 22).

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

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

Operator : NAME

Notes :

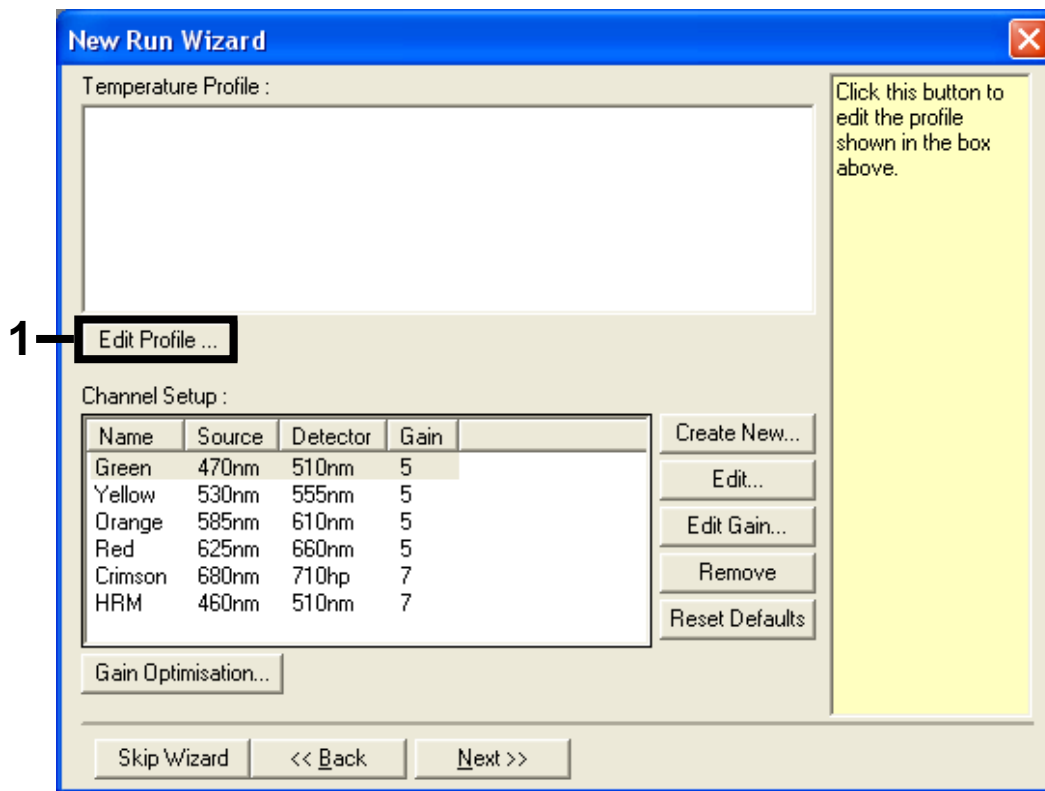
Reaction Volume (ul) : 25

Sample Layout : 1, 2, 3...

Skip Wizard << Back Next >>

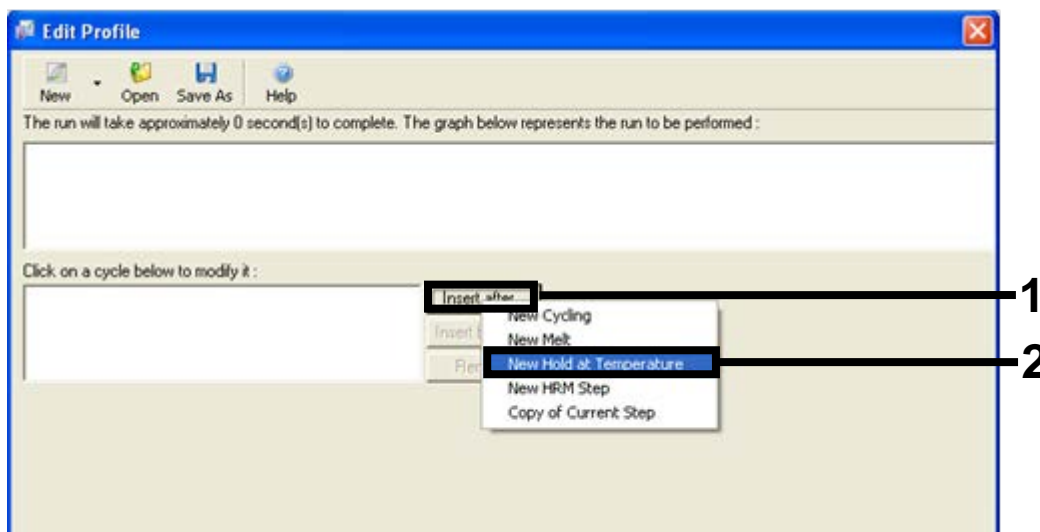
**Kuva 22. Testaajan nimen ja reaktiomäärän antaminen.** (1 = "Operator" [Testaaja] -kenttä, 2 = "Notes" [Huomautukset] -kenttä, 3 = "Reaction Volume" [Reaktiomäärä] -kenttä, 4 = "Sample Layout" [Näytteen asettelu] -kenttä, 5 = "Next" [Seuraava] -painike).

5. Napsauta "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -ikkunassa "Edit Profile" (Muokkaa profiilia) -painiketta (kuva 23) ja tarkista ajon parametrit alla esitettyjen vaiheiden mukaisesti.



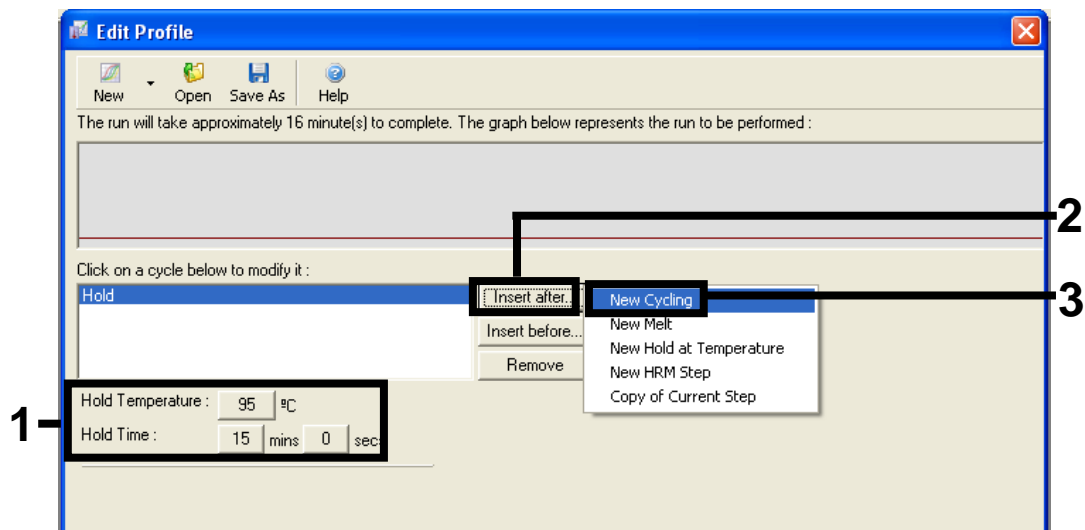
Kuva 23. Profiilin muokkaaminen (1).

6. Napsauta "Insert after" (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta "New Hold at Temperature" (Uusi pito lämpötilassa) (kuva 24).



Kuva 24. Alun inkubointivaiheen määrittäminen. (1 = "Insert after" [Syötä seuraavan jälkeen] -painike, 2 = "New Hold at Temperature" [Uusi pito lämpötilassa]).

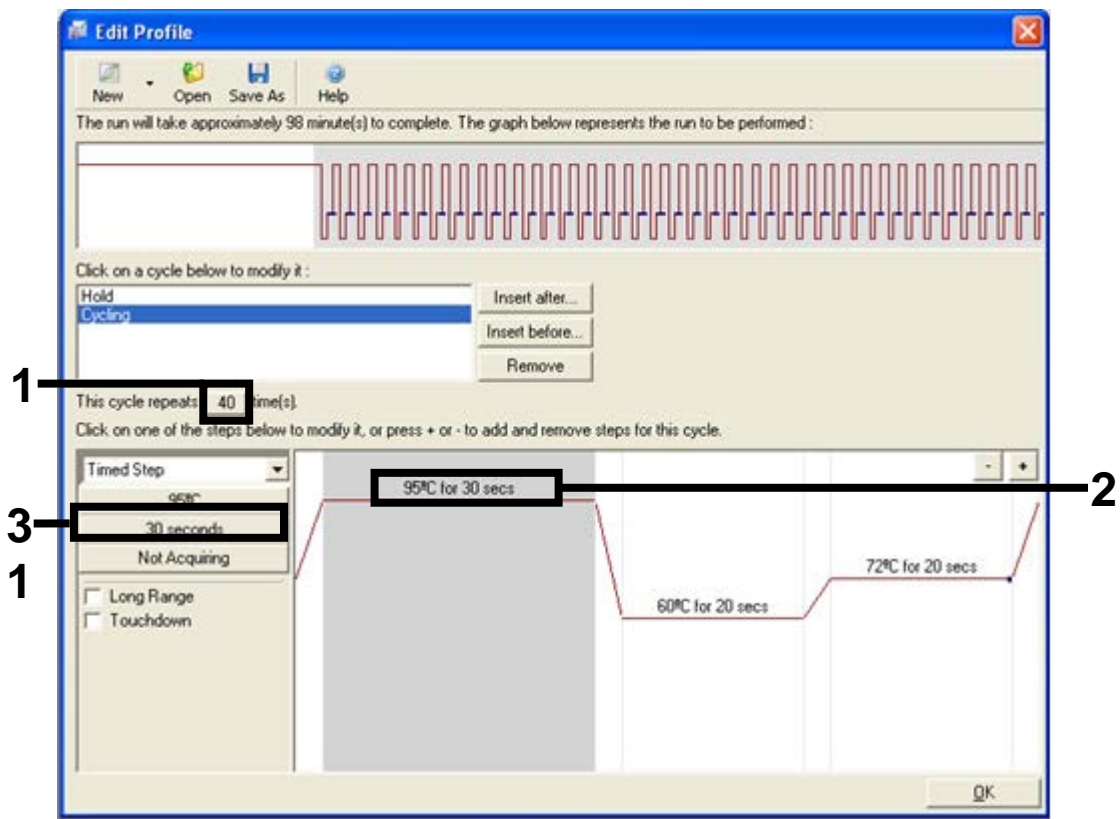
7. Muuta "Hold Temperature" (Pitolämpötila) -asetukseksi 95 °C ja "Hold Time" (Pitoaika) -asetukseksi 15 min 0 s. Napsauta "Insert after" (Syötä seuraavan jälkeen) -painiketta ja valitse kohta "New Cycling" (Uusi jakso) (kuva 25).



**Kuva 25.** Alun inkubointivaiheen lämpötila 95 °C. (1 = "Hold Temperature" [Pitolämpötila] -painike, "Hold Time" [Pitoaika] -painike, 2 = "Insert after" [Syötä seuraavan jälkeen] -painike, 3 = "New Cycling" [Uusi jakso]).

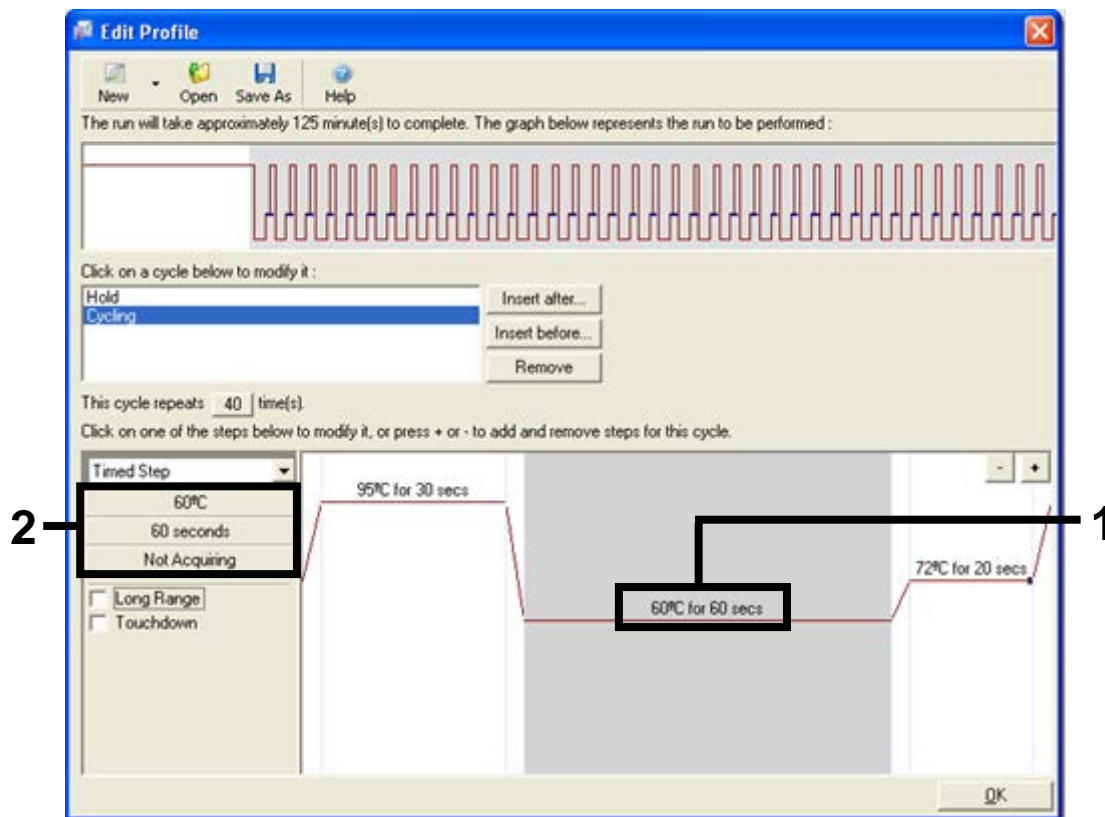


8. Vaihda jakson toistojen määräksi 40. Valitse ensimmäinen vaihe ja asetus "95°C for 30 secs " (95 °C 30 sekunnin ajan) (kuva 26).



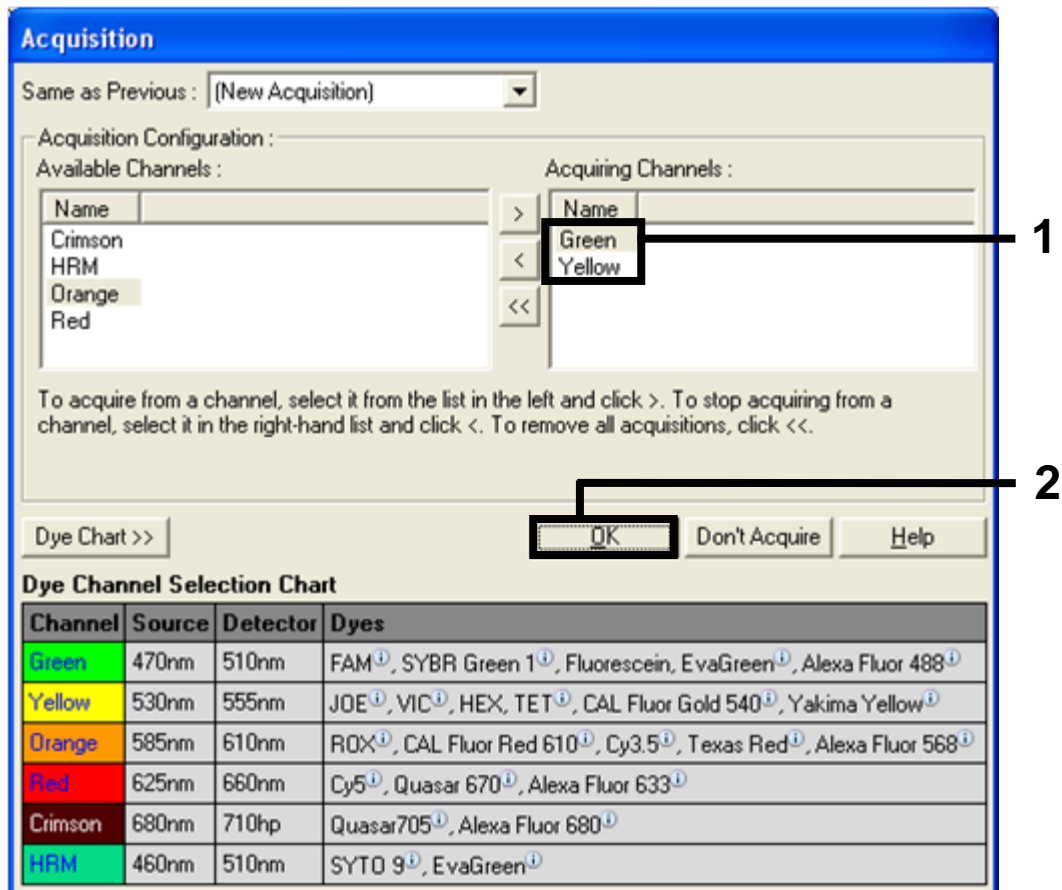
**Kuva 26. Jakson vaiheen lämpötila 95 °C.** (1 = Cycle repeats" [Jakson toistot] -ruutu, 2 = 1. vaiheen lämpötila-asetus, 3 = 1. vaiheen ajan asetus).

9. Korosta toinen vaihe ja asetus "60 °C for 60 secs" (60 °C 60 sekunnin ajan). Ota käyttöön tiedonkeruu tämän vaiheen aikana valitsemalla kohta "Not Acquiring" (Ei kerätä) -painike (kuva 27).



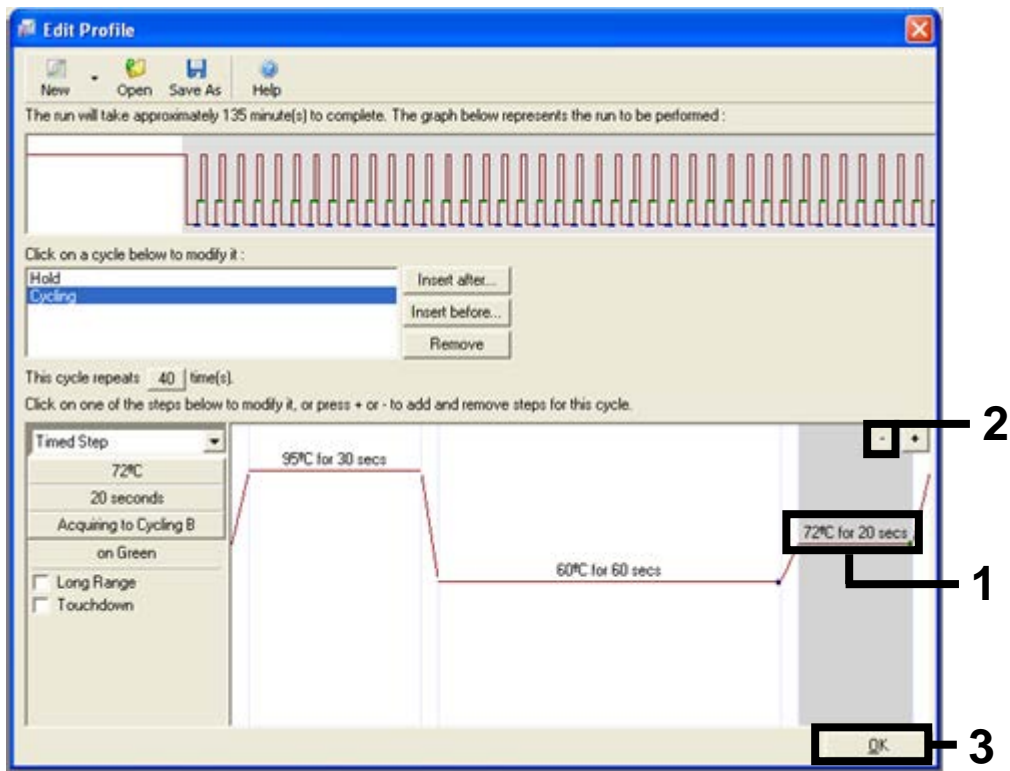
**Kuva 27. Jakson vaiheen lämpötila 60 °C.** (1 = 2. Vaiheen lämpötilan ja ajan asetus, 2 = "Not Acquiring" (Ei kerätä) -painike).

10. Aseta keruukanaviksi Green (Vihreä) ja Yellow (Keltainen) siirtämällä ne "Available Channels" (Käytettävissä olevat kanavat) -luettelosta valitsemalla ">"-painike. Napsauta "OK" (kuva 28).



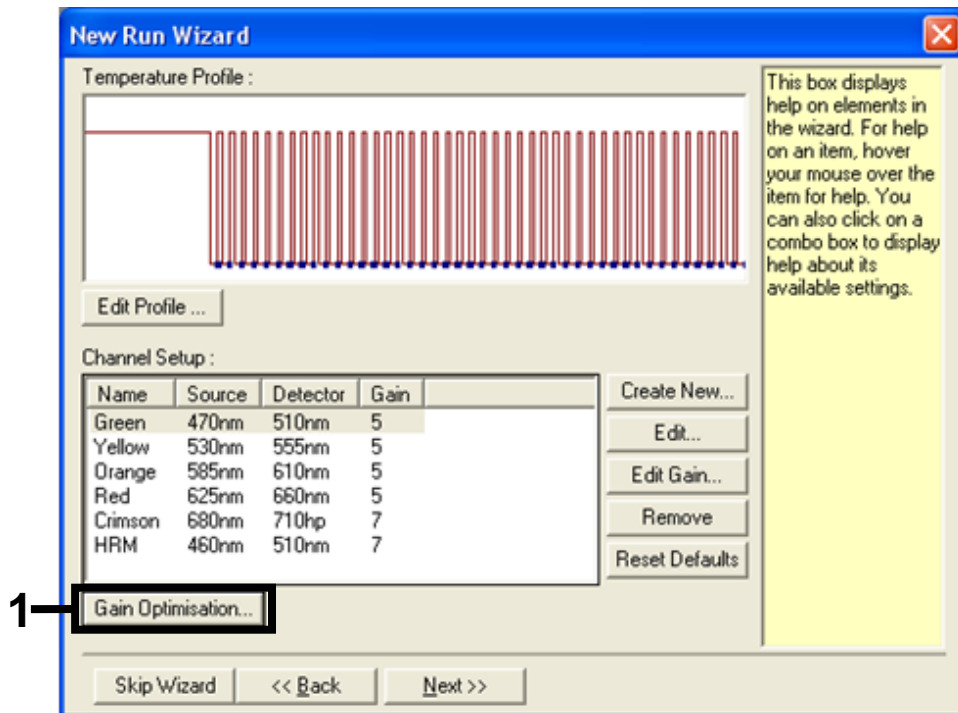
Kuva 28. Keruu vaiheen 60 °C lämpötilassa. (1 = Valitut kanavat, 2 = "OK"-painike).

11. Korosta 3. vaihe ja poista napsauttamalla "-"-painiketta. Napsauta "OK" (kuva 29).



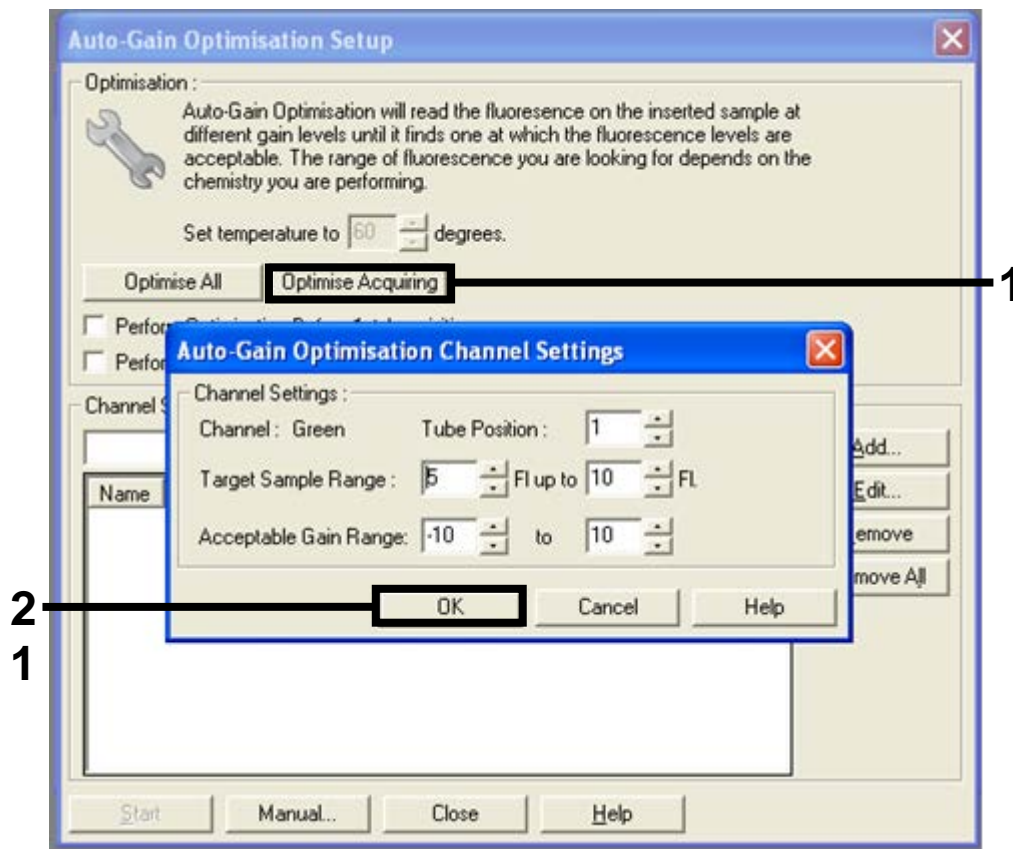
Kuva 29. Laajennusvaiheen poistaminen. (1 = 3. vaihe, 2 = Poistopainike, 3 = "OK"-painike).

12. Napsauta seuraavassa valintaikkunassa "Gain Optimisation" (Poiminnan optimointi) -painike (kuva 30).



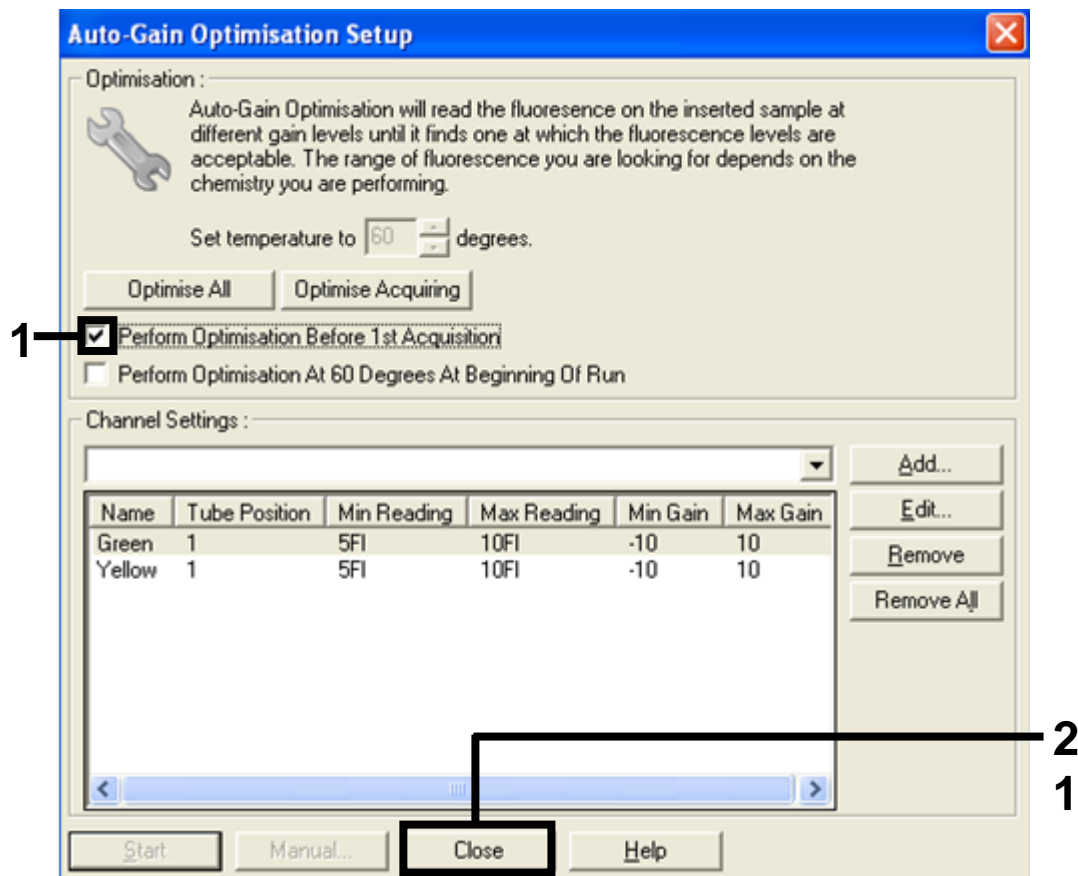
Kuva 30. Gain optimization (Poiminnan optimointi) (1).

13. Napsauta "Optimise Acquiring" (Optimoi keruu) -painike. Kanavan asetukset näytetään kullekin kanavalle. Hyväksy nämä oletusarvot napsauttamalla molempien kanavien kohdalla "OK" (kuva 31).



Kuva 31. Vihreän kanavan poiminnan automaattinen optimointi. (1 = "Optimise Acquiring" [Optimoi keruu] -painike, 2 = "OK"-painike).

14. Valitse "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu ja palaa ohjattuun toimintoon napsauttamalla "Close" (Sulje) -painiketta (kuva 32).



Kuva 32. Vihreän ja keltaisen kanavan valinta. (1 = "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -valintaruutu, 2 = "Close" (Sulje) -painike).

15. Napsauta "Next" (Seuraava) -painike ja tallenna malli haluamaasi sijaintiin valitsemalla "Save Template" (Tallenna malli).

## Toimenpide (manuaalinen)

### Protokolla: Näytteen arviointi (manuaalinen)

Tätä protokollaa käytetään arvioimaan näytteissä olevan monistettavissa olevan DNA:n kokonaismäärä. Arviointi tulisi suorittaa ennen BRAF-mutaatioanalyysin tekemistä.

- Valmistele näytteet osassa "Protokolla: Näytteen arviointi" sivulla 15 annettujen ohjeiden mukaisesti.
- Suorita PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx -laitteessa osassa "Protokolla: *therascreen* BRAF PCR RGQ -testin suorittaminen" sivulla 74 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.
- Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot osassa "Näytteen arviointitietojen analyysi" sivulla 80 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.



## **Protokolla: BRAF-mutaation tunnistaminen (manuaalinen)**

Kun näyte on läpäissyt näytteen arvioinnin, se voidaan testata BRAF-mutaatiotesteillä.

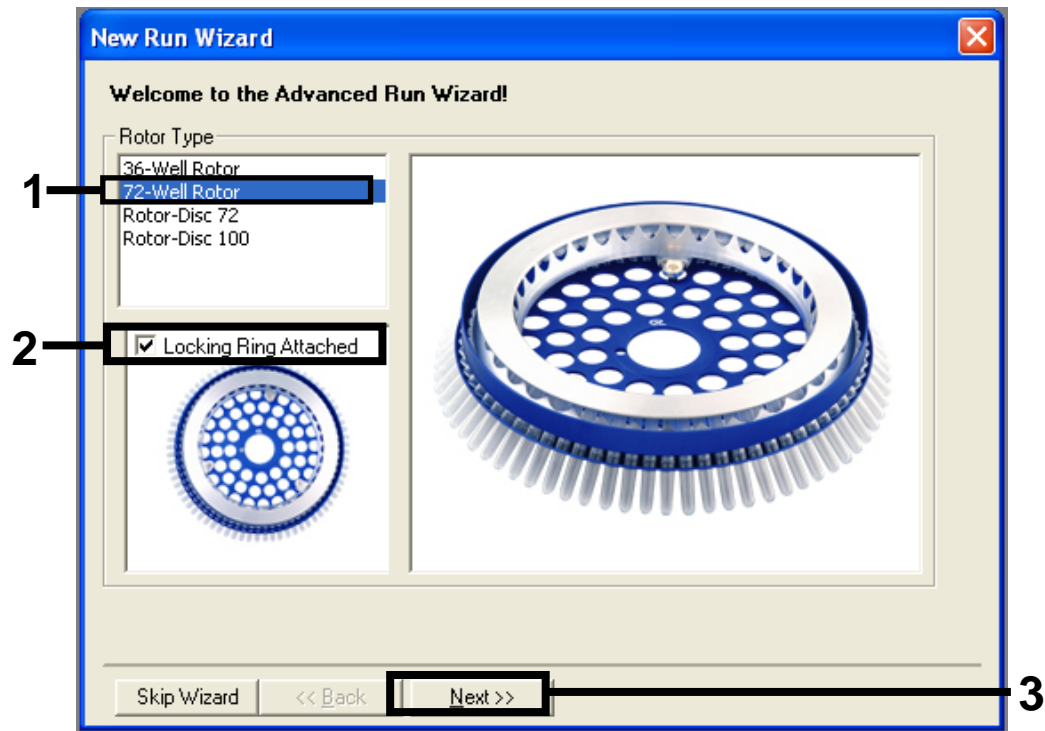
- Valmistele näytteet osassa "Protokolla: BRAF-mutaation tunnistaminen" sivulla 26 annettujen ohjeiden mukaisesti.
- Suorita PCR-ajo Rotor-Gene Q MDx -laitteessa osassa "Protokolla: *therascreen* BRAF PCR RGQ -testin suorittaminen" sivulla 74 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.
- Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot osassa "BRAF-mutaation tunnistamisen tietojen analysointi" sivulla 81 esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

## Protokolla: *therascreen* BRAF PCR RGQ -testin suorittaminen

1. Avaa Rotor-Gene Q -sarjan ohjelmisto (2.3) ja avaa tarvittava lämpötilaprofiili (.ret-tiedosto).

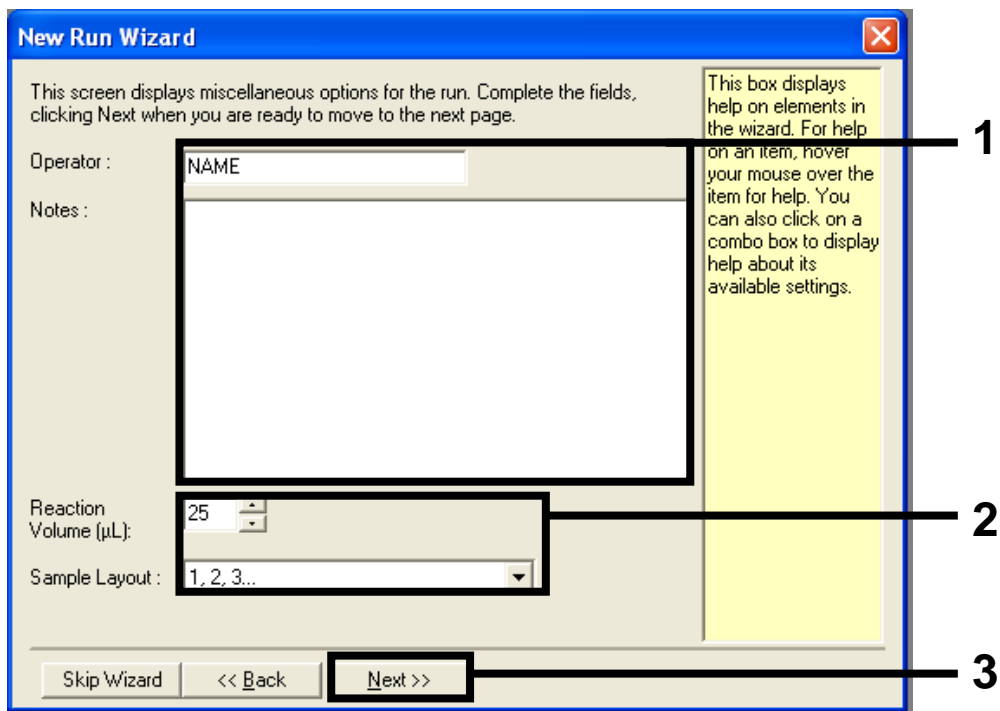
Katso ohjeet lämpötilaprofiilin luomisesta ja ajoparametrien tarkistamisesta osasta "Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen" sivulta 60.

2. Varmista, että oikea roottori on valittu ja valitse valintaruutu, jossa varmistetaan, että lukkorengas on paikallaan. Napsauta "Next" (Seuraava) (kuva 33).



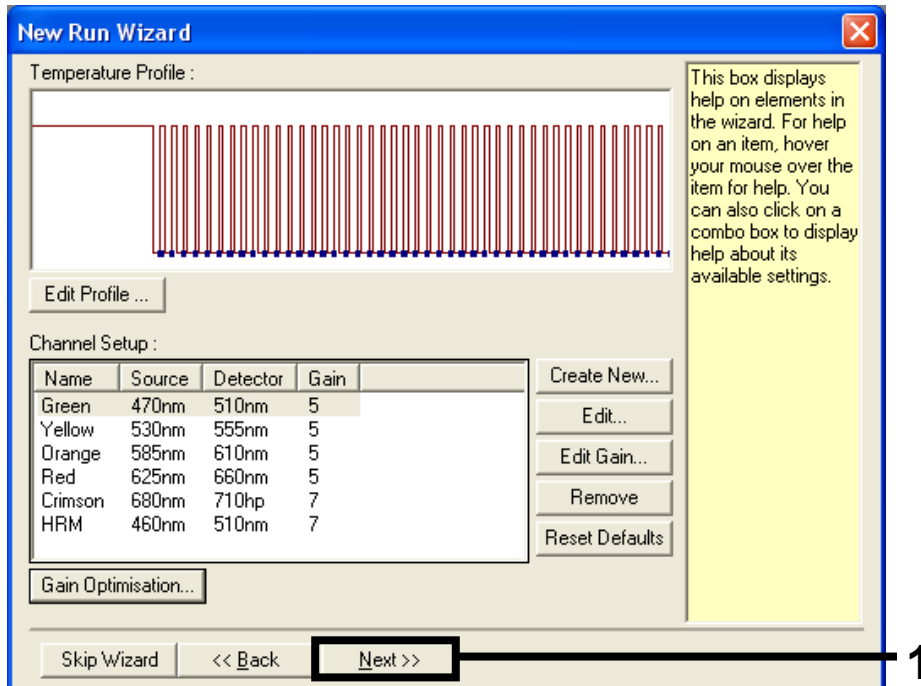
Kuva 33. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja Tervetuloa-ruutu. (1 = "Rotor type" [Roottorityyppi], 2 = "Locking Ring Attached" [Lukkorengas kiinnitetty] -valintaruutu, 3 = "Next" (Seuraava) -painike).

3. Anna testiaan nimi. Lisää mahdolliset huomautukset ja tarkista, että reaktiovolyymiksi on asetettu 25 ja että "Sample Layout" (Näytteen asettelu) -kohdassa lukee "1, 2, 3...". Napsauta "Next" (Seuraava) (kuva 34).



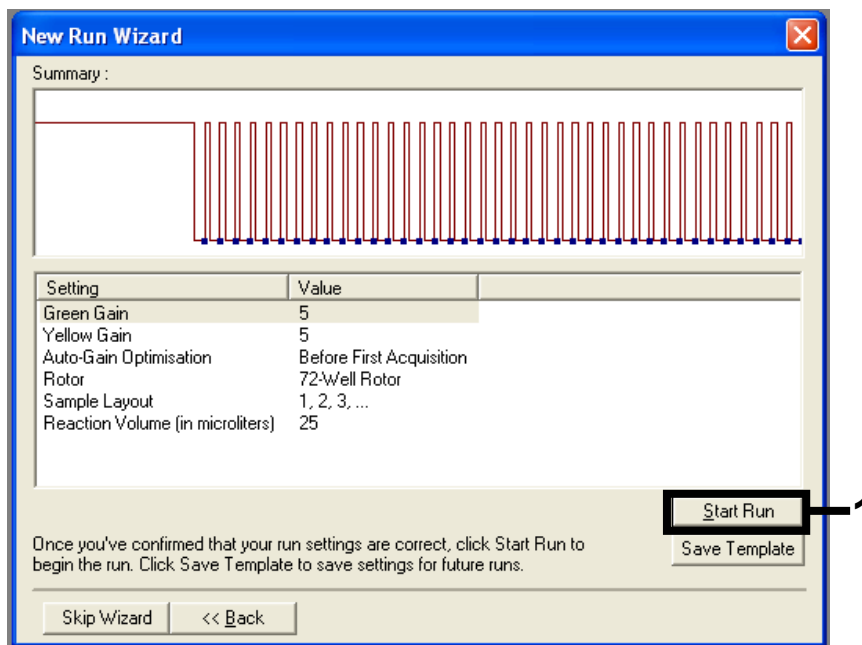
**Kuva 34. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaikkuna.** (1 = "Operator" [Testaaja] -kenttä ja "Notes" [Huomautukset] -kenttä, 2 = "Reaction Volume" [Reaktiomäärä] -kenttä ja "Sample Layout" [Näytteen asettelu] -kenttä, 3 = "Next" [Seuraava] -painike).

4. Seuraavassa ikkunassa voit muokata lämpötilaprofiilia. Muokkaus ei ole tarpeen, koska lämpötilaprofiili on jo luotu osassa "Protokolla: Lämpötilaprofiilin luominen" sivulla 60 esitettyjen ohjeiden mukaan. Napsauta "Next" (Seuraava) (kuva 35).



Kuva 35. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja lämpötilanmuokkausruutu. (1 = "Next" [Seuraava] -painike).

5. Tarkista tiivistelmä ja napsauta "Start Run" (Käynnistä ajo), kun haluat tallentaa suoritettavan tiedoston ja käynnistää ajon (kuva 36).



Kuva 36. "New Run Wizard" (Uusi ohjattu ajo) -valintaruutu ja tiivistelmäruutu. (1 = "Start Run" [Käynnistä ajo] -painike).

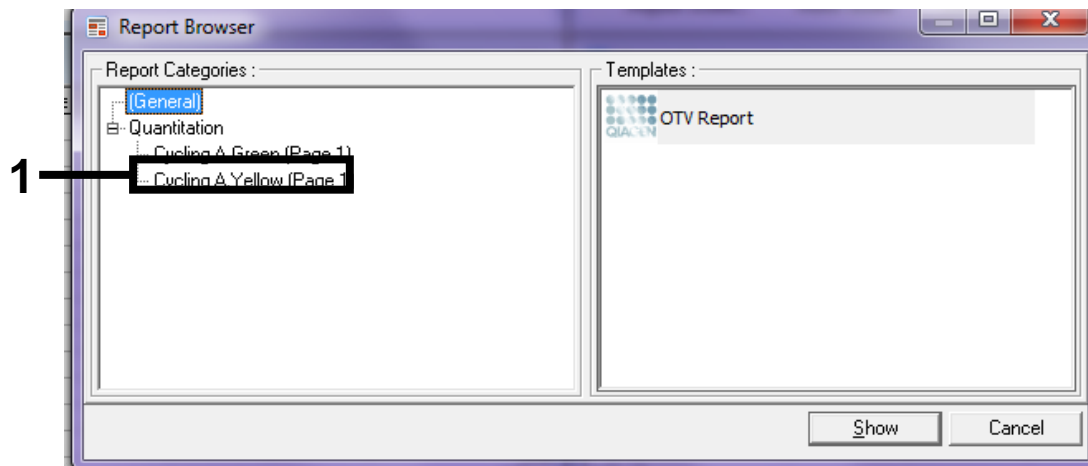
6. Kun ajo käynnistyy, näyttöön tulee uusi ikkuna, jossa voit joko antaa näytteiden nimet tai napsauttaa "Finish" (Lopeta) ja antaa nimet myöhemmin valitsemalla ajon aikana tai ajon suorittamisen jälkeen "Sample" (Näyte) -painike.

Kun napsautat "Finish and Lock Samples" (Lopeta ja lukitse näytteet), et voi enää muokata näytteiden nimiä. Käyttäjän on oltava erityisen huolellinen antaessaan näytteiden nimiä, jotta näytteiden testaus ja analyysi suoritetaan oikein.

**Huomautus:** Näytteitä nimettäessä tyhjiä kuoppien kohdat "Name" (Nimi) -sarakkeessa on jätettävä tyhjiksi.

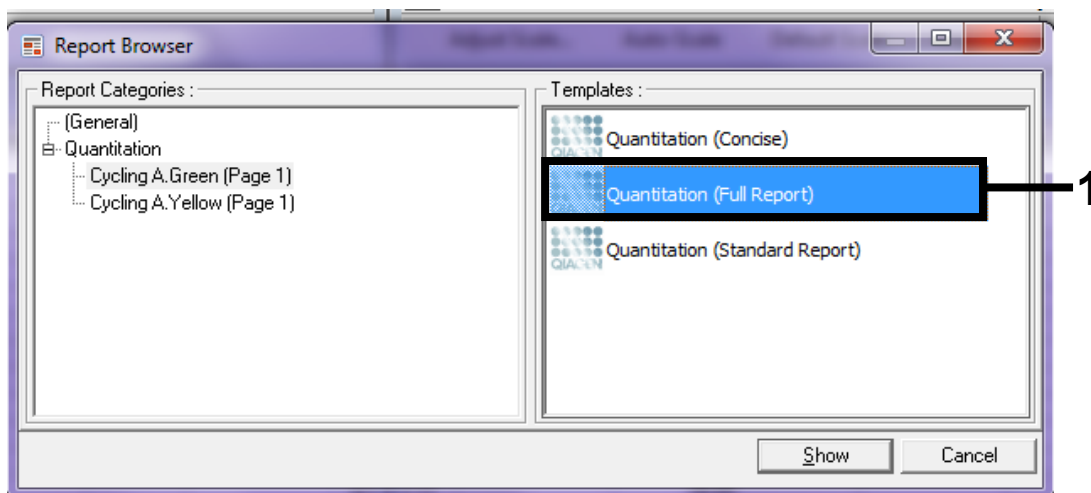
7. Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot osassa "Näytteen arviointitietojen analyysi" sivulla 80 tai osassa "BRAF-mutaation tunnistamisen tietojen analysointi" sivulla 81 esitettyjen ohjeiden mukaisesti tai tilanteen mukaan.
8. Jos tarvitaan kvantitatiivisia raportteja, napsauta Rotor-Gene Q -ajotiedoston työkalupalkissa olevaa "Reports" (Raportit) -kuvaketta.

9. Napsauta raportiselaimen "Report Categories" (Raporttiluokat) -kohdassa "Cycling A Green (Page 1)" (Vihreä jakso (sivu 1)) (kuva 37).



Kuva 37. Report Browser (Raporttiselain). (1 = "Cycling A. Green (Page 1)" [Vihreä jakso] [Sivu 1] -painike).

10. Valitse "Templates" (Mallit) -kohdasta "Quantitation (Full Report)" (Kvantitointi [täysi raportti]) (kuva 38).



Kuva 38. "Quantitation report (Full Report)" (Kvantitointiraportti [täysi raportti]) (1).

11. Luo raportti napsauttamalla "Show" (Näytä).  
12. Tallenna elektroninen versio napsauttamalla "Save As" (Tallenna nimellä).  
13. Toista "Cycling A Yellow (Page 1)" (Keltainen jakso [sivu 1]).

## Tulosten tulkinta (manuaalinen)

Kun näytteen arviointiajo on suoritettu tai mutaatioanalyysi on valmis, analysoi tiedot alla esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

### Ohjelmiston analyysiasetukset

1. Avaa tarvittava tiedosto Rotor-Gene Q series software 2.3 -ohjelmistolla.
2. Jos et ole jo nimennyt näytteitä ennen ajon suorittamista, napsauta "Edit Samples" (Muokkaa näytteitä).
3. Anna näytteille nimet "Name" (Nimi) -sarakkeessa.  
Huomautus: Jätä tyhjiä kuoppien nimet tyhjiksi.
4. Napsauta "Analysis" (Analyysi). Napsauta analyysisivulla "Cycling A. Yellow" (Keltainen jakso), jos haluat tarkastella keltaista kanavaa.
5. Napsauta "Named On" (Nimetty).  
Huomautus: Näin voit varmistaa, ettei tyhjiä kuoppia käytetä analyysissä.
6. Valitse "Dynamic tube" (Dynaaminen putki).
7. Valitse "Slope correct" (Pudotus oikea).
8. Valitse "Linear scale" (Lineaariasteikko).
9. Valitse "Take off Adj" (Mittauspisteen säätö) ja anna arvo 15,01 yläruutuun ("If take off point was calculated before cycle") (Jos mittauspiste laskettiin ennen jaksoa) ja arvo 20,01 alaruutuun ("then use the following cycle and take off point") (käytä sitten seuraavaa jaksoa ja mittauspistettä).
10. Aseta kynnyksarvoksi 0,05.
11. Aseta "Eliminate Cycles before" (Eliminoidut edeltävät jaksot) -kohdan asetukseksi 15.
12. Valitse keltaisen C<sub>T</sub>-arvot.
13. Napsauta analyysisivulla "Cycling A. Green" (Vihreä jakso), jos haluat tarkastella vihreää kanavaa.
14. Valitse "Named On" (Nimetty).
15. Valitse "Dynamic tube" (Dynaaminen putki).
16. Valitse "Slope correct" (Pudotus oikea).
17. Valitse "Linear scale" (Lineaariasteikko).
18. Valitse "TOA" ja anna arvo 15,01 yläruutuun ("If take off point was calculated before cycle") (Jos mittauspiste laskettiin ennen jaksoa) ja arvo 20,01 alaruutuun ("then use the following cycle and take off point") (käytä sitten seuraavaa jaksoa ja mittauspistettä).
19. Aseta kynnyksarvoksi 0,15.

20. Aseta "Eliminate Cycles before" (Eliminoi edeltävät jaksot) -kohdan asetukseksi 15.

21. Valitse vihreän C<sub>T</sub>-arvot.

## Näytteen arviointitietojen analyysi

### Ajon kontrollin analyysi

Kun ajo on suoritettu loppuun, analysoi tiedot alla esitetyllä tavalla.

- **Negatiivinen kontrolli:** Templaatin kontaminoitumisen estämiseksi NTC ei saa tuottaa alle 40:n C<sub>T</sub>-arvoa vihreässä (FAM) kanavassa. Jotta voisit varmistaa, että ajo on määritetty oikein, NTC:ssä ei saa näkyä monistusta alueella 32,53–38,16 keltaisessa (HEX) kanavassa. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot.
- **Positiivinen kontrolli:** BRAF-positiivisen kontrollin (PC) antaman kontrollitestin C<sub>T</sub>-arvon vihreässä (FAM) kanavassa on oltava 30,37–36,38. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot. Tämän alueen ulkopuolella oleva arvo merkitsee ongelmaa ajon valmistelussa ja siten ajon epäonnistumista.

Näytteen tietoja ei saa käyttää, jos jompi kumpi näistä kontroleista on epäonnistunut.

Kun molemmat kontrollit ovat hyväksyttäviä, jokaisen näytteen C<sub>T</sub>-arvon on oltava vihreässä kanavassa alueella 21,95–32,00. Jos näyte on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

### Näytteen analysointi – kontrollitesti

- **Näytteen kontrollitesti C<sub>T</sub> < 21,95:** Näytteitä, joiden C<sub>T</sub> < on 21,95, on laimennettava, koska kyseessä on hyväksyttävän testialueen alaraja. Matalan tason mutaation havaitsemiseksi konsentroituja näytteitä on laimennettava siten, että niiden pitoisuus on sallitun alueen rajojen sisäpuolella, jolloin laimennus puolella nostaa C<sub>T</sub>-arvoa yhdellä numerolla. Jos näytteen lukema on lähellä lukemaa 21,95, näytettä suositellaan laimennettavaksi, jotta voidaan varmistaa, että näytteen testausajossa (BRAF-mutaation tunnistus) saadaan tulos. Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Dil.).
- **Näytteen kontrollitesti CC<sub>T</sub> > 32,00:** Näytteen uuttaminen uudelleen on suositeltavaa, koska alun riittämätön DNA-templaatti estää kaikkien mutaatioiden tunnistamisen testille määritetyillä raja-arvoilla.



## BRAF-mutaation tunnistamisen tietojen analysointi

### Ajon kontrollin analyysi

Katso ajon kontrollin analyysin vaihekaavio kuvassa 39.

- **Negatiivinen kontrolli:** Templaatin kontaminoitumisen estämiseksi NTC ei saa tuottaa alle 40:n  $C_T$ -arvoa vihreässä (FAM) kanavassa. Jotta voitaisiin varmistaa, että ajo on määritetty oikein, NTC:ssä ei saa näkyä monistusta alueella 32,53–38,16 keltaisessa (HEX) kanavassa. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot.
- **Positiivinen kontrolli:** BRAF-positiivisen kontrollin (PC) on annettava  $C_T$ -arvo vihreässä kanavassa kaikissa BRAF-testeissä, kuten taulukossa 14 on esitetty. Annetut arvot ovat näiden arvojen sisäpuolella ja sisältävät nämä arvot. Tämän alueen ulkopuolella oleva arvo merkitsee ongelmaa ajon valmistelussa ja siten ajon epäonnistumista.

**Huomautus:** Näytteen tietoja ei saa käyttää, jos jompi kumpi näistä kontrolleista on epäonnistunut.

**Taulukko 14. Reaktion kontrollien hyväksyttävä  $C_T$ -alue.**

Reaktioseos	Näyte	Kanava	$C_T$ -alue
Kontrolli	PC	Vihreä	30,37–36,38
V600E/Ec	PC	Vihreä	29,62–35,73
V600D	PC	Vihreä	29,75–35,79
V600K	PC	Vihreä	29,32–35,32
V600R	PC	Vihreä	29,41–35,41



Kuva 39. Ajon kontrollin analyysin vaihekaavio.

## Näytteen analyysi – näytteen kontrollin vihreän C<sub>T</sub>-arvo

Katso ajon näytteen analyysin vaihekaavio kuvassa 40.

Kun molemmat ajon kontrollit ovat hyväksyttäviä kontrollin testaukseen, jokaisen näytteen kontrollin C<sub>T</sub>-arvon on oltava vihreässä kanavassa alueella 21,95–32,00.

Jos näyte on tämän alueen ulkopuolella, toimi jäljempänä esitettyjen ohjeiden mukaan.

- **Näytteen kontrollitesti C<sub>T</sub> < 21,95:** Näytteet, joiden kontrollin C<sub>T</sub> -arvo on 21,95, ylikuormittavat mutaatiotestejä, ja ne on laimennettava. Matalan tason mutaation havaitsemiseksi konsentroituja näytteitä on laimennettava siten että niiden pitoisuus on sallitun alueen rajojen sisäpuolella, jolloin laimennus puolella nostaa C<sub>T</sub>-arvoa yhdellä numerolla. Näytteiden laimentamiseen on käytettävä sarjan mukana toimitettua vettä (Dil.).
- **Näytteen kontrollitesti C<sub>T</sub> > 32,00:** Näytteen uuttaminen uudelleen on suositeltavaa, koska alun riittämätön DNA-templatti estää kaikkien mutaatioiden tunnistamisen testille määritetyillä raja-arvoilla.

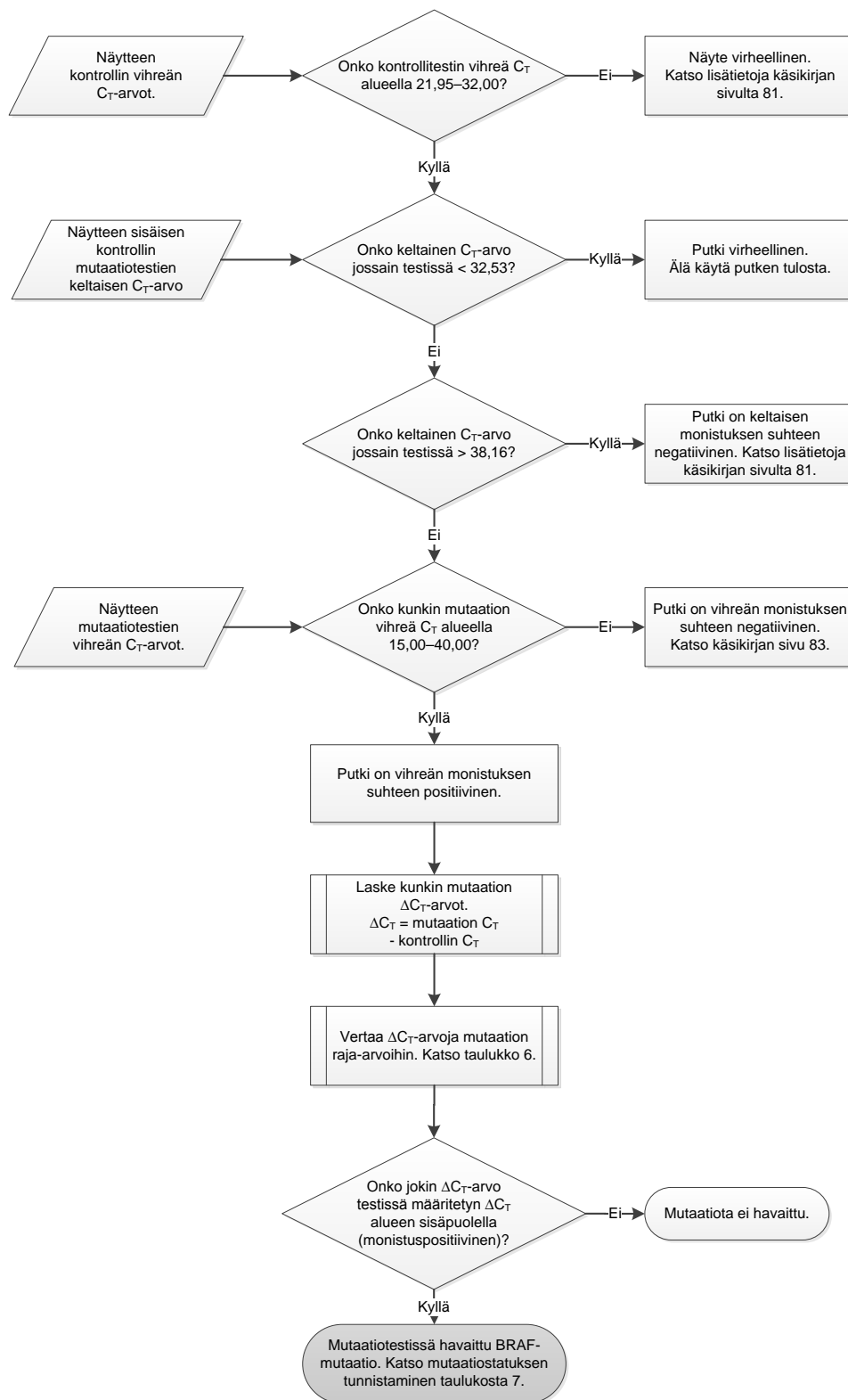
## Näytteen analyysi – näytteen sisäisen kontrollin mutaatiotestien C<sub>T</sub>-arvo

Katso ajon näytteen analyysin vaihekaavio kuvassa 40.

Jokaisen näytteen kaikki kuopat on analysoitava. Tarkista, että jokainen kuoppa luo sisäisestä kontrollista HEX-signaalin keltaisessa kanavassa. Mahdollisia tuloksia on kolmenlaisia.

- Jos sisäisen kontrollin C<sub>T</sub>-arvo on määritetyllä alueella (32,53–38,16), se on keltaisen osalta monistuspositiivinen ja hyväksyty.
- Jos sisäisen kontrollin C<sub>T</sub>-arvo on määritetyn alueen (> 38,16), yläpuolella, putki on keltaisen osalta monistusnegatiivinen. Jos vihreässä kanavassa on monistus kyseiselle putkelle, keltaisen monistus on hyväksyty. Jos vihreässä kanavassa ei ole monistusta kyseiselle putkelle, keltaisen monistus on virheellinen.
- Jos sisäisen kontrollin C<sub>T</sub>-arvo on määritetyn alueen (< 32,53), alapuolella, putki on virheellinen.

Jos sisäisen kontrollin virhe johtuu PCR-inhibitiosta, näytteen laimentaminen saattaa vähentää inhibiittorien vaikutusta. Tässä tapauksessa on kuitenkin huomattava, että tällöin myös kohde-DNA laimenee. Sarjaan sisältyy vesiputki näytteen laimentamista varten (Dil.).



**Kuva 40. Näytteen analyysin vaihekaavio.**

## Näytteen analyysi – näytteen mutaatiotestien C<sub>T</sub>-arvo

Vihreän arvot kaikille neljälle reaktioseokselle on tarkistettava taulukossa 15 esitettyjen arvojen avulla.

**Taulukko 15. Hyväksyttävät näytteen mutaation reaktioarvot (vihreä kanava)\***

Testi	Hyväksyttävä C <sub>T</sub> -alue	ΔC <sub>T</sub> -alue
V600E/E <sub>c</sub>	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

\* Hyväksyttävät arvot ovat näytettyjen alueiden mukaisia raja-arvot mukaan lukien.

- Jos vihreä C<sub>T</sub>-arvo on määritetyllä alueella, se on FAM-monistuspositiivinen.
- Jos vihreä C<sub>T</sub>-arvo on määritetyn alueen yläpuolella, eikä monistusta ilmene, se on vihreän osalta monistusnegatiivinen.

Laske ΔC<sub>T</sub>-arvo kaikille FAM-monistuspositiivisille mutaatioputkille alla esitettyllä tavalla varmistaen että mutaation ja kontrollin C<sub>T</sub>-arvot ovat peräisin samasta näytteestä.

$$\Delta C_T = \text{mutaation } C_T - \text{kontrollin } C_T$$

Vertaa näytteen ΔC<sub>T</sub>-arvoa kyseisen testin raja-arvoon (taulukko 15) varmistaen että kuhunkin testiin käytetään oikeaa raja-arvoa.

Raja-arvo on arvo, jonka ylittävä positiivinen signaali voi johtua villityypin DNA:n ARMS-alukkeen taustasignaalista. Jos näytteen ΔC<sub>T</sub>-arvo on korkeampi kuin raja-arvo, näyte luokitellaan negatiiviseksi tai sarjan havaitsemisrajojen ulkopuolella olevaksi.

Jokaisen näytteen kohdalla jokaiselle mutaatioreaktiolle annetaan status havaitun mutaation perusteella: mutaation havaittu, mutaatiota ei havaittu tai virheellinen alla esitettyjen kriteerien mukaisesti.

### ■ Mutaatio havaittu:

Vihreä monistuspositiivinen ja ΔC<sub>T</sub> ovat raja-arvon mukaisia tai sen alapuolella. Jos havaitaan useita mutaatioita, mutaatiostatus on määritettävä taulukossa 16 esitettyllä tavalla.

■ **Mutaatiota ei havaittu:**

Vihreä monistuspositiivinen ja  $\Delta C_T$  ovat raja-arvon yläpuolella.

Vihreä monistusnegatiivinen ja keltainen (sisäinen kontrolli) monistuspositiivinen.

■ **Virheellinen:**

Keltainen (sisäinen kontrolli) on virheellinen.

Vihreän monistus on negatiivinen ja keltaisen monistus on negatiivinen.

Katso tarkemmat tiedot vaihekaaviosta (kuva 40). Jos näyte on keltaisen osalta monistusnegatiivinen putkessa, mutta vihreän osalta monistuspositiivinen toisessa putkessa, "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tulosta toisessa putkessa voidaan pitää hyväksyttynä tuloksena, mutta kyseisen havaitun mutaation määrittäminen ei välttämättä ole luotettava.

Jos näyte on keltaisen osalta monistusnegatiivinen ja vihreä monistuspositiivinen samassa putkessa, "Mutation detected" (Mutaatio havaittu) -tulosta pidetään hyväksyttynä.

Jos putki on keltaisen (sisäinen kontrolli) osalta virheellinen, kyseisen putken tulosta ei saa käyttää.

### **Näytteen analyysi – näytteen mutaatiostatuksen määrittäminen**

Kun kaikki mutaatioreaktioputket on arvioitu, näytteen mutaatiostatus määritetään seuraavasti.

- **Mutaatio havaittu:** Yksi tai useampi neljästä mutaatioreaktiosta ovat positiivisia. Jos useita mutaatioita havaitaan, raportoidun mutaation tulisi olla yhdenmukainen taulukossa 16 esitettyjen tietojen kanssa (katso seuraava sivu).
- **Mutaatiota ei havaittu:** Kaikki neljä mutaatioreaktiota ovat negatiivisia.
- **Virheellinen:** Yksikään mutaatioreaktio ei ole positiivinen ja yksi tai useampi mutaatioreaktio on virheellinen.

**Taulukko 16. Näytteen mutaatiostatuksen tunnistaminen**

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutaatiostatus
<b>Positiivinen</b>	Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen	V600E- tai V600Ec-positiivinen
<b>Positiivinen</b>	Negatiivinen	<b>Positiivinen</b>	Negatiivinen	V600Ec- tai V600K-positiivinen
<b>Positiivinen</b>	<b>Positiivinen</b>	Negatiivinen	Negatiivinen	V600D-positiivinen
Negatiivinen	<b>Positiivinen</b>	Negatiivinen	Negatiivinen	V600D-positiivinen
Negatiivinen	Negatiivinen	<b>Positiivinen</b>	Negatiivinen	V600K-positiivinen
Negatiivinen	Negatiivinen	Negatiivinen	<b>Positiivinen</b>	V600R-positiivinen

**Huomautus:** *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja on tarkoitettu havaitsemaan DNA-näytteen mahdolliset BRAF-geenin mutaatiot. Kun näytteessä havaitaan BRAF-mutaatio, vain yksi spesifinen mutaatio raportoidaan. Jos useita mutaatioita havaitaan, raportoidun mutaation tulisi olla yhdenmukainen taulukossa 16 esitettyjen tietojen kanssa.

Mutaatioreaktioiden välillä ilmenee jonkinlaista ristireagoivuutta. Esimerkiksi V600E/Ec-testi voi antaa positiivisen tuloksen, jos se havaitsee näytteessä V600D-mutaation, V600E/Ec-testi voi antaa positiivisen tuloksen, jos se havaitsee näytteessä V600K-mutaation ja V600K-testi voi antaa positiivisen tuloksen, jos se havaitsee näytteessä kompleksin V600E-mutaation. Mutaatiostatus voidaan kuitenkin määrittää taulukossa 16 esitetyllä tavalla.

Ristireagoivuus johtuu ARMS-alukkeesta, joka havaitsee myös muita saman sekvenssin mutaatioita. Jos toinen mutaatiotesti antaa positiivisen tuloksen, kyseessä on todennäköisesti ristireagoivuus. Myös kaksoismutaatioita on havaittu, mutta ne ovat harvinaisia.

Näin ollen harvinaisissa tapauksissa voidaan havaita positiivisten tulosten yhdistelmiä, joita ei ole esitetty taulukossa 16. Näytteessä voidaan edelleen ilmoittaa olevan BRAF-mutaatio. Ristireagoivuudesta johtuen tiettyä mutaatiota ei voida erottaa. Tästä syystä näytteessä voidaan edelleen ilmoittaa olevan pelkkä BRAF-mutaatio.

Jos yksi tai useampi mutaatioreaktio on virheellinen, mutta yksi tai useampi on positiivinen, voidaan silti sanoa, että näytteessä on havaittu BRAF-mutaatio, koska mutaatio on silti havaittu. Spesifinen raportoitu mutaatio ei kuitenkaan välttämättä ole täsmällinen ja saattaa olla ristireagoinnin aiheuttama. Tästä syystä näytteessä voidaan edelleen ilmoittaa olevan pelkkä BRAF-mutaatio.

## **Liite II: *therascreen* BRAF -testipaketin asennus**

*therascreen* BRAF RGQ PCR -sarja on tarkoitettu käytettäväksi Rotor-Gene Q MDx -laitteen ja 72-kuoppaisen roottorin kanssa. *therascreen* BRAF -testipaketti on ladattavissa *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan tuotesivulta osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Lataustiedot löytyvät "Supplementary Protocols" (Lisäprotokollat) -välilehdestä kohdasta "Product Resources" (Tuoteressit). Testipaketteja voi myös tilata CD-levymuodossa (QIAGEN, luettelonro 9023820).

Testipaketti sisältää "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template"- ja "*therascreen* BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" -templaatin.

**Huomautus:** *therascreen* BRAF -testipaketti on yhteensopiva ainoastaan Rotor-Gene Q -ohjelmistoversion 2.3 kanssa. Varmista, että asennettuna on oikea Rotor-Gene Q -ohjelmistoversio ennen kuin aloitat *therascreen* BRAF -testipaketin asennuksen. Jos Rotor-Gene Q MDx -laitteessasi on vanhempi ohjelmistoversio, voit helposti päivittää sen lataamalla ohjelmistoversion 2.3 Rotor-Gene Q MDx -tuotesivulta osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Uusi ohjelmisto löytyy "Operating Software" (Ohjelmisto) -välilehdestä kohdasta "Product Resources" (Tuoteressit).

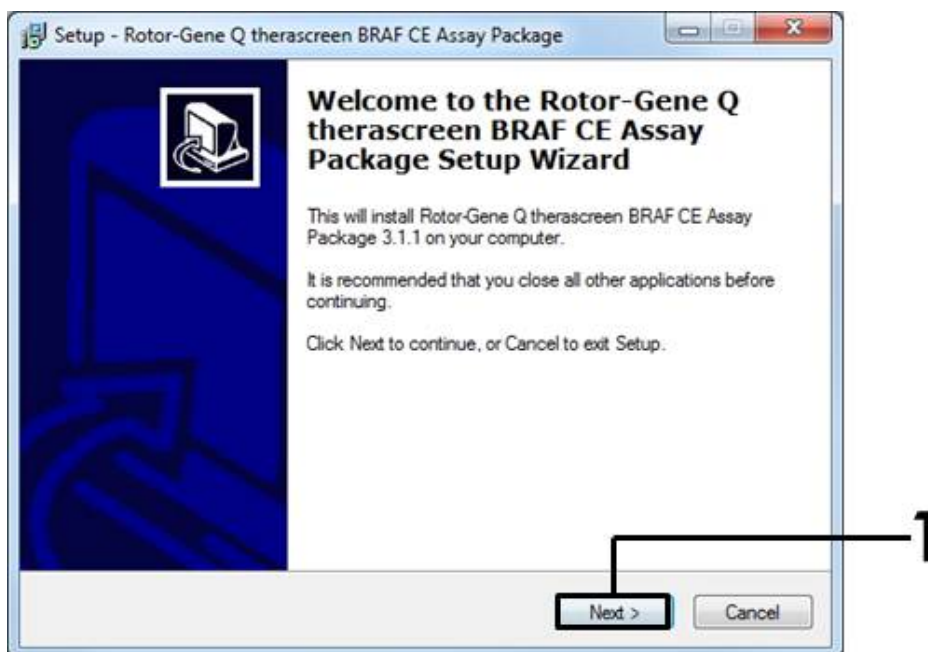
### **Toimenpide (lataus)**

- 1. Lataa *therascreen* BRAF RGQ Assay Package CE vastaavalta *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan tuotesivulta osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).**
- 2. Avaa ladattu zip-tiedosto kaksoisnapsauttamalla sitä ja purkamalla tiedosto.**
- 3. Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla purettua tiedostoa *therascreen\_BRAF\_Assay\_Package\_3.1.1.exe*.**



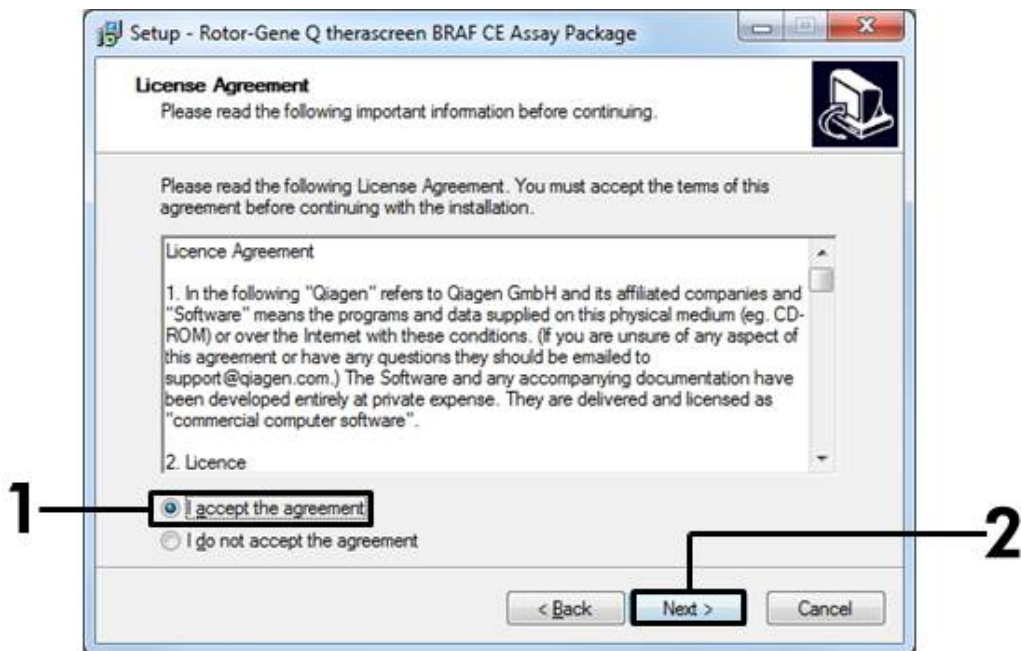
## Toimenpide (CD)

1. Tilaa erikseen saatavana oleva *therascreen* BRAF RGQ Assay Package CE -CD-levy (QIAGEN, luettelonro 9023820) QIAGENilta.
2. Aseta CD-levy Rotor-Gene Q -laitteeseen liitetyn kannettavan tietokoneen levyasemaan.
3. Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla tiedostoa *therascreen\_BRAF\_Assay\_Package\_3.1.1.exe*, jos CD latautuu automaattisesti tai etsi suoritettava tiedosto kannettavan tietokoneen resurssienhallinnasta.
4. Ohjattu asennustoiminto tulee näyttöön. Napsauta "Next" (Seuraava) (kuva 41).



Kuva 41. "Setup" (Asennus) -valintaikkuna. (1 = "Next" [Seuraava] -painike).

5. Lue lisenssisopimus kohdasta "License Agreement" (Lisenssisopimus) ja hyväksy se valitsemalla kohta "I accept the agreement" (Hyväksyn sopimuksen). Napsauta "Next" (Seuraava) (kuva 42).



Kuva 42. "License Agreement" (Lisenssisopimus) -valintaikkuna. (1 = "Accept" (Hyväksy) -painike, 2 = "Next" (Seuraava) -painike).

6. Asennus alkaa automaattisesti ja kun se on suoritettu loppuun, näyttöön tulee viimeinen "Setup" (Asennus) -valintaikkuna. Poistu ohjatusta asennuksesta napsauttamalla "Finish" (Lopeta) (kuva 43).



Kuva 43. Ohjatun asennuksen päättäminen. (1 = "Finish" [Lopeta] -painike).

7. Käynnistä tietokone uudelleen. Pikakuvakkeet sekä "therascreen BRAF CE Sample Assessment Locked Template" -templaattiin että "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" -templaattiin luodaan työpöydälle automaattisesti.

## Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), soita ilmaisnumeroomme 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Kataloginumero
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit (24)	24 reaktiolle: kontrollitesti, 4 mutaatiotestiä, positiivinen kontrolli, <i>Taq</i> DNA -polymeraasi, NTC-testissä käytettävä vesi ja näytteen laimennuksessa käytettävä vesi	870211
<b>Rotor-Gene Q ja muut tarvikkeet</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM- analysointilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM- kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sis. asennusta ja koulutusta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-jakso ja HRM- analysointilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM- kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennuksen ja koulutuksen	9002033
<i>therascreen</i> BRAF Assay Package CD	CD, joka sisältää <i>therascreen</i> BRAF CE Sample Assessment Locked Template- ja <i>therascreen</i> BRAF CE Mutation Analysis Locked Template -templaatin.	9023820
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiinilaatta manuaalisen reaktion suorittamiseksi sekä yksikanavainen pipetti; 72 x 0,1 ml:n putkea	9018901

Tuote	Sisältö	Kataloginnumero
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 liuskaa 4 putkessa ja korkit 1 000 reaktiota varten	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 liuskaa 4 putkessa ja korkit 10 000 reaktiota varten	981106
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – genomisen DNA:n puhdistukseen parafiiniin valetuista kudospäätteistä</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNA-näytteelle: 50 QIAamp MinElute® -pakkausta, Proteinase K, puskureita, näyteputkia (2 ml)	56404

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi.

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

Ei käytetä endometriosisin kehittymisen riskin arvioinnissa

#### **Rajoitettu lisenssisopimus**

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjaa voidaan käyttää ainoastaan *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan käsikirjan ohjeiden mukaisesti ja ainoastaan yhdessä sarjan sisältämien komponenttien kanssa. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten *therascreen* BRAF RGQ PCR -sarjan käsikirjassa ja lisäprotokollissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. QIAGEN ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN sanoutuu irti muista suorista ja epäsuorista lisensseistä.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi kääntyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Päivitetyt lisenssiehdot saa osoitteesta [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1273-005 © 2016 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Itävalta** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgia** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brasilia** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Kanada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**Kiina** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Tanska** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Suomi** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Ranska** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Saksa** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hongkong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**Intia** ■ techservice-india@qiagen.com

**Irlanti** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italia** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japani** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (Etelä)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxemburg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Meksiko** ■ techservice-mx@qiagen.com

**Alankomaat** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norja** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Ruotsi** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Sveitsi** ■ techservice-ch@qiagen.com

**Yhdistynyt kuningaskunta** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Yhdysvallat** ■ techservice-us@qiagen.com

