

# Håndbok for *therascreen*<sup>®</sup> BRAF RGQ PCR-sett



Versjon 2

**IVD**

Til bruk i in vitro-diagnostikk

Til bruk sammen med Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx-instrumenter

**CE**

**REF**

870211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

TYSKLAND

R2

**MAT**

1072802NO



## **QIAGEN prøve- og analyseteknologi**

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi som gjør det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og -tjenester sikrer suksess fra prøve til resultat.

### **QIAGEN setter standarden når det gjelder:**

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Vårt mål er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. Du finner mer informasjon på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Innhold

<b>Tiltenkt bruk</b>	<b>5</b>
<b>Sammendrag og forklaring</b>	<b>5</b>
<b>Prosedyreprinsipp</b>	<b>6</b>
Analyser	7
Kontroller	7
<b>Materialer som medfølger</b>	<b>9</b>
Settets innhold	9
<b>Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger</b>	<b>10</b>
<b>Advarsler og forholdsregler</b>	<b>11</b>
Sikkerhetsinformasjon	11
Generelle forholdsregler	11
<b>Oppbevaring og håndtering av reagenser</b>	<b>12</b>
<b>Oppbevaring og håndtering av prøver</b>	<b>13</b>
<b>Prosedyre</b>	<b>14</b>
DNA-ekstraksjon og klargjøring	14
Protokoller:	
■ Prøvevurdering	15
■ Deteksjon av BRAF-mutasjon	26
<b>Tolkning av resultater (automatisk)</b>	<b>38</b>
<b>Feilsøkingsveiledning</b>	<b>39</b>
<b>Flagg i <i>therascreen</i> BRAF Assay Package</b>	<b>40</b>
<b>Kvalitetskontroll</b>	<b>46</b>
<b>Begrensninger</b>	<b>47</b>
<b>Ytelseskarakteristikker</b>	<b>47</b>
Blank grense (LOB), arbeidsområde og cutoff-verdier	47
Nøyaktighet: Sammenligning med analytisk referansem metode	48
Effekt av input-DNA på $\Delta C_T$ -verdier	49
Kryssreaktivitet	50
Deteksjonsgrense (LOD)-verdier	50

Effekt av melanin på settytelsen	51
Repeterbarhet	52
Reproduserbarhet	52
<b>Symboler</b>	<b>54</b>
<b>Vedlegg I: Manuell protokoll for <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-sett</b>	<b>55</b>
Generell informasjon	55
Protokoll:	
■ Opprette en temperaturprofil	55
<b>Prosedyre (manuell)</b>	<b>67</b>
Protokoller:	
■ Prøvevurdering (manuell)	67
■ Deteksjon av BRAF-mutasjon (manuell)	68
■ Oppsett for <i>therascreen</i> BRAF PCR RGQ	69
<b>Tolkning av resultater (manuell)</b>	<b>74</b>
Analyseinnstillinger i programvaren	74
Dataanalyse av prøvevurdering	75
Dataanalyse av deteksjon av BRAF-mutasjon	76
<b>Vedlegg II: Installasjon av <i>therascreen</i> BRAF Assay Package</b>	<b>83</b>
Prosedyre (nedlasting)	83
Prosedyre (CD)	83
<b>Kontaktinformasjon</b>	<b>86</b>
<b>Bestillingsinformasjon</b>	<b>87</b>

## Tiltenkt bruk

*therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er en test til bruk i in vitro-diagnostikk til påvisning av fem somatiske mutasjoner i BRAF-genet, og gir kvalitativ vurdering av mutasjonsstatus. DNA ekstraheres fra formalinfiksert parafinlagret (FFPE) tumorvev og testes ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (PCR) i sanntid på Rotor-Gene Q MDx-instrumenter. *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er beregnet på å hjelpe leger med å identifisere kreftpasienter som kan ha utbytte av BRAF-rettet behandling, som f.eks. vemurafenib.

**Tabell 1. Liste over mutasjoner og COSMIC ID-er.\***

Mutasjon	Base-endring	COSMIC-ID
V600E	GTG>GAG	476
V600E-kompleks	GTG>GAA	475
V600D	GTG>GAT	473
V600K	GTG>AAG	474
V600R	GTG>AGG	477

\* COSMIC ID-er er hentet fra Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (katalog over somatiske mutasjoner ved kreft): [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).

## Sammendrag og forklaring

*therascreen* BRAF RGQ PCR-settet består av et sett som er klart til bruk til deteksjon av fem somatiske mutasjoner i BRAF-genet ved hjelp av polymerasekjedereaksjon (RT PCR) i sanntid på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.

Bruk av teknologier som ARMS<sup>®</sup> (Amplification Refractory Mutation System) og Scorpions<sup>®</sup> gjør det mulig for *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet å detektere følgende mutasjoner i kodon 600 i BRAF-onkogenet mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA.

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

Metodene i dette settet er svært selektive, og avhengig av total mengde DNA som er til stede, kan en lav prosent mutant detekteres mot en bakgrunn av villtype av genomisk DNA. Disse selektivitets- og deteksjonsgrensene er bedre enn teknologier som f.eks. fluorofor terminatorsekvensering.

## Prosedyreprinsipp

*therascreen* BRAF RGQ PCR-settet benytter to teknologier – ARMS og Scorpions – til påvisning av mutasjoner i PCR i sanntid.

### ARMS

Allel- eller mutasjonsspesifikk amplifikasjon oppnås ved ARMS. *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) er effektiv til å skille mellom en match og en mismatch ved 3'-enden av en PCR-primer. Spesifikt muterte sekvenser kan også amplifiseres selektivt, også i prøver der hoveddelen av sekvensene ikke bærer mutasjonen. Når primeren har full match, utføres amplifikasjonen med full effektivitet. Når 3'-basen ikke matcher, oppstår kun et lavt nivå bakgrunnsamplifikasjon.

### Scorpions

Deteksjon av amplifikasjon utføres med Scorpions. Scorpions er bifunksjonelle molekyler som inneholder en PCR-primer kovalent bundet til en fluorescensmerket probe. Fluoroforen i denne proben er tilknyttet en slukker som også er innlemmet i proben, og som reduserer fluorescens. Under polymerasekjedereaksjonen separeres fluoroforen og slukkeren når proben bindes til amplikonet. Dette fører til en målbar økning i fluorescens fra reaksjonsrøret.

### Settformat

Fem analyser leveres med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet.

- Én kontrollanalyse (kontrollreaksjonsblanding; CTRL)
- Fire mutasjonsanalyser (mutasjonsreaksjonsblandinger; V600E/Ec, V600D, V600K, V600R)

V600E/Ec-analysen detekterer både V600E- og V600Ec-mutasjoner, men skiller ikke mellom dem.

Alle reaksjonsblandinger består av to deler og inneholder reagenser for å oppdage mål som er merket med FAM™, og en intern kontroll som er merket med HEX™. Disse internkontrollanalysene kontrollerer nærvær av hemmere som kan føre til falske negative resultater.

## Analyser

*therascreen* BRAF RGQ PCR-settet omfatter en prosedyre på to trinn. I det første trinnet blir kontrollanalysen utført for å vurdere totalt amplifiserbart BRAF DNA i en prøve. I det andre trinnet blir både mutasjons- og kontrollanalyser utført for å fastslå om mutant DNA er til stede eller ikke.

### Kontrollanalyse

Kontrollanalysen merket med FAM brukes for å vurdere totalt BRAF DNA i en prøve. Kontrollanalysen amplifiserer et område av ekson 3 i BRAF-genet. Primerne og Scorpions-proben er utformet for å amplifisere, uavhengig av kjente BRAF-polymorfismer.

### Mutasjonsanalyser

Hver mutasjonsanalyse inneholder en FAM-merket Scorpions-probe og en ARMS-primer for å skille mellom villtype-DNA og spesifikt mutant DNA.

## Kontroller

**Merk:** Alle forsøksanalyseringer må inneholde positive og negative kontroller.

### Positiv kontroll

Hver analysering må inneholde en positiv kontroll i rør 1–5. *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet inneholder BRAF positiv kontroll (PC) som skal brukes som templat i reaksjonen for positiv kontroll. Resultatene for positiv kontroll vil bli vurdert for å sikre at settet fungerer i henhold til angitte akseptkriterier.

### Negativ kontroll

Hver analysering må inneholde en negativ kontroll (ikke-templat-kontroll) i rør 9–13. *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet inneholder vann for NTC (NTC) som skal brukes som templat for ikke-templat-kontroll. Ikke-templatkontrollen brukes for å vurdere potensiell kontaminering i løpet av analyseringen, og for å vurdere ytelsen til internkontrollreaksjonen.

## Vurdering av internkontrollreaksjon

Hver reaksjonsblanding inneholder en intern kontroll i tillegg til målreaksjonen. Hvis det oppstår feil, kan dette innebære at det enten finnes hemmere som kan føre til et unøyaktig resultat, eller at det har oppstått en operatørfeil i oppsettet for det aktuelle røret. Hvis det oppstår feil ved bruk av intern kontroll pga. PCR-hemming, kan en fortykning av prøven redusere effekten av hemmerne, men det er viktig å merke seg at dette også vil fortynne mål-DNA-et. Et rør med vann til fortykning (fort.) er inkludert i settet. Fortynning av prøver må utføres med vann til fortykning (fort.) av prøver.

## Prøvevurdering

Vi anbefaler på det sterkeste å bruke kontrollreaksjonsblandingen (CTRL) som leveres med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet for å vurdere totalt amplifiserbart BRAF DNA i en prøve. Kontrollanalysen amplifiserer et område av ekson 3 i BRAF-genet. Vi anbefaler å sette opp prøver der kun kontrollanalysen bruker BRAF positiv kontroll (PC) som positiv kontroll, og vann for NTC (NTC) som ikke-templatkontroll.

**Merk:** DNA-vurderinger må baseres på polymerasekjedereaksjon (PCR) og kan variere fra kvantifisering basert på absorbansavlesninger. Ekstra kontrollreaksjonsblanding (CTRL) følger med for å vurdere kvaliteten og mengden av DNA i prøvene før analyse med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet.



# Materialer som medfølger

## Settets innhold

<b><i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit</b>			<b>(24)</b>
<b>Katalognr.</b>			<b>870211</b>
<b>Antall reaksjoner</b>			<b>24</b>
Control Reaction Mix (kontrollreaksjonsblanding)	Rød	1 CTRL	2 × 720 µl
V600E/Ec Reaction Mix (reaksjonsblanding)	Lilla	2 V600E/Ec	720 µl
V600D Reaction Mix (reaksjonsblanding)	Oransje	3 V600D	720 µl
V600K Reaction Mix (reaksjonsblanding)	Rosa	4 V600K	720 µl
V600R Reaction Mix (reaksjonsblanding)	Grønn	5 V600R	720 µl
BRAF Positive Control (positiv kontroll)	Beige	PC	250 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase ( <i>Taq</i> DNA-polymerase)	Mint	<i>Taq</i>	2 × 80 µl
Water for NTC (vann til NTC)	Hvit	NTC	1,9 ml
Water for Sample Dilution (vann til fortykning av prøve)	Hvit	Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit Handbook (engelsk håndbok)			1

## Materialer som er nødvendige, men ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablad (SDS) som leveres av leverandøren av produktet, hvis du ønsker mer informasjon.

### Reagenser

- DNA-ekstraksjonssett (se "DNA-ekstraksjon og klargjøring" på side 14)
- Xylen
- Etanol (96–100 %) \*

### Forbruksartikler

- 1,5 ml eller 2 ml mikrosentrifugerør (for lyseringstrinn)
- 1,5 ml mikrosentrifugerør (for fortykningstrinn) (tilgjengelig fra Brinkmann [Safe-Lock, kat.nr. 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat.nr. 0030 120.086] eller Sarstedt [Safety Cap, kat.nr. 72.690])<sup>†</sup>
- Tilpassede pipetter<sup>‡</sup> (justerbare) til prøveklargjøring
- Tilpassede pipetter<sup>‡</sup> (justerbare) til klargjøring av PCR Master Mix
- Tilpassede pipetter<sup>‡</sup> (justerbare) til pipettering av templat-DNA
- Sterile pipettespisser med filtre (vi anbefaler pipettespisser med aerosolbarriere for å unngå krysskontaminering)

### Utstyr

- Termomikser, oppvarmet orbitalinkubator, varmeblokk eller vannbad egnet til inkubering ved 90 °C<sup>‡</sup>
- Bordsentrifuge<sup>‡</sup> med rotor for 2 ml reaksjonsrør
- Vorteksmikser<sup>‡</sup>

\* Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer, som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

<sup>†</sup> Dette er ikke en fullstendig liste over leverandører.

<sup>‡</sup> Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM-instrument\*† med fluorescenskanaler for Cycling Green og Cycling Yellow (henholdsvis påvisning av FAM og HEX)
  - Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3 med BRAF-analysepakken (versjon 3.1.1) installert for automatisk mutasjonsdeteksjon (se "Vedlegg II: Installasjon av *therascreen* BRAF Assay Package", side 83)
- Merk:** Rotor-Gene Q-programvaren kan brukes uten BRAF-analysepakken for manuell mutasjonsdeteksjon. Se "Vedlegg I: Manuell protokoll for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett", side 55
- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (remser med mikrorør, 0,1 ml og lokk) til bruk med 72-brønners rotor (QIAGEN, katalognr. 981103 eller 981106)
  - Sterile mikrosentrifugerør til klargjøring av Master Mix-blandinger
  - Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes (lasteblokk for 72 × 0,1 ml rør), aluminiumsblokk for manuelt reaksjonsoppsett med en pipette med enkeltkanal (QIAGEN, kat.nr. 9018901)

## Advarsler og forholdsregler

Til bruk i in vitro-diagnostikk

### Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

### Generelle forholdsregler

Brukeren må alltid være oppmerksom på følgende:

- Positivt materiell (prøver og positive kontroller) skal oppbevares og ekstraheres separat i forhold til alle andre reagenser og tilsettes reaksjonsblandingen i et eget avgrenset område.

\* Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

† I enkelte land er det eventuelt mulig å bruke Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrumenter som er produsert i mai 2011 eller senere. Serienummeret på baksiden av instrumentet inneholder produksjonsdatoen. Serienummeret er i formatet "mmåånnn" der "mm" angir produksjonsmånedene i tall, "åå" angir de siste to tallene i produksjonsåret, og "nnn" angir den unike instrument-ID-en.

- Vær svært forsiktig med tanke på å forhindre kontaminering av polymerasekjedereaksjoner med syntetisk kontrollmateriale. Vi anbefaler at du bruker egne, tilpassede pipetter til å klargjøre reaksjonsblandinger og tilsette DNA-templat. Klargjøringen og pipetteringen av reaksjonsblandinger må utføres i et annet område enn der templat tilsettes. Rotor-Gene Q-rør må ikke åpnes etter at PCR-analyseringen er fullført. Dette for å forhindre laboratoriekontaminering med materiale etter PCR-analysen.
- Reagenser for *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er optimalt fortynnet. Videre fortynninger av reagenser anbefales ikke, da dette vil påvirke ytelsen negativt. Det er ikke anbefalt å bruke mindre enn 25 µl reaksjonsvolum, da dette vil øke risikoen for falske negative resultater.
- Alle reagenser i *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet settes sammen spesifikt for å få optimal ytelse. Alle reagenser som følger med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet skal bare brukes med de andre reagensene i det samme *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet. Reagensene i settet må ikke erstattes med andre produkter dersom optimal ytelse skal opprettholdes.
- Kun *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) vedlagt i settet skal benyttes. Bytt ikke ut med *Taq* DNA-polymerase fra andre sett av samme eller en annen type, eller med *Taq* DNA-polymerase fra en annen leverandør.

## Oppbevaring og håndtering av reagenser

*therascreen* BRAF RGQ PCR-settet sendes på tørris og må fortsatt være frosset ved ankomst. Dersom innholdet i *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet ikke er frosset ved ankomst, hvis den ytre pakningen er åpnet under frakt, hvis forsendelsen ikke inneholder en pakkseddel, brukerhåndbok eller reagenser, må du kontakte QIAGENs tekniske tjeneste i ditt land eller den lokale distributøren (se baksiden eller [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

*therascreen* BRAF RGQ PCR-settet skal umiddelbart etter mottak plasseres i en mørk fryser som holder en konstant temperatur på mellom  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  og  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  – Scorpions (dette gjelder alle fluorescensmerkede molekyler) må beskyttes mot lys for å unngå fotobleking og tap av ytelse.

Settet er stabilt frem til utløpsdatoen når det oppbevares under anbefalte oppbevaringsbetingelser i originalemballasjen. Gjentatt tining og frysing bør unngås. Maks. 6 frysetiningssykluser kan benyttes.

## Oppbevaring og håndtering av prøver

**Merk:** Alle prøver kan være smittefarlige og må behandles deretter.

Prøvematerialet må være humant genomisk DNA, ekstrahert fra formalinfiksert og parafinlagret (FPPE) vev. Prøvene må transporteres i henhold til standard patologimetodologi for å sikre prøve kvalitet.

Tumorprøver er ikke-homogene, og data fra en tumorprøve stemmer kanskje ikke overens med andre snitt fra samme tumor. Tumorprøver kan også inneholde vev som ikke er fra tumoren. DNA fra vev som ikke stammer fra tumoren, antas å ikke inneholde mutasjoner detektert med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet.

# Prosedyre

## DNA-ekstraksjon og klargjøring

Ytelseskaraktistikene for *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er opprettet ved å bruke DNA ekstrahert med QIAamp DNA FFPE-vevssettet (QIAGEN, katalognr. 56404). Hvis QIAamp DNA FFPE-vevssettet brukes, må DNA-ekstrasjonen skje i henhold til instruksjonene i håndboken med spesielt fokus på følgende:

- FFPE-snitt må legges på glassplater.
- Overflødig parafin må skrapes vekk rundt vevssnitt med en ny, steril skalpell.
- Skrap vevssnitt inn i mikrosentrifugerør ved hjelp av en ny skalpell for hver prøve som skal ekstraheres.
- Renset genomisk DNA skal elueres i 120–200 µl ATE-buffer (følger med QIAamp DNA FFPE-vevssettet). Renset genomisk DNA skal oppbevares ved –15 °C til –30 °C.

DNA-vurderinger må baseres på kontrollreaksjonsblandingen (CTRL) som leveres med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet, og dette kan være forskjellig fra kvantifisering basert på absorbansavlesninger. Ekstra kontrollreaksjonsblanding (CTRL) følger med for å vurdere kvaliteten og mengden av DNA i prøvene før analyse med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet.

**Merk:** For å sikre at det er nok DNA for analyse, er det anbefalt å samtidig fremstille minst to FFPE-objektglass i det første tilfellet og vurdere det sammen med kontrollanalysen. Hvis det innhentes utilstrekkelig med DNA for PCR, kan flere objektglass ekstraheres og DNA samles.

**Merk:** FFPE-snitt må være minst 5 µm tykke for å sikre nok DNA til analysen.

Alle analyser i *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet genererer korte PCR-produkter. *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet vil imidlertid ikke virke på kraftig fragmentert DNA.

## Protokoll: Prøvevurdering

Denne protokollen brukes til å få tilgang til totalt amplifiserbart DNA i prøver ved å bruke BRAF CE Sample Assessment Locked Template (therascreen BRAF CE-prøvevurdering med låst templat) (analysepakken) for automatisk prøvevurdering.

**Merk:** Les mer om manuell prøvevurdering i "Vedlegg I: Manuell protokoll for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett", side 55.

### Viktige punkter før du starter

- Les "Generelle forholdsregler" på side 11 før du starter prosedyren.
- Ta deg god tid til å bli kjent med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet før du starter protokollen. Se instrumentets bruksanvisning.
- Ikke vorteks *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) eller andre blandinger som inneholder *Taq* DNA-polymerase, da dette kan forårsake inaktivering av enzymet.
- Pipetter *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) ved å plassere pipettespissen rett under væskeoverflaten for å unngå at spissen dekkes av overskytende enzym.
- Opptil 24 prøver kan vurderes med Control Reaction Mix (kontrollreaksjonsblanding – CTRL) som er tilgjengelig.

### Dette må du gjøre før du starter

- Kontroller at *therascreen* BRAF Assay Package-programvaren er installert før Rotor-Gene Q-instrumentet tas i bruk første gang (se "Vedlegg II: Installasjon av *therascreen* BRAF Assay Package", side 83).
- Før bruk må alle reagenser tines i minst én time i romtemperatur (15–25 °C), blandes ved å snu rørene 10 ganger, og sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.
- Kontroller at *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) holder romtemperatur (15–25 °C) før hver bruk. Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet i bunnen av røret.

### Prosedyre

1. **Tin kontrollreaksjonsblandingen (CTRL), vann for ikke-templatkontroll (NTC) og positiv kontroll (PC) ved romtemperatur (15–25 °C) i minst én time. Når reagensene er tint, skal de blandes ved å vende hvert rør 10 ganger for å unngå lokale konsentrasjoner av salter. Sentrifuger deretter rørene en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.**

2. Klargjør egnede blandinger av Master Mix (kontrollreaksjonsblanding [CTRL] pluss *Taq* DNA-polymerase [*Taq*]) for DNA-prøvene, en positiv kontrollreaksjon og en ikke-templatkontroll-reaksjon i henhold til mengdene som er angitt i tabell 2. Inkluder reagenser for 1 prøve, slik at det vil være nok til PCR-oppsettet.

Master Mix inneholder alle komponentene som er nødvendige PCR, unntatt prøven.

Tabell 2. Klargjøring av Master Mix\* for kontrollanalyse

Komponent	Volum
Kontrollreaksjonsblanding (CTRL)	19,5 µl × (n+1)*
<i>Taq</i> DNA-polymerase ( <i>Taq</i> )	0,5 µl × (n+1)*
<b>Totalt volum</b>	<b>20,0 µl/reaksjon</b>

\* n = antall reaksjoner (prøver pluss kontroller). Når Master Mix skal klargjøres, må du klargjøre nok til én ekstra prøve (n+1) for å ha nok til PCR-oppsettet. Verdien n må ikke overskride 26 (24 prøver pluss 2 kontroller).

3. Bland Master Mix grundig (ved å pipettere forsiktig opp og ned 10 ganger). Plasser riktig antall remser med rør i lasteblokken i henhold til oppsettet i figur 1. Tilsett 20 µl Master Mix i hvert PCR-rør umiddelbart.

La lokkene ligge i plastbeholderen til de skal brukes. Ved prøvevurdering bør Master Mix for kontrollanalyse tilsettes i én positiv kontrollbrønn, én negativ kontrollbrønn og én brønn for hver prøve.

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

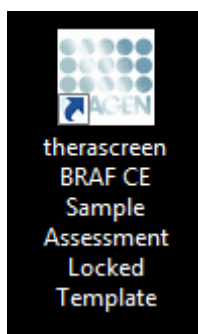
Figur 1. Oppsett av prøvevurderingsanalyser i lasteblokken. Tallene angir posisjoner i lasteblokken og indikerer endelig rotorposisjon.



4. Tilsett umiddelbart 5 µl vann for ikke-templatkontrollen (NTC) til ikke-templatkontrollrøret (PCR-rør nr. 2), og sett lokk på røret. Tilsett 5 µl av hver prøve til prøverørene (PCR-rør nr. 3–26), og sett lokk på rørene. Tilsett 5 µl BRAF positiv kontroll (PC) til det positive kontrollrøret (PCR-rør nr. 1), og sett lokk på røret.

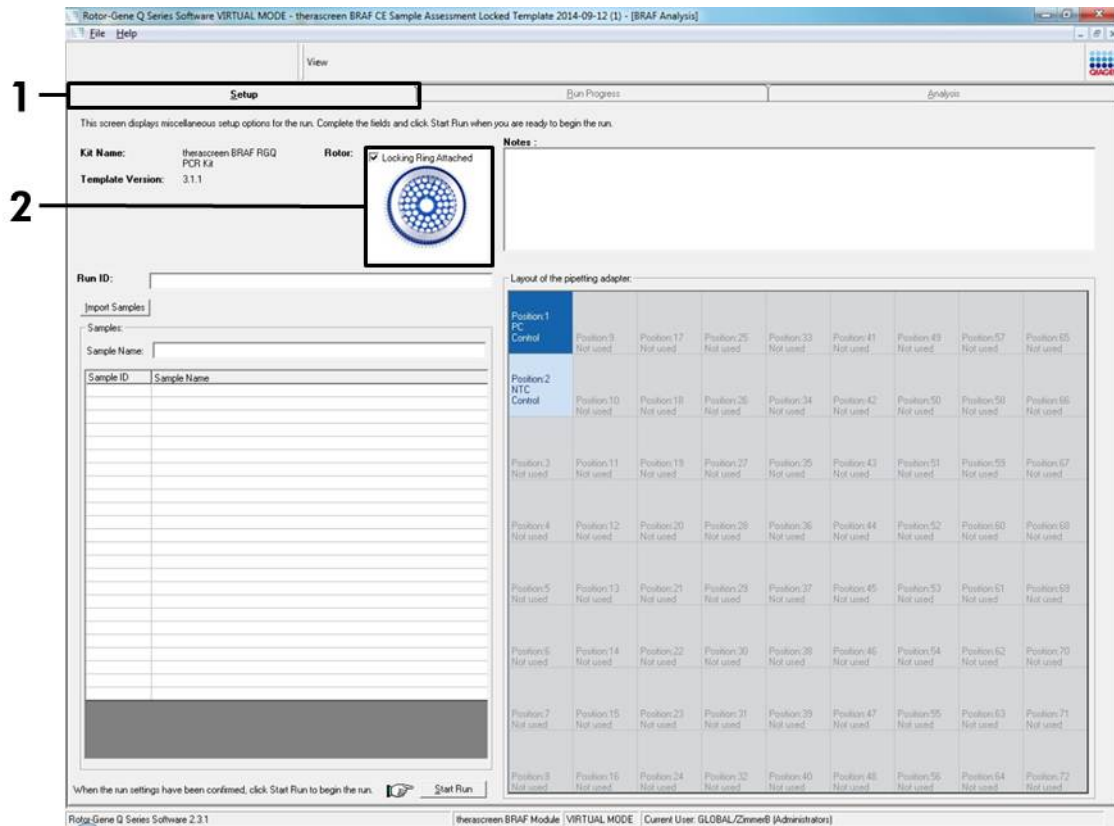
Merk lokkene på rørene, slik at de viser hvilken retning rørene skal settes inn i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.

5. Når det er satt lokk på alle PCR-rørene, ser du over at rørene er fylt, for å sikre at prøven er tilsatt alle rørene.
6. Vend alle PCR-rørene (4 ganger) for å blande prøvene og reaksjonsblandingene.
7. Plasser remsene med PCR-rør i de aktuelle posisjonene i rotoren med 72 brønner (figur 1). Hvis rotoren ikke er fullsatt, må alle tomme posisjoner i rotoren fylles med et tomt rør med påsatt lokk.
8. Sett umiddelbart rotoren med 72 brønner inn i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet. Se til at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) er plassert øverst på rotoren for å sikre rørene under analyseringen.
9. Start programvaren for Rotor-Gene Q-serien ved å dobbeltklikke på ikonet "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template" (*therascreen* BRAF CE-prøvevurdering med låst templat) på skrivebordet til den bærbare datamaskinen som er koblet til Rotor-Gene Q MDx-instrumentet (se figur 2).



Figur 2. Ikonet "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template" (*therascreen* BRAF CE-prøvevurdering med låst templat).

10. Fanen "Setup" (Oppsett) vises som standard (figur 3). Kontroller at låseringen er forsvarlig festet, og merk av i boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet). Lukk lokket på Rotor-Gene Q-instrumentet.



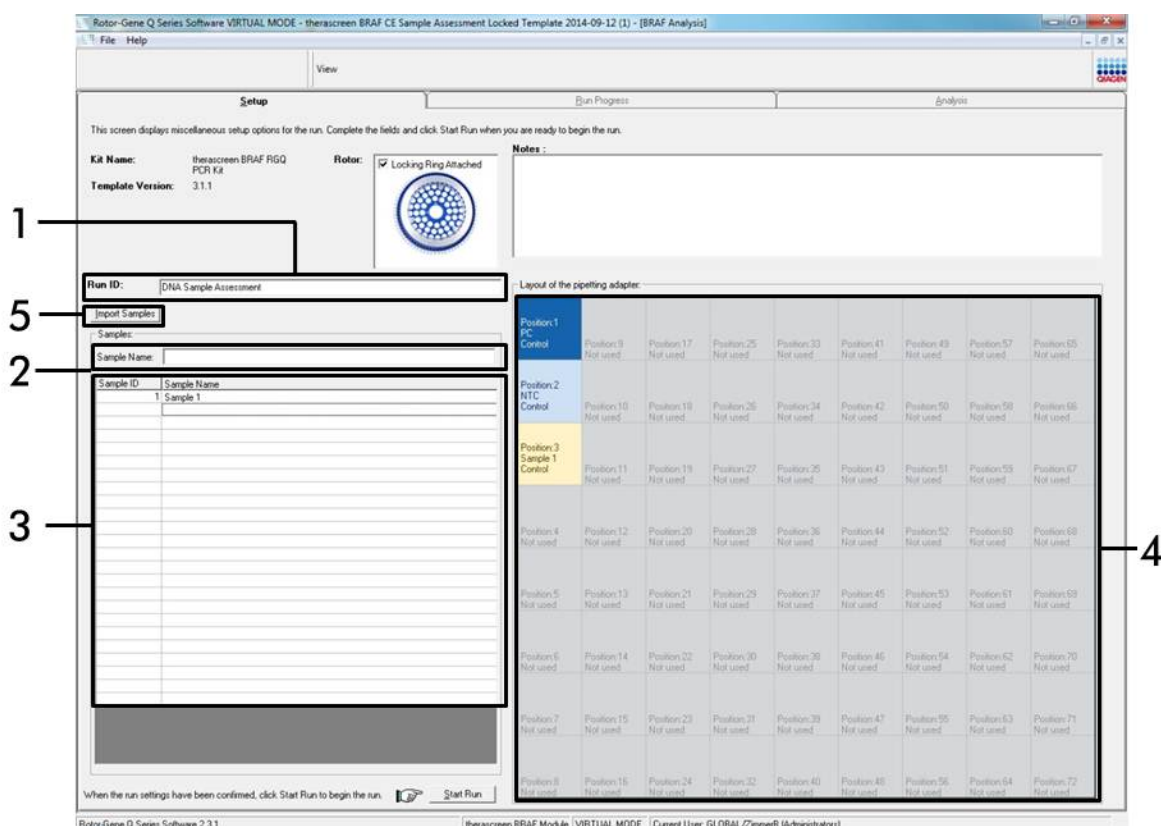
Figur 3. Fanen "Setup" (Oppsett) (1) og boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet) (2).

11. Legg inn analyse-ID i feltet "Run ID" (Analyse-ID) i henhold til de lokale navnereglene. Legg inn prøvenavnet i feltet "Sample Name" (Prøvenavn) i henhold til de lokale navnereglene, og trykk på returtasten. Prøvenavnet legges til i prøvelisten nedenfor, og prøven tilordnes en "Sample ID" (Prøve-ID) (1, 2, 3 osv.). I tillegg blir feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter) til høyre oppdatert med prøvenavnet (figur 4).

**Merk:** Prøvenavn som lagres i formatet \*.smp (Rotor-Gene Q-prøvefil) eller \*.csv (kommaseparerte verdier), kan alternativt importeres ved hjelp av knappen "Import Samples" (Importer prøver). Prøvenavnene vil bli fylt ut automatisk med denne metoden.

**Merk:** Kontroller i feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter) at det tilføyde prøvenavnet er uthevet og vises i en annen farge, og at prøvenavnet er i prøveposisjonen (figur 4).

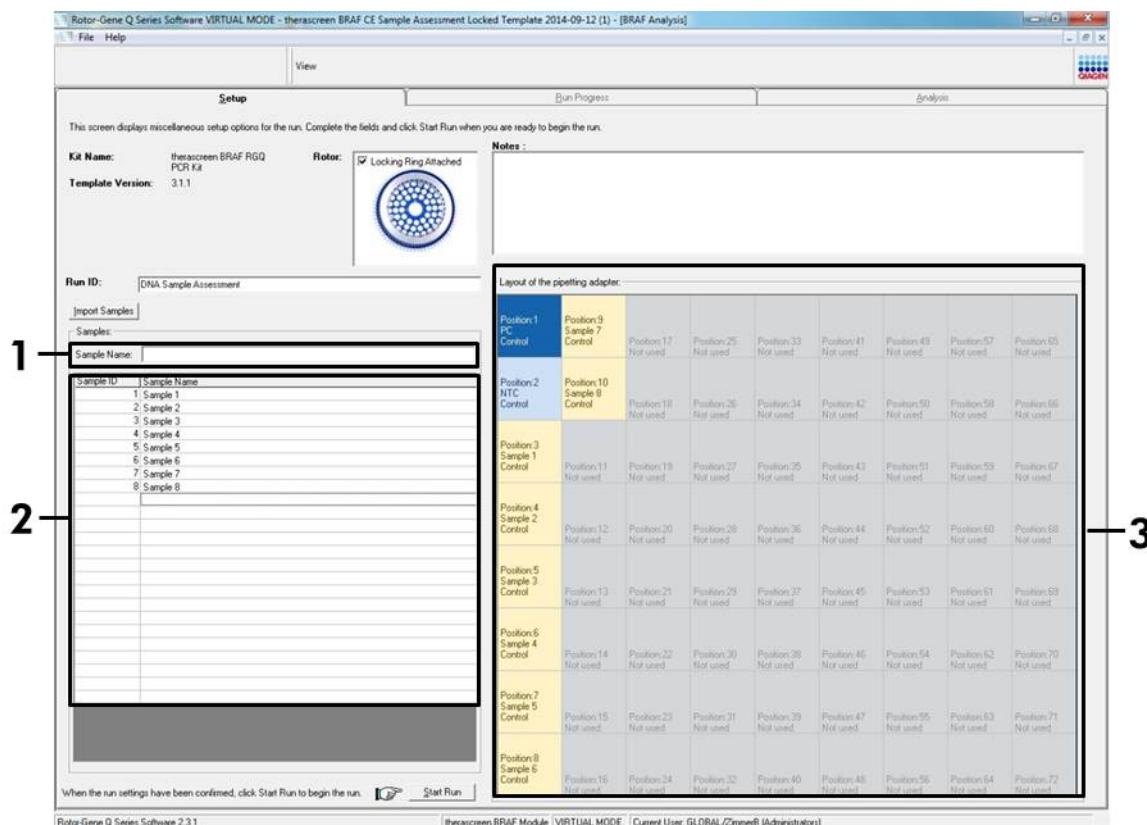
**Merk:** Hvis prøvenavn har mer enn 8 tegn, er det ikke alltid hele navnet vises i feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter).



**Figur 4. Inntasting av "Run ID" (Analyse-ID) og "Sample Name" (Prøvenavn).** (1 = feltet "Run ID" (Analyse-ID), 2 = "Sample Name" (Prøvenavn), 3 = prøveliste, 4 = feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter), 5 = knappen "Import Samples" (Importer prøver).)

## 12. Gjenta trinn 11 for å legge inn navnene på alle ytterligere prøver (figur 5).

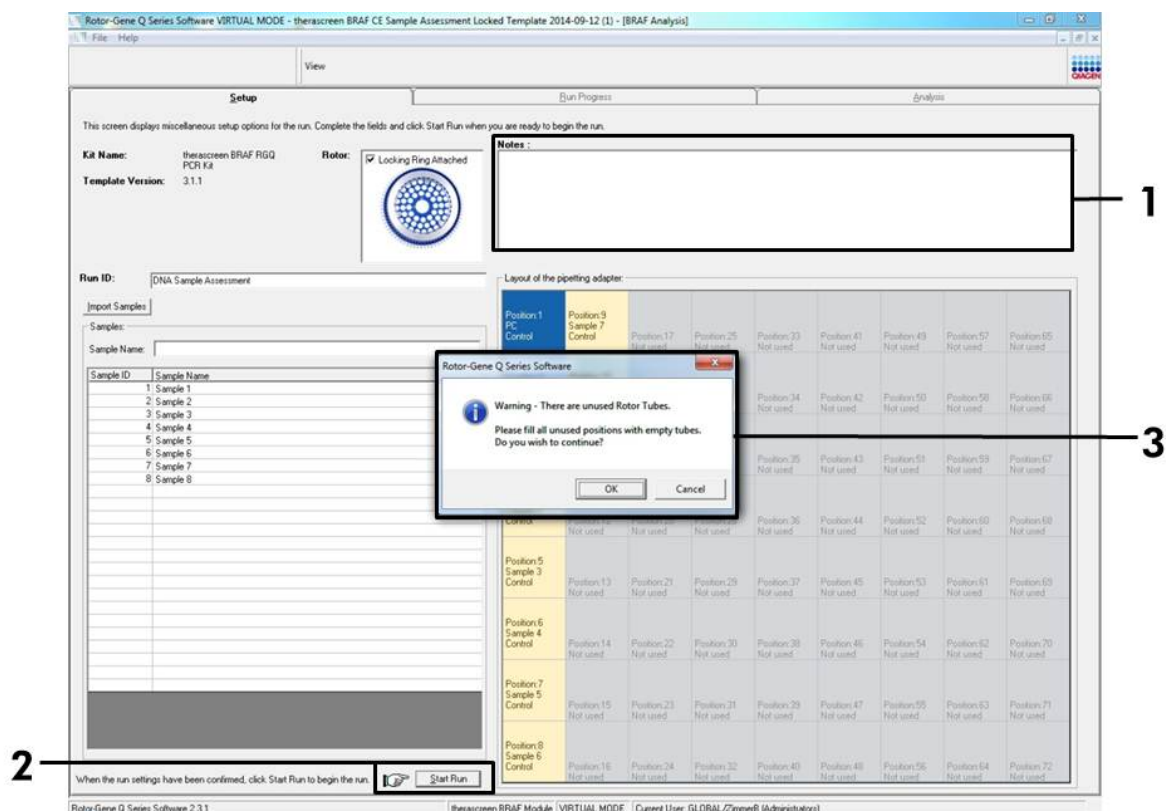
**Merk:** Når du skal redigere et prøvenavn, klikker du på "Sample Name" (Prøvenavn) i prøvelisten. Den valgte prøven vises i feltet "Sample Name" (Prøvenavn) ovenfor. Rediger prøvenavnet i henhold til lokale navneregler, og trykk på returtasten for å oppdatere navnet.



**Figur 5. Inntasting av ytterligere prøvenavn i feltet "Sample Name" (Prøvenavn). (1 = feltet "Sample Name" (Prøvenavn), 2 = prøveliste, 3 = feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter).)**

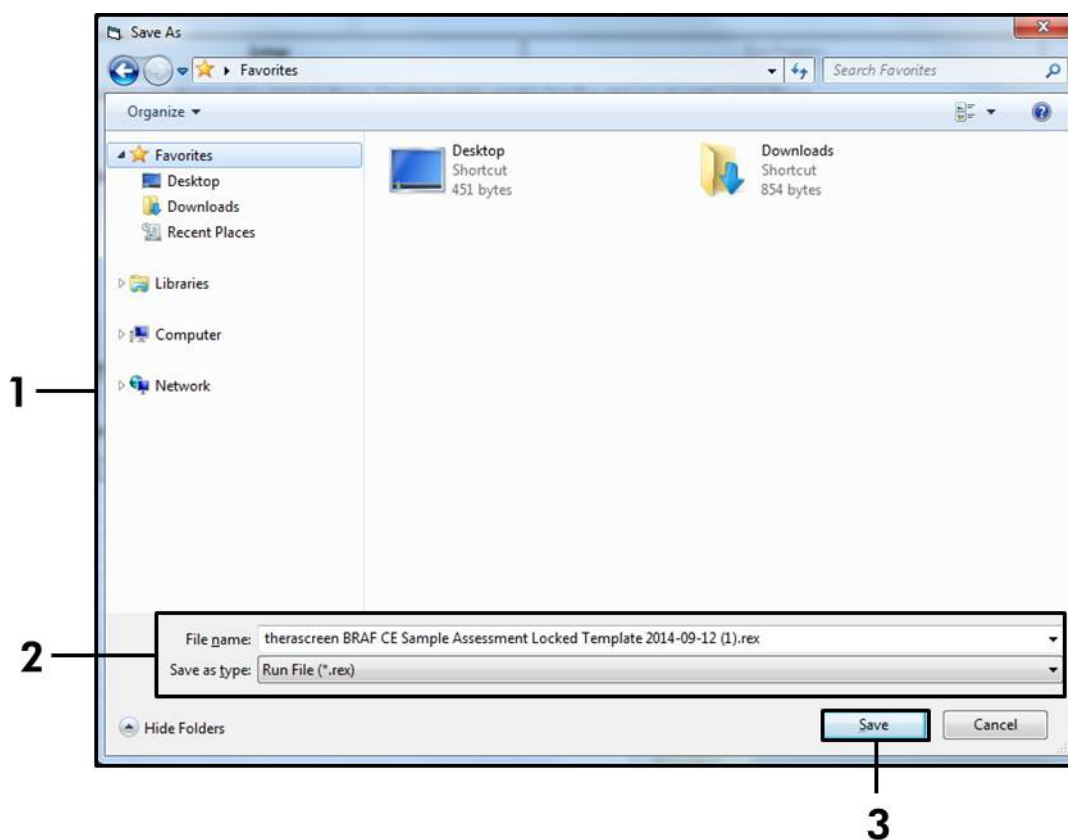
13. Når alle prøvenavnene er lagt inn, kontrollerer du at de er riktige. Legg om nødvendig til eventuell tilleggsinformasjon i feltet "Notes" (Notater), og klikk på knappen "Start Run" (Start analyse) (figur 6).

**Merk:** Hvis en rotorposisjon er tom, vises en "Warning" (Advarsel) (figur 6) for å minne brukeren på at alle ubrukte posisjoner i rotoren må fylles med et tomt rør med lokk. Kontroller at alle rotorposisjoner er fylt med et tomt rør med lokk, og klikk på "OK" for å fortsette.



Figur 6. Feltet "Notes" (Notater) (1), knappen "Start Run" (Start analyse) (2) og "Warning" (Advarsel) om ubrukte rotorposisjoner (3).

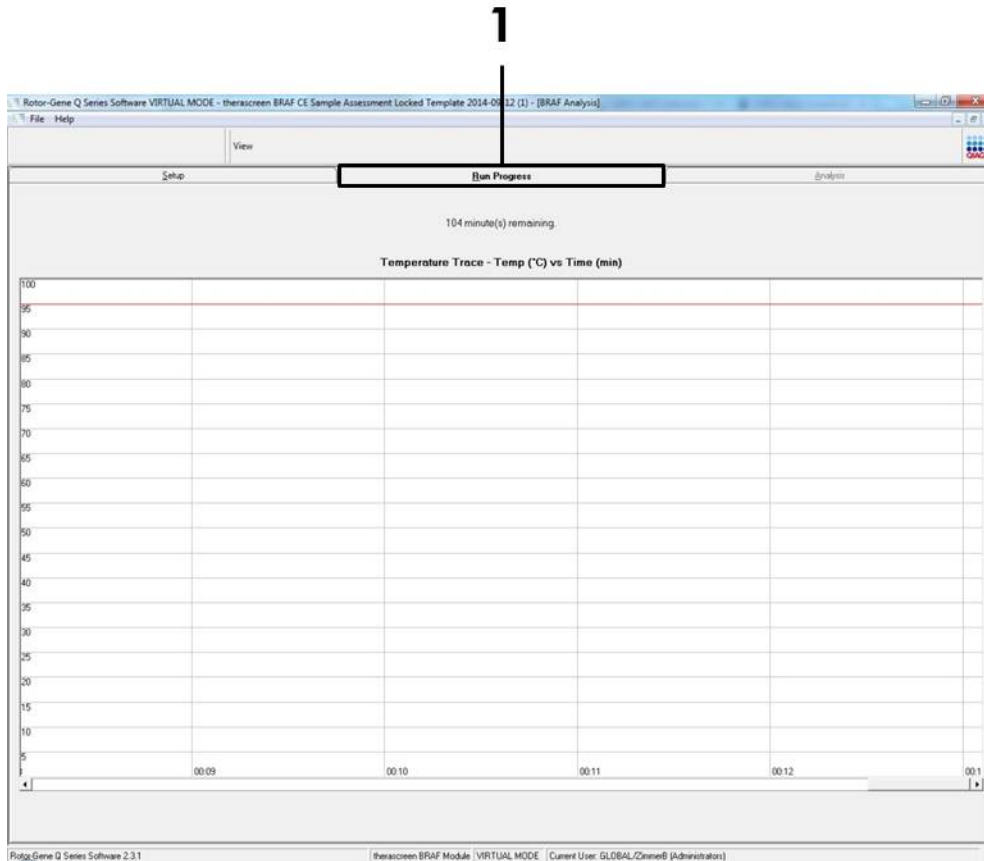
14. Vinduet "Save As" (Lagre som) vises. Velg et relevant filnavn, og lagre PCR-analysen som en \*.rex-analysefil på ønsket sted ved å klikke på knappen "Save" (Lagre) (figur 7).



**Figur 7. Lagring av analysefilen.** (1 = vinduet "Save As" (Lagre som), 2 = feltene "File Name" (Filnavn) og "Save as type" (Lagre som type), 3 = knappen "Save" (Lagre).)

## 15. PCR-analysen starter.

**Merk:** Når analyseserien starter, åpnes fanen "Run Progress" (Analysefremdrift) automatisk for å vise temperaturregistrering og resterende analyseringstid (figur 8).

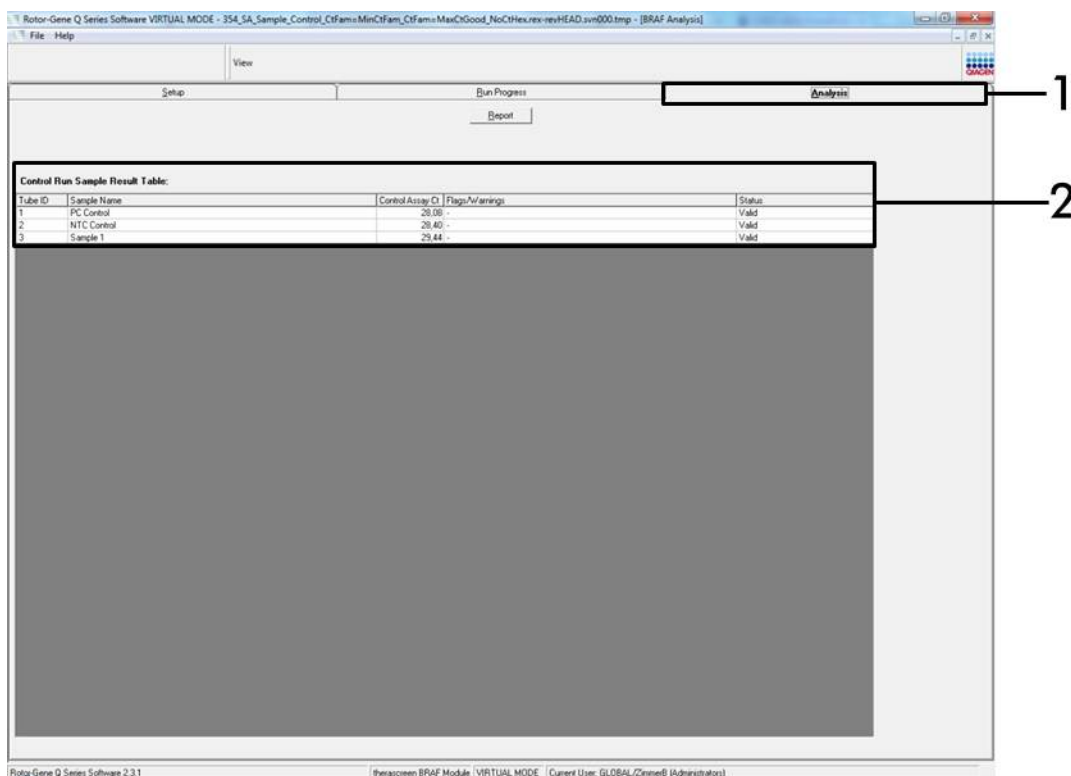


Figur 8. Fanen "Run Progress" (Analysefremdrift).

## 16. Når analysen er ferdig, åpnes fanen "Analysis" (Analyse) automatisk.

**Merk:** Hvis fanen "Analysis" (Analyse) ikke åpnes av seg selv, klikker du på fanen "Analysis" (Analyse) (figur 9).

**Merk:** Du finner en beskrivelse av beregningsmetoden i avsnittet "Tolkning av resultater", side 38.



**Figur 9. Fanen "Analysis" (Analyse) og rapportering av resultater.** (1 = Fanen "Analysis" (Analyse), 2 = "Sample Result Table" (Tabell for prøveresultater).)

## 17. Kontrollresultater rapporteres som vist i "Sample QC Result Table" (Tabell for prøvekontrollresultater) (figur 9).

- **Analysekontroller (PC og NTC, henholdsvis rørposisjon 1 og 2).** Hvis resultatene er innenfor akseptable områder, vil "Valid" (Gyldig) vises. Hvis ikke vises resultatet "Invalid" (Ugyldig).
- **Prøvekontrollreaksjon- $C_T > 32,00$  vil vise "Invalid" (Ugyldig).** Kvantitet av DNA er ikke tilstrekkelig for mutasjonsanalyse. Test prøven på nytt. Hvis kvantiteten av DNA fortsatt er utilstrekkelig, må du ekstrahere mer tumorvev hvis det lar seg gjøre (se "Feilsøkningsveiledning" på side 39).
- **Prøvekontrollreaksjon- $C_T < 21,95$  vil vise "Invalid" (Ugyldig).** DNA-konsentrasjon er for høy for mutasjonsanalyse. Fortynn med nukleasefritt vann til fortyning (Dil.) og test på nytt. Fortynn til en  $C_T$  på 21,95–32,00. En 1:1-fortynning øker  $C_T$ -verdien med ca. 1,0.

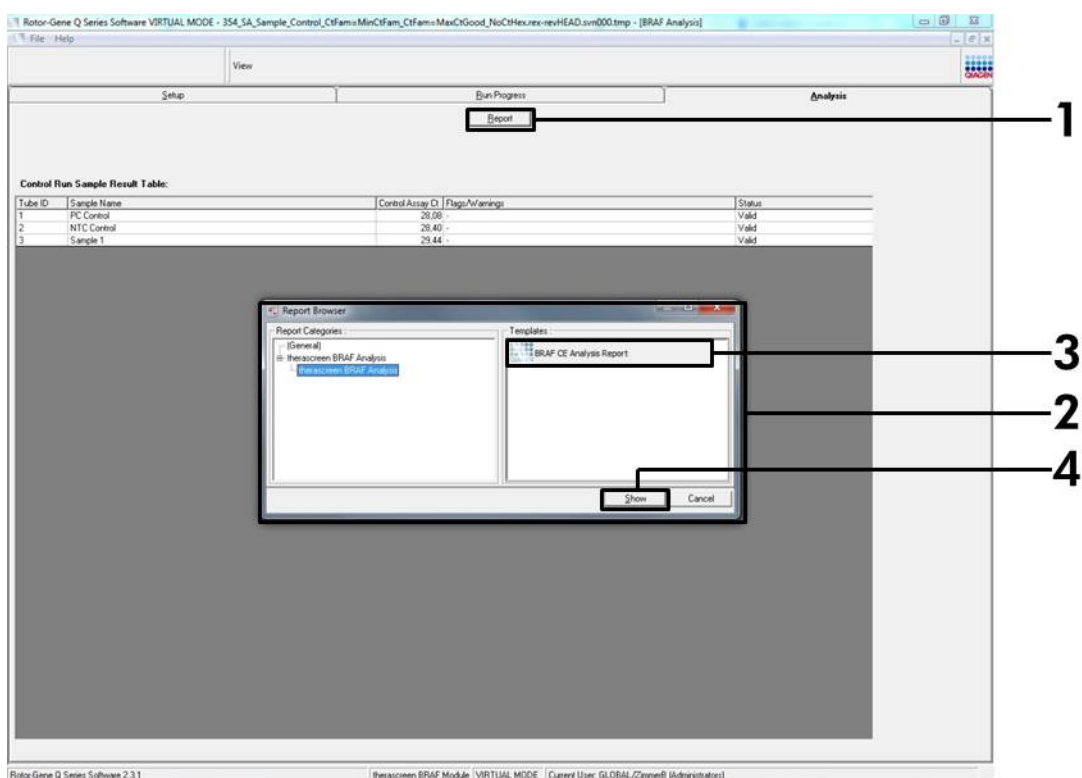


- **Prøvekontrollreaksjon  $C_T$  med 21,95–32,00 ( $21,95 \leq \text{kontroll } C_T \leq 32,00$ ) vil vise "Valid" (Gyldig).** DNA-konsentrasjonen er egnet for mutasjonsanalyse.

**Merk:** Hvis du blir nødt til å ekstrahere eller fortynne mer, må kontrollreaksjonen gjentas for å bekrefte at DNA-konsentrasjonen er egnet for bruk.

- 18. Rapportfiler kan genereres ved å klikke på knappen "Report" (Rapport). Vinduet "Report Browser" (Rapportfunksjon) vises. Velg "BRAF CE Analysis Report" (BRAF CE analyserapport) under "Templates" (Templater), og klikk på knappen "Show" (Vis) (figur 10).**

**Merk:** Rapporter kan lagres på et annet sted i Web Archive-format ved å klikke på knappen "Save As" (Lagre som) øverst til venstre i hver rapport.



**Figur 10. Velg "BRAF CE Analysis Report" (BRAF CE-analyserapport).** (1 = knappen "Report" (Rapport), 2 = "Report Browser" (Rapportleser), 3 = "BRAF CE Analysis Report" (BRAF CE-analyserapport), 4 = knappen "Show" (Vis).)

## Protokoll: Deteksjon av BRAF-mutasjon

Denne protokollen gjelder deteksjon av BRAF-mutasjoner. Så snart en prøve har bestått prøvevurderingen, kan den testes med BRAF-mutasjonsanalysene ved hjelp av automatisert programvare.

**Merk:** Les mer om manuell mutasjonsdeteksjon i "Vedlegg I: Manuell protokoll for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett", side 55.

### Viktige punkter før du starter

- Les "Generelle forholdsregler" på side 11 før du starter prosedyren.
- Ta deg god tid til å bli kjent med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet før du starter protokollen. Se instrumentets bruksanvisning.
- Ikke vorteks *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) eller andre blandinger som inneholder *Taq* DNA-polymerase, da dette kan forårsake inaktivering av enzymet.
- For å få en effektiv bruk av *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet, må prøvene deles inn i batcher på minst 6. Mindre batchstørrelser innebærer at færre prøver kan testes med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet.
- Pipetter *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) ved å plassere pipettespissen rett under væskeoverflaten for å unngå at spissen dekkes av overskytende enzym.

### Dette må du gjøre før du starter

- Kontroller at *therascreen* BRAF Assay Package-programvaren er installert før Rotor-Gene Q-instrumentet tas i bruk første gang (se "Vedlegg I: Manuell protokoll for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett", side 55).
- Før bruk må alle reagenser tines i minst én time i romtemperatur (15–25 °C), blandes ved å snu rørene 10 ganger, og sentrifugeres en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.
- Kontroller at *Taq* DNA-polymerase (*Taq*) holder romtemperatur (15–25 °C) før hver bruk. Sentrifuger røret en kort stund for å samle enzymet i bunnen av røret.

### Prosedyre

1. **Tin reaksjonsblandingerne, vann for ikke-templatkontroll (NTC) og BRAF positiv kontroll (PC) ved romtemperatur (15–25 °C) i minst én time. Når reagensene er tint, skal de blandes ved å vende hvert rør 10 ganger for å unngå lokale konsentrasjoner av salter. Sentrifuger deretter rørene en kort stund for å samle innholdet nederst i røret.**

2. Klargjør egnede blandinger av Master Mix (reaksjonsblanding pluss Taq DNA-polymerase [Taq]) for DNA-prøvene, en positiv kontrollreaksjon og en ikke-templatkontrollreaksjon i henhold til mengdene som er angitt i tabell 3. Inkluder reagenser for 1 prøve, slik at det vil være nok til PCR-oppsettet.

Master Mix inneholder alle komponentene som er nødvendige for PCR, unntatt prøven.

**Tabell 3. Klargjøring av Master Mix for analyse\***

Analyse	Reaksjonsblandingsvolum	Mengde Taq DNA-polymerase (Taq)
Kontroll	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 = antall reaksjoner (prøver pluss kontroller). Når Master Mix skal klargjøres, må du klargjøre nok til én ekstra prøve (n+1) for å ha nok til PCR-oppsettet.

3. Bland Master Mix grundig (ved å pipettere forsiktig opp og ned 10 ganger). Plasser riktig antall remser med rør i lasteblokken i henhold til oppsettet i figur 11. Tilsett 20 µl Master Mix umiddelbart til hvert PCR-rør (følger ikke med).

La lokkene ligge i plastbeholderen til de skal brukes.

Analyse	Kontroller		Prøvenummer						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Kontroll	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

**Figur 11. Oppsett av kontroll- og mutasjonsanalyser i lasteblokken.** Tallene angir plassering i lasteblokken og indikerer endelig rotorposisjon.

4. Tilsett 5 µl vann umiddelbart for ikke-templatkontrollen (NTC) til ikke-templatkontrollens PCR-rør (PCR-rør nr. 9–13), og sett lokk på rørene. Tilsett 5 µl av hver prøve til prøverørene (PCR-rør nr. 17–21, 25–29, 33–37, 41–45, 49–53, 57–61 og 65–69), og sett lokk på rørene. Tilsett 5 µl BRAF positiv kontroll (PC) til rørene med positiv kontroll (PCR-rør nr. 1–5), og sett lokk på rørene. Hver DNA-prøve må kontrolleres med både kontrollen og alle mutasjonsanalysene.

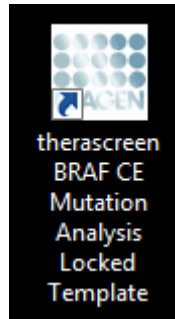
Merk lokkene på rørene, slik at de viser hvilken retning rørene skal settes inn i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.

5. Når det er satt lokk på alle PCR-rørene, ser du over at rørene er fylt, for å sikre at prøven er tilsatt alle rørene.
6. Vend alle PCR-rørene (4 ganger) for å blande prøvene og reaksjonsblandingene.
7. Plasser remsene med PCR-rør i de aktuelle posisjonene i rotoren med 72 brønner (figur 11).

Maks. 7 prøver kan inkluderes i hver PCR-analyse. Hvis rotoren ikke er fullsatt, må alle tomme posisjoner i rotoren fylles med et tomt rør med påsatt lokk.

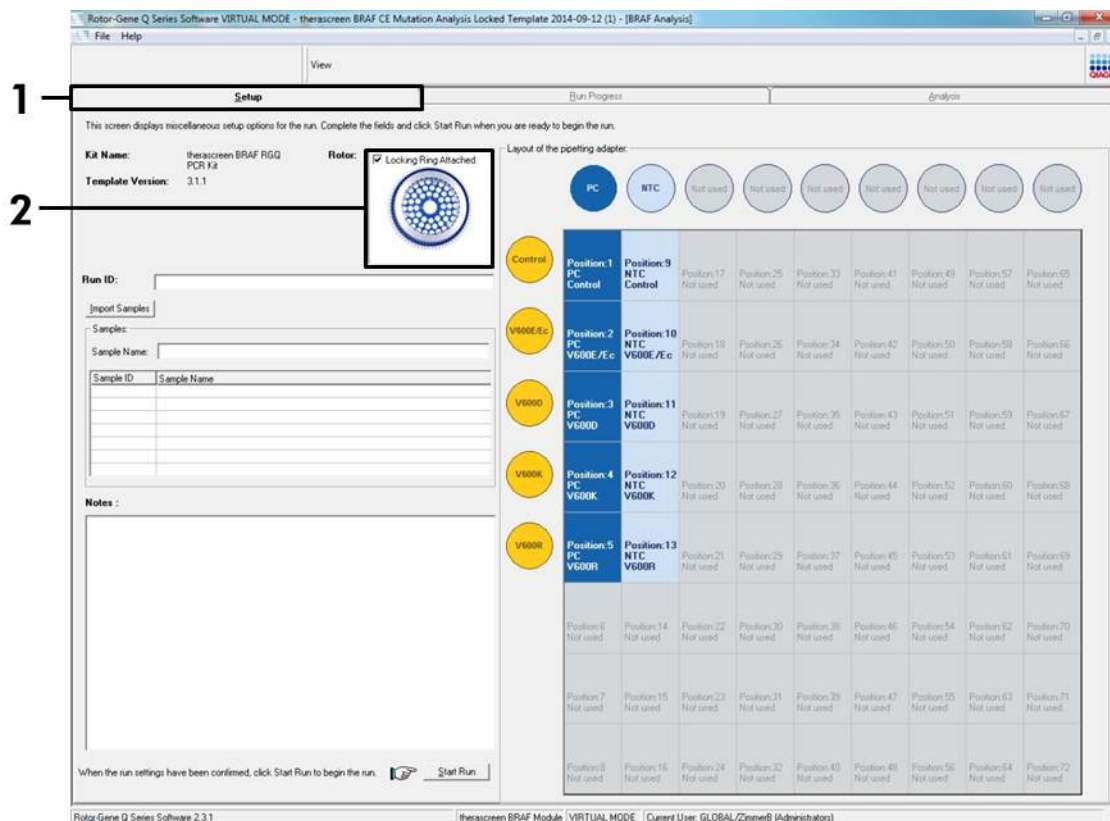
8. Sett umiddelbart rotoren med 72 brønner inn i Rotor-Gene Q MDx-instrumentet. Se til at låseringen (tilbehør til Rotor-Gene Q-instrumentet) er plassert øverst på rotoren for å sikre rørene under analyseringen.

- Start Rotor-Gene Q-programvaren og åpne samtidig templatet ved å dobbeltklikke på ikonet "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" (therascreen BRAF CE-mutasjonsanalyse med låst templat) på skrivebordet på datamaskinen som er koblet til Rotor-Gene Q-instrumentet (figur 12).



Figur 12. Ikonet "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" (therascreen BRAF CE-mutasjonsanalyse med låst templat).

- Fanen "Setup" (Oppsett) vises som standard (figur 13). Kontroller at låseringen er forsvarlig festet, og merk av i boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet). Lukk lokket på Rotor-Gene Q-instrumentet.



Figur 13. Fanen "Setup" (Oppsett) (1) og boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet) (2).

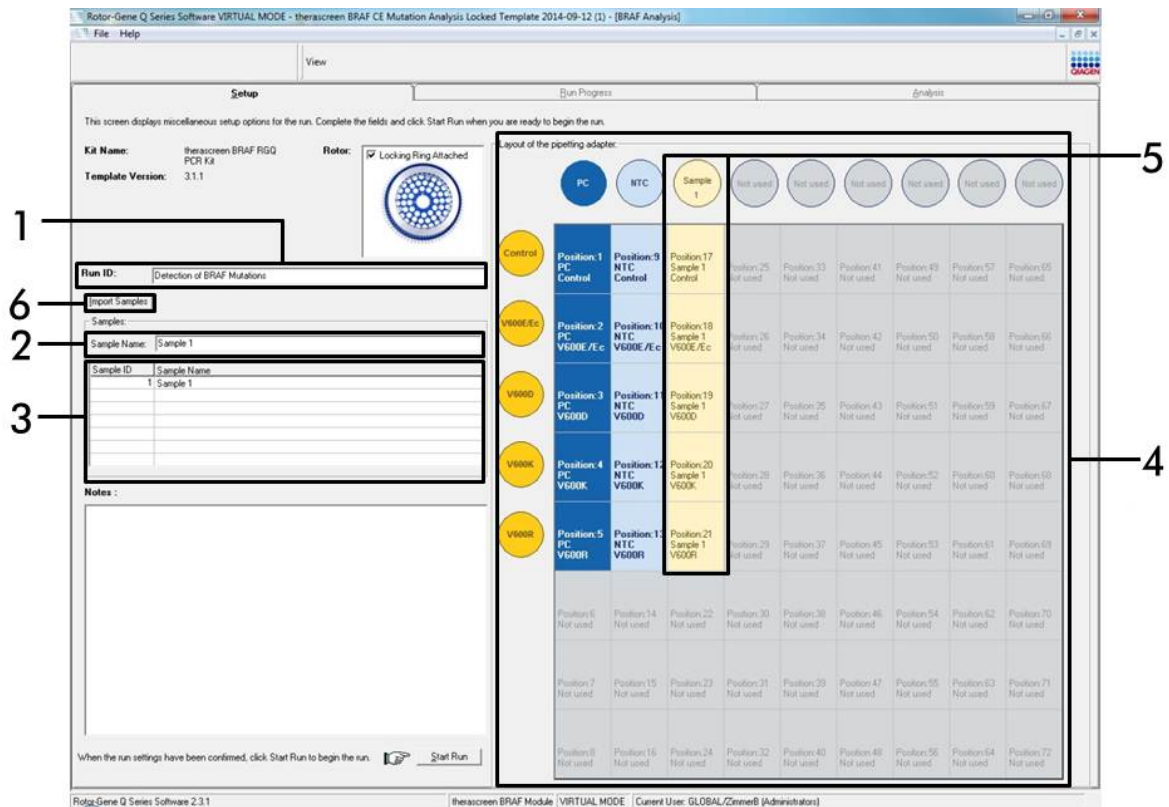
11. Legg inn analyse-ID i feltet "Run ID" (Analyse-ID) i henhold til de lokale navnereglene. Legg inn prøvenavnet i feltet "Sample Name" (Prøvenavn) i henhold til de lokale navnereglene, og trykk på returtasten. Prøvenavnet legges til i prøvelisten nedenfor, og prøven tilordnes en "Sample ID" (Prøve-ID) (1, 2, 3 osv.). I tillegg blir feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter) til høyre oppdatert med prøvenavnet (figur 14).

**Merk:** Prøvenavn som lagres i formatet \*.smp (Rotor-Gene Q-prøvefil) eller \*.csv (kommaseparerte verdier), kan alternativt importeres ved hjelp av knappen "Import Samples" (Importer prøver). Prøvenavnene vil bli fylt ut automatisk med denne metoden.

**Merk:** Kontroller i feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter) at det tilføyde prøvenavnet er uthevet og vises i en annen farge, og at alle analyser i kolonnen under prøvesirkelen er uthevet (figur 14).

**Merk:** Du kan legge til maks. 7 prøver. Prøve-ID-ene (i prøvesirklene) tilordnes automatisk fra 1 til 7.

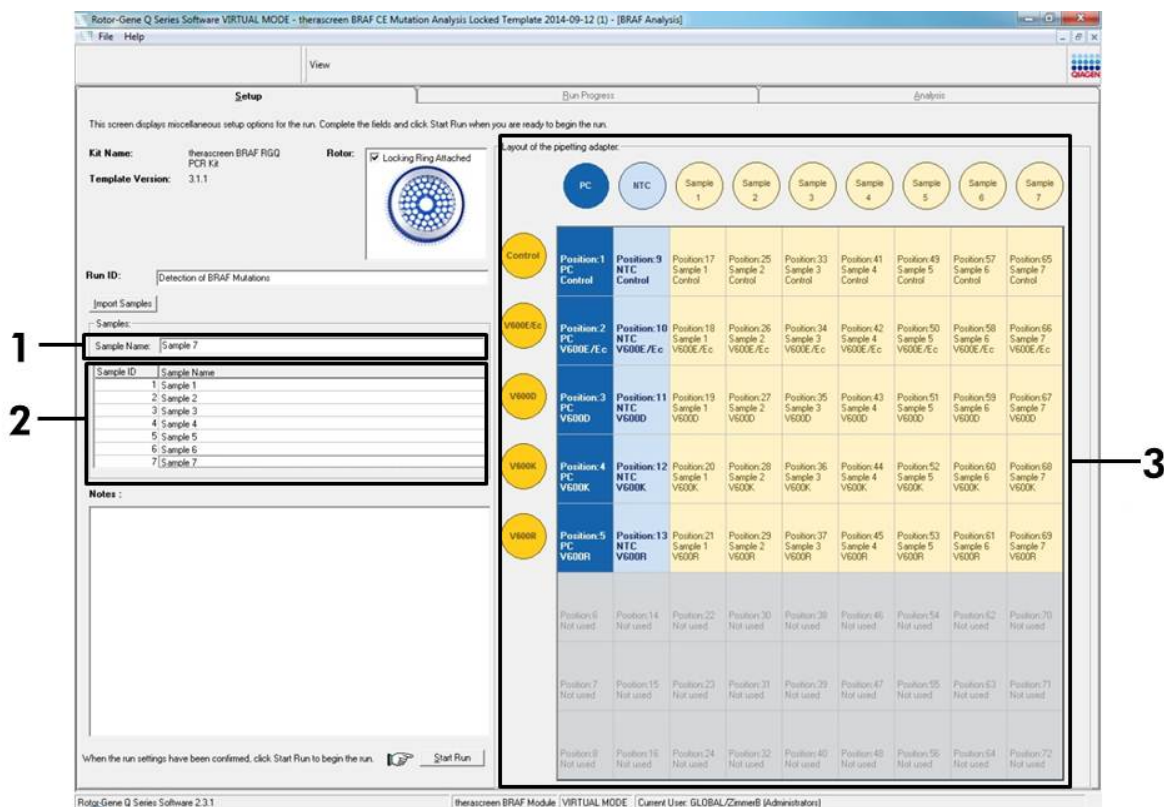
**Merk:** Hvis prøvenavn har mer enn 8 tegn, er det ikke alltid hele navnet vises i feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter).



**Figur 14. Inntasting av "Run ID" (Analyse-ID) og "Sample Name" (Prøvenavn).** (1 = feltet "Run ID" (Analyse-ID), 2 = "Sample Name" (Prøvenavn), 3 = prøveliste, 4 = feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter) 5 = uthevet prøvesirkel og kolonnen med 5 analyser under feltet, 6 = knappen "Import Samples" (Importer prøver).)

## 12. Gjenta trinn 11 for å legge inn navnene på alle ytterligere prøver (figur 15).

**Merk:** Når du skal redigere et prøvenavn, klikker du på "Sample Name" (Prøvenavn) i prøvelisten. Den valgte prøven vises i feltet "Sample Name" (Prøvenavn) ovenfor. Rediger prøvenavnet i henhold til lokale navneregler, og trykk på returtasten for å oppdatere navnet.

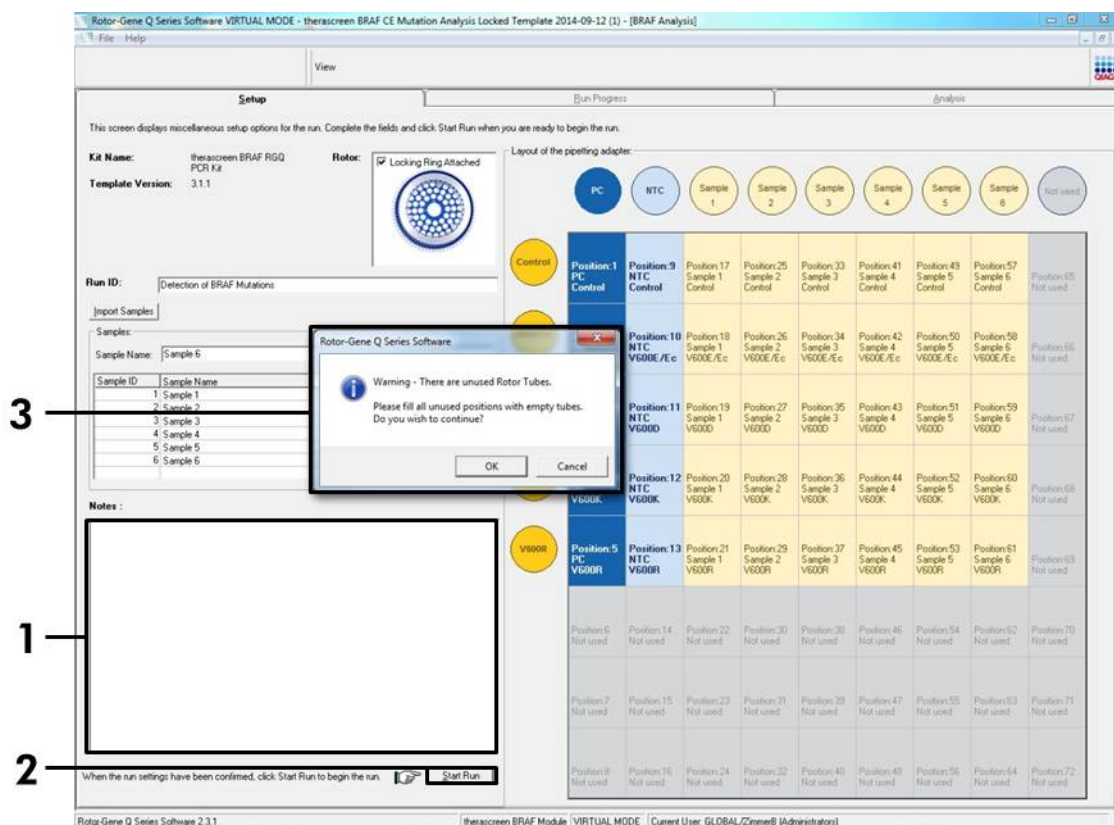


**Figur 15.** Inntasting av ytterligere prøvenavn i feltet "Sample Name" (Prøvenavn). (1 = feltet "Sample Name" (Prøvenavn), 2 = prøveliste, 3 = feltet "Layout of the pipetting adapter" (Oppsett for pipetteringsadapter).)



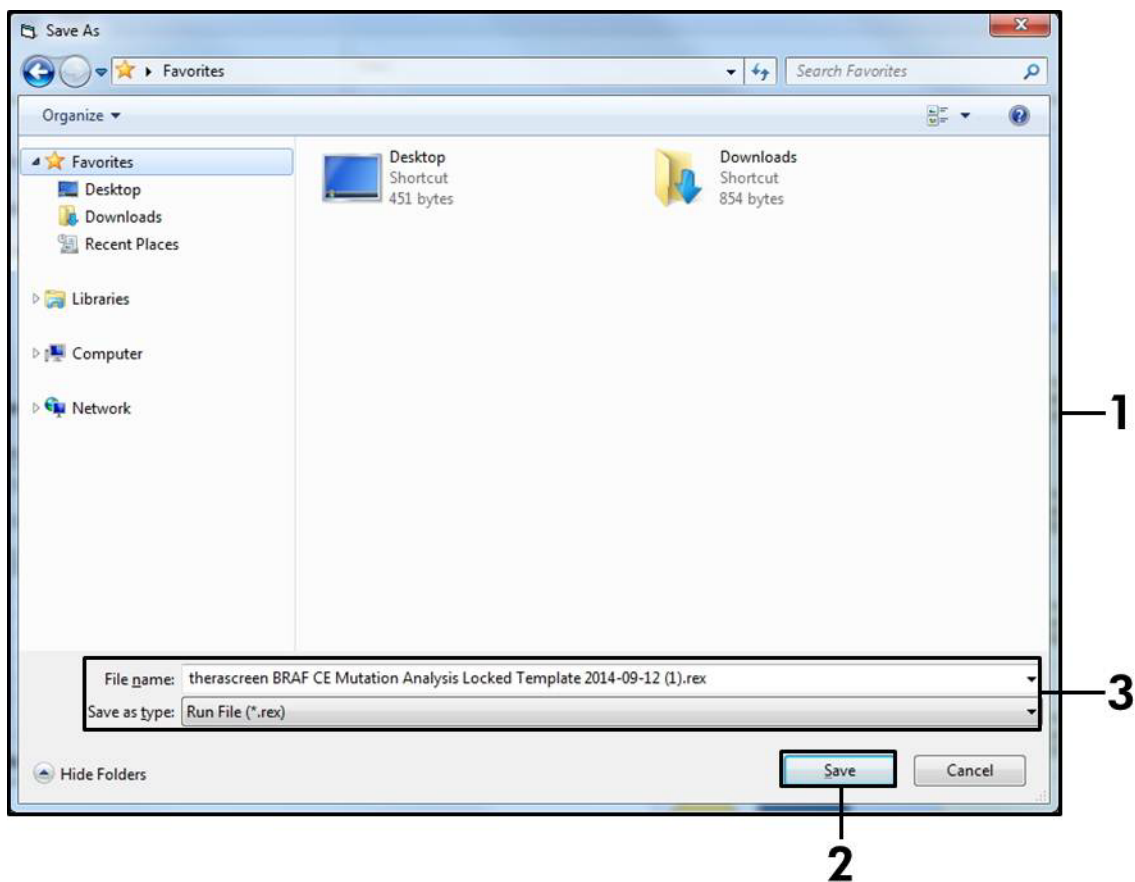
13. Når alle prøvenavnene er lagt inn, kontrollerer du at de er riktige. Legg om nødvendig til eventuell tilleggsinformasjon i feltet "Notes" (Notater), og klikk på knappen "Start Run" (Start analyse) (figur 16).

**Merk:** Hvis en rotorposisjon er tom, vises en "Warning" (Advarsel) (figur 16) for å minne brukeren på at alle ubrukte posisjoner i rotoren må fylles med et tomt rør med lokk. Kontroller at alle rotorposisjoner er fylt med et tomt rør med lokk, og klikk på "OK" for å fortsette.



Figur 16. Feltet "Notes" (Notater) (1), knappen "Start Run" (Start analyse) (2) og "Warning" (Advarsel) om ubrukte rotorposisjoner (3).

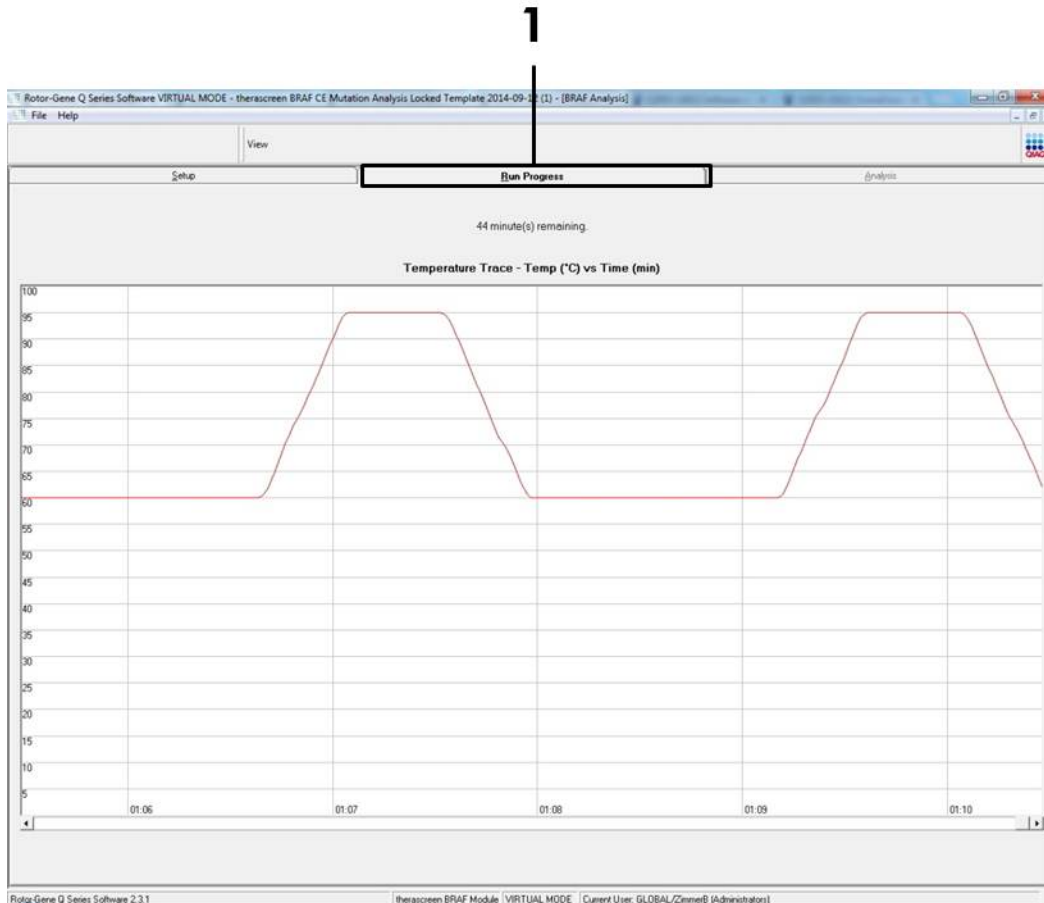
14. Vinduet "Save As" (Lagre som) vises. Velg et relevant filnavn, og lagre PCR-analysen som en \*.rex-analysefil på ønsket sted (figur 17).



**Figur 17. Lagring av analysefilen.** (1 = vinduet "Save As" (Lagre som), 2 = feltene "File Name" (Filnavn) og "Save as type" (Lagre som type), 3 = knappen "Save" (Lagre).)

## 15. PCR-analysen starter.

**Merk:** Når analyseserien starter, åpnes fanen "Run Progress" (Analysefremdrift) automatisk for å vise temperaturregistrering og resterende analyseringstid (figur 18).



Figur 18. Fanen "Run Progress" (Analysefremdrift) (1).

## 16. Når analysen er ferdig, åpnes fanen "Analysis" (Analyse) automatisk.

**Merk:** Hvis fanen "Analysis" (Analyse) ikke åpnes av seg selv, klikker du på fanen "Analysis" (Analyse) (figur 19).

**Merk:** Du finner en beskrivelse av beregningsmetoden i avsnittet "Tolkning av resultater", side 38.

Rotor Position	Assay	Control	Flags/Warnings	Positive Control Status
1	Control	-	-	Valid
2	V600E/Ec	-	-	Valid
3	V600D	-	-	Valid
4	V600K	-	-	Valid
5	V600R	-	-	Valid

Rotor Position	Assay	NTC	Internal Control	Flags/Warnings	Negative Control Status
9	Control	Valid	Valid	-	Valid
10	V600E/Ec	Valid	Valid	-	Valid
11	V600D	Valid	Valid	-	Valid
12	V600K	Valid	Valid	-	Valid
13	V600R	Valid	Valid	-	Valid

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, V600R	SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID, SAMPLE_MUTATION_EARLY_DELTA_CT	Mutation Detected

**Figur 19. Fanen "Analysis" (Analyse) og rapportering av resultater.** (1 = fanen "Analysis" (Analyse), 2 = feltet "Run Controls, Positive Control" (Analysekontroller, positiv kontroll), 3 = feltet "Run Controls, Negative Control" (Analysekontroller, negativ kontroll), 4 = feltet "Sample Result Table" (Tabell for prøveresultater), 5 = feltet "Mutation Status" (Mutasjonsstatus).)

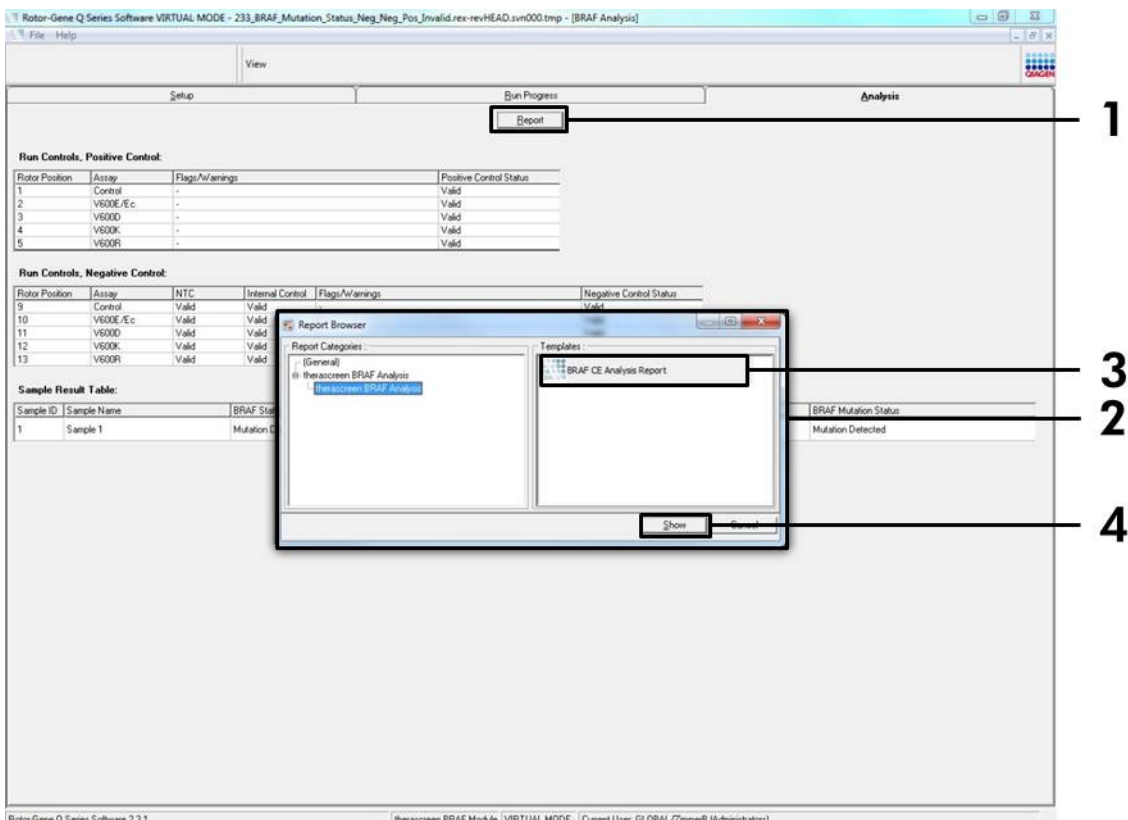
## 17. Analyseresultater rapporteres som følger (figur 19):

- **Feltet "Run Controls, Positive Control" (Analysekontroller, positiv kontroll).** Hvis resultatene er innenfor akseptable områder, vil "Positive Control Status" (Positiv kontrollstatus) vise "Valid" (Gyldig). Hvis ikke, vises "Invalid" (Ugyldig).
- **Feltet "Run Controls, Negative Control" (Analysekontroller, negativ kontroll).** Hvis både "NTC" og "Internal Control" (Internkontroll) er innenfor akseptable områder, vil "Negative Control Status" (Negativ kontrollstatus) vise "Valid" (Gyldig). Hvis ikke, vises "Invalid" (Ugyldig).

- **Feltet "Sample Result Table" (Tabell for prøveresultater).** For mutasjonspositive prøver rapporteres spesifikke mutasjoner under kolonnen "BRAF Mutation Status" (BRAF mutasjonsstatus).

**18. Rapportfiler kan genereres ved å klikke på knappen "Report" (Rapport).** Vinduet "Report Browser" (Rapportfunksjon) vises. Velg "BRAF CE Analysis Report" (BRAF CE analyserapport) under "Templates" (Templater), og klikk på knappen "Show" (Vis) (figur 20).

**Merk:** Rapporter kan lagres på et annet sted i Web Archive-format ved å klikke på knappen "Save As" (Lagre som) øverst til venstre i hver rapport.



**Figur 20. Velg "BRAF CE Analysis Report" (BRAF CE-analyserapport).** (1 = knappen "Report" (Rapport), 2 = feltet "Report Browser" (Rapportleser), 3 = knappen "BRAF CE Analysis Report" (BRAF CE-analyserapport), 4 = knappen "Show" (Vis).)

## Tolkning av resultater (automatisk)

Tolkning av analyse- og mutasjonsfunn foretas automatisk av *therascreen* BRAF Assay Package med en gang en analysering er fullført. Følgende informasjon beskriver hvordan *therascreen* BRAF Assay Package tolker analyse- og mutasjonsfunn.

**Merk:** Les mer om manuell analyse i "Vedlegg I: Manuell protokoll for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett", side 55.

PCR-syklusen der fluorescensen fra en bestemt reaksjon krysser en terskelverdi, defineres som  $C_T$ -verdien.  $C_T$ -verdier indikerer kvantiteten av spesifikt input-DNA. Lave  $C_T$ -verdier indikerer høyere input-DNA-nivåer, og høye  $C_T$ -verdier indikerer lavere input-DNA-nivåer. Reaksjoner med en  $C_T$ -verdi klassifiseres som positiv amplifikasjon.

Rotor-Gene Q-programvaren interpolerer fluorescenssignaler mellom to hvilke som helst registrerte verdier.  $C_T$ -verdiene kan derfor være ethvert reelt tall (ikke begrenset til heltall) innenfor området 0 til 40.

Terskelverdiene for de grønne og gule kanalene i *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er satt til henholdsvis 0,15 og 0,05 relative fluorescenseenheter. Disse verdiene konfigureres automatisk i *therascreen* BRAF-analysepakken.

Analysekontrollene (positiv kontroll, NTC og internkontroller) vurderes for å sikre at det oppnås akseptable  $C_T$ -verdier og at reaksjonene fungerer som de skal.

$\Delta C_T$ -verdier for prøver beregnes for hver mutasjonsanalyse med ligningen:

$$\Delta C_T = [\text{mutasjonsanalyse-}C_T\text{-verdi}] - [\text{kontrollanalyse-}C_T\text{-verdi}]$$

Prøver klassifiseres som mutasjonspositive hvis de gir en  $\Delta C_T$  som er mindre enn eller lik cutoff- $\Delta C_T$ -verdien for prøven. Over denne verdien kan prøven enten inneholde mindre enn den mutasjonsprosenten som kan detekteres av *therascreen* BRAF RGQ PCR Kit (utenfor analysenes grense), eller prøven kan være mutasjonsnegativ, noe som vil bli rapportert som "No Mutation Detected" (Ingen mutasjon detektert).

Ingen amplifikasjon i mutasjonsreaksjoner vil bli registrert som "No Mutation Detected" (Ingen mutasjon detektert).  $\Delta C_T$ -verdier beregnet fra bakgrunnsamplifikasjon forventes å være større enn cutoff- $\Delta C_T$ -verdiene, og prøven vil bli klassifisert som "No Mutation Detected" (Ingen mutasjon detektert).

Analyseresultatene vises som "Mutation Detected" (Mutasjon detektert), "No Mutation Detected" (Ingen mutasjon detektert), "Invalid" (Ugyldig) eller, hvis en analysekontroll mislykkes, "Run Control Failed" (Analysekontroll mislyktes). For de mutasjonspositive prøvene vil spesifikke mutasjoner bli rapportert i henhold til kryssreaktivitetslogikken i "Tabell 8. Få frem prøvemutasjonsstatus" på side 50.

Andre mulige resultater kan vises som beskrevet i "Protokoll: Prøvevurdering" på side 15, "Protokoll: Deteksjon av BRAF-mutasjon" på side 26 og "Flagg i theascreen BRAF Assay Package" på side 40 i denne håndboken.

En tumor vil sjelden inneholde mer enn én mutasjon. I slike tilfeller viser rapporten BRAF-statusen som "Mutation Detected" (Mutasjon detektert), men alle positive mutasjoner vil vises sammen med varselflagget "SAMPLE\_POSITIVE\_AND\_UNCLASSIFIABLE" (Prøve positiv og ikke klassifiserbar).

## Feilsøkningsveiledning

Denne feilsøkningsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Forskerne ved QIAGENs tekniske avdelinger er alltid klare til å svare på eventuelle spørsmål, enten det dreier seg om innholdet og protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (du finner kontaktinformasjon bak på omslaget eller ved å gå til [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Kommentarer og forslag

---

#### Ugyldige resultater

- |   |   |
|---|---|
| a) Oppbevaringsforholdene for én eller flere komponenter stemte ikke overens med instruksjonene i "Oppbevaring og håndtering av reagenser", side 12 | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se etiketten) til boksen, og bruk om nødvendig et nytt sett.                                     |
| b) <i>therascreen</i> BRAF CE RGQ PCR-settet er utløpt på dato  | Kontroller oppbevaringsforholdene og utløpsdatoen (se settetiketten) til boksen, og bruk om nødvendig et nytt <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-sett. |

## Flagg i *therascreen* BRAF Assay Package

Tabell 4 viser en liste over flagg som kan genereres av *therascreen* BRAF Assay Package, hva de betyr, og hvilke tiltak som skal iverksettes.

Tabell 4. Flagg i *therascreen* BRAF Assay Package

Flagg	Betydning	Tiltak
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR-analyse ugyldig – FAM C <sub>T</sub> utenfor område for positiv kontroll i kontrollreaksjon.	Gjenta hele PCR-analysen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	PCR-analyse ugyldig – Fluorescensdata i positiv kontroll (kontrollreaksjon) kan ikke tolkes.	Gjenta hele PCR-analysen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	PCR-analyse ugyldig – FAM C <sub>T</sub> utenfor område for en eller flere mutasjonsreaksjoner.	Gjenta hele PCR-analysen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR-analyse ugyldig – Fluorescensdata i positiv kontroll (mutasjonsreaksjon) kan ikke tolkes.	Gjenta hele PCR-analysen.
NTC_INVALID_DATA	PCR-analyse ugyldig – Fluorescensdata i negativ kontroll kan ikke tolkes.	Gjenta hele PCR-analysen.
NTC_ASSAY_CT_INVALID	PCR-analyse ugyldig – FAM ugyldig (mindre enn grense) for negativ kontroll.	Gjenta hele PCR-analysen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR-analyse ugyldig – Internkontroll over område for negativ kontroll.	Gjenta hele PCR-analysen.

Tabellen fortsetter på neste side.



**Tabell 4. Forts.**

<b>Flagg</b>	<b>Betydning</b>	<b>Tiltak</b>
NTC_INT_CTRL_ EARLY_CT	PCR-analyse ugyldig – Internkontroll under område for negativ kontroll.	Gjenta hele PCR-analysen.
SAMPLE_CTRL_ INVALID_DATA	Prøve ugyldig – Fluorescensdata i prøvekontroll kan ikke tolkes.	Sett opp ny PCR-analyse for å gjenta den eller de relevante prøvene.
SAMPLE_CTRL_ HIGH_CONC	Prøve ugyldig – FAM C <sub>T</sub> for lav i prøvekontroll.	Fortynn prøven for å øke kontroll-C <sub>T</sub> -verdien. Denne fortynningen skal beregnes ut fra forutsetningen om at 1:1- fortynning med vannet i settet vil øke C <sub>T</sub> med 1,0. Når prøven er fortynnet, må ny PCR-analyse settes opp for å gjenta prøve.
SAMPLE_CTRL_ LOW_CONC	Gyldig prøve – Lav konsentrasjon i prøvekontroll (advarsel, ikke feil).	Ingen tiltak.
SAMPLE_CTRL_FAIL	Prøve ugyldig – FAM C <sub>T</sub> for høy i prøvekontrollreaksjon.	Sett opp ny PCR-analyse for å gjenta prøve. Hvis prøven er ugyldig etter gjentatt PCR-analyse, må prøven ekstraheres fra ett eller flere nye FFPE-snitt. Sett opp ny PCR-analyse for å teste ny ekstraksjon. Hvis den er ugyldig, skal denne andre ekstraksjonen gjentas. Hvis prøven ikke gir et gyldig resultat etter denne analysen, gis prøven en ubestemt mutasjonsstatus, og det skal ikke utføres ytterligere testing.

Tabellen fortsetter på neste side.

**Tabell 4. Forts.**

<b>Flagg</b>	<b>Betydning</b>	<b>Tiltak</b>
SAMPLE_CTRL_ INT_CTRL_EARLY_ CT	Prøve ugyldig – HEX C <sub>T</sub> for lav for prøve (internkontroll).	Sett opp ny PCR-analyse for å gjenta prøve. Hvis prøven er ugyldig etter gjentatt PCR- analyse, må prøven ekstraheres fra ett eller flere nye FFPE-snitt. Sett opp ny PCR-analyse for å teste ny ekstraksjon. Hvis den er ugyldig, skal denne andre ekstraksjonen gjentas. Hvis prøven ikke gir et gyldig resultat etter denne analysen, gis prøven en ubestemt mutasjonsstatus, og det skal ikke utføres ytterligere testing.
SAMPLE_CTRL_ INT_CTRL_FAIL	C <sub>T</sub> for høy (eller ingen C <sub>T</sub> ) for intern kontroll (HEX), og C <sub>T</sub> for høy (eller ingen C <sub>T</sub> ) for kontrollanalysen (FAM).	Sett opp ny PCR-analyse for å gjenta prøve. Hvis prøven er ugyldig etter gjentatt PCR- analyse, må prøven ekstraheres fra ett eller flere nye FFPE-snitt. Sett opp ny PCR-analyse for å teste ny ekstraksjon. Hvis den er ugyldig, skal denne andre ekstraksjonen gjentas. Hvis prøven ikke gir et gyldig resultat etter denne analysen, gis prøven en ubestemt mutasjonsstatus, og det skal ikke utføres ytterligere testing.

Tabellen fortsetter på neste side.

**Tabell 4. Forts.**

<b>Flagg</b>	<b>Betydning</b>	<b>Tiltak</b>
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C <sub>T</sub> for høy (eller ingen C <sub>T</sub> ) for intern kontroll (HEX), og ingen C <sub>T</sub> for mutasjonsanalysen (FAM).	<p>Hvis prøven gir status for mutasjon detektert – ingen tiltak.</p> <p>Hvis prøven gir ugyldig status, må ny PCR-analyse kjøres for å gjenta prøven.</p> <p>Merk: Hvis det oppstår feil ved bruk av intern kontroll pga. PCR-hemming, kan en fortykning av prøven redusere effekten av hemmerne, men det er viktig å merke seg at dette også vil fortynne mål-DNA-et. Et rør med vann til fortykning (Dil.) er inkludert i settet.</p> <p>Hvis prøven er ugyldig etter gjentatt PCR-analyse, må prøven ekstraheres fra ett eller flere nye FFPE-snitt. Sett opp ny PCR-analyse for å teste ny ekstraksjon. Hvis den er ugyldig, skal denne andre ekstraksjonen gjentas. Hvis prøven ikke gir et gyldig resultat etter denne analysen, gis prøven en ubestemt mutasjonsstatus, og det skal ikke utføres ytterligere testing.</p>

Tabellen fortsetter på neste side.

**Tabell 4. Forts.**

<b>Flagg</b>	<b>Betydning</b>	<b>Tiltak</b>
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	Mutasjonsrør ugyldig – C <sub>T</sub> HEX for lav for prøve (internkontroll).	<p>Hvis prøven gir gyldig status for mutasjon detektert – ingen tiltak.</p> <p>Hvis prøven gir ugyldig status, må ny PCR-analyse kjøres for å gjenta prøven. Hvis prøven er ugyldig etter gjentatt PCR-analyse, må prøven ekstraheres fra ett eller flere nye FFPE-snitt. Sett opp ny PCR-analyse for å teste ny ekstraksjon. Hvis den er ugyldig, skal denne andre ekstraksjonen gjentas. Hvis prøven ikke gir et gyldig resultat etter denne analysen, gis prøven en ubestemt mutasjonsstatus, og det skal ikke utføres ytterligere testing.</p>
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutasjonsrør ugyldig – Fluorescensdata i internkontroll kan ikke tolkes.	<p>Hvis prøven gir gyldig status for mutasjon detektert – ingen tiltak.</p> <p>Hvis prøven gir ugyldig status, må ny PCR-analyse kjøres for å gjenta prøven. Hvis prøven er ugyldig etter gjentatt PCR-analyse, må prøven ekstraheres fra ett eller flere nye FFPE-snitt. Sett opp ny PCR-analyse for å teste ny ekstraksjon. Hvis den er ugyldig, skal denne andre ekstraksjonen gjentas. Hvis prøven ikke gir et gyldig resultat etter denne analysen, gis prøven en ubestemt mutasjonsstatus, og det skal ikke utføres ytterligere testing.</p>

Tabellen fortsetter på neste side.

**Tabell 4. Forts.**

<b>Flagg</b>	<b>Betydning</b>	<b>Tiltak</b>
SAMPLE_ MUTATION_ EARLY_DELTA_CT	Mutasjonsrør ugyldig – C <sub>T</sub> FAM for lav for prøve.	Hvis prøven gir gyldig status for mutasjon detektert – ingen tiltak.  Hvis prøven gir ugyldig status, må ny PCR-analyse kjøres for å gjenta prøven. Hvis prøven er ugyldig etter gjentatt PCR-analyse, må prøven ekstraheres fra ett eller flere nye FFPE-snitt. Sett opp ny PCR-analyse for å teste ny ekstraksjon. Hvis den er ugyldig, skal denne andre ekstraksjonen gjentas. Hvis prøven ikke gir et gyldig resultat etter denne analysen, gis prøven en ubestemt mutasjonsstatus, og det skal ikke utføres ytterligere testing.

Tabellen fortsetter på neste side.

**Tabell 4. Forts.**

<b>Flagg</b>	<b>Betydning</b>	<b>Tiltak</b>
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	<p>Gyldig resultat – Et eller flere mutasjonsrør for en prøve er gyldig(e) og positiv(e), samtidig som en eller flere mutasjoner for samme prøve er ugyldig(e) (advarsel, ikke en feil).</p> <p>Prøven kalles for mutasjon detektert pga. tilstedeværelsen av en mutasjon. Den spesifikke mutasjonen som er vist på rapporten, vil kanskje ikke representere den faktiske mutasjonen som er til stede, pga. analysenes kryssreaktivitet. Derfor merkes prøven med mutasjon detektert.</p>	Ingen tiltak.
SAMPLE_POSITIVE_AND_UNCLASSIFIABLE	<p>Gyldig resultat – Mer enn ett mutasjonsrør er gyldig for samme prøve. Kombinasjonen er ikke kompatibel med de forventede mønstrene for kryssreaktivitet. Se tabell 8. Selv om det er sjelden, kan prøven inneholde mer enn én mutasjon.</p>	Ingen tiltak.

## Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringsystem, testes hvert parti med *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

## Begrensninger

Resultatene fra dette produktet må tolkes i sammenheng med alle relevante kliniske og laboratoriemessige funn og ikke brukes som eneste grunnlag for diagnose.

Det ble utført valideringsstudier med humant DNA ekstrahert fra formalinfikserte og parafinlagrede tumorprøver og syntetiske standarder egnet for hver enkelt studie.

Produktet er validert med QIAamp DNA FFPE-vevssett fra QIAGEN.

Produktet skal kun brukes på Rotor-Gene Q MDx-instrumenter

Håndboken til *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet må følges nøyaktig for å få mest mulig optimale resultater. Fortynning av reagenser som ikke er beskrevet i denne håndboken, anbefales ikke og vil påvirke ytelsen.

Det er viktig av prøvens DNA-mengde og DNA-kvalitet vurderes før prøven analyseres med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet. Ekstra kontrollblanding følger med, slik at du kan vurdere om  $C_T$ -verdien kan godkjennes for analysen. Absorbansavlesninger må ikke brukes, da de ikke samsvarer med  $C_T$ -verdier i fragmenterte DNA-prøver.

Vær spesielt oppmerksom på utløpsdatoene og oppbevaringsbetingelsene angitt på komponentenes esker og etiketter. Bruk ikke komponenter som er gått ut på dato eller oppbevart feil.

## Ytelseskarakteristikker

### Blank grense (LOB), arbeidsområde og cutoff-verdier

Totalt 143 FFPE-prøver ble testet i en studie ved hjelp av retningslinjer i NCCLS EP17-A (2004) for å bestemme verdiene for blank grense (LOB) og cutoff for hver mutasjonsanalyse. I tillegg ble arbeidsområdet for kontrollanalysen bestemt. Cutoff-verdiene ble etablert og er vist i tabell 5.

**Tabell 5. Etablerte cutoff-verdier for hver mutasjonsanalyse**

	Mutantanalyse ( $\Delta C_T$ )			
	V600E/Ec	V600D	V600K	V600R
Cutoff ( $\Delta C_T$ )	$\leq 7,0$	$\leq 6,9$	$\leq 6,0$	$\leq 7,0$

Området for kontrollreaksjon  $C_T$  ble satt til 21,95 til 32,00  $C_T$ .

Cutoff-verdiene for analysen og arbeidsområdet ble validert med standarder og ytterligere (unike) 102 FFPE-prøver. Under valideringen blir cutoff-verdiene vurdert for muligheten til å skille mellom riktig mutasjon i bakgrunn av villtype-DNA ved å vurdere hver analyse med genomisk DNA med høy input og mutasjon med høy input (se "Kryssreaktivitet", på side 50). Effekten av input-DNA på mutasjonsfunnet ble også vurdert (se "Effekt av input-DNA på  $\Delta C_T$ -verdier", på side 49).

## Nøyaktighet: Sammenligning med analytisk referansem metode

En studie viste overensstemmelse i mutasjonsstatus i *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet i forhold til toveis Sanger-sekvensering. I denne studien ble 126 FFPE-prøver testet ved hjelp av statistiske målinger av overenskomst/ikke-overenskomst angitt i veiledningen for CLSI EP12-A2 (2008). Bare 102 av FFPE-prøvene hadde gyldige resultater for både *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet og toveis Sanger-sekvensering. Pyrosequencing<sup>®</sup> ble brukt til å bekrefte mutasjonsstatus der prøvemutasjonsstatusfunnet ikke var samsvarende mellom toveis Sanger-sekvensering og *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet.

Tabell 6 viser overensstemmelsesanalysen mellom *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet og sekvensering.

**Tabell 6. Samsvarsanalyse**

	Overensstemmelsesmål	Frekvens (%)
Score	Generell overensstemmelse	96,08
	Positiv overensstemmelse	100,00
	Negativ overensstemmelse	95,29

Frekvensen av negativ overensstemmelse skyldes mutasjonsdeteksjon for 4 prøver som ble funnet villtype ved sekvensering og V600E/Ec mutasjonspositiv av *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet. Dette skyldes økt sensitivitet for Scorpions- og ARMS-teknologi.



## Effekt av input-DNA på $\Delta C_T$ -verdier

Effekten av totale nivåer av input-DNA ved bestemmelse av mutasjonsstatus med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet ble vurdert som en del av studien for validering av analysens cutoff-verdier og arbeidsområde. Dette ble gjort for å bekrefte at mutasjonsfunn generert av *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er konsekvent på ulike DNA-input-nivåer over arbeidsområdet.

Mutasjonsstandarder som inneholder mutasjon med høy, middels og lav prosentandel (henholdsvis 100 %, 50 % og 3 × LOD %) i en bakgrunn med villtype-DNA ble klargjort ved høye, middels høye og lave DNA-input-nivåer. Derfor ble totalt 9 mutasjonsstandarder testet for hver mutasjonsanalyse. Resultatene for alle analyser er vist i tabell 7.

De estimerte forskjellene i gjennomsnittlig  $\Delta C_T$  mellom hvert par med DNA-input-nivåer, estimert fra lineær regresjonsanalyse, er alle innenfor  $\pm 1 C_T$ . Alle 4 mutasjonsanalyser ble derfor vurdert å være ekvivalente ved høye, middels høye og lave nivåer av DNA-input.

**Tabell 7. Estimerte forskjeller mellom DNA-input-nivåer**

Analyse	Parameter (DNA-input-nivå)	Estimert forskjell ( $\Delta C_T$ )	95 % konfidensintervall (lavere, høyere)
V600E (E)	Høy – middels	0,56	0,22; 0,90
V600E (E)	Lav – middels	0,01	-0,33; 0,35
V600E (Ec)	Høy – middels	0,48	0,12; 0,84
V600E (Ec)	Lav – middels	0,26	-0,10; 0,62
V600D	Høy – middels	-0,32	-0,58; -0,06
V600D	Lav – middels	-0,43	-0,69; -0,17
V600K	Høy – middels	0,10	-0,10; 0,30
V600K	Lav – middels	-0,33	-0,53; -0,13
V600R	Høy – middels	-0,12	-0,28; 0,04
V600R	Lav – middels	-0,62	-0,78; -0,46

## Kryssreaktivitet

Standarder med DNA med høy input og høyt mutasjonsinnhold (100 %) ble testet for å vurdere potensiell kryssreaktivitet for hver analyse. Kryssreaktivitet-resultater gjorde det mulig å compilere en logikktabell for mutasjonstatus som vist i tabell 8. BRAF CE-analysepakken bruker kryssreaktivitetslogikk til å bestemme mutasjonsstatus.

**Tabell 8. Få frem prøvemutasjonsstatus**

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutasjonsstatus
Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	V600E- eller V600Ec-positiv
Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	V600Ec- eller V600K-positiv
Positiv	Positiv	Negativ	Negativ	V600D-positiv
Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	V600D-positiv
Negativ	Negativ	Positiv	Negativ	V600K-positiv
Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	V600R-positiv

## Deteksjonsgrense (LOD)-verdier

Det ble utført en studie for å bestemme deteksjonsgrensen for hver av de 4 mutasjonsspesifikke reaksjonene som er innlemmet i *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet. I denne studien ble deteksjonsgrensen angitt som laveste mengde mutant DNA i en bakgrunn av villtype-DNA der en mutant prøve vil gi mutasjonspositive resultater i 95 % av testresultatene ( $C_{95}$ ).

For å bestemme LOD for hver analyse, ble mutasjonsstandarder med ulik prosent klargjort med en konsentrasjon av middels input-DNA og testet med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet. LOD for hver analyse ble beregnet med logistisk regresjon. LOD for hver analyse kunne bekreftes ved å klargjøre mutasjonsstandarder ved bestemt LOD. Seksti replikater ble testet, og den positive testraten ble verifisert.

Verifisert LOD med middels input-DNA-konsentrasjon er angitt i tabell 9. For DNA-konsentrasjoner med høyere input ble LOD-verdier forventet å være lavere enn verdiene angitt i tabell 9.

**Tabell 9. LOD-verdier for hver mutasjonsanalyse (middels input)**

Analyse (mutasjon)*	LOD C <sub>95</sub> med middels input-DNA (prosent mutant DNA i villtype-DNA)
V600E (E)	1,82 %
V600E (Ec)	4,31 %
V600D	3,19 %
V600K	4,34 %
V600R	4,85 %

\* Deteksjonsgrensen for V600E-analysen ble beregnet for både V600E- og V600Ec-mutasjoner.

## Effekt av melanin på settytelsen

Målet med denne studien var å vurdere hvilken innvirkning melanin, en kjent PCR-hemmer som kan finnes i melanomprøver, kan ha på ytelsen til *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet. Dette ble gjort ved å spike melanin direkte i DNA-prøver før testing med *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet over et område konsentrasjoner (0–250 ng/reaksjon) og vurdere effekten på  $\Delta C_T$ -verdier og mutasjonsstatus til testprøvene.

Resultatene viste at lav melaninkonsentrasjon ikke hadde innvirkning på  $\Delta C_T$  og minimal effekt på  $\Delta C_T$  ved middels melaninkonsentrasjon. Derfor hadde ikke melanin innvirkning på analysens evne til å påvise mutasjon ved lave og middels høye konsentrasjonsnivåer av melanin. Ved 180 ng/reaksjon sviktet internkontrollen og indikerte tilstedeværelse av hemmer, og dermed blir muligheten for å detektere hemmere før mutasjonsfunn berørt.

Melaninkonsentrasjoner som var forventet å forekomme i normal bruk, påvirker ikke evnen til *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet å skille mellom mutasjonspositive og mutasjonsnegative prøver.

Oppsummering av resultater vises i tabell 10.

**Tabell 10. Mengde melanin testet i hver analyse**

Melaninkonsentrasjon (ng/reaksjon)	Endring i ( $\Delta C_T$ )	Internkontrollstatus (bestått/ikke bestått)
0	0	Bestått
60	-0,20	Bestått
100	-0,61	Bestått
150	-1,21	Bestått
180	-2,15	Ikke bestått

## Repeterbarhet

En matrisestudiedesign ble implementert for å variere operatør, dag, plateoppsett og instrument for å bestemme analysepresisjon både i analyseserien og mellom analyseserier. Repeterbarhet ble vist ved lave DNA-input-nivåer ved  $3 \times \text{LOD}$  for mutasjonsanalyser. I tillegg ble prosentandelen for mutasjonspositive funn vurdert for hver analyse når de ble testet med den bestemte mutasjonsstandarden. Hver mutasjonsanalyse ga 100 % positive mutasjonsfunn. Presisjonsverdier er angitt i tabell 11.

## Reproduserbarhet

En matrisestudiedesign ble implementert for å vurdere analysereproduserbarhet ved å teste standarder ved 3 laboratorier (teststeder), med 3 partier med *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett (2 på hvert sted), med henholdsvis 2 operatører og 2 instrumenter per sted, over 4 dager. Reproduserbarhet ble vist ved lavt mutasjonsnivå ( $3 \times \text{LOD}$ ) for mutasjonsanalyser og villtype med lav input for kontrollanalysen. Presisjon for hver analyse ble beregnet for de 3 stedene, i tillegg til 95 % presisjonsestimater (tabell 12).

**Tabell 11. Presisjonsestimater for repeterbarhet**

<b>Analyse</b>	<b>Presisjon (mellom analyse- serier)</b>	<b>95 % konfidens- intervall (lavere, høyere)</b>	<b>Presisjon (innen analyse- serier)</b>	<b>95 % konfidens- intervall (lavere, høyere)</b>
Kontroll	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

**Tabell 12. Presisjonsestimater for reproduserbarhet**

<b>Analyse</b>	<b>Presisjon</b>	<b>95 % konfidensintervall (lavere, høyere)</b>
Kontroll	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

## Symboler



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <24> reaksjoner



Skal brukes innen



Medisinsk utstyr for in vitro-diagnostikk



Katalognummer



Partinummer (lot)



Materialnummer



Komponenter



Innhold



Nummer



Globalt artikkelnummer



Temperaturbegrensninger



Produsent



Se informasjonen i håndboken



Må beskyttes mot sollys



Forsiktig

## Vedlegg I: Manuell protokoll for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett

Denne delen inneholder instruksjoner for bruk av *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet med RGQ-programvareversjon 2.3 i åpen modus (dvs. uten å bruke BRAF-analysepakken).

### Generell informasjon

- Du finner en liste over nødvendige materialer på side 9.
- Du finner fullstendige instruksjoner om prøveklargjøring og prøveoppsett i delen "Protokoll: Prøvevurdering", på side 15, og i delen "Protokoll: Deteksjon av BRAF-mutasjon", på side 26.

### Protokoll: Opprette en temperaturprofil

Det må opprettes en temperaturprofil for BRAF-analysen før du starter. Syklusparameterne er de samme for både prøvevurdering og mutasjonsvurdering.

### Prosedyre

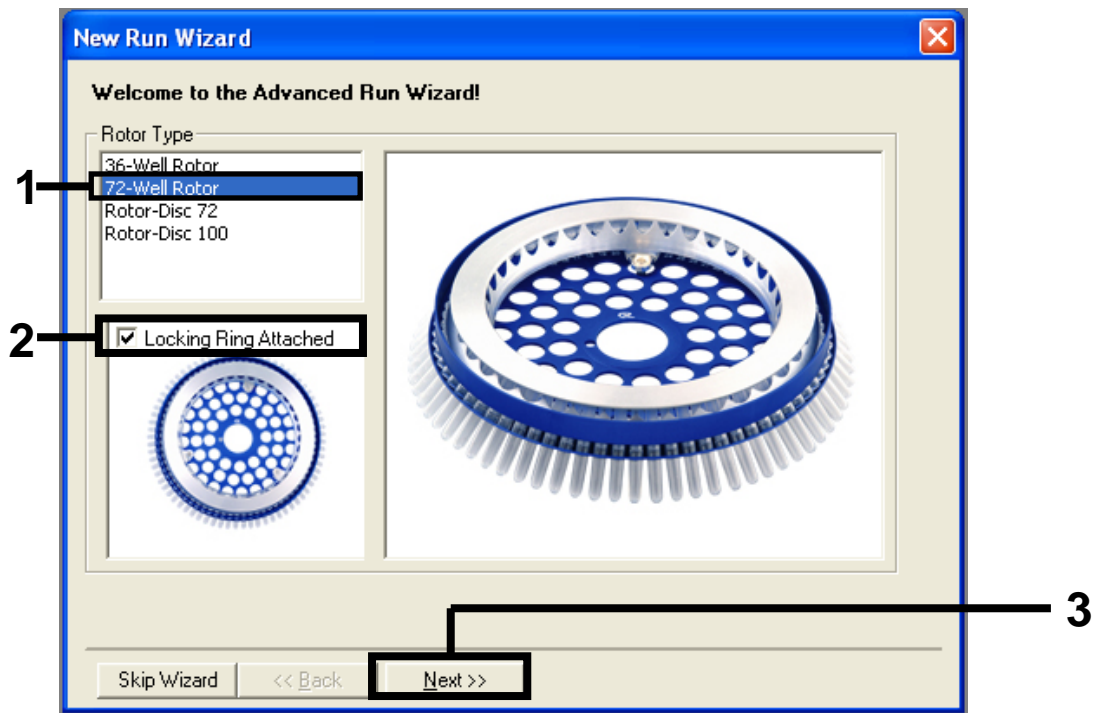
Oppsummert er syklusparameterne som følger:

Tabell 13. Syklusparametere

Sykluser	Temperatur	Klokkeslett	Dataavlesning
1	95 °C	15 minutter	Ingen
40	95 °C	30 sekunder	Ingen
	60 °C	60 sekunder	Grønn og gul

1. **Dobbelklikk på programvareikonet til Rotor-Gene Q-seriens programvareversjon 2.3 på datamaskinens skrivebord som er tilkoblet Rotor-Gene Q MDx-instrumentet.**
2. **Opprett en ny templat ved å velge "Empty Run" (Nullstill analyse), og klikk deretter på "New" (Ny) for å gå inn i "New Run Wizard"(Veiviser for ny analyse).**

3. Velg "72-Well Rotor" (72 brønners rotor) som rotortype. Kontroller at låseringen er festet, og merk av i boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet). Klikk på "Next" (Neste) (figur 21).



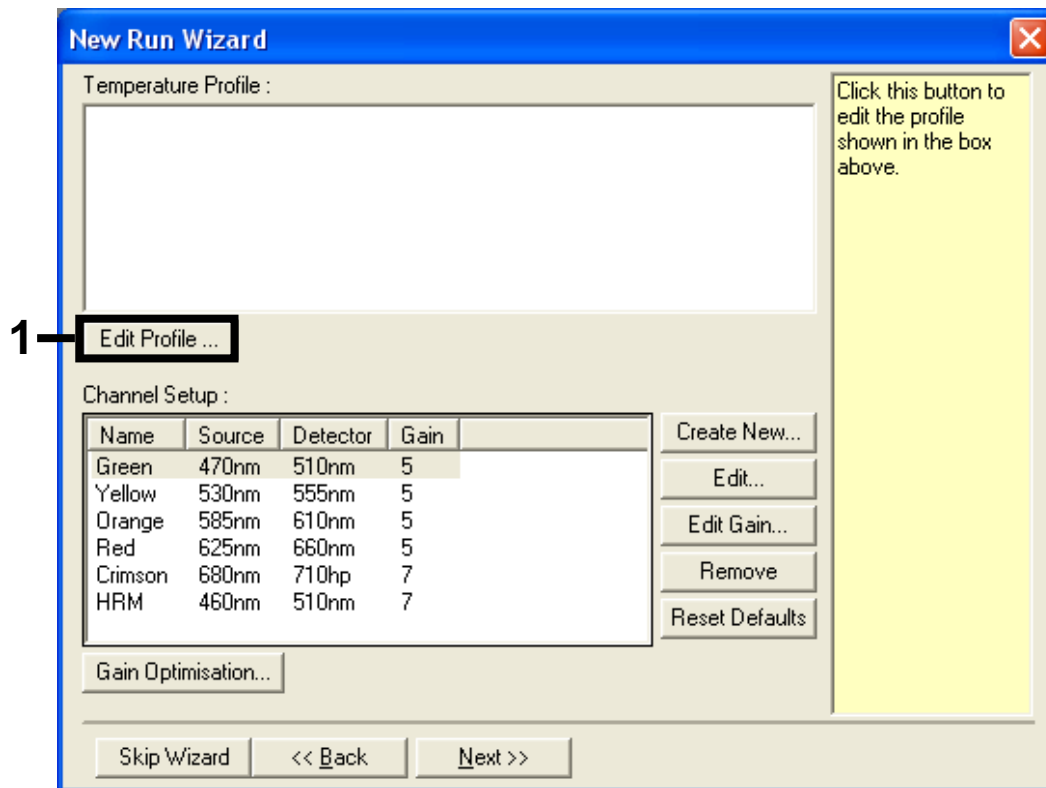
Figur 21. Dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse). (1 = "Rotortype", 2 = boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet), 3 = knappen "Next" (Neste).)



4. Skriv inn navnet på operatøren. Legg til merknader, og legg inn reaksjonsvolumet som 25. Kontroller at det ved siden av "Sample Layout" (Prøveoppsett) står "1, 2, 3...". Klikk på "Next" (Neste) (figur 22).

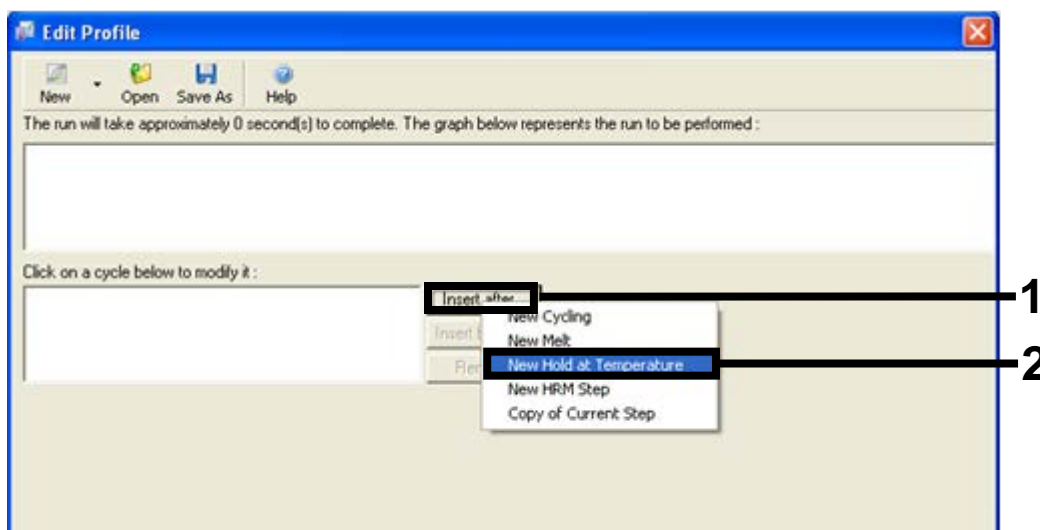
**Figur 22. Innlegging av operatørnavn og reaksjonsmengder.** (1 = feltet "Operator" (Operatør), 2 = feltet "Notes" (Merknader), 3 = feltet "Reaction Volume" (Reaksjonsvolum), 4 = feltet "Sample Layout" (Prøveoppsett), 5 = knappen "Next" (Neste).)

5. Klikk på knappen "Edit Profile" (Rediger profil) i dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse) (figur 23), og kontroller analyseparameterne i henhold til følgende trinn.



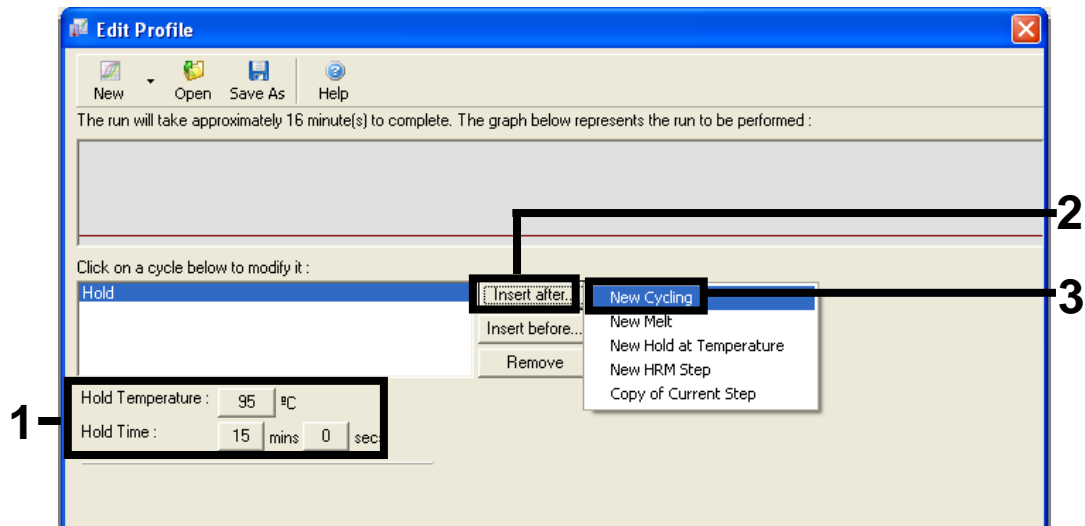
Figur 23. Redigering av profil (1).

6. Klikk på knappen "Insert after" (Sett inn etter) og velg "New Hold at Temperature" (Ny pause ved temperatur) (figur 24).



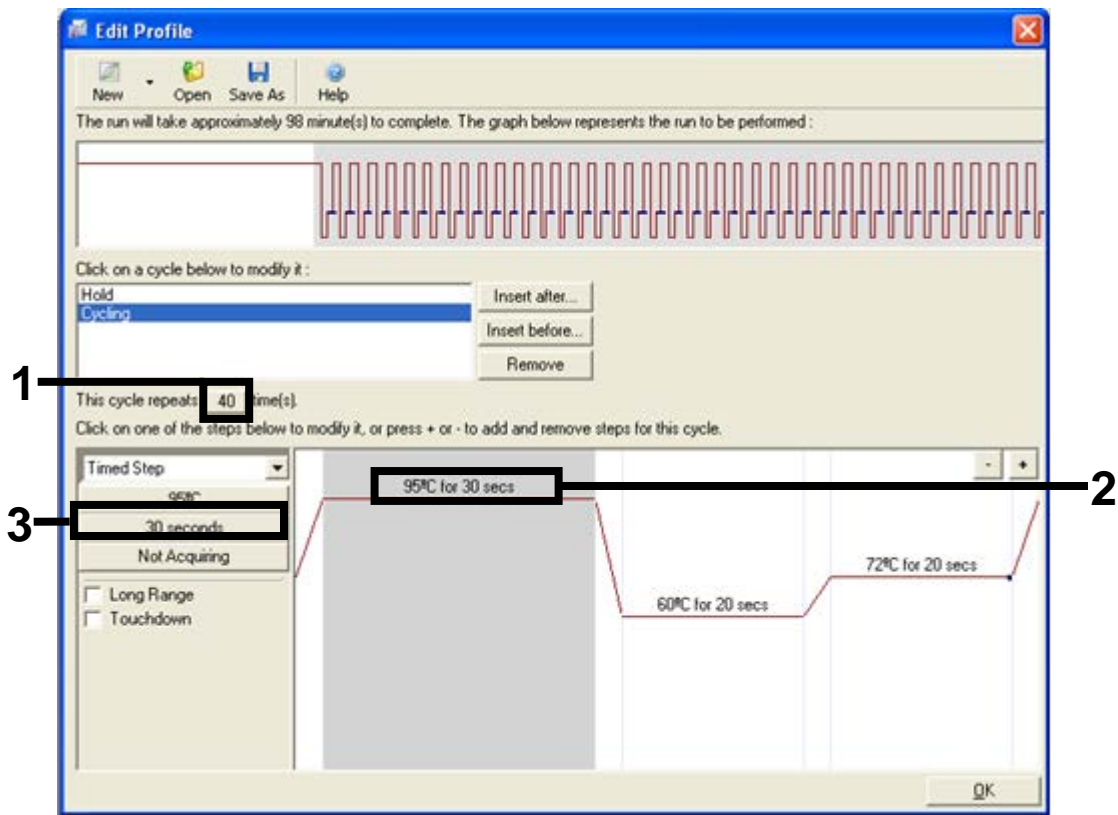
Figur 24. Innsetting av et innledende inkubasjonstrinn. (1 = knappen "Insert after" (Sett inn etter), 2 = "New Hold at Temperature" (Ny pause ved temperatur).)

7. Endre "Hold Temperature" (Pausetemperatur) til 95 °C og "Hold Time" (Pausetid) til "15 mins 0 secs" (15 min i 0 s). Klikk på knappen "Insert after" (Sett inn etter) og velg deretter "New Cycling" (Ny syklus) (figur 25).



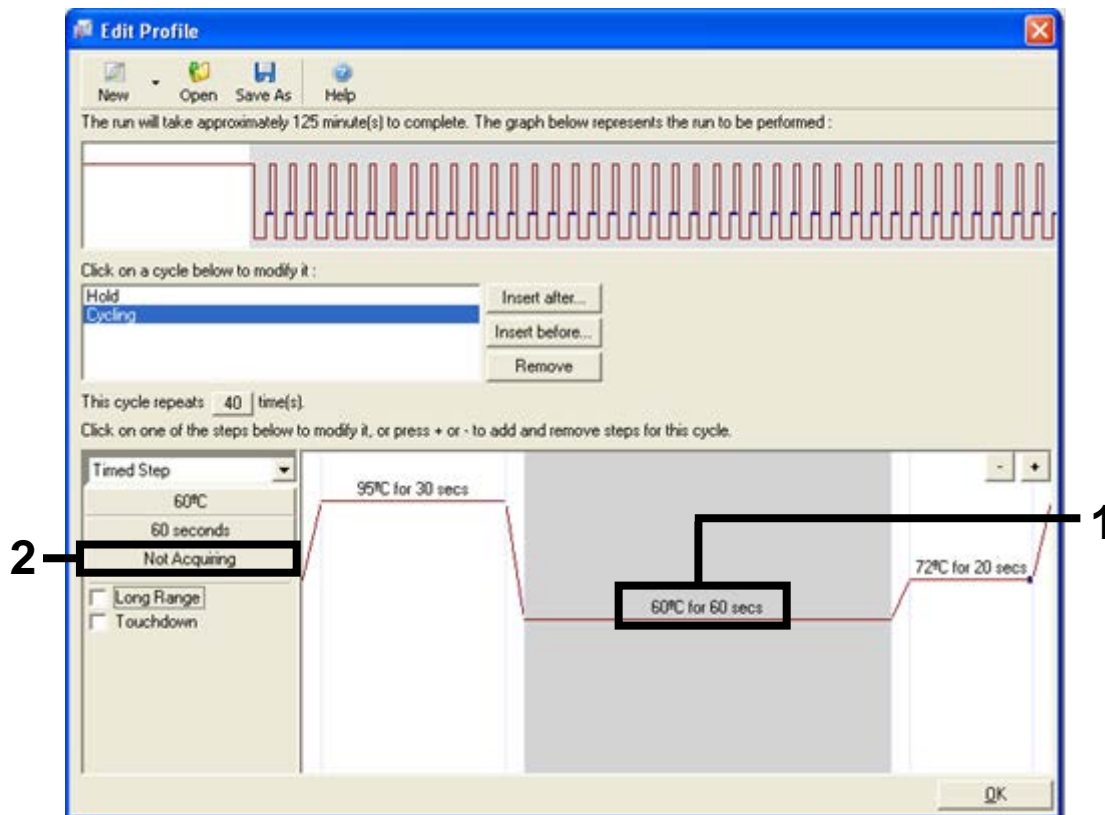
**Figur 25. Innledende inkubasjonstrinn ved 95 °C.** (1 = knappene "Hold Temperature" (Pausetemperatur) og "Hold Time" (Pausetid), 2 = knappen "Insert after" (Sett inn etter), 3 = "New Cycling" (Ny syklus).)

8. Endre antall syklusrepetisjoner til 40. Velg det første trinnet og angi "95°C for 30 secs" (95 °C i 30 s) (figur 26).



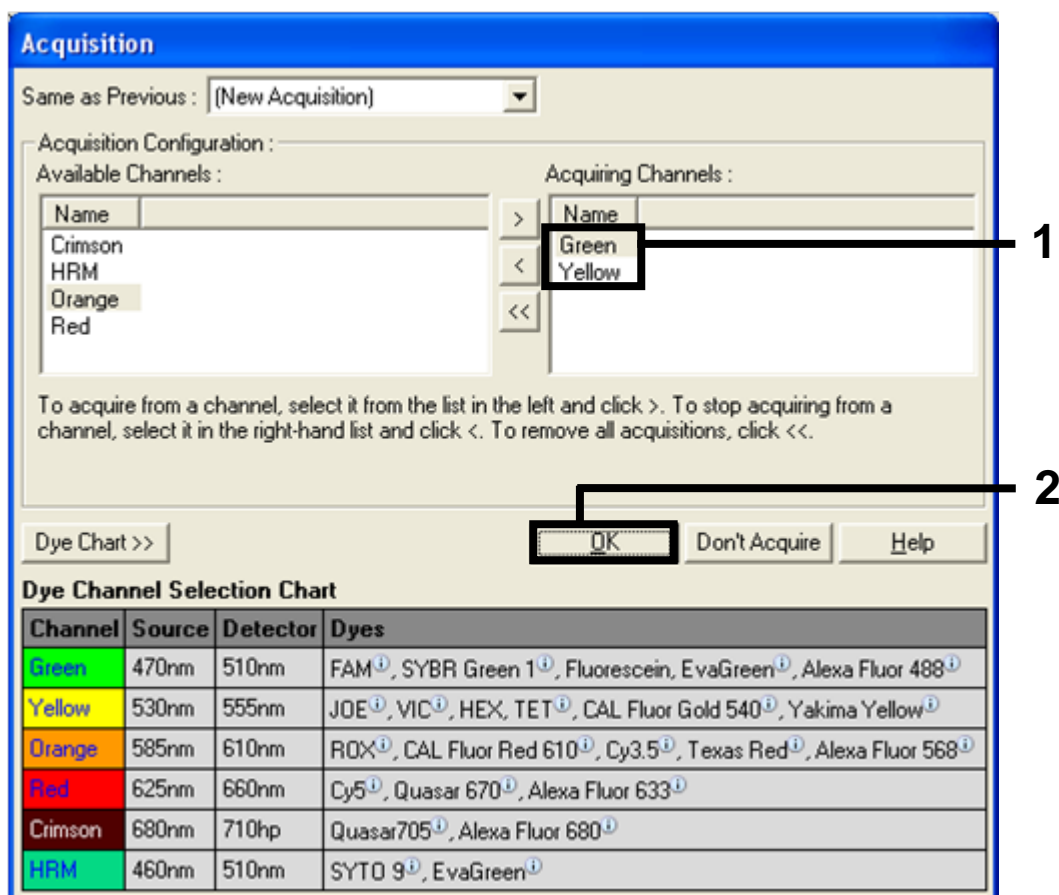
Figur 26. Syklusstrinn ved 95 °C. (1 = boks med syklusrepetisjoner, 2 = første trinn for temperaturinnstilling, 3 = første trinn for tidsinnstilling.)

9. Marker det andre trinnet og angi "60°C for 60 secs" (60 °C i 60 s). I dette trinnet kan du aktivere dataavlesning ved å velge knappen "Not Acquiring" (Ingen avlesning) (figur 27).



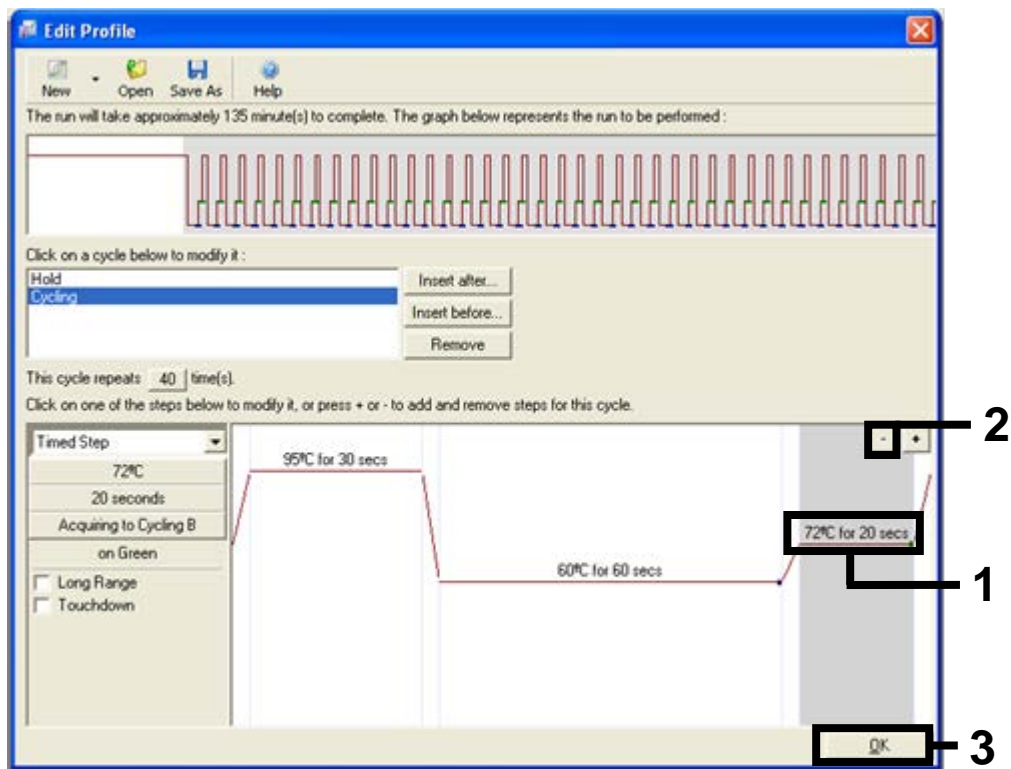
**Figur 27. Syklustrinn ved 60 °C.** (1 = andre trinn for temperatur- og tidsinnstilling, 2 = knappen "Not Acquiring" (Ingen avlesning).)

10. Angi Green (Grønn) og Yellow (Gul) som kanaler som skal avleses, ved å velge ">"-knappen for å overføre dem fra listen "Available Channels" (Tilgjengelige kanaler). Klikk på "OK" (figur 28).



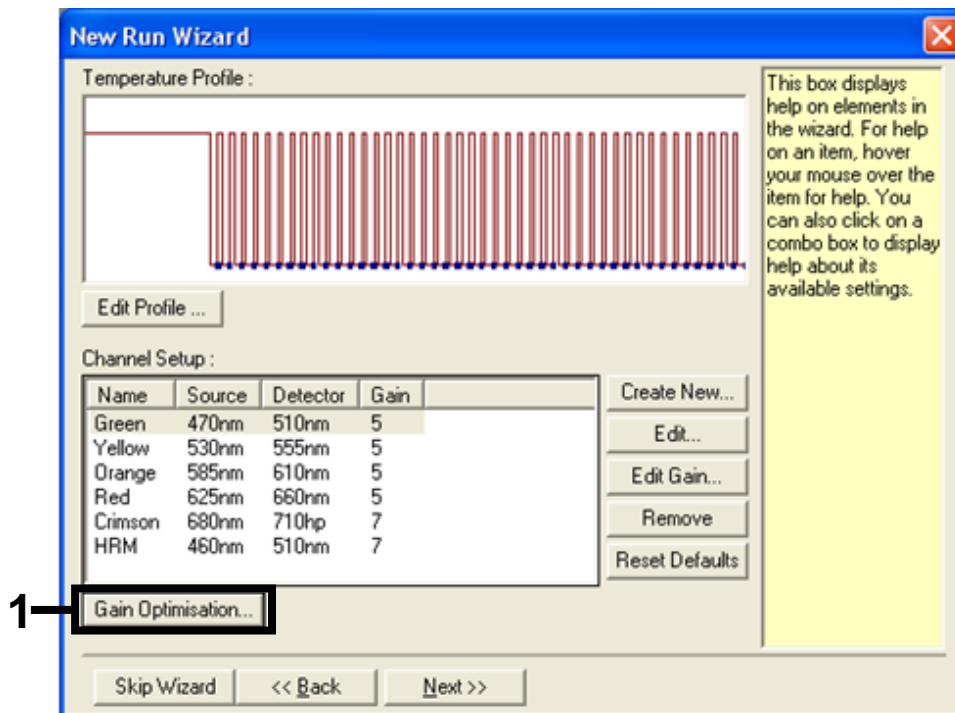
Figur 28. Avlesning ved syklustrinn på 60 °C. (1 = valgte kanaler, 2 = knappen "OK".)

11. Marker det tredje trinnet og slett ved å klikke på "-"-knappen. Klikk på "OK" (figur 29).



Figur 29. Fjerning av forlengelsestrinn. (1 = tredje trinn, 2 = sletteknapp, 3 = knappen "OK".)

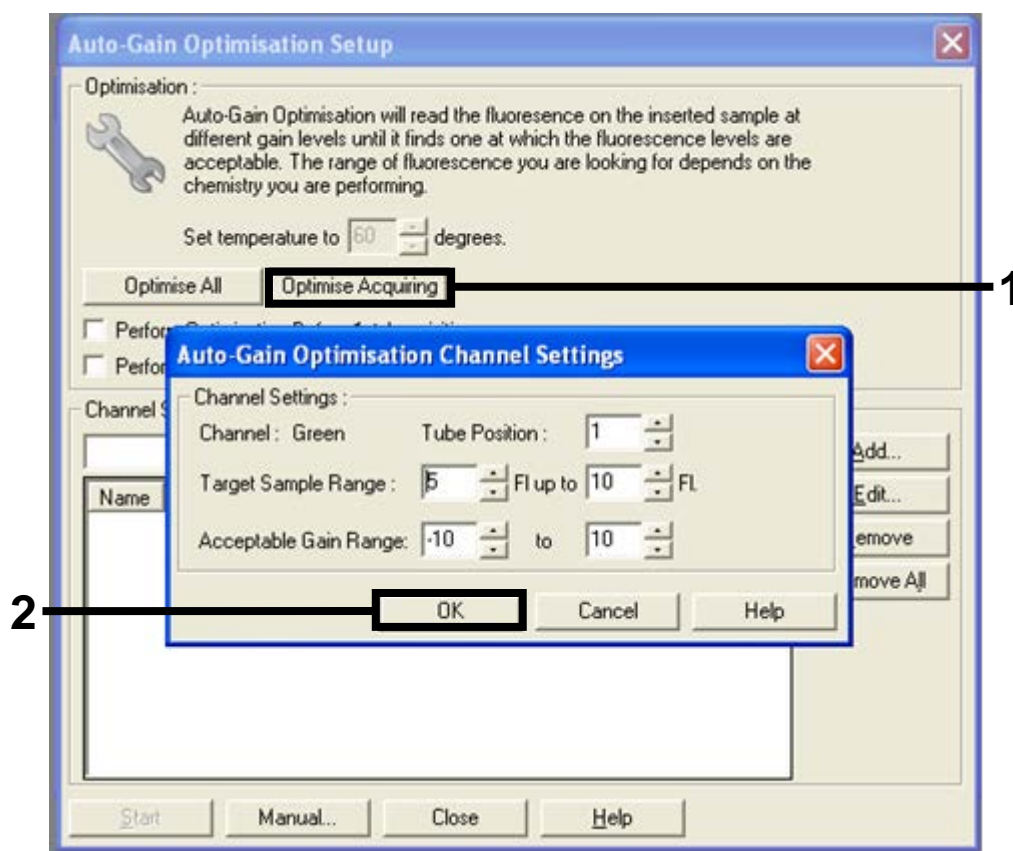
12. Klikk på knappen "Gain Optimisation" (Optimal forsterkning) i den neste dialogboksen (figur 30).



Figur 30. Optimal forsterking (1).

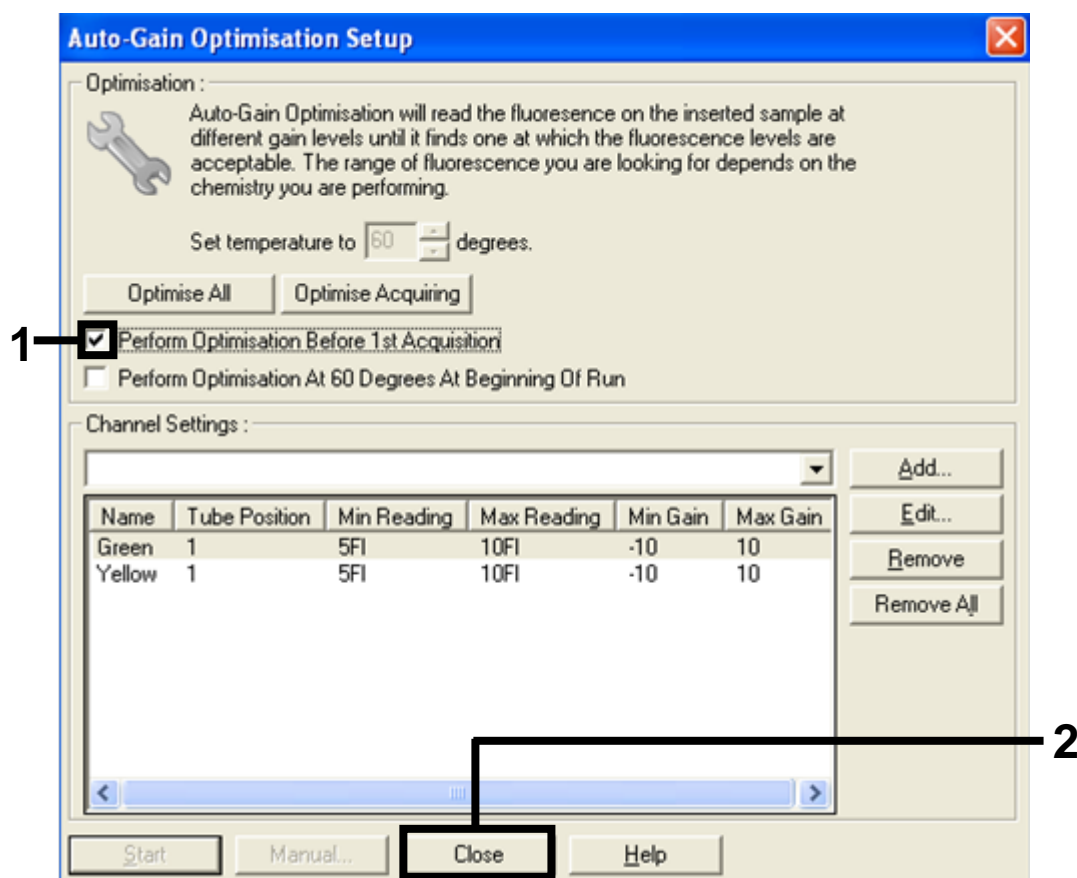


13. Klikk på knappen "Optimise Acquiring" (Optimaliser avlesning). Kanalinnstillinger vises for hver kanal. Godta disse standardverdiene ved å klikke på "OK" for begge kanaler (figur 31).



Figur 31. Automatisk optimal forsterkning for den grønne kanalen. (1 = knappen "Optimise Acquiring" (Optimaliser avlesning), 2 = knappen "OK".)

14. Merk av for "Perform Optimisation before 1st Acquisition" (Utfør optimalisering før første avlesning), og klikk deretter på knappen "Close" (Lukk) for å gå tilbake til veiviseren (figur 32).



Figur 32. Valg av grønne og gule kanaler. (1 = avkrysningsboksen "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" (Utfør optimalisering før første avlesning), 2 = knappen "Close" (Lukk).)

15. Klikk på "Next" (Neste) for å lagre templatet på et passende sted ved å velge "Save Template" (Lagre templat).

## Prosedyre (manuell)

### Protokoll: Prøvevurdering (manuell)

Denne protokollen brukes til å vurdere totalt amplifiserbart DNA i prøver og bør utføres før BRAF-mutasjonsanalyse.

- Klargjør prøver slik det er beskrevet i delen "Protokoll: Prøvevurdering" på side 15.
- Gjør klar til PCR-analyse på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet slik det er beskrevet i delen "Protokoll: Oppsett for *therascreen* BRAF PCR RGQ" på side 69.
- Når analyseserien er fullført, kan dataene analyseres i henhold til instruksjonene i delen "Dataanalyse av prøvevurdering" på side 75.

## Protokoll: Deteksjon av BRAF-mutasjon (manuell)

Så snart en prøve har bestått prøvevurderingen, kan den testes for å detektere BRAF-mutasjoner.

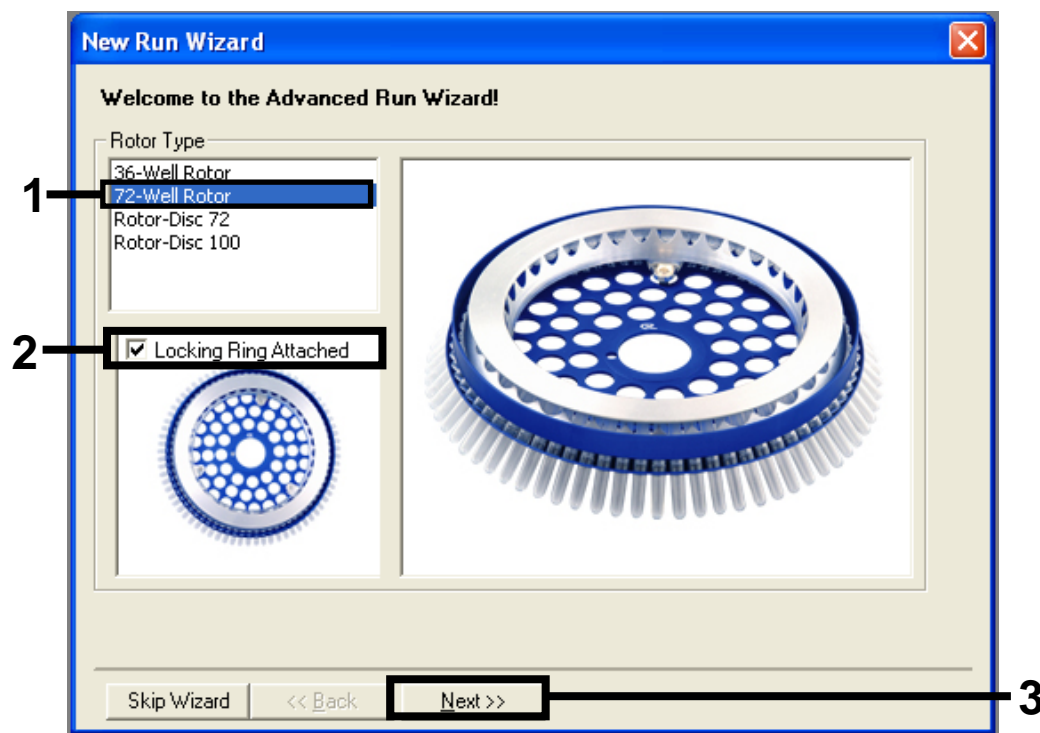
- Klargjør prøver slik det er beskrevet i delen "Protokoll: Deteksjon av BRAF-mutasjon" på side 26.
- Gjør klar til PCR-analyse på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet slik det er beskrevet i delen "Protokoll: Oppsett for *therascreen* BRAF PCR RGQ" på side 69.
- Når analyseserien er fullført, kan dataene analyseres i henhold til instruksjonene i delen "Dataanalyse av deteksjon av BRAF-mutasjon" på side 76.

## Protokoll: Oppsett for *therascreen* BRAF PCR RGQ

1. Åpne programvaren til Rotor-Gene Q-serien (2.3), og åpne den aktuelle temperaturprofilen (.ret-fil).

Se "Protokoll: Opprette en temperaturprofil" på side 55 for å få informasjon om hvordan du oppretter temperaturprofilen og kontrollerer analyseparameterne.

2. Kontroller at riktig rotor er valgt, og merk av i ruten for å bekrefte at låseringen er festet. Klikk på "Next" (Neste) (figur 33).



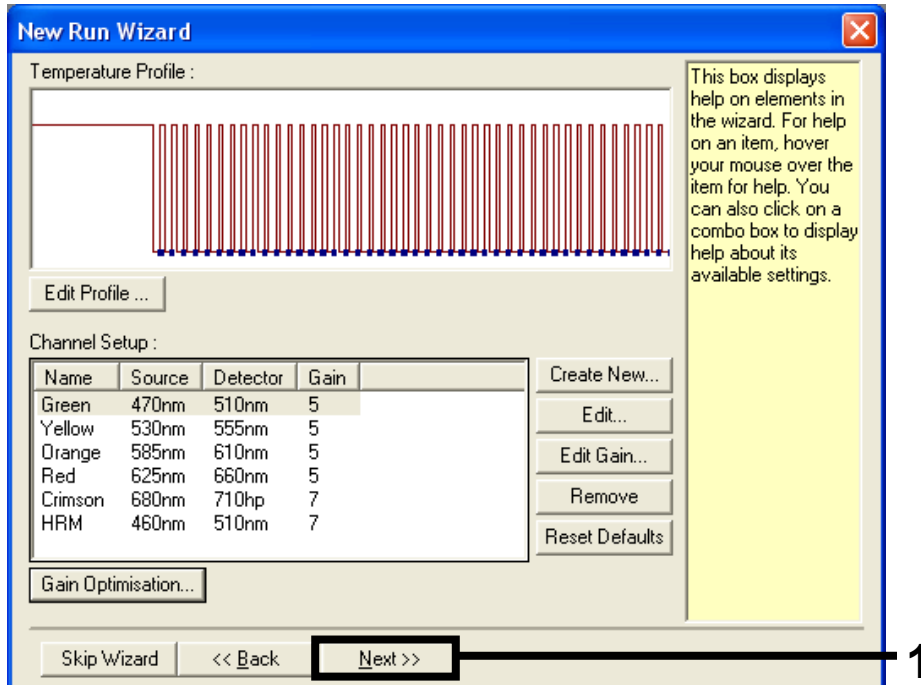
Figur 33. Dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse) og startskjermbilde. (1 = "Rotortype", 2 = boksen "Locking Ring Attached" (Låsering festet), 3 = knappen "Next" (Neste).)

3. Skriv inn navnet på operatøren. Legg til merknader, og kontroller at reaksjonsvolumet er satt til 25 og at det ved siden av "Sample Layout" (Prøveoppsett) står "1, 2, 3...". Klikk på "Next" (Neste) (figur 34).

The screenshot shows the 'New Run Wizard' dialog box. It has a title bar with a close button. The main area contains a text box for 'Operator' with 'NAME' entered, a larger text box for 'Notes', a spin box for 'Reaction Volume (µL)' set to 25, and a dropdown menu for 'Sample Layout' showing '1, 2, 3...'. At the bottom are three buttons: 'Skip Wizard', '<< Back', and 'Next >>'. A yellow help box on the right contains text about hovering for help. Three black lines with numbers 1, 2, and 3 point to the 'Operator' field, the 'Reaction Volume' field, and the 'Next >>' button respectively.

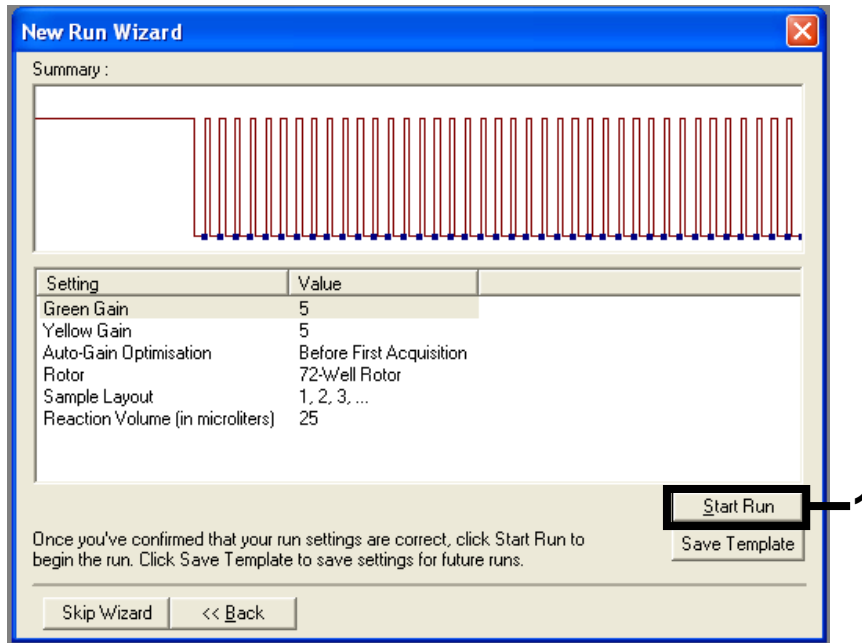
**Figur 34. Dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse) med alternativer.** (1 = feltet "Operator" (Operatør) og feltet "Notes" (Merknader), 2 = feltet "Reaction Volume" (Reaksjonsvolum) og feltet "Sample Layout" (Prøveoppsett), 3 = knappen "Next" (Neste).)

4. I neste vindu er det mulig å redigere temperaturprofilen. Det er ikke nødvendig å redigere noe fordi temperaturprofilen allerede er opprettet i henhold til instruksjonene i "Protokoll: Opprette en temperaturprofil" på side 55. Klikk på "Next" (Neste) (figur 35).



Figur 35. Dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse) og skjermbilde for temperaturredigering. (1 = knappen "Next" (Neste).)

5. Kontroller oppsummeringen og klikk på "Start Run" (Start analyse) for å lagre analysefilen og starte analysen (figur 36).



Figur 36. Dialogboksen "New Run Wizard" (Veiviser for ny analyse) og sammendragsskjerm bilde. (1 = knappen "Start Run" (Start analyse).)

6. Etter at analyseserien er startet, vises et nytt vindu der du enten kan legge inn prøvenavn med det samme, eller klikke på "Finish" (Fullfør) og skrive dem inn senere ved å velge knappen "Sample" (Prøve) i løpet av analyseserien, eller så snart serien er fullført.

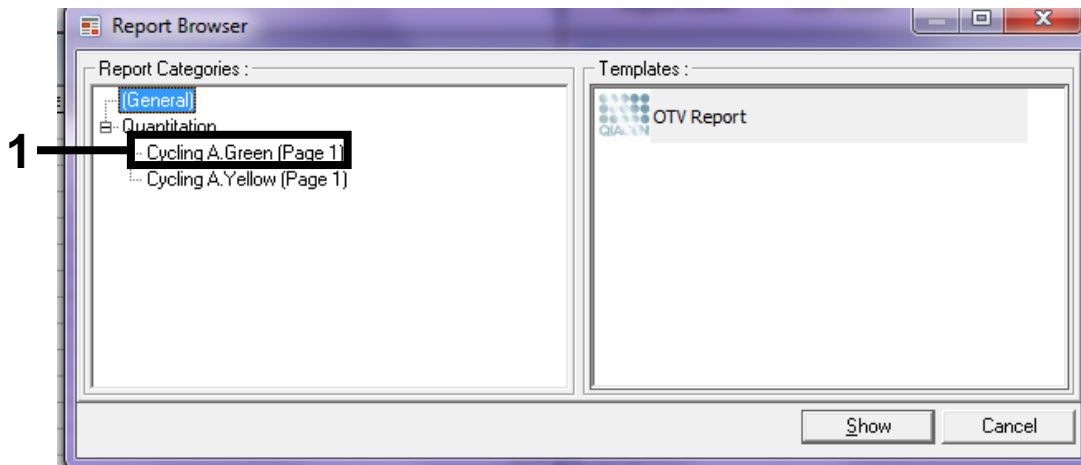
Hvis du klikker på "Finish and Lock Samples" (Fullfør og lås prøver), vil dette hindre deg i å redigere prøvenavnene. Brukeren bør være spesielt forsiktig ved innlegging av prøvenavn for å sikre en korrekt prøvetesting og analyse.

**Merk:** Når du gir navn til prøver, bør du ikke skrive noe i kolonnen "Name" (Navn) for tomme brønner.

7. Når analyseserien er fullført, kan dataene analyseres i henhold til delen "Dataanalyse av prøvevurdering", på side 75 eller delen "Dataanalyse av deteksjon av BRAF-mutasjon", på side 76.
8. Der det er krav om kvantifiseringsrapporter, må du klikke på ikonet "Reports" (Rapporter) på verktøylinjen i analysefilen for Rotor-Gene Q.

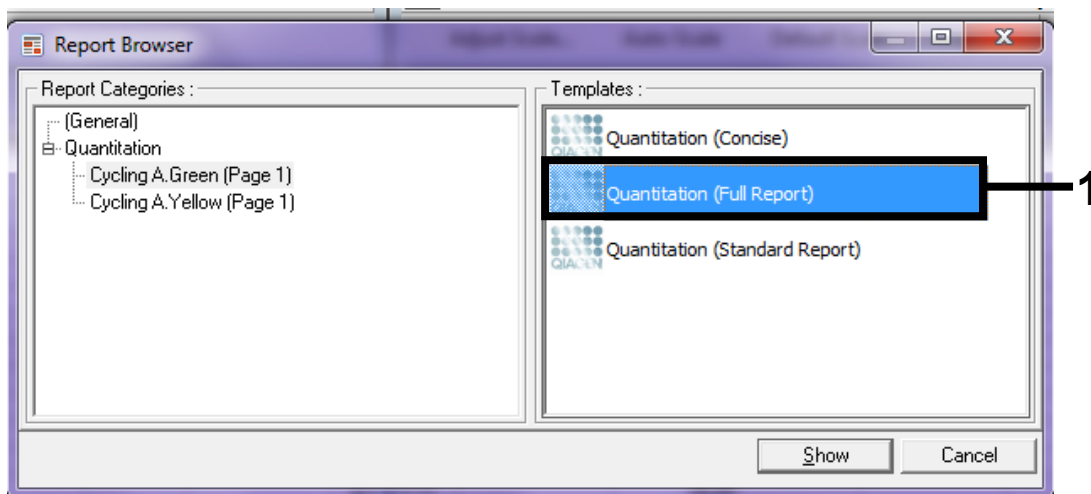


9. Klikk på "Cycling A. Green (Page 1)" (Syklus A. Grønn (side 1)) i rapportleseren under "Report Categories" (Rapportkategorier) (figur 37).



Figur 37. Rapportleser. (1 = knappen "Cycling A. Green (Page 1)" (Syklus A. Grønn (side 1)).)

10. Velg "Quantitation (Full Report)" (Kvantifisering (full rapport)) under "Templates" (Templater) (figur 38).



Figur 38. Kvantifiseringsrapport (full rapport) (1).

11. Klikk på "Show" (Vis) for å opprette rapporten.
12. Klikk på "Save As" (Lagre som) for å lagre en versjon elektronisk.
13. Gjenta for "Cycling A. Yellow (Page 1)" (Syklus A. Gul (side 1)).

## Tolkning av resultater (manuell)

Etter kjøring av prøvevurderingen eller mutasjonsanalysen må dataene analyseres i henhold til følgende prosedyre.

### Analyseinnstillinger i programvaren

1. Åpne den riktige filen ved hjelp av programvare for Rotor-Gene Q-serien (2.3).
2. Hvis du ikke allerede har gitt navn til prøvene før analysen er utført, klikker du på "Edit Samples" (Rediger prøver).
3. Sett inn navn på prøvene i kolonnen "Name" (Navn).  
Merk: La navnefeltene stå tomme for de tomme brønnene.
4. Klikk på "Analysis" (Analyse). Klikk på "Cycling A. Yellow" (Syklus A, gul) for å vise kanalen Yellow (Gul).
5. Klikk på "Named On" (Navngitt).  
Merk: Da sikrer du at de tomme brønnene ikke kommer med i analysen.
6. Velg "Dynamic tube" (Dynamisk rør).
7. Velg "Slope correct" (Riktig helning).
8. Velg "Linear scale" (Lineær skala).
9. Velg "Take off Adj." (Utgangspunktjust.), og legg inn verdiene 15,01 i den øverste boksen (hvis utgangspunktet ble beregnet før syklusen) og 20,01 i den nederste boksen (bruk da følgende syklus og utgangspunkt).
10. Angi 0,05 som terskelverdi.
11. Angi "Eliminate Cycles before" (Fjern sykluser før) til 15.
12. Kontroller Yellow C<sub>T</sub>-verdier.
13. Klikk på "Cycling A. Green" (Syklus A. Grønn) for å vise kanalen Green (Grønn).
14. Velg "Named On" (Navngitt).
15. Velg "Dynamic tube" (Dynamisk rør).
16. Velg "Slope correct" (Riktig helning).
17. Velg "Linear scale" (Lineær skala).
18. Velg "TOA" (Utgangspunktjust.), og legg inn verdiene 15,01 i den øverste boksen (hvis utgangspunktet ble beregnet før syklusen) og 20,01 i den nederste boksen (bruk da følgende syklus og utgangspunkt).
19. Angi 0,15 som terskelverdi.
20. Angi "Eliminate Cycles before" (Fjern sykluser før) til 15.
21. Kontroller Green C<sub>T</sub>-verdier.

## Dataanalyse av prøvevurdering

### Seriekontrollanalyse

Når analyseringen er fullført, kan dataene analyseres på følgende måte.

- **Negativ kontroll:** Hvis du vil sikre at det ikke skjer noen templat-kontaminering, må ikke-templat-kontrollen ikke generere en  $C_T$ -verdi i den grønne kanalen (FAM) på under 40. Ikke-templat-kontrollen må vise amplifikasjon i området 32,53–38,16 i den gule kanalen (HEX) for å sikre at analysen er satt opp korrekt. De angitte verdiene ligger innenfor og inkluderer disse verdiene.
- **Positiv kontroll:** BRAF positiv kontroll (PC) må gi en kontrollanalyse- $C_T$ -verdi i den grønne kanalen (FAM) på 30,37–36,38. De angitte verdiene ligger innenfor og inkluderer disse verdiene. En verdi som ligger utenfor dette området, indikerer et oppsettsproblem for analysen og er derfor en analysefeil.

Prøvedata må ikke brukes hvis en av disse to analysekontrollene mislykkes.

Forutsatt at begge analysekontrollene er gyldige, må hver prøve  $C_T$ -verdi ligge innenfor et område på 21,95–32,00 i den grønne kanalen. Hvis prøven ligger utenfor dette området, gis følgende råd.

### Prøveanalyse – kontrollanalyse

- **Prøvekontrollanalyse  $C_T < 21,95$ :** Prøver med en kontroll- $C_T$  på  $< 21,95$  må fortynnes, da denne representerer den nedre delen av validert analyseområde. For å kunne se hver mutasjon på et lavt nivå, må de overkonsentrerte prøvene fortynnes til å falle innenfor området ovenfor med utgangspunkt i at en fortynning med en halv vil øke  $C_T$  med 1. Hvis prøven ligger nær 21,95, anbefales fortynning for å sikre at et resultat blir innhentet fra prøvetestanalysen (BRAF-mutasjonsdeteksjon). Prøver må fortynnes med vann som følger med dette settet (vann for fortynning [Dil.]).
- **Prøvekontrollanalyse  $C_T > 32,00$ :** Ny ekstraksjon av prøven anbefales fordi utilstrekkelig start-DNA-templat vil være til stede for å påvise alle mutasjoner ved de angitte cutoff-verdiene for analysen.

## Dataanalyse av deteksjon av BRAF-mutasjon

### Seriekontrollanalyse

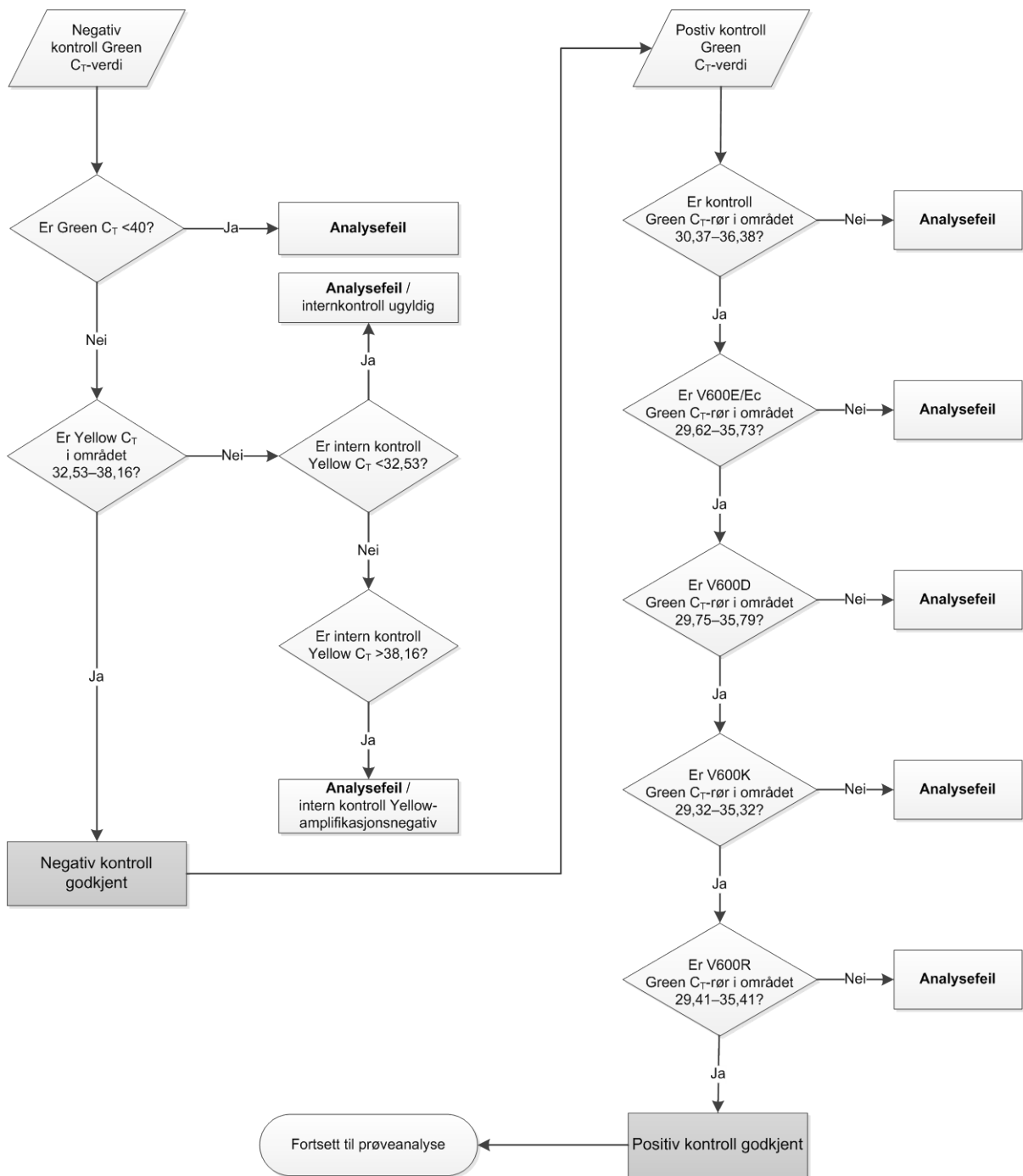
Se flytskjemaet "Seriekontrollanalyse" i figur 39.

- **Negativ kontroll:** Hvis du vil sikre at det ikke skjer noen templat-kontaminering, må ikke-templat-kontrollen ikke generere en  $C_T$ -verdi i den grønne kanalen (FAM) på under 40. Ikke-templat-kontrollen må vise amplifikasjon i området 32,53–38,16 i den gule kanalen (HEX) for å sikre at analysen er satt opp korrekt. De angitte verdiene ligger innenfor og inkluderer disse verdiene.
- **Positiv kontroll:** BRAF positiv kontroll (PC) må gi en  $C_T$ -verdi for hver BRAF-analyse som vist i tabell 14 i den grønne kanalen. De angitte verdiene ligger innenfor og inkluderer disse verdiene. En verdi som ligger utenfor dette området, indikerer et oppsettsproblem for analysen og er derfor en analysefeil.

**Merk:** Prøvedata må ikke brukes hvis en av disse to analysekontrollene mislykkes.

**Tabell 14. Godkjent  $C_T$ -område for reaksjonskontroller.**

Reaksjonsblanding	Prøve	Kanal	$C_T$ -område
Kontroll	PC	Grønn	30,37–36,38
V600E/Ec	PC	Grønn	29,62–35,73
V600D	PC	Grønn	29,75–35,79
V600K	PC	Grønn	29,32–35,32
V600R	PC	Grønn	29,41–35,41



Figur 39. Flytskjema for seriekontrollanalyse.

## Prøveanalyse – prøvekontroll Green C<sub>T</sub>-verdi

Se flytskjemaet "Prøveanalyse" i figur 40.

Forutsatt at begge analysekontrollene er gyldige for kontrollanalysen, må hver prøvekontroll C<sub>T</sub>-verdi ligge innenfor et område på 21,95–32,00 i den grønne kanalen.

Hvis prøven ligger utenfor dette området, gis følgende råd.

- **Prøvekontrollanalyse C<sub>T</sub> <21,95:** Prøver med en kontroll-C<sub>T</sub> på <21,95 vil overbelaste mutasjonsanalysene og må fortynnes. For å kunne se hver mutasjon på et lavt nivå, må de overkonsentrerte prøvene fortynnes til å falle innenfor området ovenfor med utgangspunkt i at en fortynning med en halv vil øke C<sub>T</sub> med 1. Prøver bør fortynnes med vann som følger med dette settet (vann for fortynning [Dil.]).
- **Prøvekontrollanalyse C<sub>T</sub> <32,00:** Ny ekstraksjon av prøven anbefales fordi utilstrekkelig start-DNA-templat vil være til stede for å påvise alle mutasjoner ved de angitte cutoff-verdiene for analysen.

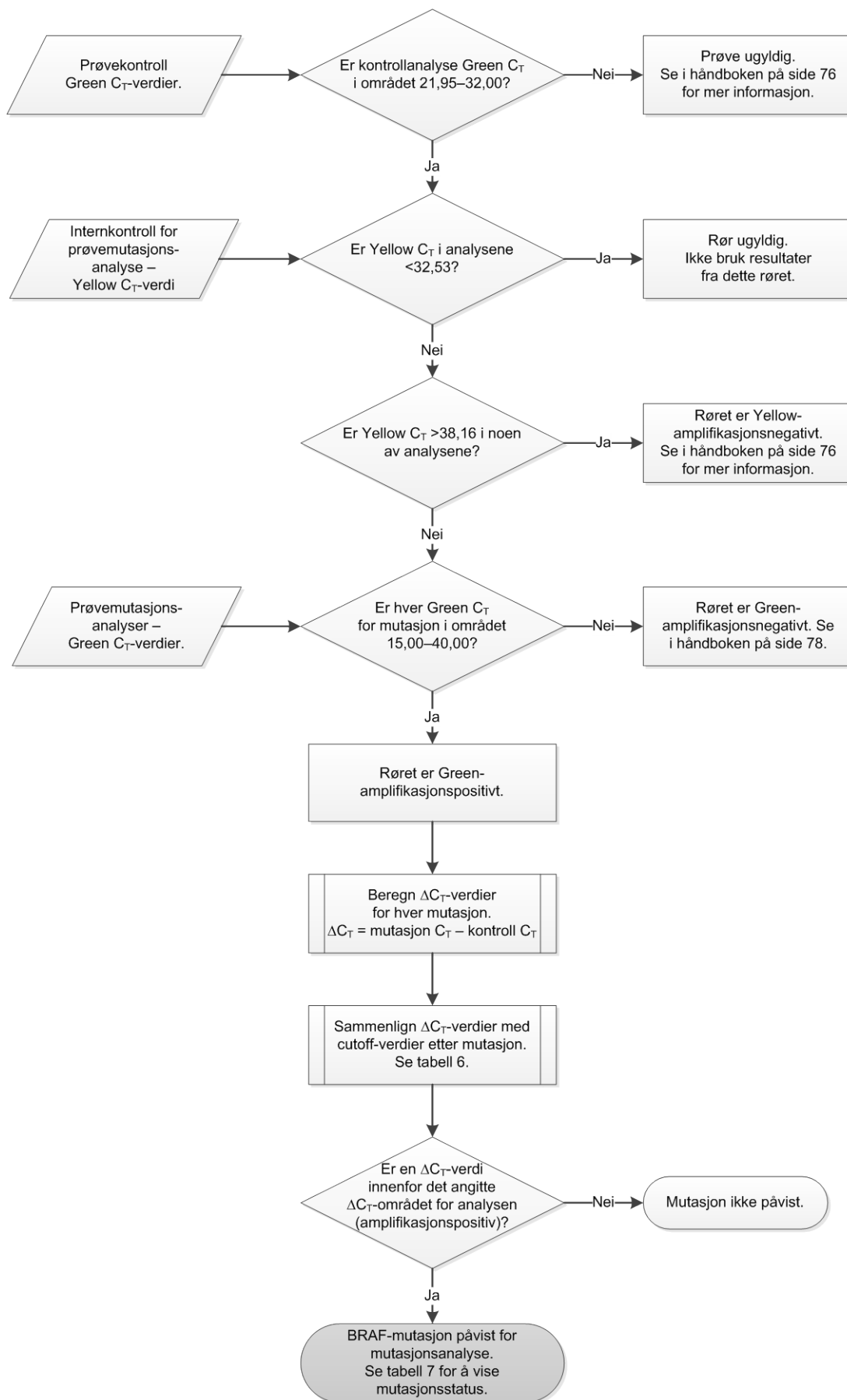
## Prøveanalyse – internkontroll for prøvemutasjonsanalyse – Yellow C<sub>T</sub>-verdi

Se flytskjemaet "Prøveanalyse" i figur 40.

Alle prøvebrønner må analyseres. Kontroller at hver brønn gir et HEX-signal i den gule kanalen fra den interne kontrollen. Det er 3 mulige resultater.

- Hvis intern kontroll C<sub>T</sub> ligger innenfor grenseområdet (32,53–38,16), er den Yellow-amplifikasjonspositiv og gyldig.
- Hvis intern kontroll C<sub>T</sub> ligger over grenseområdet (>38,16), er den Yellow-amplifikasjonsnegativ. Hvis det er amplifikasjon i den grønne kanalen for det røret, er Yellow-amplifikasjonen gyldig. Hvis det ikke er amplifikasjon i den grønne kanalen for det røret, er Yellow-amplifikasjonen ugyldig.
- Hvis intern kontroll C<sub>T</sub> ligger under grenseområdet (<32,53), er røret ugyldig.

Hvis det oppstår feil ved bruk av intern kontroll pga. PCR-hemming, kan en fortynning av prøven redusere effekten av hemmerne, men det er viktig å merke seg at dette også vil fortynne mål-DNA-et. Et rør med vann til fortynning (Dil.) er inkludert i settet.



Figur 40. Flytskjema for prøveanalyse.

## Prøveanalyse – prøvemutasjonsanalyser – Green C<sub>T</sub>-verdi

Green-verdier for alle 4 reaksjonsblandinger må kontrolleres opp mot verdiene angitt i tabell 15.

**Tabell 15. Godkjente reaksjonsverdier for prøvemutasjon (grønn kanal)\***

Analyse	Godkjent C <sub>T</sub> -område	ΔC <sub>T</sub> -område
V600E/Ec	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

\* Godkjente verdier ligger innenfor og inkluderer verdiene som er angitt i tabellen.

- Hvis Green C<sub>T</sub> ligger innenfor det angitte området, er den FAM-amplifikasjonspositiv.
- Hvis Green C<sub>T</sub> ligger over det angitte området, er det ingen amplifikasjon, og den er Green-amplifikasjonsnegativ.

Beregn ΔC<sub>T</sub>-verdien for hver mutasjonsbrønn som er FAM-amplifikasjonspositiv ved hjelp av følgende metode, og kontroller at mutasjons- og kontroll-C<sub>T</sub>-verdier er fra samme prøve.

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

Sammenlign ΔC<sub>T</sub>-verdien for prøven med cutoff-punkt for den aktuelle analysen (tabell 15) som sikrer at riktig cutoff-punkt brukes til hver analyse.

Cut-off-punktet er punktet over der et positivt signal kan forekomme, på grunn av bakgrunnssignalet til ARMS-primeren på villtype-DNA. Hvis prøve ΔC<sub>T</sub>-verdien er høyere enn cutoff-punktet, er den klassifisert som negativ eller utenfor settets deteksjonsgrense.

For hver prøve vil hver mutasjonsreaksjon få statusen mutasjon påvist, mutasjon ikke påvist eller ugyldig i henhold til følgende kriterier.

### ■ **Mutasjon påvist:**

FAM-amplifikasjon er positiv og ΔC<sub>T</sub> er ved eller under cutoff-verdien.  
Dersom flere mutasjoner påvises, bør mutasjonsstatus tildeles i henhold til tabell 16.



■ **Mutasjon ikke påvist:**

Green-amplifikasjon er positiv, og  $\Delta C_T$  er over cutoff-verdien.

Green-amplifikasjon er negativ og Yellow (intern kontroll)-amplifikasjon er positiv.

■ **Ugyldig:**

Yellow (intern kontroll) er ugyldig.

Green-amplifikasjonen er negativ og Yellow-amplifikasjonen er negativ.

Se flytkart (Figur 40) for ytterligere forklaringer. Hvis en prøve er Yellow-amplifikasjonsnegativ i et rør, men Green-amplifikasjonspositiv i et annet rør, kan resultatet "Mutation detected" (Mutasjon påvist) fortsatt betraktes som gyldig, men det er ikke sikkert at mutasjonen som er identifisert, er riktig tilordnet.

Hvis en prøve er Yellow-amplifikasjonsnegativ og Green-amplifikasjonspositiv i det samme røret, bør resultatet "Mutation detected" (Mutasjon påvist) betraktes som gyldig.

Hvis et rør er Yellow (intern kontroll)-ugyldig, skal ikke resultatet fra dette røret brukes.

### **Prøveanalyse – tildeling av prøvemutasjonsstatus**

Når mutasjonreaksjonsrørene er vurdert, bestemmes prøvens mutasjonsstatus på følgende måte.

- **Mutasjon påvist:** Én eller flere av de 4 mutasjonsreaksjonene er positive. Dersom flere mutasjoner påvises, bør mutasjonen som er rapportert være i henhold til tabell 16 (se neste side).
- **Mutasjon ikke påvist:** Alle 4 mutasjonsreaksjoner er negative.
- **Ugyldig:** Ingen mutasjonsreaksjoner er positive, og én eller flere mutasjonsreaksjoner er ugyldige.

**Tabell 16. Få frem prøvemutasjonsstatus**

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutasjonsstatus
<b>Positiv</b>	Negativ	Negativ	Negativ	V600E- eller V600Ec-positiv
<b>Positiv</b>	Negativ	<b>Positiv</b>	Negativ	V600Ec- eller V600K-positiv
<b>Positiv</b>	<b>Positiv</b>	Negativ	Negativ	V600D-positiv
Negativ	<b>Positiv</b>	Negativ	Negativ	V600D-positiv
Negativ	Negativ	<b>Positiv</b>	Negativ	V600K-positiv
Negativ	Negativ	Negativ	<b>Positiv</b>	V600R-positiv

**Merk:** *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er utviklet for å detektere mutasjoner i BRAF-genet i en DNA-prøve. Når en prøve klassifiseres som BRAF-mutasjon påvist, er det bare en bestemt mutasjon som skal rapporteres. Dersom flere mutasjoner påvises, bør mutasjonen som er rapportert være i henhold til tabell 16.

Noe kryssreaktivitet kan inntreffe mellom mutasjonsreaksjoner. V600E/Ec-analysen kan for eksempel gi et positivt resultat hvis en V600D-mutasjon er til stede, V600E/Ec-analysen kan gi et positivt resultat hvis en V600K-mutasjon er til stede, og V600K-analysen kan gi et positivt resultat hvis en V600E kompleks mutasjon er til stede. Det er imidlertid mulig å skille mellom mutasjonsstatus ved hjelp av tabell 16.

Kryssreaktivitet skyldes ARMS-primeren som påviser andre mutasjoner med lignende sekvens for hverandre. Hvis en annen mutasjonsanalyse gir et positivt resultat, er dette sannsynligvis kryssreaktivitet. Doble mutanter er observert, men disse er sjeldne.

Derfor, i sjeldne tilfeller, kan kombinasjoner med positive resultater påvises som ikke er angitt i tabell 16. Derfor kan prøven fortsatt klassifiseres som BRAF-mutasjon påvist. På grunn av kryssreaktivitet kan imidlertid ikke en bestemt mutasjon bli identifisert. Derfor må prøven kun klassifiseres som BRAF-mutasjon påvist.

Hvis en eller flere av mutasjonsreaksjonene er ugyldige, mens en eller flere er positive, kan prøven fortsatt angis som BRAF-mutasjon påvist, i og med at en mutasjon er til stede. Men den bestemte mutasjonen som er rapportert er kanskje ikke nøyaktig. Den kan være et resultat av kryssreaktivitet. Derfor må prøven kun klassifiseres som BRAF-mutasjon påvist.

## Vedlegg II: Installasjon av *therascreen* BRAF Assay Package

*therascreen* BRAF RGQ PCR-settet er beregnet for bruk med Rotor-Gene Q MDx-instrumentet med rotor med 72 brønner. *therascreen* BRAF-analysepakken kan lastes ned fra produksidene til *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Du finner informasjon om nedlasting i delen "Product Resources" (Produktressurser) i fanen "Supplementary Protocols" (Tilleggsprotokoller). Analysepakker kan også bestilles på CD (QIAGEN, katalognr. 9023820).

Analysepakken inneholder "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template" (*therascreen* BRAF CE-prøvevurdering med låst templat) og "*therascreen* BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" (*therascreen* BRAF CE-mutasjonsanalyse med låst templat).

**Merk:** *therascreen* BRAF-analysepakken er kun kompatibel med Rotor-Gene Q-programvareversjon 2.3. Kontroller at den riktige versjonen av Rotor-Gene Q-programvaren er installert før du installerer *therascreen* BRAF Assay Package. Hvis Rotor-Gene Q MDx-instrumentet ble levert med en tidligere programvareversjon, er det enkelt å oppgradere den ved å laste ned programvareversjon 2.3 for Rotor-Gene Q MDx fra produksidene på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Du finner den nye programvaren i delen "Product Resources" (Produktressurser) i fanen "Operating Software" (Systemprogramvare).

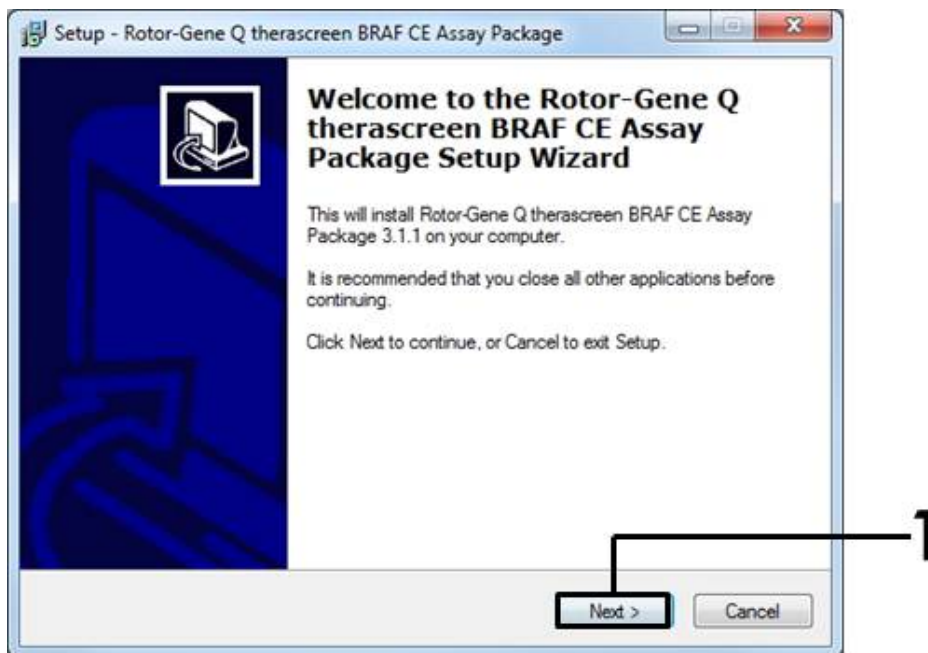
### Prosedyre (nedlasting)

1. *therascreen* BRAF RGQ-analysepakken CE kan lastes ned fra produksidene til *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Åpne den nedlastede zip-filen ved å dobbeltklikke på filen og pakke ut filen som ligger i arkivet.
3. Start installasjonen ved å dobbeltklikke på filen som er pakket ut, `therascreen_BRAF_Assay_Package_3.1.1.exe`.

### Prosedyre (CD)

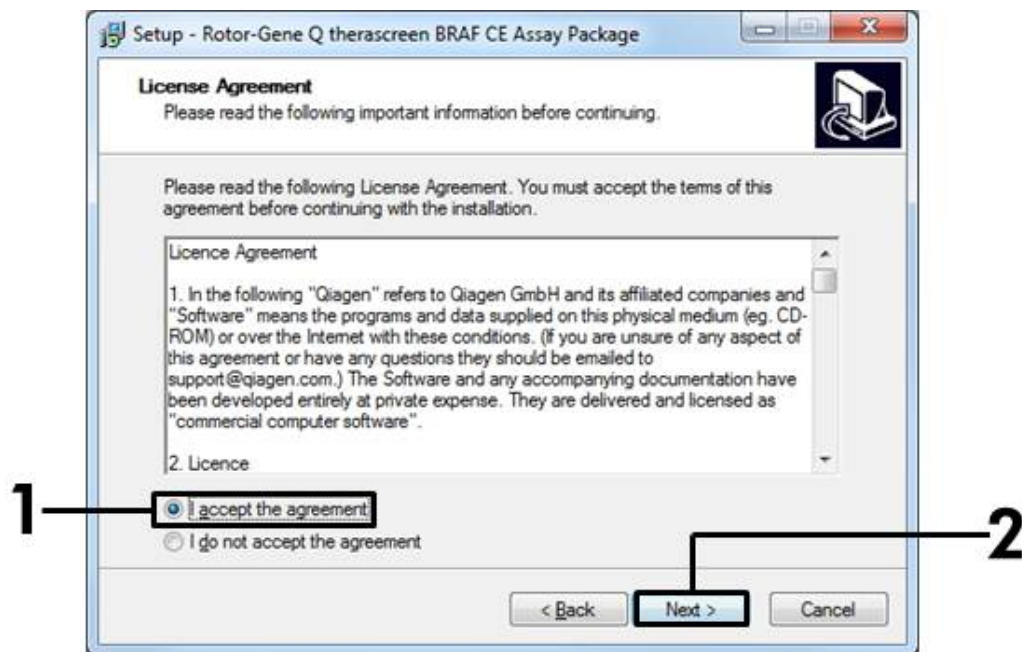
1. Bestill CD-en *therascreen* BRAF RGQ Assay Package CE (*therascreen* BRAF RGQ-analysepakke CE) (QIAGEN, katalognr. 9023820) som leveres separat fra QIAGEN.
2. Sett CD-en inn i CD-stasjonen på datamaskinen som er koblet til Rotor-Gene Q-instrumentet.

3. Start installeringen ved å dobbeltklikke på filen *therascreen\_BRAF\_Assay\_Package\_3.1.1.exe* hvis CD-en lastes inn automatisk, eller finn *exe*-filen ved å søke etter filen i filutforskeren på den tilkoblede datamaskinen.
4. Installasjonsveiviseren vises. Klikk på "Next" (Neste) for å fortsette (figur 41).



Figur 41. Dialogboksen "Setup" (Oppsett). (1 = Knappen "Next" (Neste).)

5. Les lisensvilkårene i dialogboksen “License Agreement” (Lisensavtale) og godta avtalen ved å huke av ved siden av “I accept the agreement” (Jeg godtar avtalen). Klikk på “Next” (Neste) for å fortsette (figur 42).



Figur 42. Dialogboksen “License Agreement” (Lisensavtale). (1 = godkjenningknapp, 2 = knappen “Next” (Neste).)

6. Templatoppsettet starter automatisk, og etterpå vises dialogboksen "Setup" (Oppsett). Klikk på "Finish" (Avslutt) for å avslutte installasjonsveiviseren (figur 43).



Figur 43. Avslutt installasjonsveiviseren. (1 = Knappen "Finish" (Avslutt).)

7. Start datamaskinen på nytt. Snarveier til både "therascreen BRAF CE Sample Assessment Locked Template" (therascreen BRAF CE-prøvevurdering med låst templat) og "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" (therascreen BRAF CE-mutasjonsanalyse med låst templat) genereres automatisk og vises på skrivebordet.

## Kontaktinformasjon

Hvis du ønsker teknisk assistanse eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportsenter på [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) eller ringe 00800-22-44-6000 eller en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Katalognr.
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit (24)	Til 24 reaksjoner: Kontrollanalyse, 4 mutasjonsanalyser, positiv kontroll, <i>Taq</i> DNA-polymerase, vann til NTC og vann til fortykning av prøve	870211
<b>Rotor-Gene Q og annet tilbehør</b>		
RotorGene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring ikke inkludert.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-sentrifuge i sanntid og apparat for HRM-analyser med 5 kanaler (grønn, gul, oransje, rød, karmosinrød) pluss HRM-kanal, bærbar PC, programvare, tilbehør, ett års garanti på deler og arbeid, installasjon og opplæring.	9002033
<i>therascreen</i> BRAF Assay Package CD	CD med <i>therascreen</i> BRAF CE Sample Assessment Locked Template ( <i>therascreen</i> BRAF CE-prøvevurdering med låst templat) og <i>therascreen</i> BRAF CE Mutation Analysis Locked Template ( <i>therascreen</i> BRAF CE-mutasjonsanalyse med låst templat).	9023820
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumsblokk til manuelt reaksjons- oppsett med en énkannelspipette i rør på 72 x 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remser med 4 rør og lokk til 1000 reaksjoner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remser med 4 rør og korker til 10 000 reaksjoner	981106

Produkt	Innhold	Katalognr.
<b>QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – for rensing av genomisk DNA fra parafininnstøpte vev</b>		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp MinElute®-kolonner, Proteinase K, buffere, prøverør (2 ml)	56404

Hvis du ønsker oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfrasingelser, kan du se i den aktuelle håndboken for QIAGEN-settet eller i bruksanvisningen. Håndbøker og bruksanvisninger for QIAGEN-settet er tilgjengelig på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan leveres fra QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren.



Denne siden skal være tom.

Denne siden skal være tom.

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

Skal ikke bruke til å bestemme risiko for utvikling av endometriose

#### **Begrenset lisensavtale**

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet samtykker i følgende vilkår:

1. *therascreen* BRAF RGQ PCR-settet kan brukes bare i samsvar med håndboken for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett og til bruk med komponenter som bare finnes i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme vedlagte komponenter i dette settet med komponenter som ikke er inkluderte i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i håndboken for *therascreen* BRAF RGQ PCR-sett og flere protokoller som nå finnes på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller dets bruk ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i ikke å la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i enhver handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1273-005 © 2016 QIAGEN. Med enerett.

---

**www.qiagen.com**

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

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

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

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

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

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

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

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

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

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

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

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

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

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

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

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

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

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

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

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

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

