

Handbok för *therascreen*[®] BRAF RGQ PCR-kit



Version 2

IVD

För in vitro-diagnostisk användning

För användning med Rotor-Gene[®] Q MDx-instrument

CE

REF

870211



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

TYSKLAND

R2

MAT

1072802SV



QIAGEN provtagnings- och analysmetoder

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analysmetoder som möjliggör isolering och detektion av innehållet i alla typer av biologiska prover. Våra avancerade, högkvalitativa produkter och tjänster säkerställer framgång från prov till resultat.

QIAGEN sätter standarden för:

- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyra- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vi strävar efter att göra det möjligt för dig att nå stor framgång med din verksamhet. Besök oss gärna på www.qiagen.com.

Innehåll

Avsedd användning	5
Sammanfattning och förklaring	5
Användningsprinciper	6
Analyser	7
Kontroller	7
Material som medföljer	9
Kitets innehåll	9
Material som behövs men inte medföljer	9
Varningar och säkerhetsåtgärder	11
Säkerhetsinformation	11
Allmänna säkerhetsåtgärder	11
Förvaring och hantering av reagenser	12
Förvaring och hantering av prover	12
Procedur	13
Extraktion och beredning av DNA	13
Protokoll:	
■ Provbedömning	14
■ BRAF-mutationsdetektion	25
Tolkning av resultat (automatiskt)	36
Felsökningsguide	37
<i>therascreen</i> BRAF Assay Package-flaggor	38
Kvalitetskontroll	46
Begränsningar	47
Testets egenskaper	47
LOB (limit of blank), arbetsintervall och cutoff-värden	47
Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod	48
Effekt av input-DNA på ΔC_T -värden	49
Korsreaktivitet	50
Värden för detektionsgräns (LOD)	50

Effekt av melanin på kitets prestanda	51
Repeterbarhet	52
Reproducerbarhet	52
Symboler	54
Bilaga I: Manuellt protokoll för <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-kitet	55
Allmän information	55
Protokoll:	
■ Skapa en temperaturprofil	55
Procedur (manuell)	65
Protokoll:	
■ Provbedömning (manuell)	65
■ BRAF-mutationsdetektion (manuell)	66
■ Förberedelse av <i>therascreen</i> BRAF PCR RGQ	67
Tolkning av resultat (manuellt)	72
Programinställningar för analys	72
Analys av provbedömningsdata	73
Analys av BRAF-mutationsdetektionsdata	74
Bilaga II: Installation av <i>therascreen</i> BRAF Assay Package	81
Procedur (nedladdning)	81
Procedur (CD)	81
Kontaktinformation	84
Beställningsinformation	85

Avsedd användning

therascreen BRAF RGQ PCR-kitet är ett in vitro-diagnostiskt test för detektion av fem somatiska mutationer i BRAF-genen och ger en kvalitativ bedömning av mutationsstatusen. DNA extraheras från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) tumörvävnad och testas med realtids-PCR-teknik (polymerase chain reaction) på Rotor-Gene Q MDx-instrument. *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet är avsett att användas som hjälp för läkare för att identifiera cancerpatienter som kan vara lämpade för BRAF-inriktad behandling, till exempel med vemurafenib.

Tabell 1. Lista med mutationer och COSMIC-ID*

Mutation	Basskifte	COSMIC-ID
V600E	GTG>GAG	476
V600E komplex	GTG>GAA	475
V600D	GTG>GAT	473
V600K	GTG>AAG	474
V600R	GTG>AGG	477

* COSMIC-ID har hämtats från databasen Catalogue of Somatic Mutations in Cancer: www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.

Sammanfattning och förklaring

therascreen BRAF RGQ PCR-kitet är ett kit färdigt för användning för detektion av fem somatiska mutationer i BRAF-genen med realtids-PCR-teknik (polymerase chain reaction) (RT PCR) på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.

Med teknikerna ARMS® (Amplification Refractory Mutation System) och Scorpions® kan *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet möjliggöra detektion av följande mutationer i kodon 600 i BRAF-onkogenen mot en bakgrund av vildtyp-genomiskt DNA.

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

De metoder som används är mycket selektiva, och beroende på den totala mängden närvarande DNA kan en låg procentandel mutant detekteras i en bakgrund av vildtyp-genomiskt DNA. Denna selektivitet och detektionsgräns är överlägsen annan teknik, t.ex. färgsekvensering.

Användningsprinciper

I *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet används två typer av teknik – ARMS och Scorpions – för detektion av mutationer i realtids-PCR.

ARMS

Allel- eller mutationsspecifik amplifiering uppnås med hjälp av ARMS. *Taq* DNA polymeras (*Taq*) är effektivt när det gäller att skilja på en matchning och en felmatchning vid 3'-änden av en PCR-primer. Specifikt muterade sekvenser amplifieras selektivt även i prover där majoriteten av sekvenserna inte bär på mutationen. När primern är helt matchad fortsätter amplifieringen med full effekt. När 3'-basen inte matchar sker endast bakgrundsamplifiering på låg nivå.

Scorpions

Detektion av amplifiering utförs genom att använda Scorpions. Scorpions är bifunktionella molekyler med en PCR-primer som är kovalent bunden till en fluorescensmärkt prob. Fluoroforen i den här proben är associerad med en quencher, även den integrerad i proben, som minskar fluorescensen. Medan PCR pågår när proben binds till amplikon separeras fluoroforen och quenchern. Detta leder till en mätbar ökning av fluorescens från reaktionsröret.

Kitets format

Fem analyser ingår i *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet.

- En kontrollanalys (kontrollreaktionsmix; CTRL)
- Fyra mutationsanalyser (mutantreaktionsmixar; V600E/Ec, V600D, V600K, V600R)

Analysen V600E/Ec detekterar både mutationerna V600E och V600Ec men särskiljer dem inte.

Samtliga reaktionsmixar är dubbla och innehåller reagenser för att detektera mål som är märkta med FAM™, och en internkontroll som är märkt med HEX™. Den interna kontrollanalysen kontrollerar förekomsten av hämmare som kan leda till att ett falskt negativt resultat uppstår.

Analys

therascreen BRAF RGQ PCR-kitet består av en procedur i två steg. I det första steget utförs kontrollanalysen för att bedöma den totala mängden amplifierbart BRAF DNA i ett prov. I det andra steget utförs både mutations- och kontrollanalyser för att bestämma förekomst eller frånvaro av mutant-DNA.

Kontrollanalys

Kontrollanalysen, märkt med FAM, används för att bedöma den totala mängden amplifierbart BRAF DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 3 i BRAF-genen. Primrarna och Scorpions-proben har utformats för att amplifiera oberoende av kända BRAF-polymorfismer.

Mutationsanalys

Varje mutationsanalys innehåller en FAM-märkt Scorpions-prob och en ARMS-primer för urskiljning mellan vildtyps-DNA och ett specifikt mutant-DNA.

Kontroller

Obs: Alla experimentkörningar måste innehålla positiva och negativa kontroller.

Positiv kontroll

Varje körning måste innehålla en positiv kontroll i rör 1–5. *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet innehåller BRAF-positiv kontroll (PC) som ska användas som mall i den positiva kontrollreaktionen. De positiva kontrollresultaten bedöms för att garantera att kitet fungerar inom de angivna acceptanskriterierna.

Negativ kontroll

Varje körning måste innehålla en negativ kontroll ("kontroll utan mall") i rör 9–13. *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet innehåller vatten för NTC (NTC) som ska användas som "mall" i kontrollen utan mall. Kontrollen utan mall används för att bedöma potentiell kontaminering under körningskonfigurationen samt för att bedöma effekten hos den interna kontrollreaktionen.

Bedömning av internkontrollreaktion

Varje reaktionsmix innehåller en internkontroll utöver målreaktionen. Ett misslyckande indikerar antingen förekomst av hämmare som kan leda till ett felaktigt resultat eller en felaktig hantering av det röret vid förberedelsen. Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämmarna, men det leder även till spädning av mål-DNA. Ett rör med vatten för spädning av prov (Dil.) ingår i kitet. Spädning av prover måste utföras med vattnet för spädning av prov (Dil.).

Provbedömning

Vi rekommenderar starkt att använda kontrollreaktionsmixen (CTRL) som medföljer *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet för att bedöma den totala mängden amplifierbart BRAF DNA i ett prov. Denna kontrollanalys amplifierar ett område av exon 3 i BRAF-genen. Vi rekommenderar iordningställande av prover med endast kontrollanalysen och att använda BRAF-positiv kontroll (PC) som en positiv kontroll och vatten för NTC (NTC) som kontroll utan mall.

Obs: DNA-bedömningar bör baseras på PCR och kan variera i kvantifiering beroende på avläsningar av absorbans. Extra kontrollreaktionsmix (CTRL) medföljer för bedömning av kvalitet och kvantitet av DNA i prover innan analysen med *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet.

Material som medföljer

Kitets innehåll

<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit			(24)
Katalognr			870211
Antal reaktioner			24
Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix)	Röd	1 CTRL	2 × 720 µl
V600E/Ec Reaction Mix (V600E/Ec reaktionsmix)	Lila	2 V600E/Ec	720 µl
V600D Reaction Mix (V600D reaktionsmix)	Orange	3 V600D	720 µl
V600K Reaction Mix (V600K reaktionsmix)	Rosa	4 V600K	720 µl
V600R Reaction Mix (V600R reaktionsmix)	Grön	5 V600R	720 µl
BRAF Positive Control (BRAF-positiv kontroll)	Beige	PC	250 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i> DNA-polymeras)	Mint	<i>Taq</i>	2 × 80 µl
Water for NTC (vatten för NTC)	Vit	NTC	1,9 ml
Water for Sample Dilution (vatten för spädning av prov)	Vit	Dil.	1,9 ml
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit Handbook (engelsk handbok)			1

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

Reagenser

- DNA-extraktionskit (se "Extraktion och beredning av DNA", sidan 13)
- Xylen
- Etanol (96–100 %) *

Förbrukningsartiklar

- 1,5 ml eller 2 ml mikrocentrifugrör (för lyseringssteg)
- 1,5 ml mikrocentrifugrör (för elueringssteg) (kan beställas från Brinkmann [Safe-Lock, kat.nr 022363204], Eppendorf [Safe-Lock, kat.nr 0030 120.086] eller Sarstedt [Safety Cap, kat.nr 72.690])[†]
- Särskilda pipetter[‡] (justerbara) för provberedning
- Särskilda pipetter[‡] (justerbara) för beredning av PCR-huvudmix
- Särskilda pipetter[‡] (justerbara) för dosering av DNA-mall
- Sterila pipettspetsar med filter (för att undvika korskontaminering rekommenderar vi pipettspetsar med aerosolbarriär)

Utrustning

- Termomixer, uppvärmd skakinkubator, värmeblock eller vattenbad som klarar inkubation på 90 °C[‡]
- Bänkcentrifug[‡] med rotor för 2 ml-reaktionsrör
- Vortexblandare[‡]
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM^{‡§} med fluorescenskanaler för Cycling Green och Cycling Yellow (detektion av FAM respektive HEX)
- Programmet Rotor-Gene Q version 2.3 med BRAF Assay Package (version 3.1.1) installerat för automatisk mutationsdetektion (se "Bilaga II: Installation av *therascreen* BRAF Assay Package", sidan 81)

* Använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon.

[†] Detta är inte en fullständig lista över leverantörer.

[‡] Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

[§] I vissa länder kan instrumentet Rotor-Gene Q 5plex HRM med tillverkningsdatum maj 2011 eller senare användas. Tillverkningsdatumet kan utläsas från serienumret på baksidan av instrumentet. Serienumret har formatet "mmyynn" där "mm" anger månaden i tillverkningsdatumet med siffror, "yy" anger de två sista siffrorna i tillverkningsåret och "nnn" är en unik identifieringskod för instrumentet.

Obs: Programmet Rotor-Gene Q kan användas utan BRAF Assay Package för manuell mutationsdetektion. Se "Bilaga I: Manuellt protokoll för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet", sidan 55

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (0,1 ml-remsor för rör med lock), för användning med rotor med 72 brunnar (QIAGEN, kat.nr 981103 eller 981106)
- Sterila mikrocentrifugrör för beredning av huvudmixar
- Loading Block 72 × 0.1 ml Tubes (laddningsblock för 72 × 0,1 ml-rör), aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett (QIAGEN, kat.nr 9018901)

Varningar och säkerhetsåtgärder

För in vitro-diagnostisk användning

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS). De är tillgängliga på webben i behändigt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, där du kan visa och skriva ut säkerhetsdatablad för varje QIAGEN-kit och kitkomponent.

Allmänna säkerhetsåtgärder

Användaren ska alltid lägga särskild vikt vid följande:

- Förvara och extrahera positivt material (prover och positiva kontroller) separerat från alla andra reagenser, och addera dem till reaktionsmixen i ett separat utrymme.
- Iakttag största försiktighet för att förhindra att PCR kontamineras av syntetiskt kontrollmaterial. Vi rekommenderar att separata, för ändamålet avsedda pipetter används för iordningställande av reaktionsmixar och tillsats av DNA-mall. Beredning och fördelning av reaktionsmixar ska utföras i ett område avskilt från området där mall tillsätts. Rotor-Gene Q-rör får inte öppnas efter att PCR-körningen har avslutats. Detta för att förhindra laboratoriekontaminering från produkter efter PCR-körningen.
- Reagenser till *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet har späts ut optimalt. Vi rekommenderar inte ytterligare spädning av reagenser då det kan resultera i förlorad prestanda. Vi rekommenderar inte användning av reaktionsvolymmer mindre än 25 µl då det ökar risken för falskt negativa resultat.

- Alla reagenser i *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet har utformats särskilt för optimal effekt. Alla reagenser som medföljer *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet är avsedda att användas enbart tillsammans med övriga reagenser i samma *therascreen* BRAF RGQ PCR-kit. För att bästa effekt ska kunna garanteras får kitets reagenser inte bytas ut mot något annat reagens.
- Använd endast det *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) som medföljer i kitet. Byt inte ut det mot *Taq* DNA-polymeras från andra kit av samma typ eller annan typ, och byt inte heller ut det mot *Taq* DNA-polymeras från en annan leverantör.

Förvaring och hantering av reagenser

therascreen BRAF RGQ PCR-kitet levereras på torris och måste vara fruset vid ankomst. Om *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet inte är fruset vid ankomst, om den yttre förpackningen har öppnats under transporten eller om det saknas en bipacksedel, handbok eller reagenser i leveransen ska du kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

therascreen BRAF RGQ PCR-kitet ska vid mottagandet omedelbart förvaras i -15 till -30 °C i en frys med konstant temperatur och skyddat mot ljus. Scorpions (liksom alla fluorescensmärkta molekyler) måste skyddas mot ljus för att undvika fotoblekning och försämrad effekt.

Vid korrekt förvaring i originalförpackningen enligt rekommendationerna är kitet hållbart fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Undvik att tina och frysa upprepade gånger. Överskrid inte 6 frys-upptiningscykler, vilket är det maximalt tillåtna.

Förvaring och hantering av prover

Obs: Alla prover ska betraktas som potentiellt smittbärande material.

Provmaterialet måste vara mänskligt, genomiskt DNA extraherat från formalinfixerad och paraffininbäddad (FFPE) vävnad. Proverna måste transporteras enligt standardmässig patologisk metod för att garantera provets kvalitet.

Tumörprover är inte homogena och data från ett tumörprov kanske inte stämmer överens med andra sektioner från samma tumör. Tumörprover kan även innehålla tumörfri vävnad. DNA från tumörfri vävnad förväntas inte innehålla mutationer som detekteras av *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet.

Procedur

Extraktion och beredning av DNA

Testegenskaper för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet togs fram med hjälp av DNA som extraherats med QIAamp DNA FFPE Tissue-kitet (QIAGEN, kat.nr 56404). Om du använder QIAamp DNA FFPE Tissue-kitet utför du DNA-extraktionen enligt instruktionerna i handboken och observerar följande:

- Samla FFPE-sektioner på objektglas.
- Skrapa bort överflödigt paraffin från vävnadssektionerna med en ny, steril skalpell.
- Skrapa ner vävnadssektionerna i mikrocentrifugrör med hjälp av en ny skalpell för varje prov som ska extraheras.
- Renat genomiskt DNA måste elueras i 120–200 µl ATE-buffert (medföljer i QIAamp DNA FFPE Tissue-kitet). Förvara renat genomiskt DNA i –15 till –30 °C.

DNA-bedömningar ska baseras på den kontrollreaktionsmix (CTRL) som medföljer *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet och kan variera i kvantifiering beroende på avläsningar av absorbans. Extra kontrollreaktionsmix (CTRL) medföljer för bedömning av kvalitet och kvantitet av DNA i prover innan analysen med *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet.

Obs: För att säkerställa att det finns tillräckligt med DNA för analys rekommenderar vi att minst två FFPE-objektglas först extraheras tillsammans och analyseras med kontrollanalysen. Om inte tillräckligt med DNA erhålls för PCR kan fler objektglas extraheras och DNA poolas.

Obs: För att säkerställa att det finns tillräckligt med DNA för analys måste FFPE-sektionerna vara minst 5 µm tjocka.

Alla analyser i *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet ger korta PCR-produkter. *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet fungerar emellertid inte på mycket fragmenterat DNA.

Protokoll: Provbedömning

Det här protokollet ska användas vid bedömning av den totala mängden amplifierbart DNA i prover med BRAF CE Sample Assessment Locked Template (Assay Package) för automatisk provanalys.

Obs: Information om manuell bedömning av prover finns i "Bilaga I: Manuellt protokoll för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet", sidan 55.

Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar proceduren ska du läsa "Allmänna säkerhetsåtgärder", sidan 11.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx innan du startar protokollet. Se användarhandboken till instrumentet.
- Vortexa inte *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) eller någon mix som innehåller *Taq* DNA-polymeras, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- Pipettera *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) genom att placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.
- Upp till 24 prover kan bedömas med tillgänglig Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL).

Saker som ska göras före start

- Kontrollera att programmet *therascreen* BRAF Assay Package är installerat innan instrumentet Rotor-Gene Q används första gången (se "Bilaga II: Installation av *therascreen* BRAF Assay Package" på sidan 81).
- Innan varje användning måste alla reagenser tinas i minst 1 timme i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom att vända 10 gånger och centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Se till att *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) håller rumstemperatur (15–25 °C) innan varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

Procedur

- 1. Tina kontrollreaktionsmix (CTRL), vatten för kontroll utan mall (NTC) och positiv kontroll (PC) i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme. När reagenserna har tinat ska du blanda dem genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer och sedan centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.**

2. **Bered tillräckligt med huvudmixar (kontrollreaktionsmix [CTRL] plus *Taq* DNA-polymeras [*Taq*]) för DNA-proverna, en positiv kontrollreaktion och en kontrollreaktion utan mall enligt volymerna som anges i tabell 2. Inkludera reagenser för 1 extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.**

Huvudmixen innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Tabell 2. Beredning av huvudmix för kontrollanalys*

Komponent	Volym
Control Reaction Mix (kontrollreaktionsmix, CTRL)	19,5 µl × (n+1)*
<i>Taq</i> DNA-polymeras (<i>Taq</i>)	0,5 µl × (n+1)*
Total volym	20,0 µl/reaktion

* n = antal reaktioner (prover plus kontroller). Vid beredning av huvudmixen ska du bereda tillräckligt för 1 extra prov (n+1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen. Värdet n ska inte överstiga 26 (24 prover plus 2 kontroller).

3. **Blanda huvudmixen noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Placera det korrekta antalet rör i laddningsblocket enligt layouten i bild 1. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje PCR-rör.**

Locken ligger kvar i sin plastbehållare tills de behövs. För provbedömning ska huvudmix för kontrollanalys tillsättas i en positiv kontrollbrunn, en negativ kontrollbrunn och en brunn för varje prov.

Analys									
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	–	–	–	–	–	–

Bild 1. Layout för provbedömningsanalyser i laddningsblocket. Siffrorna markerar position i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

4. Tillsätt omedelbart 5 µl vatten för kontroll utan mall (NTC) i röret med kontroll utan mall (PCR-rör nummer 2) och förslut röret. Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (PCR-rör nummer 3–26) och förslut rören. Tillsätt 5 µl BRAF-positiv kontroll (PC) i röret med positiv kontroll (PCR-rör nummer 1) och förslut röret.

Markera rörens lock för att visa i vilken riktning rören ska laddas på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.

5. När alla PCR-rör har förslutits ska du göra en visuell kontroll av provrörens fyllnadsnivå för att säkerställa att prov har tillsatts i alla rör.
6. Vänd alla PCR-rör (4 gånger) för att blanda prover och reaktionsmixar.
7. Placera PCR-rören i sina korrekta positioner i rotorn med 72 brunnar (bild 1). Om rotorn inte är fullbelagd måste alla tomma positioner på rotorn fyllas med ett förslutet, tomt rör.
8. Placera omedelbart rotorn med 72 brunnar i instrumentet Rotor-Gene Q MDx. Se till att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.
9. Starta programmet Rotor-Gene Q genom att dubbelklicka på ikonen "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template" på skrivbordet till den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx (se bild 2).

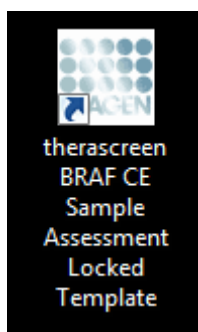


Bild 2. Ikonen "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template".

10. Fliken "Setup" [Konfiguration] visas som standard (bild 3). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på instrumentet Rotor-Gene Q.

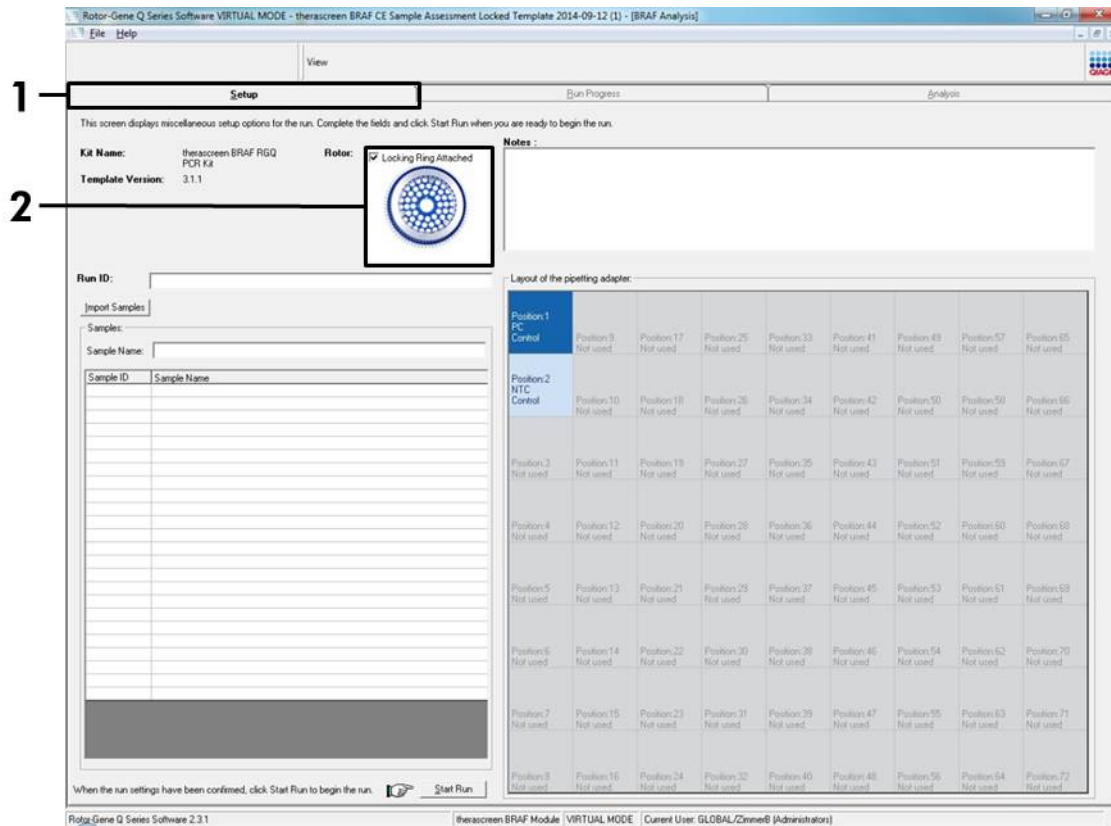


Bild 3. Fliken "Setup" [Konfiguration] (1) och rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast] (2).

11. Skriv in körnings-ID i dialogrutan "Run ID" [Körnings-ID] enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i dialogrutan "Sample Name" [Provnamn] enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten. Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" [Prov-ID] (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] på höger sida med provnamnet (bild 4).

Obs: Alternativt kan provnamn som sparats i formatet *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaseparerade värden) importeras via knappen "Import Samples" [Importerera prover]. Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden.

Obs: Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] att provnamnet som har lagts till är markerat genom en ändring av färgen och att provnamnet är i provpositionen (bild 4).

Obs: Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].

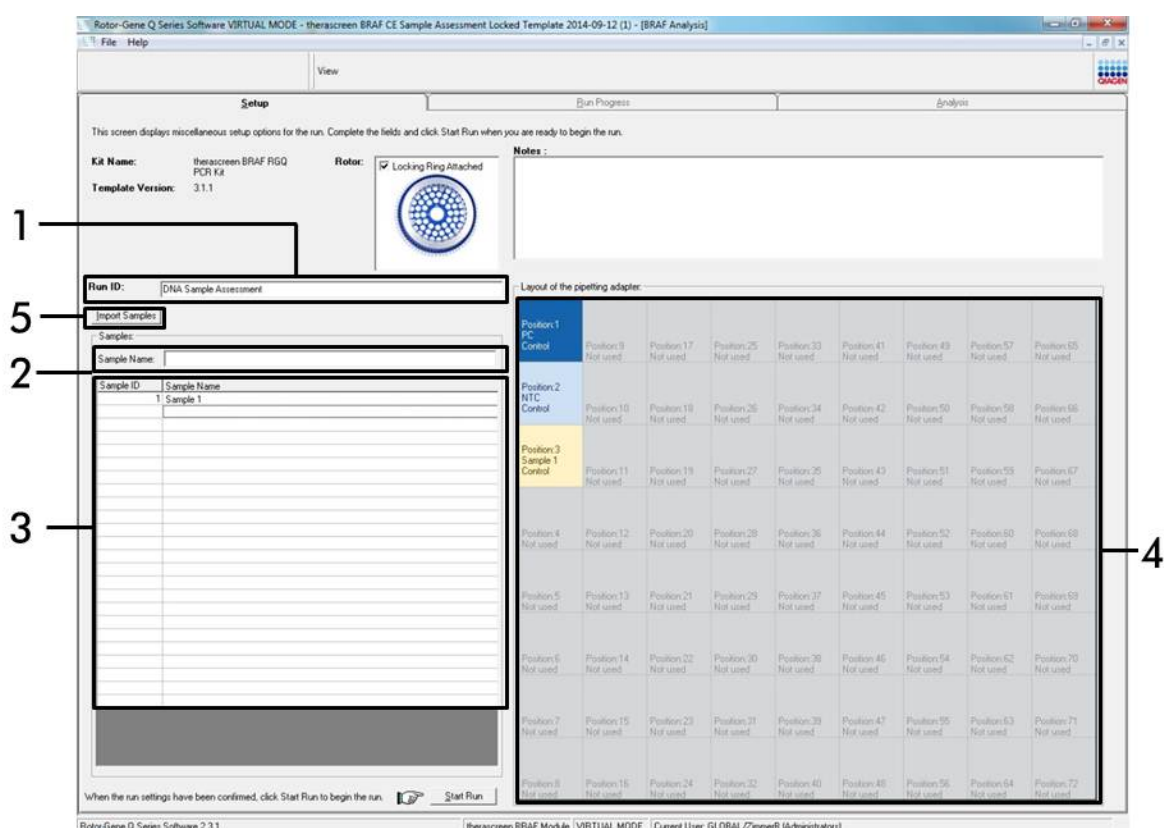


Bild 4. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn]. (1 = fältet "Run ID" [Körnings-ID], 2 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 3 = provlista, 4 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn], 5 = knappen "Import Samples" [Importerera prover].)

12. Upprepa steg 11 för att ange namnen på alla ytterligare prover (bild 5).

Obs: Om du vill redigera ett provnamn klickar du på "Sample Name" [Provnamn] i provlistan så visas det valda provet i dialogrutan "Sample Name" [Provnamn] ovanför. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten för att uppdatera namnet.

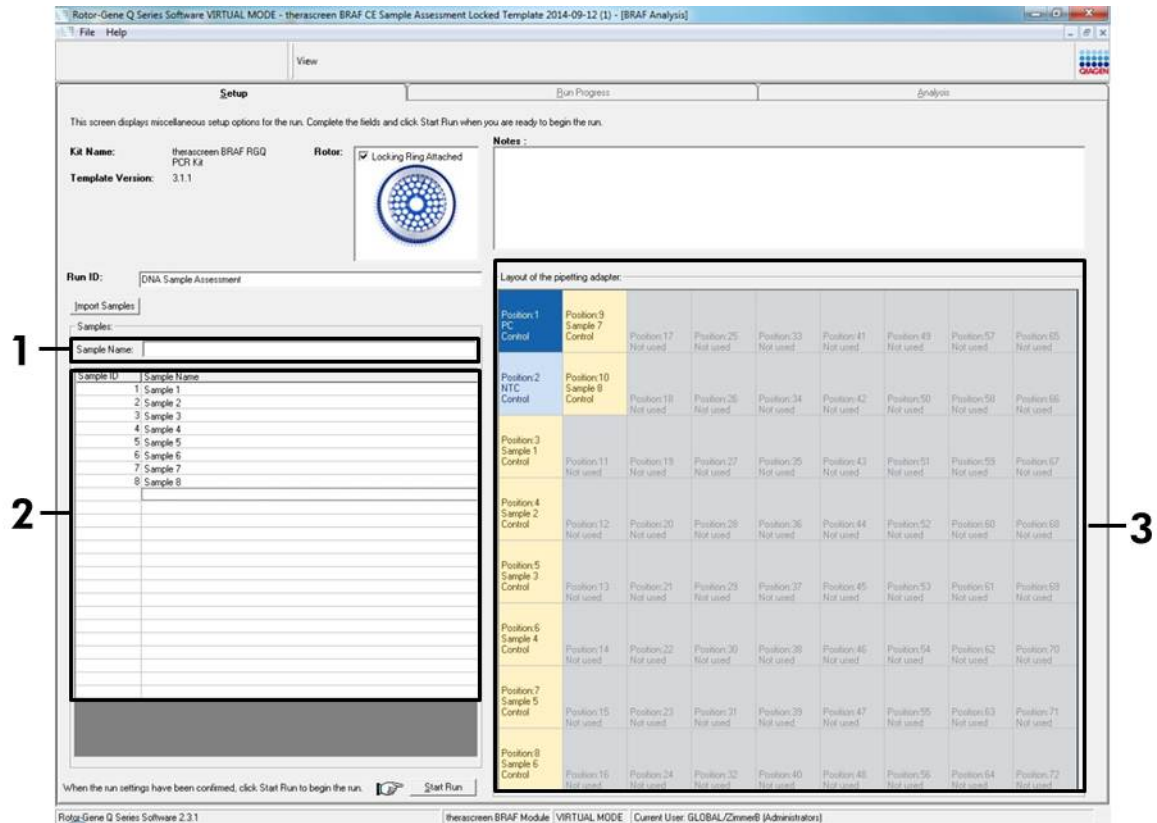


Bild 5. Ange ytterligare provnamn i dialogrutan "Sample Name" [Provnamn]. (1 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 2 = provlista, 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].)

13. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i dialogrutan "Notes" [Anteckningar] om det behövs och klicka sedan på knappen "Start Run" [Starta körning] (bild 6).

Obs: Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (bild 6) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med ett förslutet, tomt rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med ett förslutet, tomt rör och klicka på "OK" för att fortsätta.

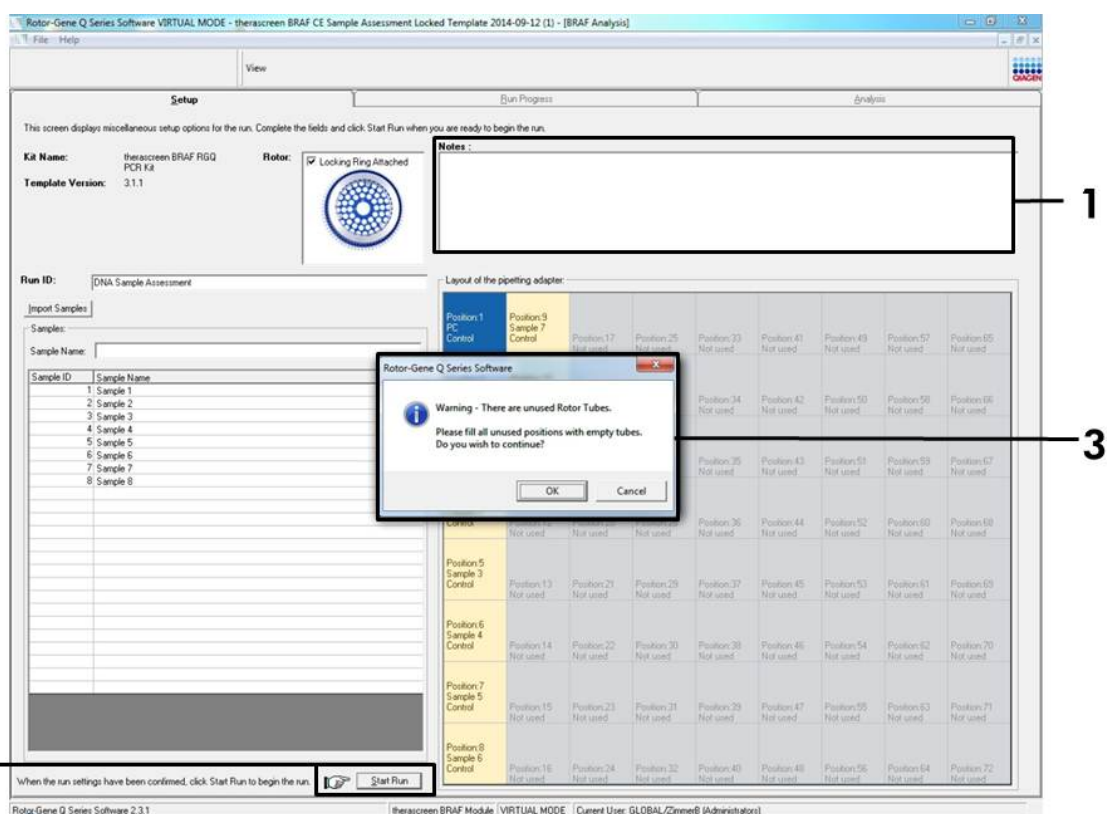


Bild 6. Fälter "Notes" [Anteckningar] (1), knappen "Start Run" [Starta körning] (2) och varning för oanvända rotorpositioner (3).

14. Ett "Save As"-fönster [Spara som] visas. Välj ett lämpligt filnamn och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen och klicka på "Save" [Spara] (bild 7).

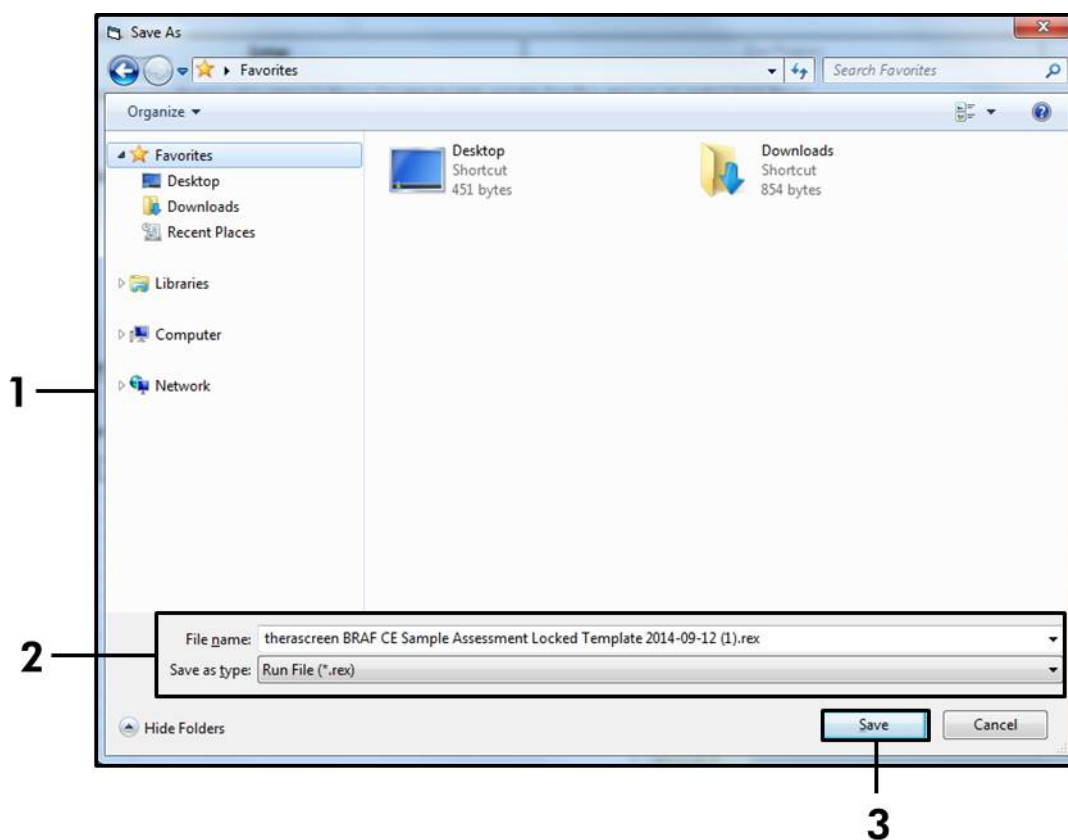


Bild 7. Spara körningsfilen. (1 = fönstret "Save As" [Spara som], 2 = fälten "File Name" [Filnamn] och "Save as type" [Spara som typ], 3 = knappen "Save" [Spara].)

15. PCR-körningen startar.

Obs: När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] automatiskt för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (bild 8).

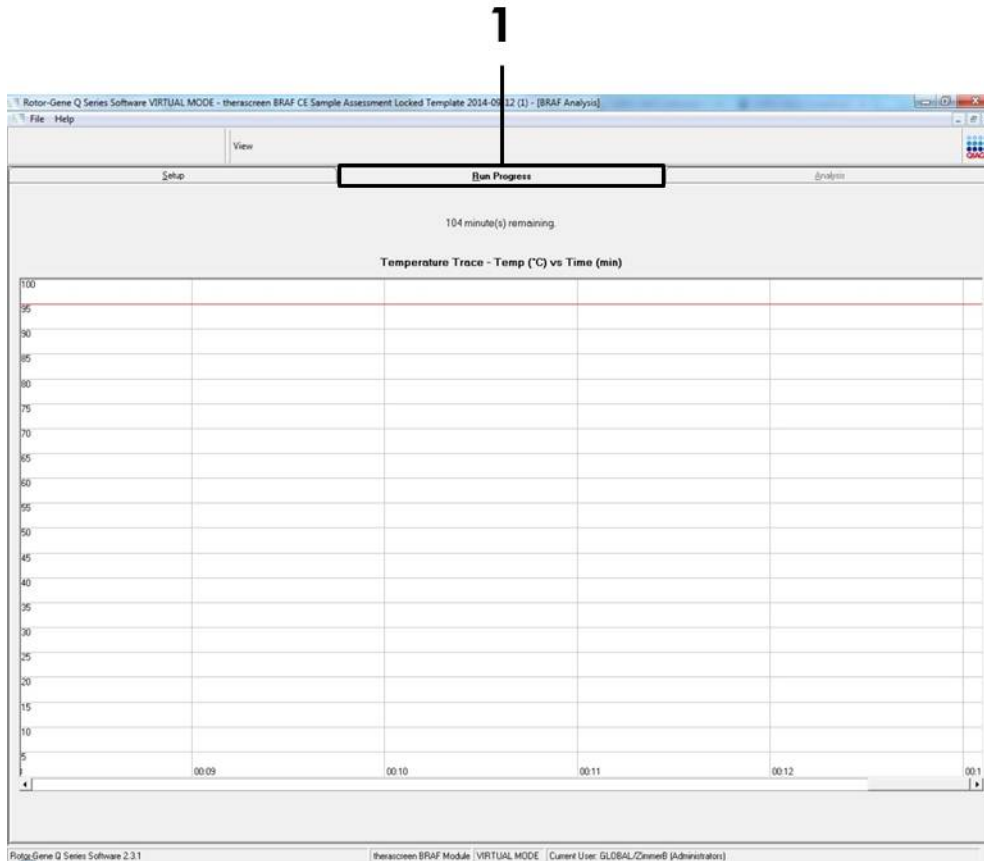


Bild 8. Fliken "Run Progress" [Körningsförlopp].

16. När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" [Analys] automatiskt.

Obs: Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på fliken "Analysis" [Analys] (bild 9).

Obs: En förklaring av beräkningsmetoden ges i "Tolkning av resultat" på sidan 36.

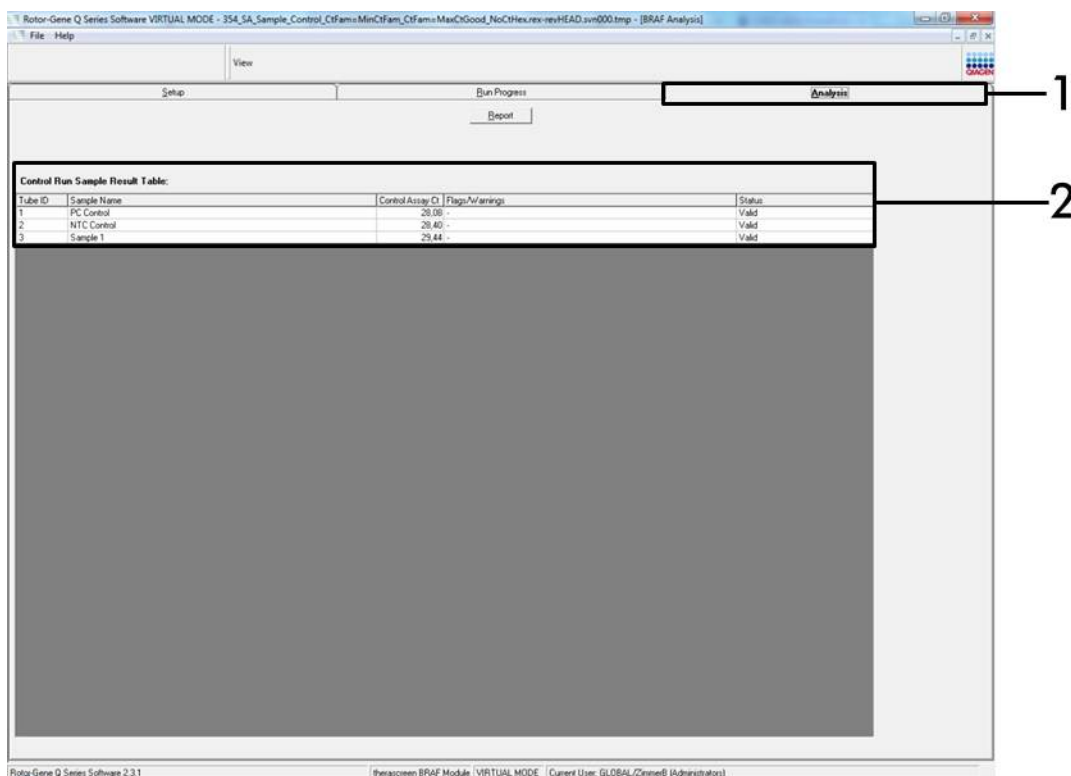


Bild 9. Fliken "Analysis" [Analys] och rapportering av resultat. (1 = fliken "Analysis" [Analys], 2 = "Sample Result Table" [Tabell med provresultat].)

17. Kontrollresultat rapporteras på följande sätt i "Sample QC Result Table" [Tabell med QC-provresultat] (bild 9).

- **Körningskontroller (PC och NTC, rörpositioner 1 respektive 2).** Om resultaten ligger inom acceptabla intervaller visas "Valid" [Giltigt] för vart och ett av dem; annars visas "Invalid" [Ogiltigt].
- **Ett C_T-värde för provets kontrollreaktion > 32,00 gör att "Invalid" [Ogiltigt] visas.** Mängden DNA är inte tillräcklig för mutationsanalys. Testa om provet. Om mängden DNA fortfarande är otillräcklig extraherar du mer tumörvävnad om det finns tillgängligt (se "Felsökningsguide" på sidan 37).

- Ett C_T -värde för provets kontrollreaktion $< 21,95$ gör att "Invalid" [Ogiltigt] visas. DNA-koncentrationen är för hög för mutationsanalys. Späd med nukleasfritt vatten för spädning (Dil.) och gör om testet. Späd till ett C_T -värde på $21,95-32,00$. En 1:1-spädning ökar C_T -värdet med ca 1,0.
- Ett C_T -värde för provets kontrollreaktion på $21,95-32,00$ ($21,95 \leq \text{kontroll-}C_T \leq 32,00$) gör att "Valid" [Giltigt] visas. DNA-koncentrationen är lämplig för mutationsanalys.

Obs: Om det behövs en ny extraktion eller spädning upprepar du kontrollreaktionen för att bekräfta att DNA-koncentrationen är lämplig för användning.

18. Rapportfiler kan skapas genom att klicka på knappen "Report" [Rapport]. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] visas. Välj "BRAf CE Analysis Report" [BRAf CE-analysrapport] under "Templates" [Mallar] och klicka sedan på "Show" [Visa] (bild 10). **Obs:** Du kan spara rapporter på en annan plats i formatet Web Archives genom att klicka på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.

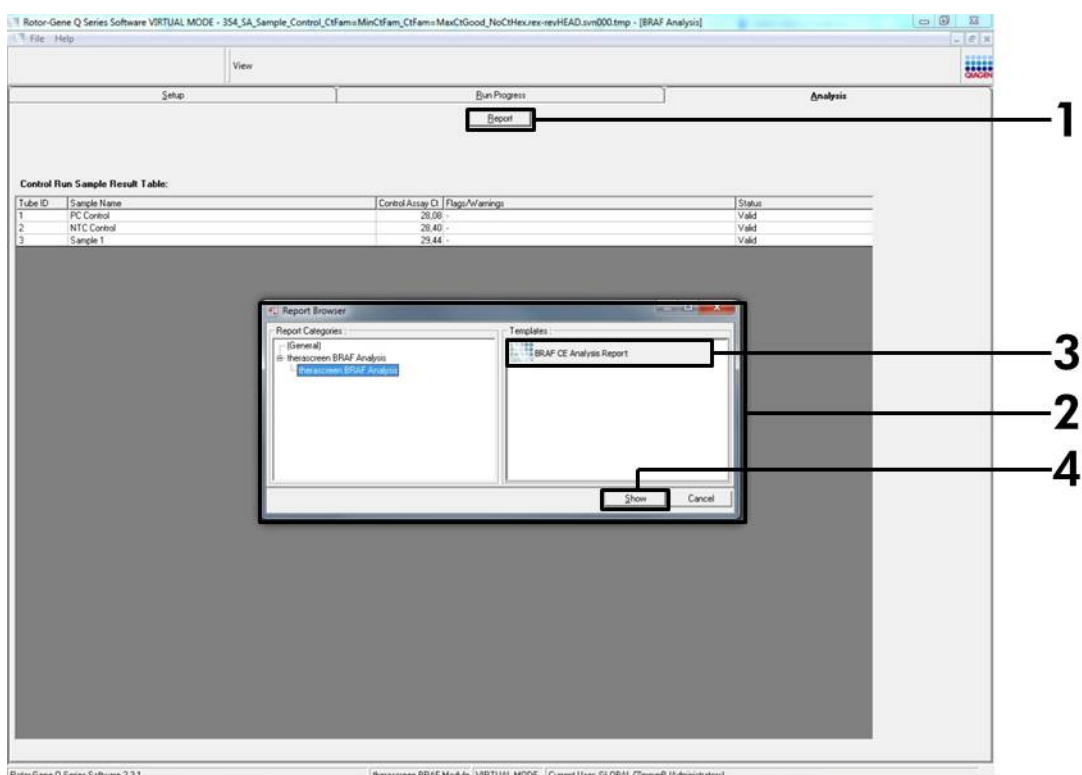


Bild 10. Välja "BRAf CE Analysis Report" [BRAf CE-analysrapport]. (1 = knappen "Report" [Rapport], 2 = fönstret "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = "BRAf CE Analysis Report" [BRAf CE-analysrapport], 4 = knappen "Show" [Visa].)

Protokoll: BRAF-mutationsdetektion

Detta protokoll är avsett för detektion av BRAF-mutationer. När ett prov har klarat provbedömningen kan det testas med BRAF-mutationsanalys som använder automatisk programvara.

Obs: Information om manuell mutationsdetektion finns i "Bilaga I: Manuellt protokoll för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet", sidan 55.

Viktigt att tänka på före start

- Innan du startar proceduren ska du läsa "Allmänna säkerhetsåtgärder", sidan 11.
- Ta dig tid att bekanta dig med instrumentet Rotor-Gene Q MDx innan du startar protokollet. Se användarhandboken till instrumentet.
- Vortexa inte *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) eller någon mix som innehåller *Taq* DNA-polymeras, eftersom det kan leda till att enzymet inaktiveras.
- För effektiv användning av *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet måste prover grupperas i en batchstorlek på minst 6. Mindre batchstorlekar innebär att färre prover kan testas med *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet.
- Pipettera *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) genom att placera pipettspetsen precis under ytan för att undvika att spetsen täcks med överflödigt enzym.

Saker som ska göras före start

- Kontrollera att programmet *therascreen* BRAF Assay Package är installerat innan instrumentet Rotor-Gene Q används första gången (se "Bilaga I: Manuellt protokoll för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet" på sidan 55).
- Innan varje användning måste alla reagenser tinas i minst 1 timme i rumstemperatur (15–25 °C), blandas genom att vända 10 gånger och centrifugeras en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
- Se till att *Taq* DNA-polymeras (*Taq*) håller rumstemperatur (15–25 °C) innan varje användning. Centrifugera röret en kort stund för att samla upp enzymet i botten av röret.

Procedur

1. Tina reaktionsmixar, vatten för kontroll utan mall (NTC) och BRAF-positiv kontroll (PC) i rumstemperatur (15–25 °C) i minst 1 timme. När reagenserna har tinat ska du blanda dem genom att vända varje rör 10 gånger för att undvika lokala saltkoncentrationer och sedan centrifugera en kort stund så att innehållet längst ned i röret samlas upp.
2. Bered tillräckligt med huvudmixar (reaktionsmix plus *Taq* DNA-polymeras [*Taq*]) för DNA-proverna, en positiv kontrollreaktion och en kontrollreaktion utan mall enligt volymerna som anges i tabell 3. Inkludera reagenser för 1 extra prov för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

Huvudmixarna innehåller alla komponenter som krävs för PCR förutom provet.

Tabell 3. Beredning av huvudmix för analys*

Analys	Volym av reaktionsmix	Volym av <i>Taq</i> DNA-polymeras (<i>Taq</i>)
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 = antal reaktioner (prover plus kontroller). Vid beredning av huvudmixen ska du bereda tillräckligt för 1 extra prov (n+1) för att ha tillräckligt överskott för PCR-konfigurationen.

3. Blanda huvudmixen noga genom att pipettera försiktigt upp och ned 10 gånger. Placera det korrekta antalet rör i laddningsblocket enligt layouten i bild 11. Tillsätt omedelbart 20 µl huvudmix i varje PCR-rör (medföljer ej).

Locken ligger kvar i sin plastbehållare tills de behövs.

Analys	Kontroller		Provnummer						
	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

Bild 11. Layout för kontroll- och mutationsanalyser i laddningsblocket. Siffrorna markerar position i laddningsblocket och indikerar slutlig rotorposition.

4. Tillsätt omedelbart 5 µl vatten för kontroll utan mall (NTC) i PCR-rören med kontroll utan mall (PCR-rör 9–13) och förslut rören. Tillsätt 5 µl av varje prov i provrören (PCR-rör nummer 17–21, 25–29, 33–37, 41–45, 49–53, 57–61 och 65–69) och förslut rören. Tillsätt 5 µl BRAF-positiv kontroll (PC) i rören med positiv kontroll (PCR-rör 1–5) och förslut rören. Varje DNA-prov måste testas med både kontrollen och alla mutationsanalyser.

Markera rörens lock för att visa i vilken riktning rören ska laddas på instrumentet Rotor-Gene Q MDx.

5. När alla PCR-rör har förslutits ska du göra en visuell kontroll av provrörens fyllnadsnivå för att säkerställa att prov har tillsatts i alla rör.
6. Vänd alla PCR-rör (4 gånger) för att blanda prover och reaktionsmixar.
7. Placera PCR-rören i sina korrekta positioner i rotorn med 72 brunnar (bild 11).

Maximalt 7 prover kan inkluderas i varje PCR-körning. Om rotorn inte är fullbelagd måste alla tomma positioner på rotorn fyllas med ett förslutet, tomt rör.

8. Placera omedelbart rotorn med 72 brunnar i instrumentet Rotor-Gene Q MDx. Se till att låsringen (tillbehör till instrumentet Rotor-Gene Q) är placerad längst upp på rotorn för att säkra rören under körningen.

9. Starta programmet Rotor-Gene Q och öppna samtidigt mallen genom att dubbelklicka på ikonen "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" på skrivbordet till den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q (bild 12).



Bild 12. Ikonen "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template".

10. Fliken "Setup" [Konfiguration] visas som standard (bild 13). Kontrollera att låsringen sitter fast ordentligt och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Stäng locket på instrumentet Rotor-Gene Q.

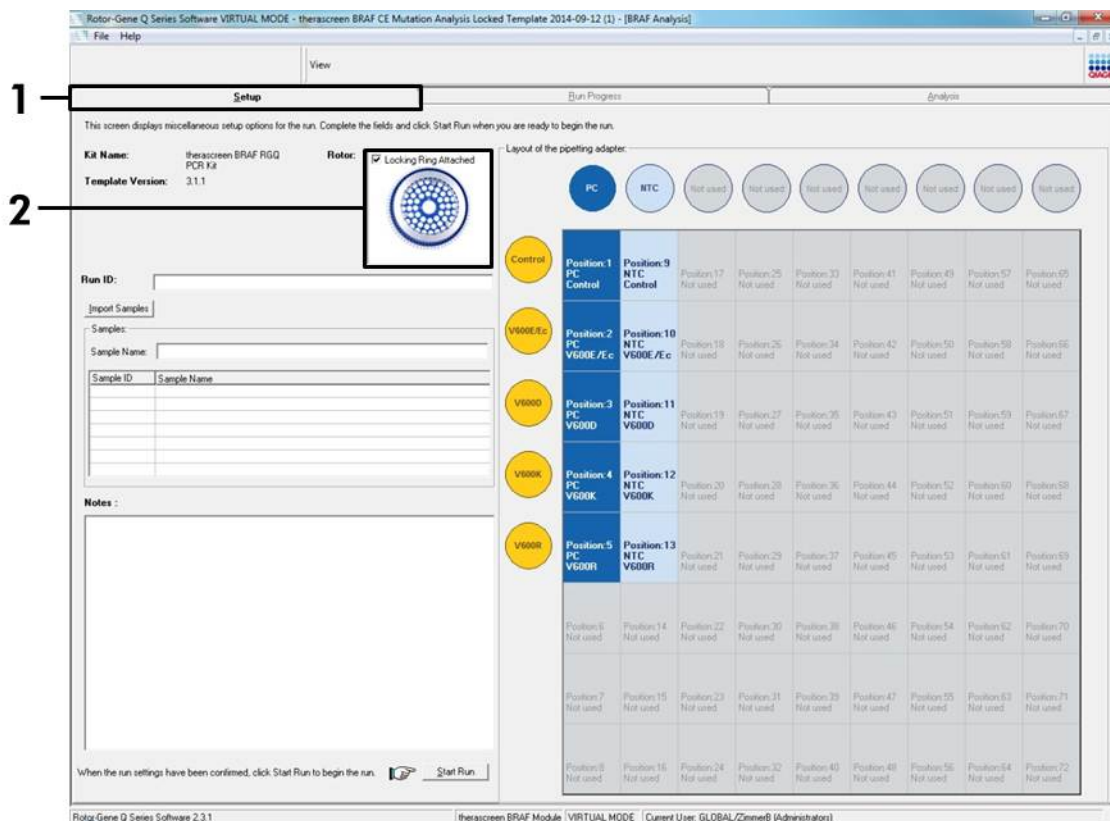


Bild 13. Fliken "Setup" [Konfiguration] (1) och rutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast] (2).

11. Skriv in körnings-ID i dialogrutan "Run ID" [Körnings-ID] enligt din lokala namnkonvention. Skriv in provnamnet i dialogrutan "Sample Name" [Provnamn] enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten.

Då läggs provnamnet till i provlistan nedanför och provet tilldelas ett "Sample ID" [Prov-ID] (1, 2, 3 etc.). Dessutom uppdateras panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] på höger sida med provnamnet (bild 14).

Obs: Alternativt kan provnamn som sparats i formatet *.smp (Rotor-Gene Q-provfil) eller *.csv (kommaseparerade värden) importeras via knappen "Import Samples" [Importerera prover]. Provnamn populeras automatiskt med hjälp av den här metoden.

Obs: Kontrollera i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn] att provnamnet är markerat genom en ändring av färgen och att alla analyserna i kolumnen under provcirkeln är markerade (bild 14).

Obs: Maximalt 7 prover kan läggas till. Prov-ID (i provcirkelarna) kommer automatiskt att tilldelas från 1 till 7.

Obs: Provnamn med mer än 8 tecken visas kanske inte i sin helhet i panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].

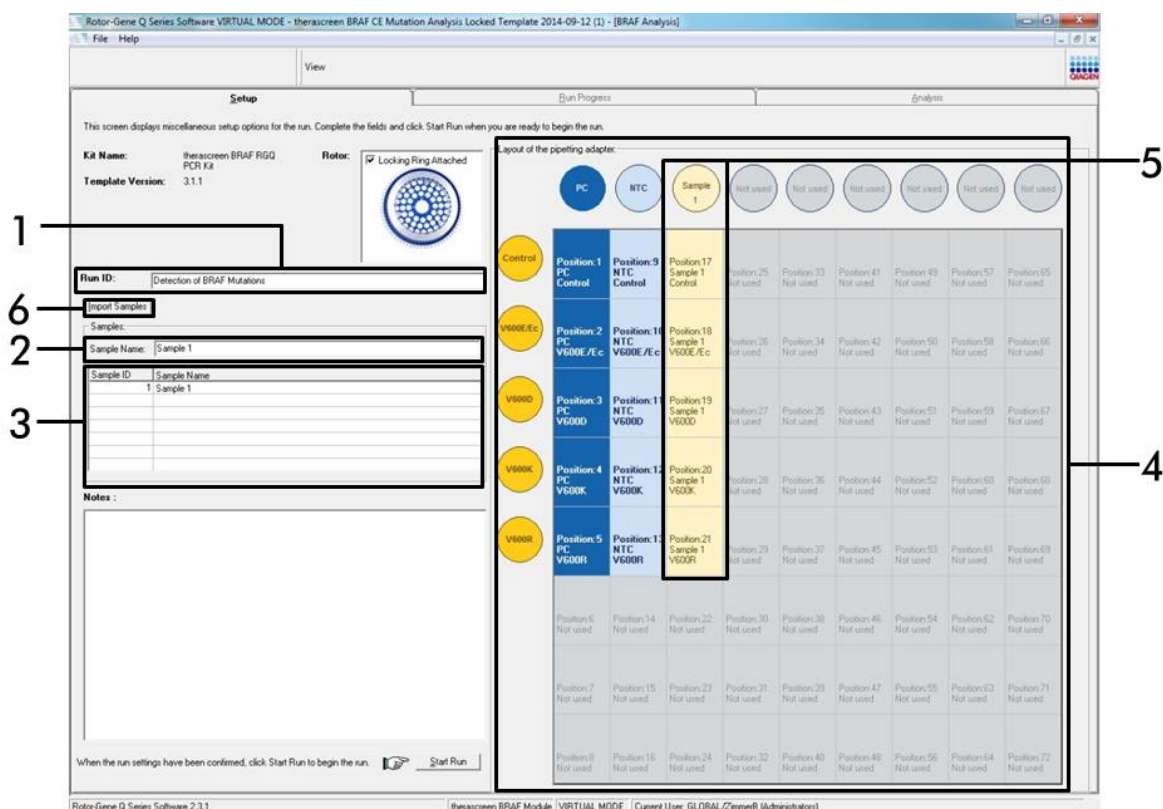


Bild 14. Ange "Run ID" [Körnings-ID] och "Sample Name" [Provnamn]. (1 = fältet "Run ID" [Körnings-ID], 2 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 3 = provlista, 4 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn], 5 = markerad provcirkel och kolumn med 5 analyser under panelen, 6 = knappen "Import Samples" [Importerera prover].)

12. Upprepa steg 11 för att ange namnen på alla ytterligare prover (bild 15).

Obs: Om du vill redigera ett provnamn klickar du på "Sample Name" [Provnamn] i provlistan så visas det valda provet i dialogrutan "Sample Name" [Provnamn] ovanför. Redigera provnamnet enligt din lokala namnkonvention och tryck på returtangenten för att uppdatera namnet.

The screenshot shows the 'Setup' tab of the Rotor-Gene Q Series Software. The 'Run ID' is 'Detection of BRAC Mutations'. The 'Layout of the pipetting adapter' table is as follows:

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

Bild 15. Ange ytterligare provnamn i dialogrutan "Sample Name" [Provnamn]. (1 = fältet "Sample Name" [Provnamn], 2 = provlista, 3 = panelen "Layout of the pipetting adapter" [Layout för pipetteringsadaptorn].)

13. När du har angett alla provnamn ska du bekräfta att de är korrekta. Lägg till eventuell kompletterande information i dialogrutan "Notes" [Anteckningar] om det behövs och klicka sedan på knappen "Start Run" [Starta körning] (bild 16).

Obs: Om någon rotorposition inte används visas en "Warning" [Varning] (bild 16) för att påminna användaren om att alla oanvända positioner på rotorn måste fyllas med ett förslutet, tomt rör. Kontrollera att alla oanvända rotorpositioner är fyllda med ett förslutet, tomt rör och klicka på "OK" för att fortsätta.

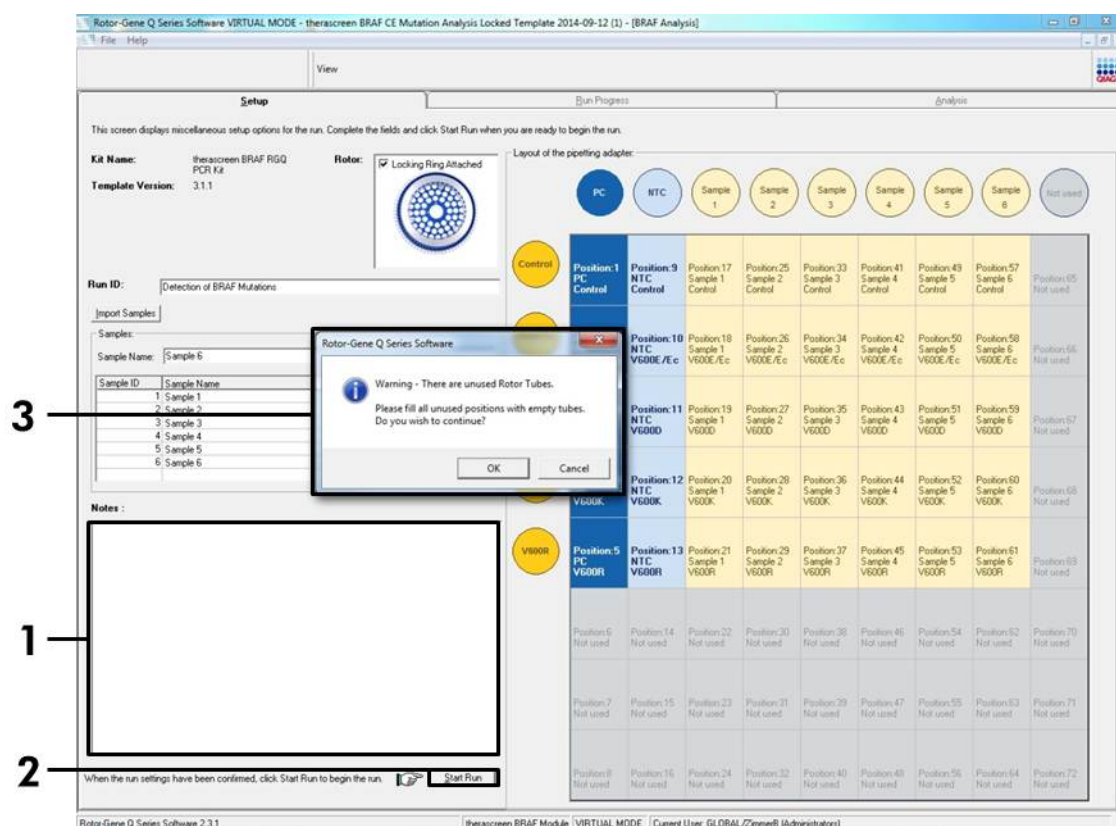


Bild 16. Fältet "Notes" [Anteckningar] (1), knappen "Start Run" [Starta körning] (2) och varning för oanvända rotorpositioner (3).

14. Ett "Save As"-fönster [Spara som] visas. Välj ett lämpligt filnamn och spara PCR-körningen som en körningsfil med ändelsen *.rex på den valda platsen (bild 17).

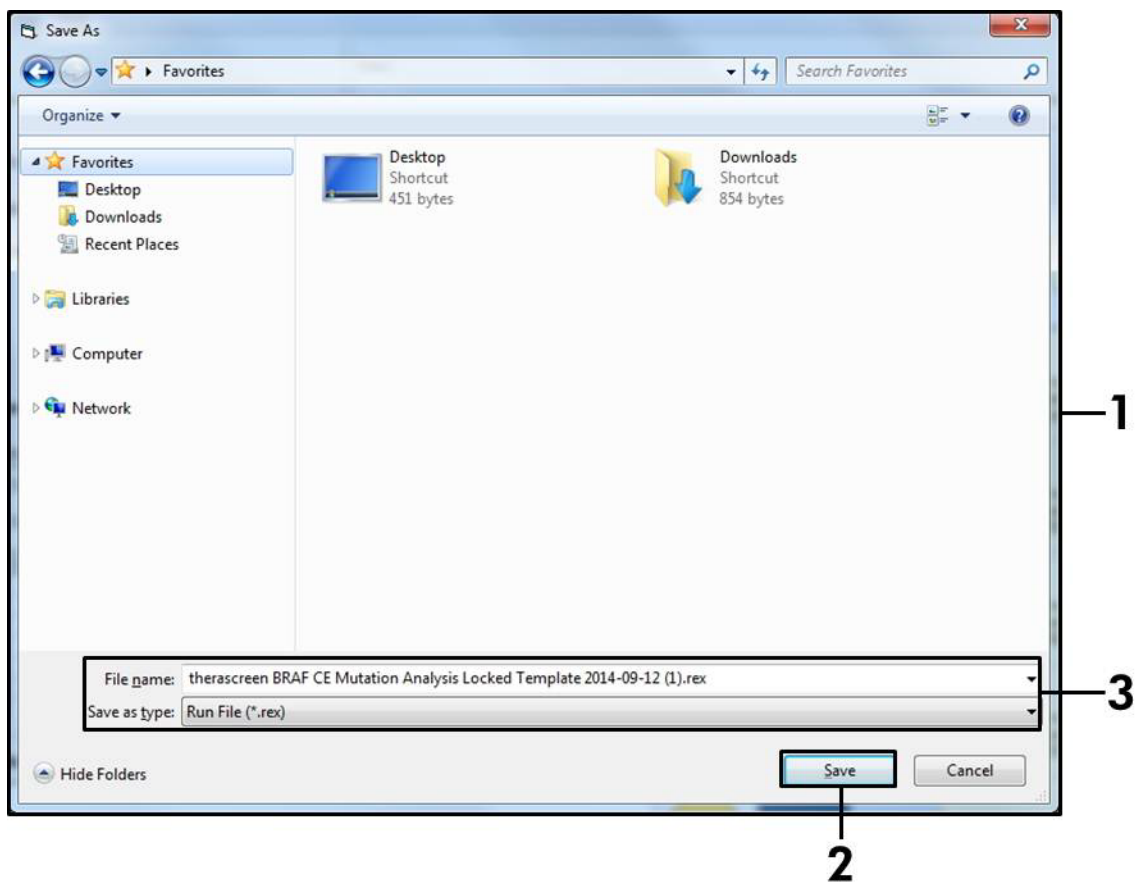


Bild 17. Spara körningsfilen. (1 = fönstret "Save As" [Spara som], 2 = fälten "File Name" [Filnamn] och "Save as type" [Spara som typ], 3 = knappen "Save" [Spara].)

15. PCR-körningen startar.

Obs: När körningen startar öppnas fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] automatiskt för att visa temperaturändringar och återstående tid av körningen (bild 18).

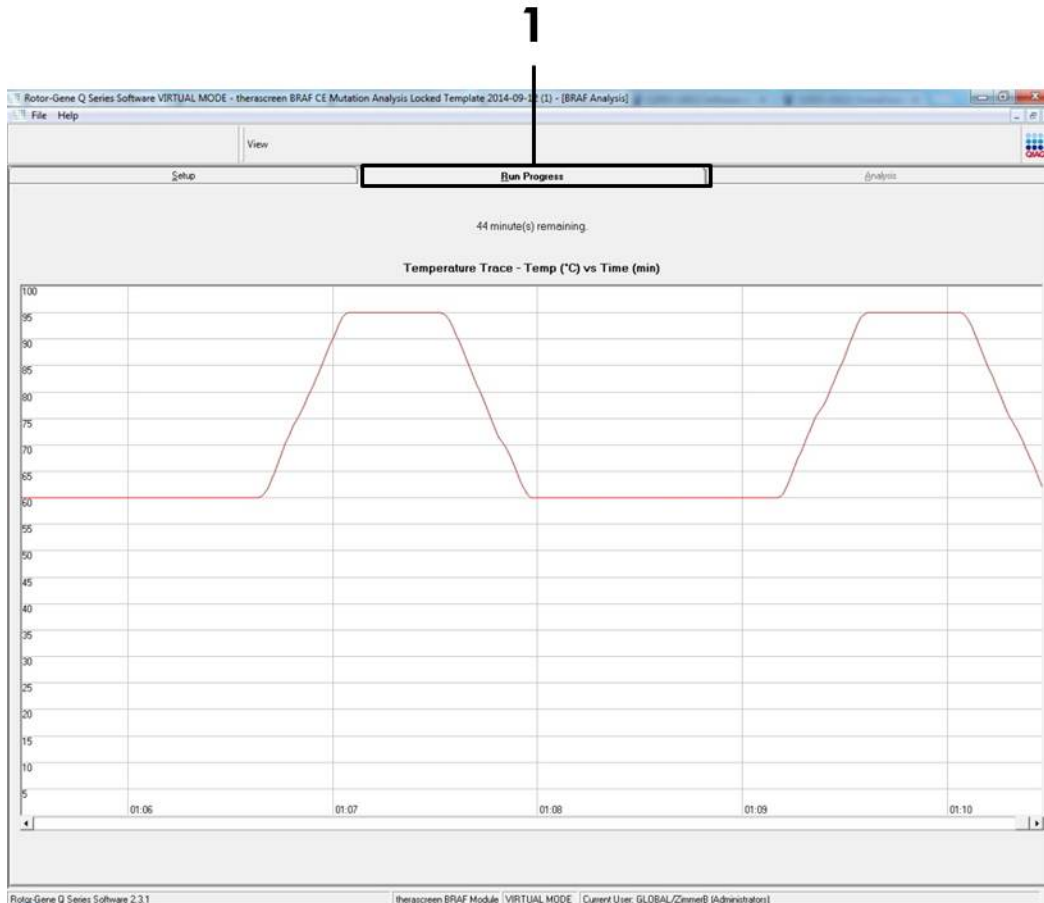


Bild 18. Fliken "Run Progress" [Körningsförlopp] (1).

16. När körningen har avslutats öppnas fliken "Analysis" [Analys] automatiskt.

Obs: Om fliken "Analysis" [Analys] inte öppnas klickar du på fliken "Analysis" [Analys] (bild 19).

Obs: En förklaring av beräkningsmetoden ges i "Tolkning av resultat" på sidan 36.

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

Bild 19. Fliken "Analysis" [Analys] och rapportering av resultat. (1 = fliken "Analysis" [Analys], 2 = panelen "Run Controls, Positive Control" [Körningskontroller, positiv kontroll], 3 = panelen "Run Controls, Negative Control" [Körningskontroller, negativ kontroll], 4 = panelen "Sample Result Table" [Tabell med provresultat], 5 = panelen "Mutation Status" [Mutationsstatus].)

17. Analysresultat rapporteras på följande sätt (bild 19):

- **Panelen "Run Controls, Positive Control" [Körningskontroller, positiv kontroll].** Om resultaten ligger inom det acceptabla intervallet visas "Valid" [Giltigt] för "Positive Control Status" [Status för positiv kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].
- **Panelen "Run Controls, Negative Control" [Körningskontroller, negativ kontroll].** Om både resultatet "NTC" och "Internal Control" [Internkontroll] ligger inom de acceptabla intervallen visas "Valid" [Giltigt] för "Negative Control Status" [Status för negativ kontroll]; annars visas ett resultat med statusen "Invalid" [Ogiltigt].

- **Panelen "Sample Result Table" [Tabell med provresultat].** Specifika mutationer rapporteras för de mutationspositiva proverna i kolumnen "BRAF Mutation Status" [BRAF-mutationsstatus].

18. Rapportfiler kan skapas genom att klicka på knappen "Report" [Rapport]. Fönstret "Report Browser" [Rapportmeny] visas. Välj "BRAF CE Analysis Report" [BRAF CE-analysrapport] under "Templates" [Mallar] och klicka sedan på "Show" [Visa] (bild 20).

Obs: Du kan spara rapporter på en annan plats i formatet Web Archives genom att klicka på "Save As" [Spara som] i det övre vänstra hörnet på varje rapport.

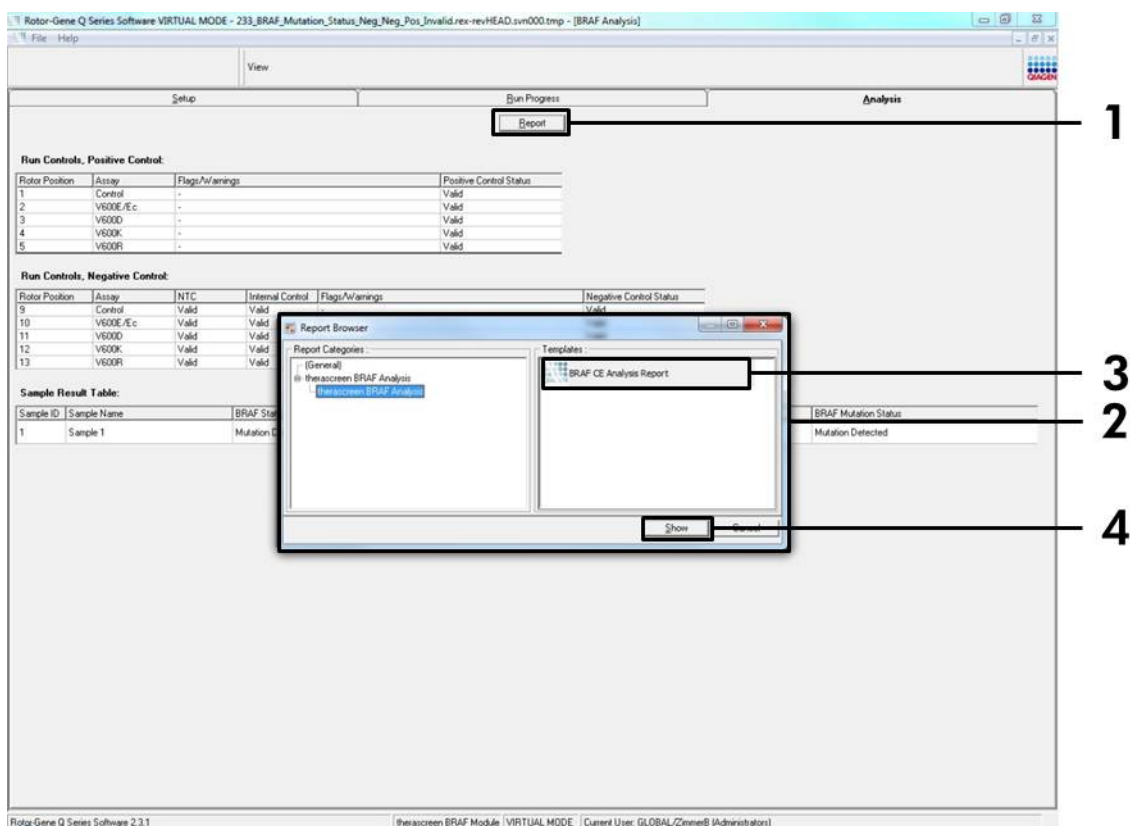


Bild 20. Välj "BRAF CE Analysis Report" [BRAF CE-analysrapport]. (1 = knappen "Report" [Rapport], 2 = fönstret "Report Browser" [Rapportmeny], 3 = knappen "BRAF CE Analysis Report" [BRAF CE-analysrapport], 4 = knappen "Show" [Visa].)

Tolkning av resultat (automatiskt)

Analysen och mutationsbestämningarna utförs automatiskt av *therascreen* BRAF Assay Package när en körning har slutförts. Följande information förklarar hur *therascreen* BRAF Assay Package gör analysen och mutationsbestämningarna.

Obs: Information om manuell analys finns i "Bilaga I: Manuellt protokoll för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet", sidan 55.

PCR-cykeln vid vilken fluorescensen från en viss reaktion går över ett tröskelvärde definieras som C_T -värdet. C_T -värdena indikerar mängden av ett specifikt input-DNA. Låga C_T -värden indikerar högre nivåer av input-DNA och höga C_T -värden indikerar lägre nivåer av input-DNA. Reaktionen med ett C_T -värde klassificeras som positiv amplifiering.

Programmet Rotor-Gene Q interpolerar fluorescenssignaler mellan två registrerade värden (vilka som helst). C_T -värdena kan därför vara vilket reellt tal som helst (inte begränsat till heltal) i intervallet från 0 till 40.

För *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet är tröskelvärdena för kanalerna Green och Yellow inställda på 0,15 respektive 0,05 relativa fluorescensenheter. De här värdena konfigureras automatiskt i *therascreen* BRAF Assay Package.

Körningskontrollerna (positiv kontroll, NTC och internkontroller) bedöms för att säkerställa att acceptabla C_T -värden uppfylls och att reaktionerna utförs korrekt.

Provets ΔC_T -värden beräknas för varje mutationsanalys med hjälp av ekvationen:

$$\Delta C_T = [\text{mutationsanalysens } C_T\text{-värde}] - [\text{kontrollanalysens } C_T\text{-värde}]$$

Prover klassas som mutationspositiva om de ger ett ΔC_T -värde lägre än eller lika med cutoff ΔC_T -värdet för den analysen. Över det här värdet kan provet antingen innehålla mindre än den procentandel mutation som kan detekteras av *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet (bortom gränsen för analyserna), eller så är provet mutationsnegativt vilket rapporteras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad].

Ingen amplifiering i mutationsreaktioner räknas som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad]. ΔC_T -värden som beräknas genom bakgrundsamplifiering förväntas vara större än cutoff ΔC_T -värdena och provet kommer att klassificeras som "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad].

Analysresultaten visas som "Mutation Detected" [Mutation detekterad], "No Mutation Detected" [Ingen mutation detekterad], "Invalid" [Ogiltig] eller, om en körningskontroll misslyckas, "Run Control Failed" [Körningskontrollen misslyckades]. För de mutationspositiva proverna rapporteras specifika mutationer enligt logiken för korsreaktivitet i "Tabell 8. Klassificera

provmutationsstatus" på sidan 50. Andra möjliga resultat som kan visas behandlas i "Protokoll: Provbedömning" på sidan 14, "Protokoll: BRAF-mutationsdetektion" på sidan 25 och "therascreen BRAF Assay Package-flaggor" på sidan 38 i den här handboken.

I sällsynta fall kan en tumör innehålla mer än en mutation. I sådana fall visar rapporten BRAF-statusen som "Mutation Detected" [Mutation detekterad]; dock kommer alla positiva mutationer att listas med varningsflaggan "SAMPLE_POSITIVE_AND_UNCLASSIFIABLE".

Felsökningsguide

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vetenskapsmännen på QIAGENs tekniska service svarar gärna på dina frågor om informationen och protokollen i den här handboken eller om prov- och analysteknik (kontaktinformation finns på baksidan eller på www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag på åtgärd

Ogiltiga resultat

- | | |
|---|--|
| a) Förvaringsvillkoren för en eller flera komponenter överensstämmer inte med instruktionerna i "Förvaring och hantering av reagenser" på sidan 12. | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se etiketten) på förpackningen och använd ett nytt kit om det behövs. |
| b) Utgångsdatum för <i>therascreen</i> BRAF CE RGQ PCR-kitet har passerats. | Kontrollera förvaringsvillkoren och utgångsdatum (se kitetiketten) på förpackningen och använd ett nytt <i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR-kit om det behövs. |

***therascreen* BRAF Assay Package-flaggor**

I tabell 4 listas de flaggor som kan genereras av *therascreen* BRAF Assay Package, deras betydelse och vilka åtgärder som kan vidtas.

Tabell 4. *therascreen* BRAF Assay Package-flaggor

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C _T utanför intervallet för positiv kontroll i kontrollreaktionen.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (kontrollreaktion) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_ASSAY_FAIL	Ogiltig PCR-körning – FAM C _T utanför intervallet för en eller flera mutationsreaktioner.	Upprepa hela PCR-körningen.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i positiv kontroll (mutationsreaktion) kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INVALID_DATA	Ogiltig PCR-körning – fluorescensdata i negativ kontroll kan inte tolkas.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_ASSAY_CT_INVALID	Ogiltig PCR-körning – ogiltigt FAM (mindre än gränsvärdet) för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
NTC_INT_CTRL_FAIL	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen ovanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
NTC_INT_CTRL_ EARLY_CT	Ogiltig PCR-körning – internkontrollen är nedanför intervallet för negativ kontroll.	Upprepa hela PCR-körningen.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	Ogiltigt prov – fluorescensdata i provkontrollen kan inte tolkas.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa de relevanta proverna.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	Ogiltigt prov – FAM C _T är för lågt i provkontrollen.	Späd provet för att öka kontroll-C _T -värdet. Den här spädningen ska beräknas baserat på antagandet att spädning 1:1 med vatten som medföljer kitet kommer att öka C _T med 1,0. När provet har späts ut ska du konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet.
SAMPLE_CTRL_LOW_CONC	Giltigt prov – låg koncentration i provkontrollen (varning, inte fel).	Ingen åtgärd.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_CTRL_FAIL	Ogiltigt prov – FAM C _T är för högt i provkontrollreaktionen.	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_CTRL_ INT_CTRL_EARLY_ CT	Ogiltigt prov – HEX C _T är för lågt för provet (internkontroll).	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.
SAMPLE_CTRL_ INT_CTRL_FAIL	C _T för högt (eller inget C _T) för internkontroll (HEX) och C _T för högt (eller inget C _T) för kontrollanalysen (FAM).	Konfigurera en ny PCR-körning och upprepa provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	C _T för högt (eller inget C _T) för internkontroll (HEX) och inget C _T för mutationsanalysen (FAM).	<p>Om provet ges statusen "mutation detekterad" – ingen åtgärd.</p> <p>Om provet ges statusen "ogiltig" konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet.</p> <p>Obs: Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämmarna, men det leder även till spädning av mål-DNA. Ett rör med vatten för spädning av prov (Dil.) ingår i kitet.</p> <p>Om den upprepade PCR-körningen ger resultatet "ogiltigt" extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_INT_ CTRL_EARLY_CT	Mutationsrör ogiltigt – C _T HEX för lågt för provet (internkontroll).	Om provet ges den giltiga statusen "mutation detekterad" – ingen åtgärd. Om provet ges statusen "ogiltig" konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_INVALID_DATA	Mutationsrör ogiltigt – fluorescensdata i internkontroll kan inte tolkas.	<p>Om provet ges den giltiga statusen "mutation detekterad" – ingen åtgärd.</p> <p>Om provet ges statusen "ogiltig" konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.</p>

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_ MUTATION_ EARLY_DELTA_CT	Mutationsrör ogiltigt – C _T FAM för lågt för provet.	Om provet ges den giltiga statusen "mutation detekterad" – ingen åtgärd. Om provet ges statusen "ogiltig" konfigurerar du en ny PCR-körning och upprepar provet. Om den upprepade PCR-körningen ger ett ogiltigt resultat extraherar du provet från ett nytt FFPE-snitt. Konfigurera en ny PCR-körning för att testa den nya extraktionen. Om resultatet blir ogiltigt upprepar du den här andra extraktionen. Om provet inte ger ett giltigt resultat efter den här körningen får provet en obestämd mutationsstatus och ingen ytterligare testning ska utföras.

Tabellen fortsätter på nästa sida

Tabell 4. Fortsättning

Flagga	Betydelse	Åtgärd som ska vidtas
SAMPLE_POSITIVE_ AND_INVALID	Giltigt resultat – ett eller flera mutationsrör för ett prov är giltiga och positiva, och samtidigt är ett eller flera mutationsrör för samma prov ogiltiga (varning, inte ett fel). Provet bestäms som "mutation detekterad" eftersom en mutation förekommer. Dock kanske inte den specifika mutationen som visas i rapporten representerar den faktiska mutationen som förekommer på grund av korsreaktivitet mellan analyserna. Därför måste provet klassificeras som "mutation detekterad".	Ingen åtgärd.
SAMPLE_POSITIVE_ AND_ UNCLASSIFIABLE	Giltigt resultat – mer än ett mutationsrör är giltigt för samma prov. Kombinationen är inte kompatibel med de förväntade mönstren för korsreaktivitet. Se tabell 8. I sällsynta fall kan provet innehålla mer än en mutation.	Ingen åtgärd.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Begränsningar

Enbart resultaten från produkten ska inte ligga till grund för diagnos, utan de måste tolkas med hänsyn till resultat från alla relevanta kliniska studier eller laboratoriestudier.

Verifieringsstudier har utförts med humant DNA som extraherats från formalinfixerade, paraffininbäddade tumörprover och syntetiska standarder lämpliga för de enskilda studierna.

Produkten har verifierats med hjälp av QIAamp DNA FFPE Tissue-kitet från QIAGEN.

Produkten är endast avsedd för användning på Rotor-Gene Q MDx-instrument.

För optimalt resultat krävs att anvisningarna i *handboken för theascreen BRAF RGQ PCR-kitet* följs strikt. Spädning av reagenser på annat sätt än vad som anges i den här handboken rekommenderas inte, då det kan resultera i försämrade prestanda.

Det är viktigt att mängden och kvaliteten hos DNA i provet utvärderas korrekt innan provanalys utförs med *theascreen BRAF RGQ PCR-kitet*. Ytterligare kontrollmix tillhandahålls för att bestämma om C_T -värdet är godkänt för analysen. Absorbansavläsningar ska inte användas då de inte överensstämmer med C_T -värden i fragmenterade DNA-prover.

Var uppmärksam på de utgångsdatum och förvaringsvillkor som anges på förpackningen och på etiketterna till alla komponenter. Använd inte komponenter vars utgångsdatum har passerat eller som har förvarats felaktigt.

Testets egenskaper

LOB (limit of blank), arbetsintervall och cutoff-värden

Totalt 143 FFPE-prover testades i en studie enligt instruktionerna i NCCLS EP17-A (2004) för att bestämma LOB och cutoff-värden för varje mutationsanalys. Dessutom bestämdes arbetsintervallet för kontrollanalysen. Cutoff-värdena fastställdes och presenteras i tabell 5.

Tabell 5. Fastställda cutoff-värden för varje mutationsanalys

	Mutantanalys (ΔC_T)			
	V600E/Ec	V600D	V600K	V600R
Cutoff (ΔC_T)	$\leq 7,0$	$\leq 6,9$	$\leq 6,0$	$\leq 7,0$

Kontrollreaktionens C_T -intervall fastställdes från 21,95 till 32,00 C_T .

Analysens cutoff-värden och arbetsintervall verifierades med hjälp av standarder och ytterligare (unika) 102 FFPE-prover. Under verifieringen bedömdes cutoff-värdena efter förmågan att särskilja korrekt mutation i en bakgrund med vildtyps-DNA genom att bedöma varje analys med hög input genomiskt DNA och hög input mutation (se "Korsreaktivitet", sidan 50). Effekten av input-DNA på mutationsklassificering bedömdes också (se "Effekt av input-DNA på ΔC_T -värden", sidan 49).

Noggrannhet: Jämförelse med analytisk referensmetod

En studie påvisade överensstämmelsen i mutationsstatus för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet i relation till bidirektionell Sanger-sekvensering. I den här studien testades 126 FFPE-prover med statistiska mått på överensstämmelse/icke-överensstämmelse från instruktionerna i CLSI EP12-A2 (2008). 102 av FFPE-proverna återgav giltiga resultat för både *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet och bidirektionell Sanger-sekvensering. Pyrosequencing[®] användes för att bekräfta mutationsstatusen där klassificeringen av en provmutationsstatus inte överensstämde mellan bidirektionell Sanger-sekvensering och *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet.

Tabell 6 visar analysen av överensstämmelse mellan *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet och sekvensering.

Tabell 6. Analys av överensstämmelse

	Mått på överensstämmelse	Frekvens (%)
Score	Total överensstämmelse	96,08
	Positiv överensstämmelse	100,00
	Negativ överensstämmelse	95,29

Frekvensen av negativ överensstämmelse beror på mutationsdetektion för 4 prover som rapporterades som vildtyp med sekvensering och V600E/Ec-mutation positiv med *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet. Detta beror på den ökade sensitiviteten hos teknikerna Scorpions och ARMS.

Effekt av input-DNA på ΔC_T -värden

Effekten av totala input-DNA-nivåer vid bestämning av mutationsstatus med *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet utvärderades som en del av verifieringsstudien av analysens cutoff-värden och arbetsintervall. Detta gjordes för att verifiera att mutationsklassificeringar som genererats av *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet är konsekventa vid olika DNA-inputnivåer genom arbetsintervallet.

Mutationsstandarder innehållande hög, medelhög och låg procentandel mutation (100 %, 50 % respektive $3 \times \text{LOD}$ %) i en bakgrund av vildtyps-DNA preparerades med höga, medelhöga och låga DNA-inputnivåer. Således testades totalt 9 mutationsstandarder för varje mutationsanalys. Resultaten för alla analyser visas i tabell 7.

De beräknade differenserna i genomsnittligt ΔC_T -värde mellan varje par av input-DNA-nivåer, enligt beräkningen från den linjära regressionsanalysen, ligger alla inom $\pm 1 C_T$. Alla 4 mutationsanalyserna betraktades därför som ekvivalenta vid höga, medelhöga och låga DNA-inputnivåer.

Tabell 7. Beräknade differenser mellan DNA-inputnivåer

Analys	Parameter (DNA-inputnivå)	Beräknad differens (ΔC_T)	95 % konfidensintervall (lägre, högre)
V600E (E)	Hög – medelhög	0,56	0,22, 0,90
V600E (E)	Låg – medelhög	0,01	-0,33, 0,35
V600E (Ec)	Hög – medelhög	0,48	0,12, 0,84
V600E (Ec)	Låg – medelhög	0,26	-0,10, 0,62
V600D	Hög – medelhög	-0,32	-0,58, -0,06
V600D	Låg – medelhög	-0,43	-0,69, -0,17
V600K	Hög – medelhög	0,10	-0,10, 0,30
V600K	Låg – medelhög	-0,33	-0,53, -0,13
V600R	Hög – medelhög	-0,12	-0,28, 0,04
V600R	Låg – medelhög	-0,62	-0,78, -0,46

Korsreaktivitet

Standarder vid hög DNA-input med högt mutationsinnehåll (100 %) testades för att bedöma potentiell korsreaktivitet för varje analys. Korsreaktivitetsresultaten möjliggjorde sammanställning av en logisk tabell för mutationsstatus enligt tabell 8. BRAF CE Assay Package använder logik för korsreaktivitet för att bestämma mutationsstatus.

Tabell 8. Klassificera provmutationsstatus

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutationsstatus
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

Värden för detektionsgräns (LOD)

En studie utfördes för att avgöra LOD för var och en av de 4 mutationsspecifika reaktionerna som innefattas i *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet. I den här studien definierades LOD som den lägsta andelen mutant-DNA i en bakgrund med vildtyps-DNA då ett mutantprov ger mutationspositiva resultat i 95 % av testresultaten (C_{95}).

För att bestämma LOD för varje analys preparerades mutationsstandarder med olika procentandelar med medelhög input-DNA-koncentration och testades med *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet. LOD för varje analys beräknades med logistisk regression. För att verifiera LOD för varje analys preparerades mutationsstandarder vid bestämd LOD. Sextio replikat testades och den positiva testandelen verifierades.

Verifierade LOD-värden vid medelhög input-DNA-koncentration anges i tabell 9. Vid högre input-DNA-koncentrationer förväntas LOD-värdena vara lägre än de värden som anges i tabell 9.

Tabell 9. LOD-värden för varje mutationsanalys (medelhög input)

Analys (mutation)*	LOD C₉₅ vid medelhög input-DNA (procentandel mutant-DNA i vildtyps-DNA)
V600E (E)	1,82 %
V600E (Ec)	4,31 %
V600D	3,19 %
V600K	4,34 %
V600R	4,85 %

* LOD för V600E-analysen beräknades för både V600E- och V600Ec-mutationer.

Effekt av melanin på kitets prestanda

Syftet med den här studien var att utvärdera huruvida melanin, en känd PCR-hämmare som hittas i melanoma prover, påverkar effekten hos *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet. Detta gjordes genom att addera melanin direkt i DNA-prover innan de testades med *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet i ett intervall koncentrationer (0–250 ng/reaktion) och sedan bedöma effekten på ΔC_T -värden och mutationsstatus hos testproverna.

Resultaten visade att låg melaninkoncentration inte hade någon effekt på ΔC_T och att medelhöga nivåer av melaninkoncentration hade minimal effekt på ΔC_T . Således påverkas inte analysernas förmåga att detektera mutation av låga och medelhöga koncentrationsnivåer melanin. Vid 180 ng/reaktion misslyckades internkontrollen, vilket indikerar förekomst av hämmare och således möjliggörs detektion av hämmare innan mutationsklassificeringen påverkas.

De melaninkoncentrationer som förväntas påträffas vid normal användning påverkar inte förmågan hos *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet att särskilja mellan mutationspositiva och mutationsnegativa prover.

En sammanfattning av resultaten visas i tabell 10.

Tabell 10. Mängd melanin som testats i varje analys

Melaninkoncentration (ng/reaktion)	Ändring i ΔC_T	Internkontrollstatus (OK/misslyckad)
0	0	OK
60	-0,20	OK
100	-0,61	OK
150	-1,21	OK
180	-2,15	Misslyckad

Repeterbarhet

En utformad studiematris implementerades för att variera operatör, datum, plattlayout och instrument för att kunna bestämma analysprecision både inom en körning och mellan körningar. Repeterbarhet påvisades vid en låg nivå av DNA-input vid $3 \times \text{LOD}$ för mutationsanalyser. Dessutom bedömdes procentandelen positiva mutationsklassificeringar för varje analys när den testades med sin specifika mutationsstandard. Varje mutationsanalys gav 100 % positiva mutationsklassificeringar.

Precisionsvärden anges i tabell 11.

Reproducerbarhet

En utformad studiematris implementerades för att bedöma analysens reproducerbarhet genom att testa standarder vid 3 laboratorier (platser), med 3 loter av *therascreen* BRAF RGQ PCR Kits (2 på varje plats) med 2 operatörer per plats och 2 instrument per plats under 4 olika dagar. Reproducerbarhet påvisades för lågnivå-mutation ($3 \times \text{LOD}$) för mutationsanalyser och låg vildtyp-input för kontrollanalysen. Precisionen för varje analys beräknades på de 3 platserna, tillsammans med 95 % uppskattningar av precision (tabell 12).

Tabell 11. Repeterbarhet, uppskattningar av precision

Analys	Precision (mellan körningar)	95 % konfidens- intervall (lägre, högre)	Precision (inom körning)	95 % konfidens- intervall (lägre, högre)
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. Reproducerbarhet, uppskattningar av precision

Analys	Precision	95 % konfidensintervall (lägre, högre)
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



Innehåller tillräckligt med reagenser för <24> reaktioner



Används senast



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Innehåller



Antal



GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen



Utsätt inte för direkt solljus



Varning

Bilaga I: Manuellt protokoll för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet

I det här avsnittet finns instruktioner om användning av *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet med programmet RGQ version 2.3 i öppet läge (dvs. utan BRAF Assay Package).

Allmän information

- En lista med det material som behövs finns på sidan 9.
- Fullständiga instruktioner om provberedning och provlayout finns i avsnitten "Protokoll: Provbedömning", sidan 14, och "Protokoll: BRAF-mutationsdetektion", sidan 25.

Protokoll: Skapa en temperaturprofil

Innan du börjar ska du skapa en temperaturprofil för BRAF-analysen. Cykelparametrarna är desamma för både provbedömning och mutationsbedömning.

Procedur

En sammanfattning av cykelparametrarna finns nedan:

Tabell 13. Cykelparametrar

Cykler	Temperatur	Tid	Datahämtning
1	95 °C	15 minuter	Inget
40	95 °C	30 sekunder	Inget
	60 °C	60 sekunder	Grön och gul

1. Dubbelklicka på programikonen för Rotor-Gene Q-programmet 2.3 på skrivbordet på den dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q MDx.
2. För att skapa en ny mall väljer du "Empty Run" [Tom körning] och klickar sedan på "New" [Ny] för att komma till "New Run Wizard" [Guide för ny körning].

3. Välj "72-Well Rotor" [Rotor med 72 brunnar] som rotortyp. Bekräfta att låsringen sitter fast och markera kryssrutan "Locking Ring Attached" [Låsring fast]. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 21).

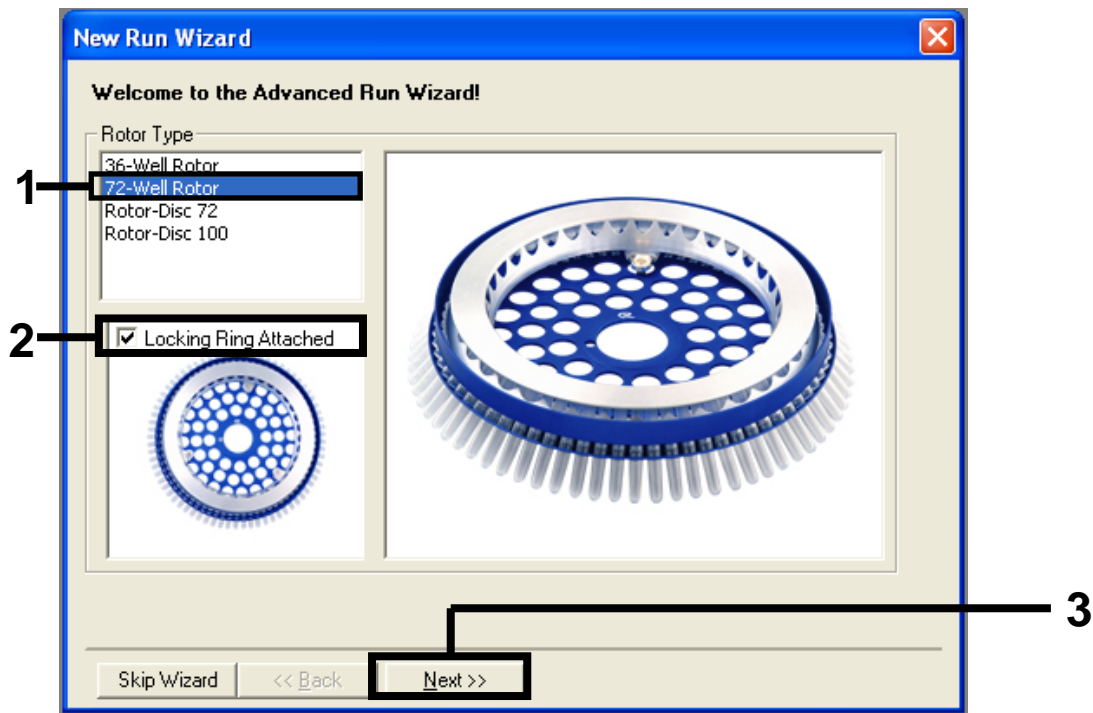


Bild 21. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning]. (1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = knappen "Next" [Nästa].)

4. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och ange reaktionsvolymen 25. Kontrollera att det står "1, 2, 3..." i rutan "Sample Layout" [Provlayout]. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 22).

Bild 22. Ange namn på operatör och reaktionsvolym. (1 = fältet "Operator" [Användare], 2 = fältet "Notes" [Anteckningar], 3 = fältet "Reaction Volume" [Reaktionsvolym], 4 = fältet "Sample Layout" [Provlayout], 5 = knappen "Next" [Nästa].)

5. Klicka på knappen "Edit Profile" [Ändra profil] i dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] (bild 23) och kontrollera körningsparametrarna enligt följande steg.

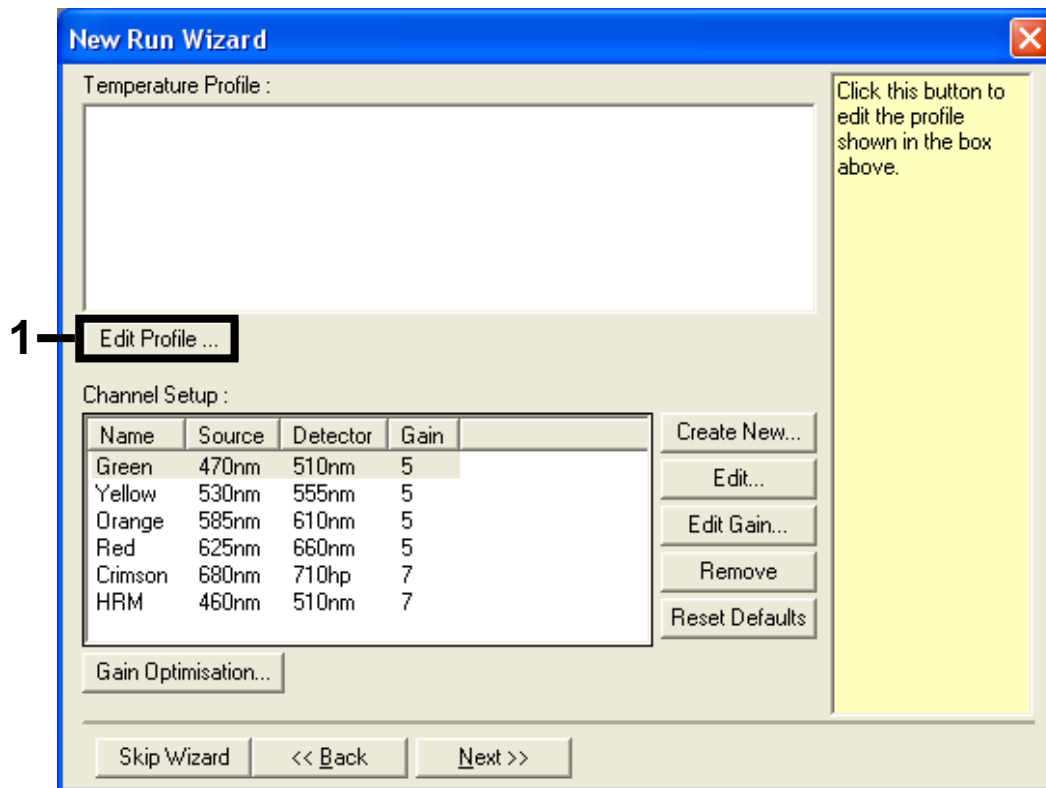


Bild 23. Ändra profilen (1).

6. Klicka på knappen "Insert after" [Sätt in efter] och välj "New Hold at Temperature" [Ny bibehållning vid temperatur] (bild 24).

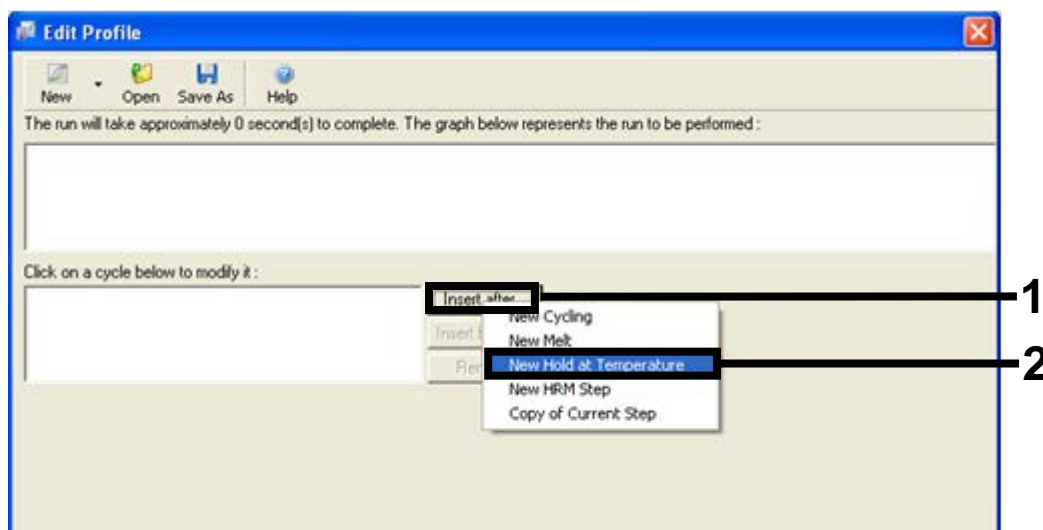


Bild 24. Infoga ett initialt inkubationssteg. (1 = knappen "Insert after" [Sätt in efter], 2 = "New Hold at Temperature" [Ny bibehållning vid temperatur].)

7. Ändra "Hold Temperature" [Bibehållen temperatur] till 95 °C och "Hold Time" [Bibehållen tid] till "15 mins 0 secs". Klicka på knappen "Insert after" [Sätt in efter] och välj "New Cycling" [Ny cykling] (bild 25).

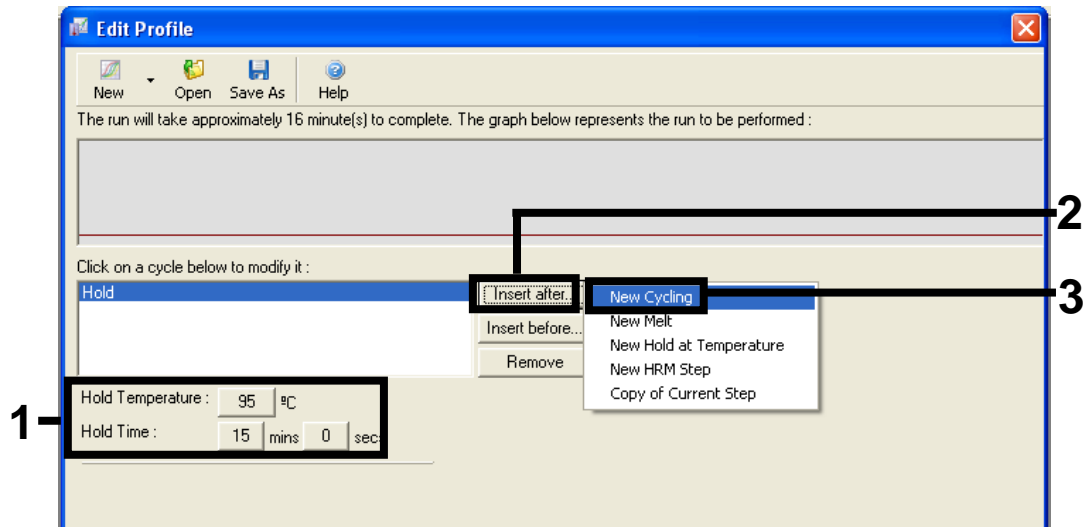


Bild 25. Initialt inkubationssteg vid 95 °C. (1 = knapparna "Hold Temperature" [Bibehållen temperatur] och "Hold Time" [Bibehållen tid], 2 = knappen "Insert after" [Sätt in efter], 3 = "New Cycling" [Ny cykling].)

8. Ändra antalet cykelrepetitioner till 40. Välj det första steget och ställ in på "95°C for 30 secs" [95 °C i 30 sekunder] (bild 26).

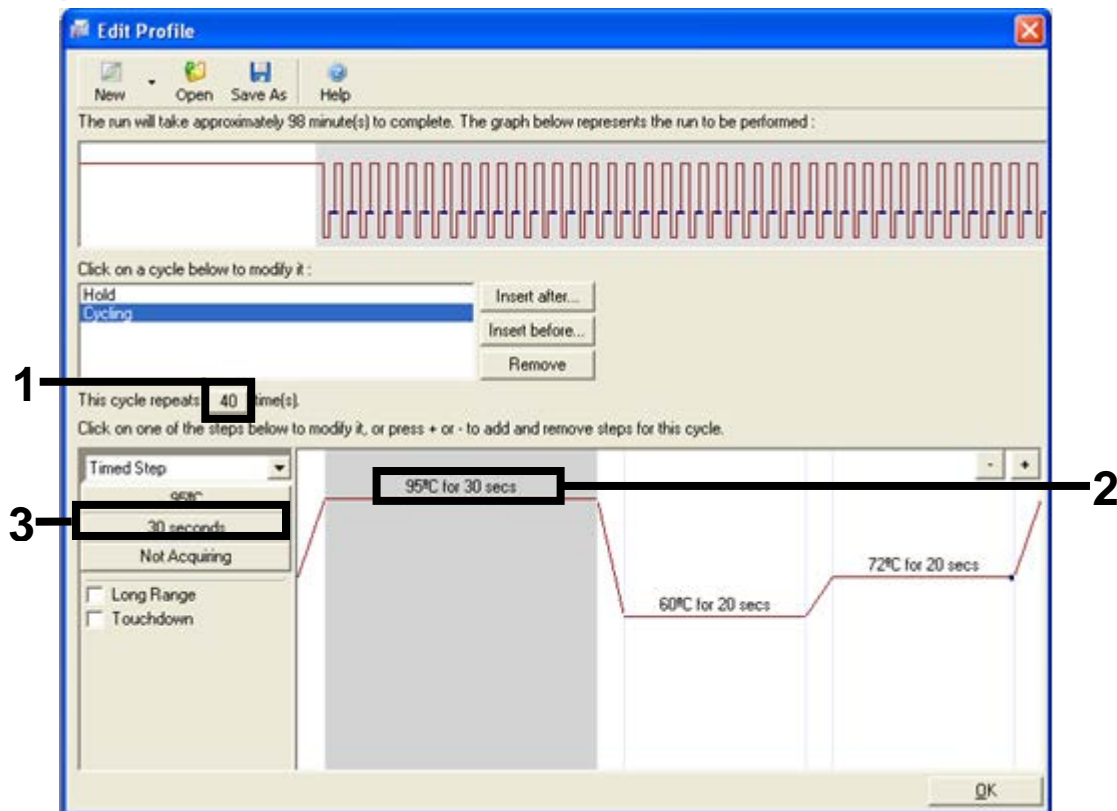


Bild 26. Cyklingssteg vid 95 °C. (1 = ruta för cykelrepetitioner, 2 = temperaturinställning för steg ett, 3 = tidsinställning för steg ett.)

9. Markera det andra steget och ställ in på "60°C for 60 secs" [60 °C i 60 sekunder]. Aktivera datahämtning under det här steget genom att välja knappen "Not Acquiring" [Hämtar inte] (bild 27).

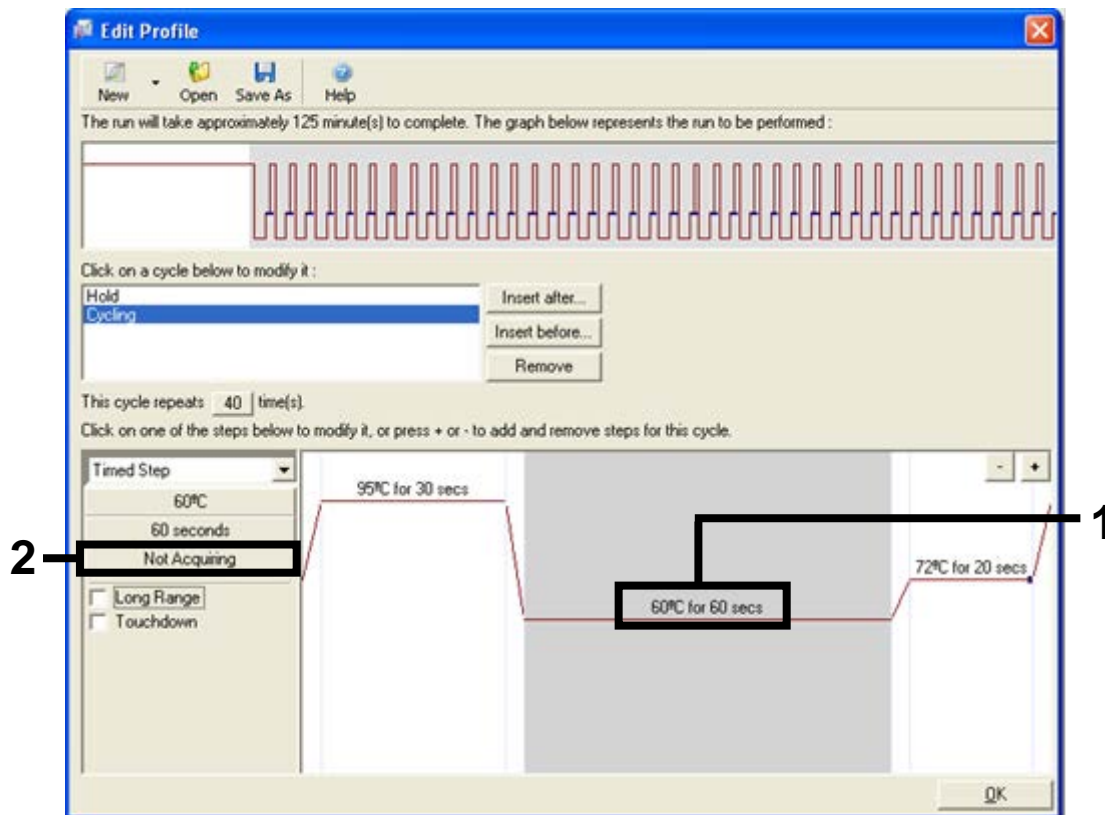


Bild 27. Cyklingssteg vid 60 °C. (1 = temperatur- och tidsinställning för andra steget, 2 = knappen "Not Acquiring" [Hämtar inte].)

10. Ange "Green" [Grön] och "Yellow" [Gul] som hämtningskanaler genom att välja knappen ">" för att överföra dem från listan "Available Channels" [Tillgängliga kanaler]. Klicka på "OK" (bild 28).

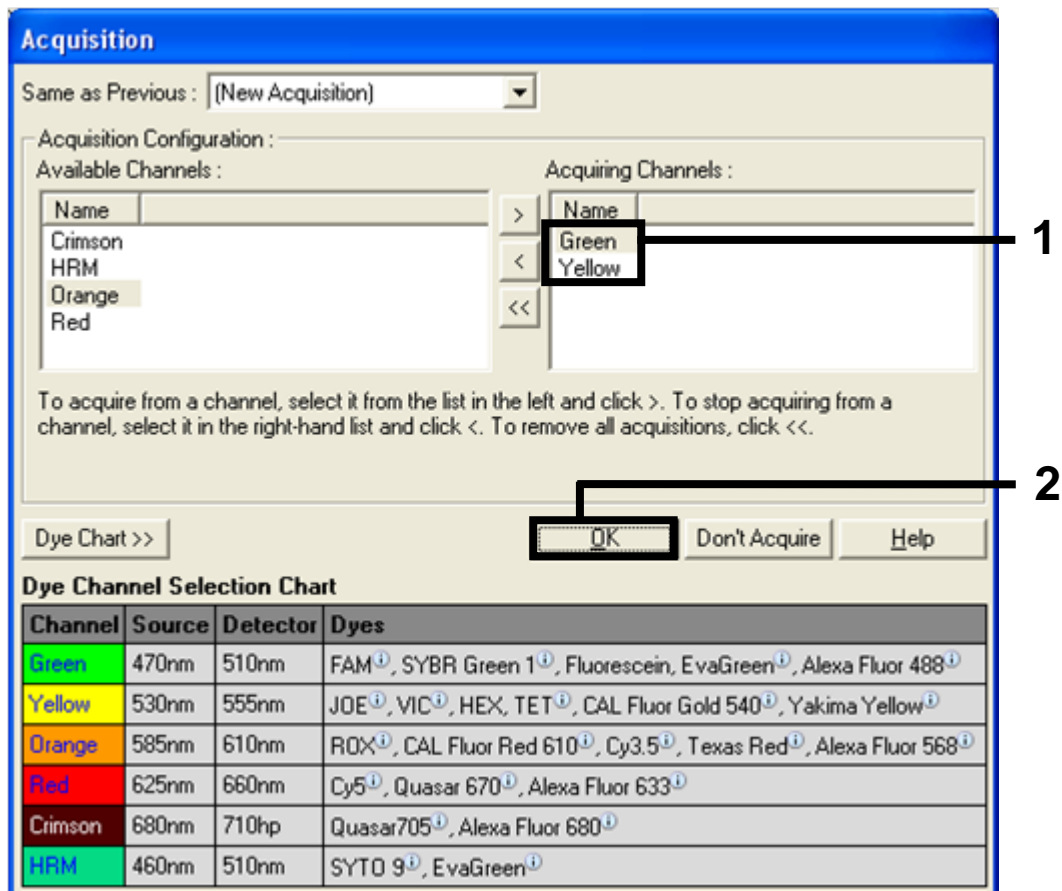


Bild 28. Hämtning vid cyklingssteg vid 60 °C. (1 = valda kanaler, 2 = knappen "OK".)

11. Markera det tredje steget och ta bort det genom att klicka på knappen "-". Klicka på "OK" (bild 29).

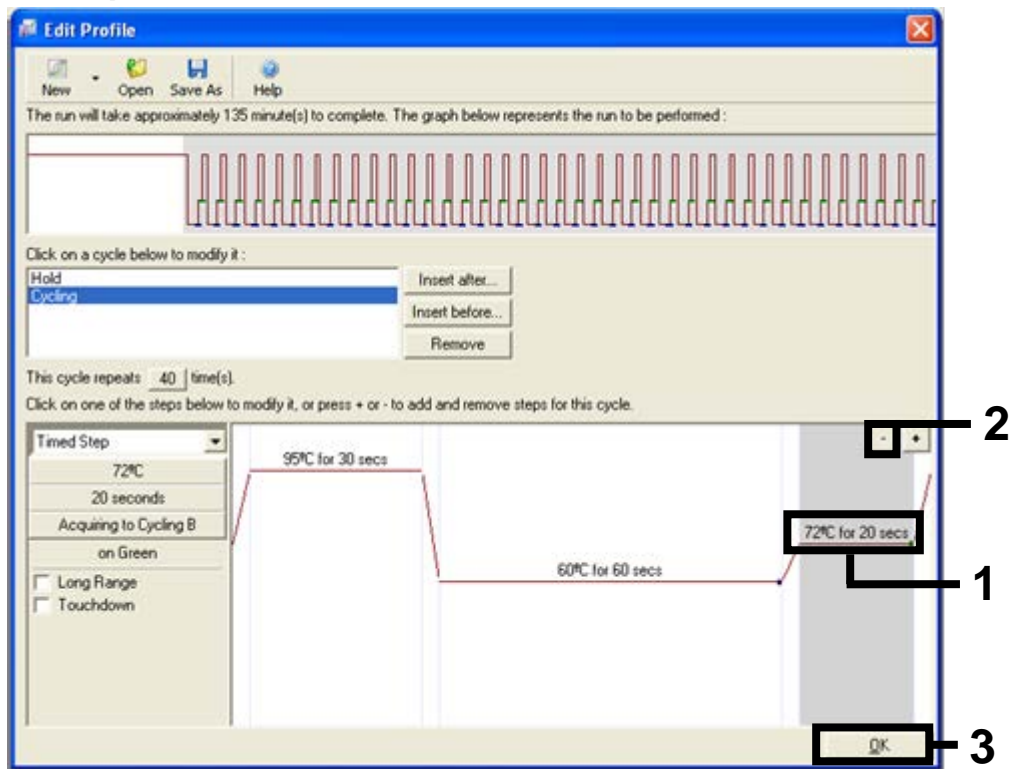


Bild 29. Ta bort förlängningssteg. (1 = tredje steget, 2 = knappen "Delete" [Ta bort], 3 = knappen "OK".)

12. I nästa dialogruta klickar du på knappen "Gain Optimisation" [Optimering av förstärkning] (bild 30).

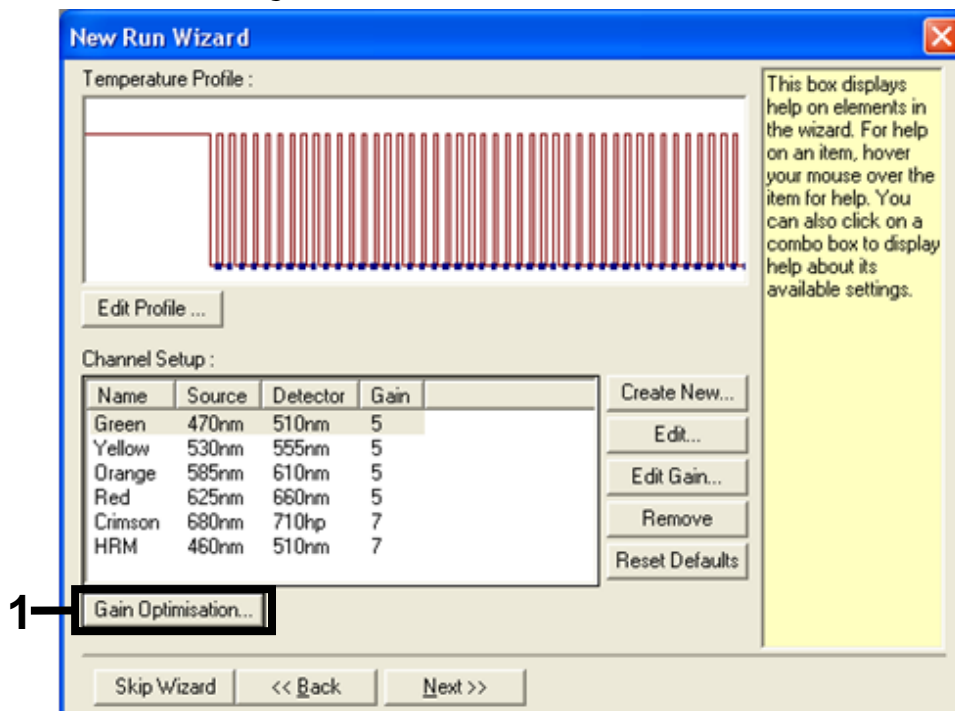


Bild 30. Optimering av förstärkning (1).

13. Klicka på knappen "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning]. Kanalinställningarna för varje kanal visas. Godkänn dessa standardvärden genom att klicka på "OK" för båda kanalerna (bild 31).

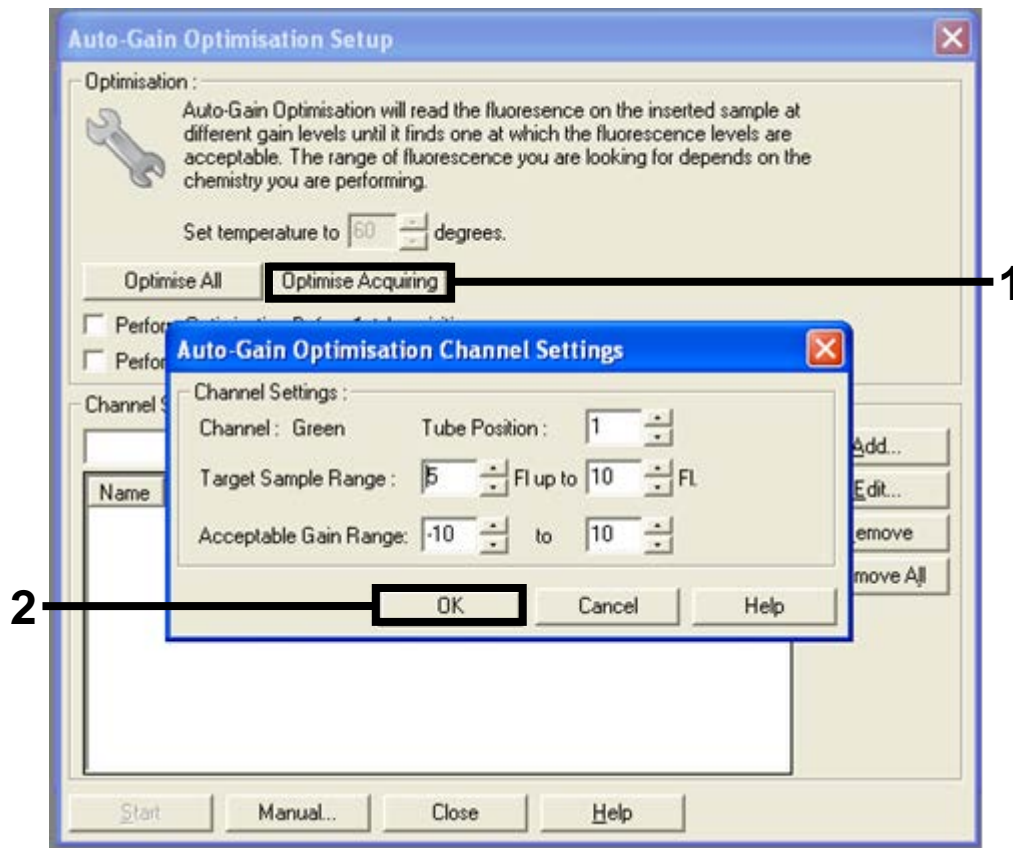


Bild 31. Automatisk nivåoptimering för den gröna kanalen. (1 = "knappen "Optimise Acquiring" [Optimera hämtning], 2 = knappen "OK".)

14. Markera kryssrutan "Perform Optimisation before 1st Acquisition" [Utför optimering före första hämtning] och klicka på knappen "Close" [Stäng] för att återgå till guiden (bild 32).

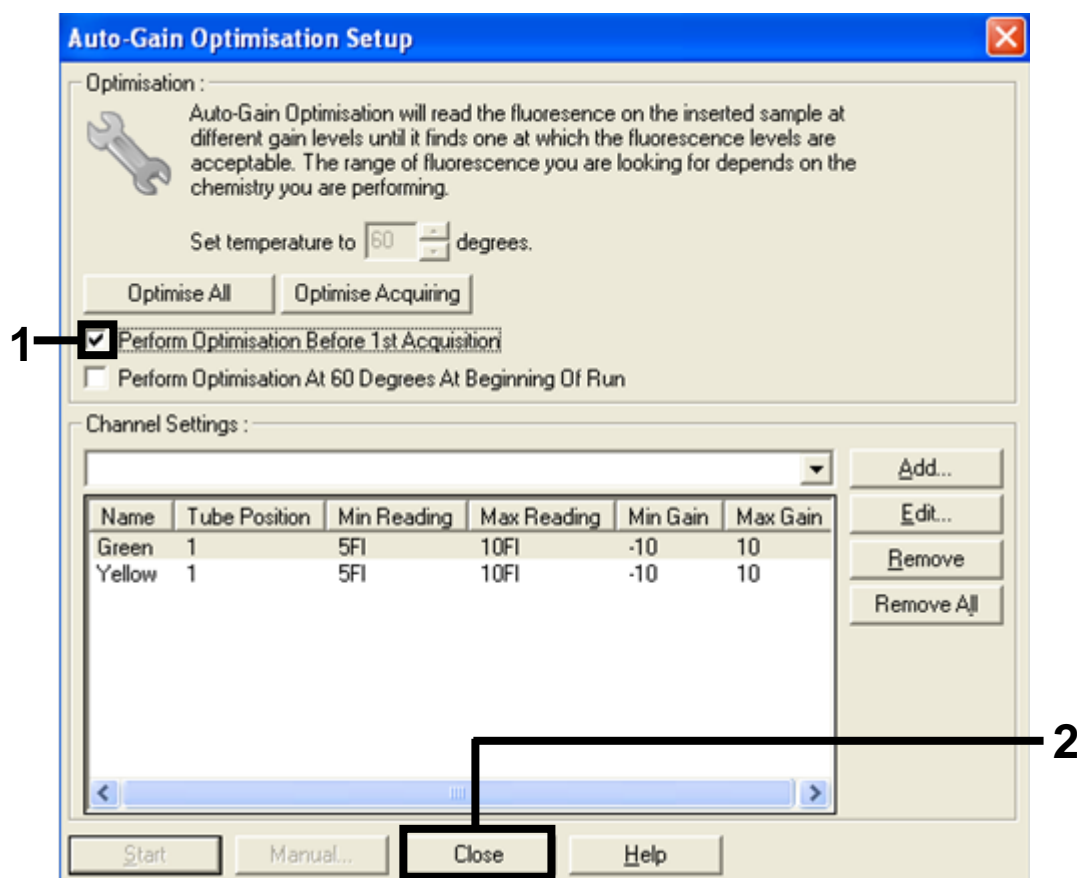


Bild 32. Val av gröna och gula kanaler. (1 = kryssrutan "Perform Optimisation before 1st Acquisition" [Utför optimering före första hämtning], 2 = knappen "Close" [Stäng].)

15. Klicka på "Next" [Nästa] för att spara mallen på en lämplig plats genom att välja "Save Template" [Spara mall].

Procedur (manuell)

Protokoll: Provbedömning (manuell)

Det här protokollet används för att bedöma den totala mängden amplifierbart DNA i prover och ska utföras innan BRAF-mutationsanalys.

- Förbered proverna enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: Provbedömning" på sidan 14.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: Förberedelse av *therascreen* BRAF PCR RGQ" på sidan 67.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet "Analys av provbedömningsdata", på sidan 73.

Protokoll: BRAF-mutationsdetektion (manuell)

När ett prov har klarat provbedömningen kan det testas för att detektera BRAF-mutationer.

- Förbered proverna enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: BRAF-mutationsdetektion" på sidan 25.
- Förbered PCR-körningen på Rotor-Gene Q MDx-instrumentet enligt beskrivningen i avsnittet "Protokoll: Förberedelse av *therascreen* BRAF PCR RGQ" på sidan 67.
- När körningen är avslutad analyserar du data enligt instruktionerna i avsnittet "Analys av BRAF-mutationsdetektionsdata", på sidan 74.

Protokoll: Förberedelse av *therascreen* BRAF PCR RGQ

1. Öppna Rotor-Gene Q-programmet (2.3) och öppna den motsvarande temperaturprofilen (.ret-filen).

Instruktioner om hur du skapar temperaturprofilen och kontrollerar körningsparametrarna finns i "Protokoll: Skapa en temperaturprofil", på sidan 55.

2. Kontrollera att korrekt rotor har valts och markera kryssrutan för att bekräfta att låsringen sitter fast. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 33).

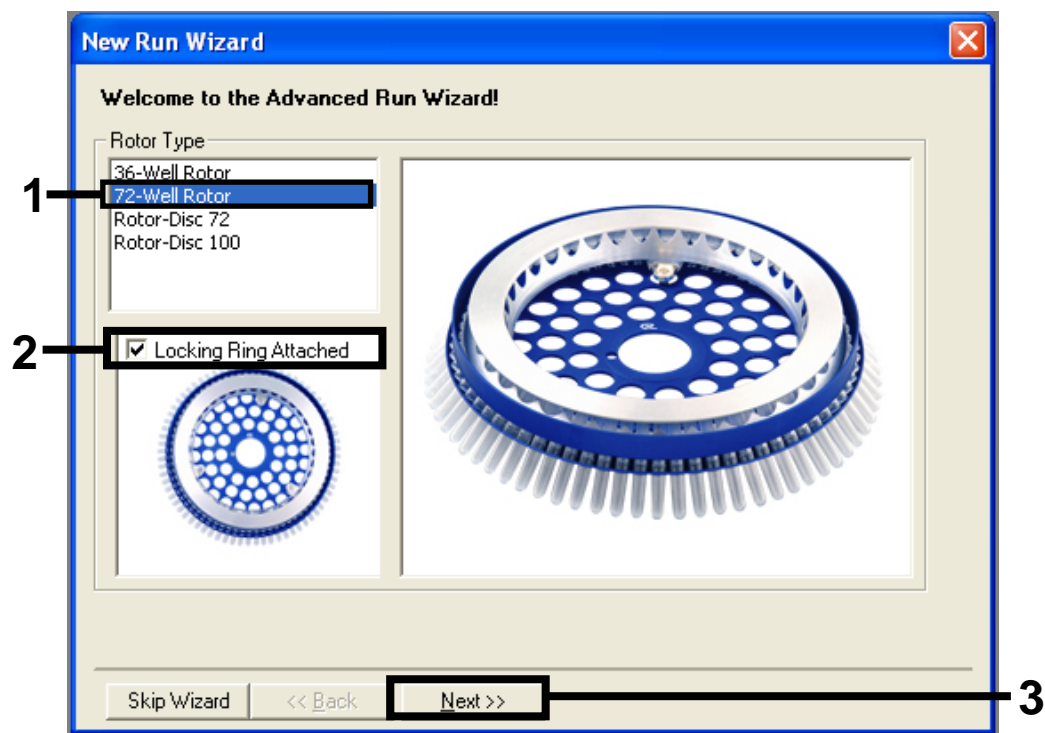


Bild 33. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och välkomstfönstret. (1 = "Rotor Type" [Rotortyp], 2 = "Locking Ring Attached" [Låsring fast], 3 = knappen "Next" [Nästa].)

3. Ange namnet på användaren. Lägg till eventuella meddelanden och kontrollera att reaktionsvolymen är inställd på 25 och att det står "1, 2, 3..." i rutan "Sample Layout" [Provlayout]. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 34).

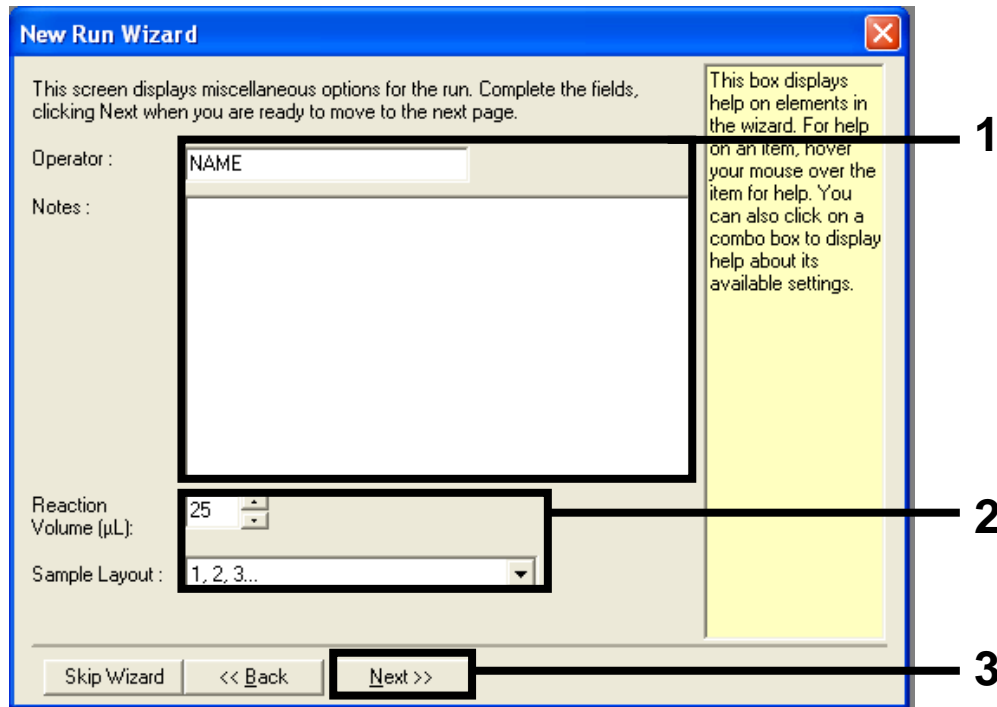


Bild 34. Alternativfönstret "New Run Wizard" [Guide för ny körning]. (1 = fälten "Operator" [Användare] och "Notes" [Anteckningar], 2 = fälten "Reaction Volume" [Reaktionsvolym] och "Sample Layout" [Provlayout], 3 = knappen "Next" [Nästa].)

4. I nästa fönster kan du redigera temperaturprofilen. Ingen redigering krävs eftersom temperaturprofilen redan har skapats enligt instruktionerna i "Protokoll: Skapa en temperaturprofil", sidan 55. Klicka på "Next" [Nästa] (bild 35).

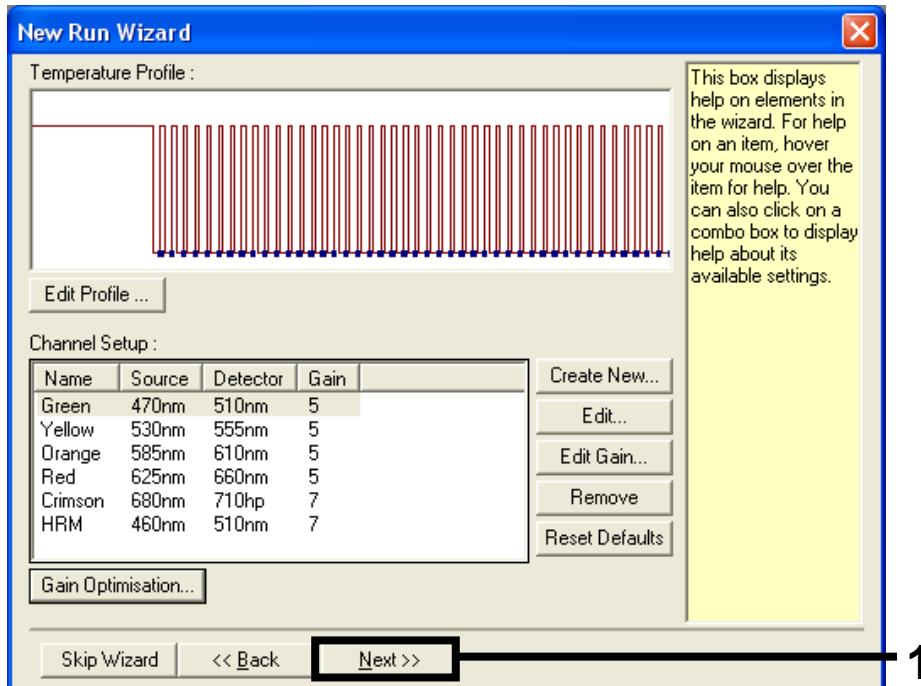


Bild 35. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och fönstret för temperaturredigering. (1 = knappen "Next" [Nästa].)

5. Kontrollera sammanfattningen och klicka på "Start Run" [Starta körning] för att spara körningsfilen och starta körningen (bild 36).

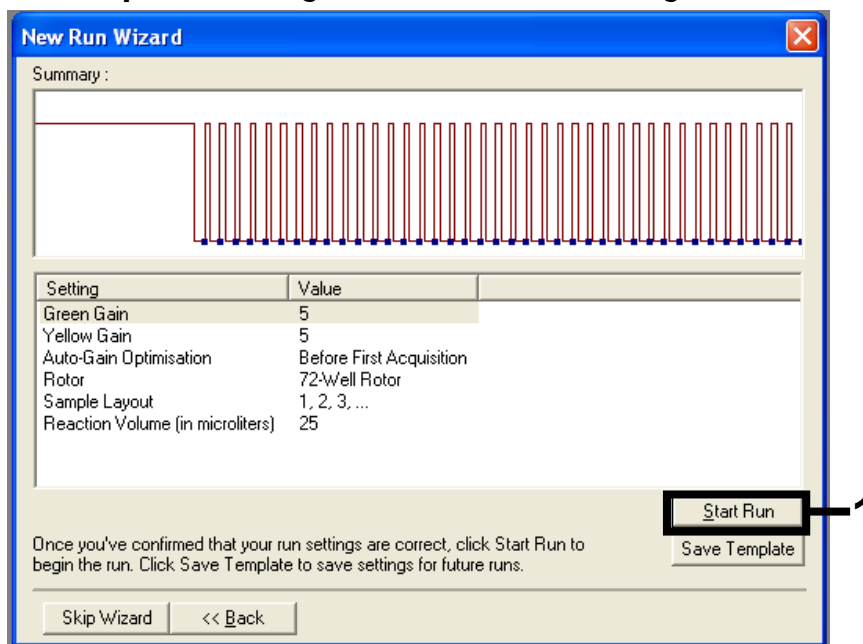


Bild 36. Dialogrutan "New Run Wizard" [Guide för ny körning] och sammanfattningsfönstret. (1 = knappen "Start Run" [Starta körning].)

6. När körningen har startats visas ett nytt fönster där du antingen kan ange provnamn nu eller klicka på "Finish" [Avsluta] och ange namnen senare genom att välja knappen "Sample" [Prov] under körningen eller när körningen är avslutad.

Om du klickar på "Finish and Lock Samples" [Avsluta och lås prover] kan provnamnen inte redigeras. Iaktta särskild försiktighet när du anger provnamn för att säkerställa korrekt provtestning och analys.

Obs: Vid namngivning av prover ska kolumnen "Name" [Namn] lämnas tom för tomma brunnar.

7. När körningen är avslutad analyserar du data enligt avsnitten "Analys av provbedömningsdata", sidan 73 eller "Analys av BRAF-mutationsdetektionsdata", sidan 74.
8. Om du behöver kvantifieringsrapporter klickar du på ikonen "Reports" [Rapporter] i verktygsfältet i Rotor-Gene Q-körningsfilen.
9. I rapportmenyn klickar du på "Cycling A Green (Page 1)" [Cykling A grön (sidan 1)] under "Report Categories" [Rapportkategorier] (bild 37).

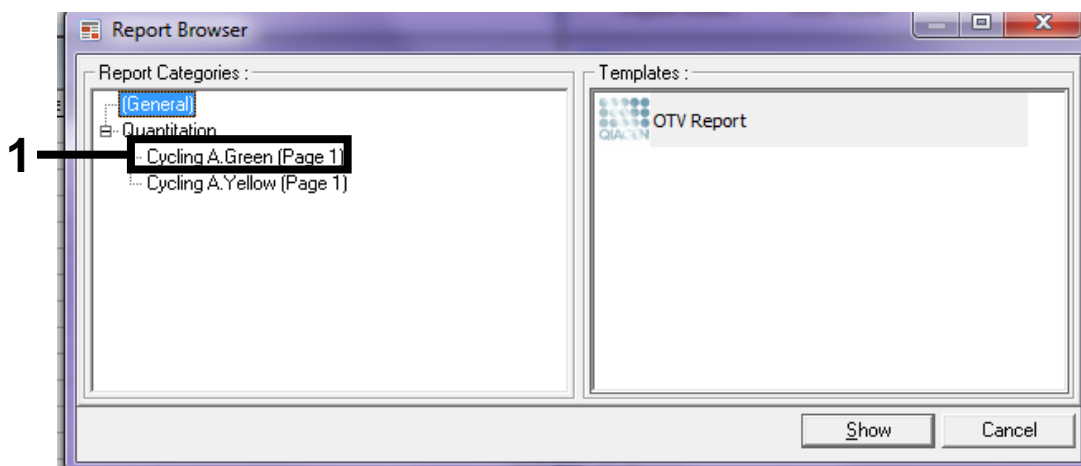


Bild 37. Rapportmeny. (1 = knappen "Cycling A. Green (Page 1)" [Cykling A. Green (sida 1)].)

10. Välj "Quantitation (Full Report)" [Kvantifiering (fullständig rapport)] under "Templates" [Mallar] (bild 38).

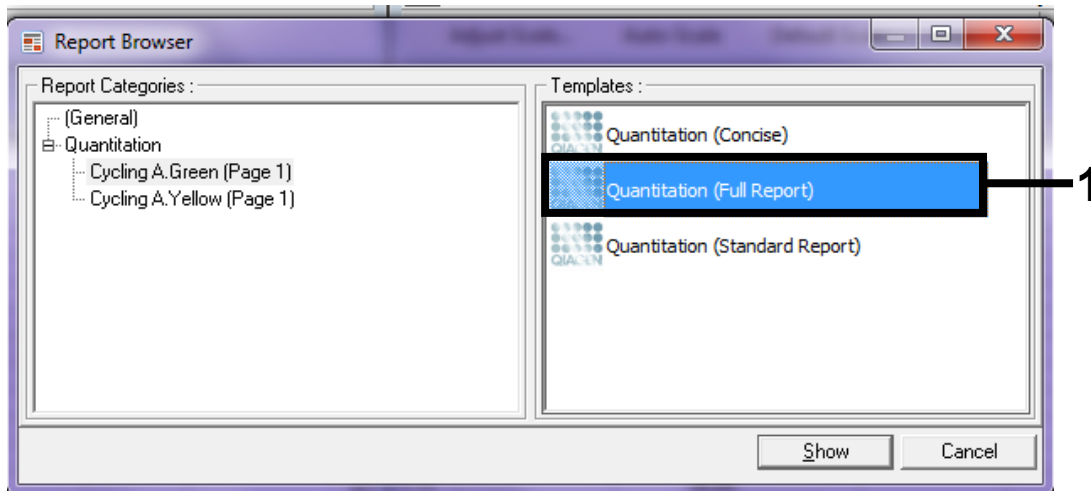


Bild 38. Kvantifieringsrapport (fullständig rapport) (1).

11. Klicka på "Show" [Visa] för att generera rapporten.

12. Klicka på "Save As" [Spara som] om du vill spara en elektronisk version.

13. Upprepa för "Cycling A Yellow (Page 1)" [Cykling A gul (sidan 1)].

Tolkning av resultat (manuellt)

När provbedömningskörningen eller mutationsanalysen är avslutad analyserar du data enligt följande procedur.

Programinställningar för analys

1. Öppna aktuell fil med Rotor-Gene Q-programmet 2.3.
2. Om du inte har namngett proverna innan körningen ska utföras klickar du på "Edit Samples" [Redigera prover].
3. Skriv in namnen på proverna i kolumnen "Name" [Namn].
Obs: Ange inget namn för tomma brunnar.
4. Klicka på "Analysis" [Analys]. På analysidan klickar du på "Cycling A. Yellow" [Cykling A gul] för att visa Yellow-kanalen.
5. Klicka på "Named On" [Namngiven].
Obs: Detta säkerställer att inga tomma brunnar ingår i analysen.
6. Välj "Dynamic Tube" [Dynamiskt rör].
7. Välj "Slope correct" [Lutning korrekt].
8. Välj "Linear scale" [Linjär skala].
9. Välj "Take off Adj." [Take off-just.] och ange värdet 15.01 i den övre rutan ("If take off point was calculated before cycle") [Om take off-punkten beräknades innan cykeln] och 20.01 i den nedre rutan ("then use the following cycle and take off point" [använd sedan följande cykel och take off-punkt]).
10. Ställ in tröskelvärde på 0.05.
11. Ställ in "Eliminate Cycles before" [Eliminering av cykler innan] på 15.
12. Kontrollera Yellow C_T-värdena.
13. På analysidan klickar du på "Cycling A. Green" [Cykling A grön] för att visa Green-kanalen.
14. Välj "Named On" [Namngiven].
15. Välj "Dynamic Tube" [Dynamiskt rör].
16. Välj "Slope correct" [Lutning korrekt].
17. Välj "Linear scale" [Linjär skala].
18. Välj "Take off Adj." [Take off-just.] och ange värdet 15.01 i den övre rutan ("If take off point was calculated before cycle") [Om take off-punkten beräknades innan cykeln] och 20.01 i den nedre rutan ("then use the following cycle and take off point" [använd sedan följande cykel och take off-punkt]).
19. Ställ in tröskelvärde på 0.15.

20. Ställ in "Eliminate Cycles before" [Eliminering av cykler innan] på 15.

21. Kontrollera Green C_T-värdena.

Analys av provbedömningsdata

Kör kontrollanalys

När körningen har avslutats ska data analyseras enligt nedan.

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får kontrollen utan mall inte generera ett C_T-värde i den gröna (FAM) kanalen under 40. För att garantera att körningen har konfigurerats korrekt måste kontrollen utan mall visa amplifiering i intervallet 32,53–38,16 i den gula kanalen (HEX). De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.
- **Positiv kontroll:** Den BRAF-positiva kontrollen (PC) måste ge ett kontrollanalys-C_T-värde i den gröna kanalen (FAM) på 30,37–36,38. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och anses därför som en misslyckad körning.

Om någon av de här två körningskontrollerna har misslyckats bör provdata inte användas.

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga måste varje prov-C_T-värde ligga inom intervallet 21,95–32,00 i den gröna kanalen. Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

Provanalys – kontrollanalys

- **Provkontrollanalysens C_T < 21,95:** Prover med ett kontroll-C_T på < 21,95 måste spädas eftersom detta representerar den lägsta nivån för det validerade analysintervallet. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom intervallet ovan baserat på att spädning till hälften kommer att öka C_T med 1. Om provet ligger nära 21,95 rekommenderas spädning för att säkerställa att ett resultat erhålls från provtestkörningen (BRAF-mutationsdetektion). Proverna måste spädas med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).
- **Provkontrollanalysens C_T > 32,00:** Omextraktion av provet rekommenderas eftersom det inte kommer att finnas tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

Analys av BRAF-mutationsdetektionsdata

Kör kontrollanalys

Se flödesdiagrammet för körning av kontrollanalys i bild 39.

- **Negativ kontroll:** För att garantera att ingen mallkontaminering förekommer får kontrollen utan mall inte generera ett C_T -värde i den gröna (FAM) kanalen under 40. För att garantera att körningen har konfigurerats korrekt måste kontrollen utan mall visa amplifiering i intervallet 32,53–38,16 i den gula kanalen (HEX). De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden.
- **Positiv kontroll:** Den BRAF-positiva kontrollen (PC) måste ge ett C_T -värde för varje BRAF-analys enligt tabell 14 i den gröna kanalen. De angivna värdena är inom och inklusive dessa värden. Ett värde utanför detta intervall indikerar ett problem i analyskonfigurationen och anses därför som en misslyckad körning.

Obs: Om någon av de här två körningskontrollerna har misslyckats bör provdata inte användas.

Tabell 14. Acceptabelt C_T -intervall för reaktionskontroller.

Reaktionsmix	Prov	Kanal	C_T -intervall
Kontroll	PC	Grön	30,37–36,38
V600E/Ec	PC	Grön	29,62–35,73
V600D	PC	Grön	29,75–35,79
V600K	PC	Grön	29,32–35,32
V600R	PC	Grön	29,41–35,41

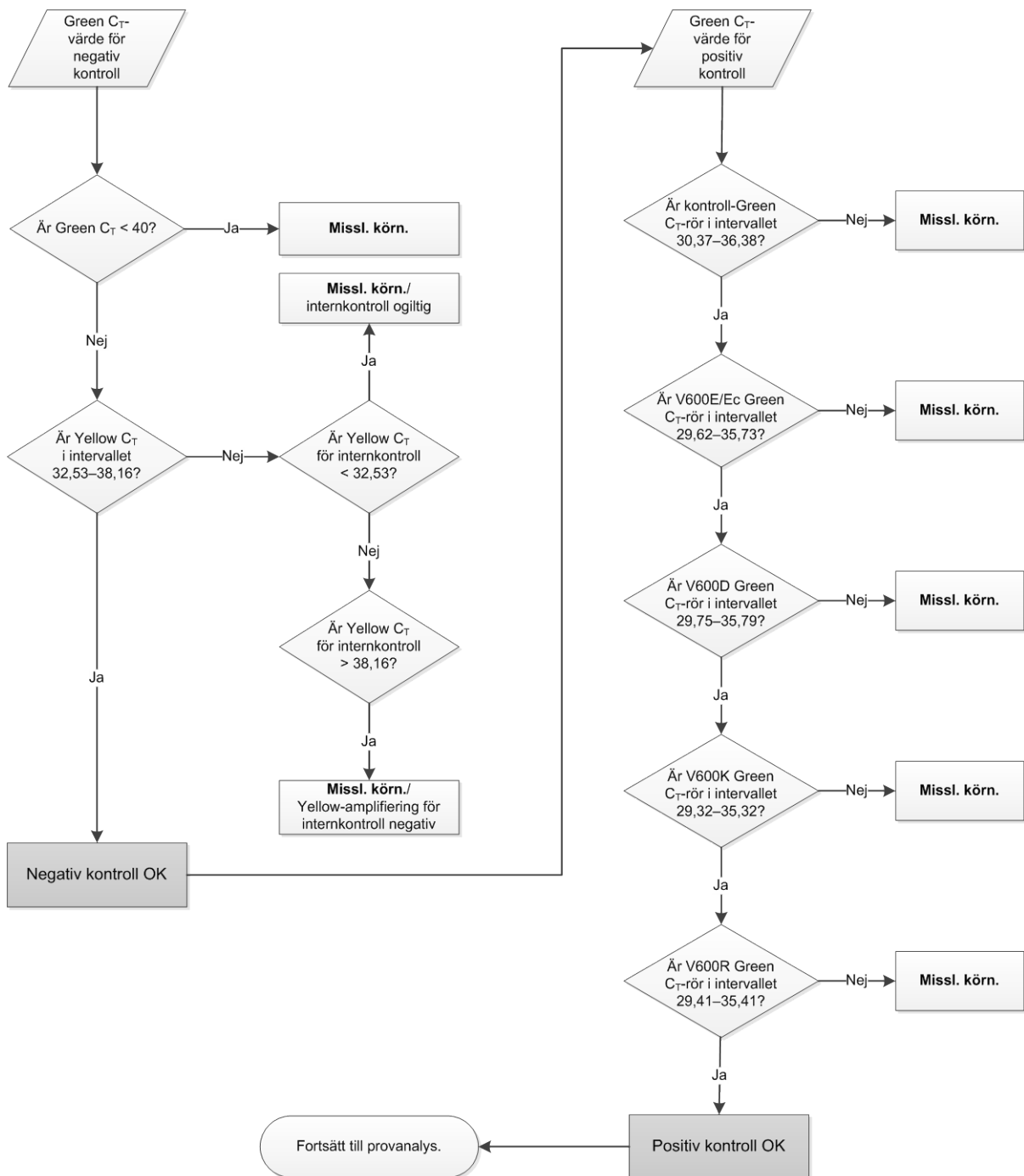


Bild 39. Flödesschema för körning av kontrollanalys.

Provanalys – Green C_T-värde för provkontroll

Se flödesdiagrammet för provanalys i bild 40.

Förutsatt att båda körningskontrollerna är giltiga för kontrollanalysen måste C_T-värdet för varje provkontroll ligga inom intervallet 21,95–32,00 i den gröna kanalen.

Om provet är utanför intervallet ska du följa instruktionerna nedan.

- **Provkontrollanalysens C_T < 21,95:** Prover med ett kontroll-C_T < 21,95 skulle överbelasta mutationsanalyserna och måste spädas. För att detektera varje mutation på en låg nivå måste överkoncentrerade prover spädas för att hamna inom intervallet ovan baserat på att spädning till hälften kommer att öka C_T med 1. Prover ska spädas med det vatten som medföljer kitet (vatten för spädning [Dil.]).
- **Provkontrollanalysens C_T < 32,00:** Omextraktion av provet rekommenderas eftersom det inte kommer att finnas tillräcklig mängd start-DNA-mall för att kunna detektera alla mutationer vid de angivna cutoff-värdena för analysen.

Provanalys – internkontrollens prov-Yellow C_T-värde för mutationsanalyser

Se flödesdiagrammet för provanalys i bild 40.

Alla brunnar i varje prov måste analyseras. Kontrollera att varje brunn genererar en HEX-signal i kanalen Yellow från internkontrollen. Det finns 3 möjliga slutresultat:

- Om internkontrollens C_T hamnar inom angivet intervall (32,53–38,16) är Yellow-amplifieringen positiv och giltig.
- Om internkontrollens C_T hamnar ovanför angivet intervall (> 38,16) visar röret negativ Yellow-amplifiering. Om det finns amplifiering i Green-kanalen för det röret så är Yellow-amplifieringen giltig. Om det inte finns amplifiering i Green-kanalen för det röret så är Yellow-amplifieringen ogiltig.
- Om internkontrollens C_T hamnar under angivet intervall (< 32,53) är röret ogiltigt.

Om internkontrollen misslyckas på grund av PCR-hämmare kan spädning av provet minska effekten hos hämmarna, men det leder även till spädning av mål-DNA. Ett rör med vatten för spädning av prov (Dil.) ingår i kitet.

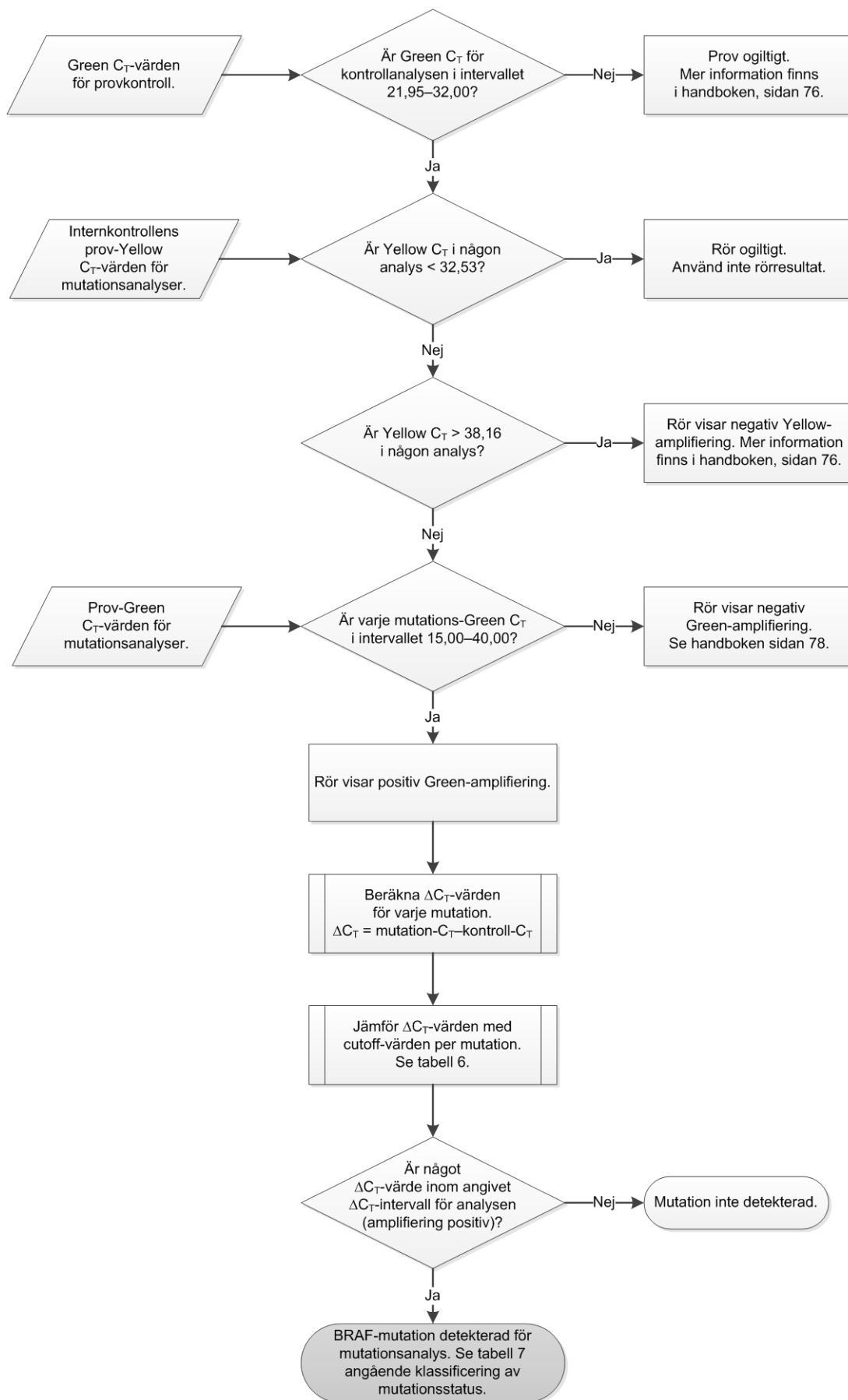


Bild 40. Flödesschema för provanalys.

Provanalys – prov-Green C_T-värde för mutationsanalyser

Green-värdena för alla 4 reaktionsmixarna ska kontrolleras mot värdena som finns angivna i tabell 15.

Tabell 15. Acceptabla provvärden för mutationsreaktion (Green-kanal)*

Analys	Acceptabelt C _T -intervall	ΔC _T -intervall
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

* Acceptabla värden är inom och inklusive de värden som visas.

- Om Green C_T hamnar inom angivet intervall är FAM-amplifieringen positiv.
- Om Green C_T hamnar ovanför angivet intervall eller om amplifiering saknas är Green-amplifieringen negativ.

Beräkna ΔC_T-värdet för varje mutationsrör med positiv FAM-amplifiering enligt nedan, för att garantera att mutations- och kontroll-C_T-värdena kommer från samma prov.

$$\Delta C_T = \text{mutation-C}_T - \text{kontroll-C}_T$$

Jämför provets ΔC_T-värde med cutoff-punkten för den aktuella analysen (tabell 15) och se till att korrekt cutoff-punkt tillämpas för varje analys.

Cutoff-punkten är den punkt ovanför vilken en positiv signal eventuellt kan bero på bakgrundssignal för ARMS-primern i vildtyps-DNA. Om provets ΔC_T-värde är högre än cutoff-punkten klassas det som negativt eller som liggande utanför kitets detektionsgräns.

För alla prover kommer varje mutationsreaktion att tilldelas statusen detekterad, inte detekterad eller ogiltig med hjälp av kriterierna nedan.

■ Mutation detekterad:

Green-amplifiering positiv och ΔC_T vid eller under cutoff-värdet. Om flera mutationer detekterats ska mutationsstatusen tilldelas enligt tabell 16.

■ **Mutation inte detekterad:**

Green-amplifiering positiv och ΔC_T ovanför cutoff-värdet.

Green-amplifiering negativ och Yellow-amplifiering (internkontroll) är positiv.

■ **Ogiltig:**

Yellow (internkontroll) är ogiltig.

Green-amplifiering är negativ och Yellow-amplifiering är negativ.

Ytterligare information finns i flödesdiagrammet (Bild 40). Om ett prov visar negativ Yellow-amplifiering i ett rör men positiv Green-amplifiering i ett annat rör kan resultatet "mutation detekterad" i det andra röret fortfarande betraktas som giltigt men den särskilda mutationen som identifierats kanske inte har tilldelats korrekt.

Om ett prov visar negativ Yellow-amplifiering och positiv Green-amplifiering i samma rör ska resultatet "mutation detekterad" betraktas som giltigt.

Om ett rör visar ogiltig Yellow (internkontroll) får resultatet från det röret inte användas.

Provanalys – tilldela provmutationsstatus

När alla mutationsreaktionsrör har bedömts fastställs provets mutationsstatus enligt nedan.

- **Mutation detekterad:** En eller flera av de 4 mutationsreaktionerna är positiva. Om flera mutationer detekterats ska den rapporterade mutationen överensstämma med tabell 16 (se näste sida).
- **Mutation inte detekterad:** Alla 4 mutationsreaktionerna är negativa.
- **Ogiltig:** Ingen mutationsreaktion är positiv och en eller flera mutationsreaktioner är ogiltiga.

Tabell 16. Klassificera provmutationsstatus

V600E/Ec	V600D	V600K	V600R	Mutationsstatus
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

Obs: *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet är avsett att detektera mutationer i BRAF-genen i ett DNA-prov. Om ett prov är klassificerat som "BRAF-mutation detekterad" ska endast en specifik mutation rapporteras. Om flera mutationer detekterats ska den rapporterade mutationen överensstämma med tabell 16.

Viss korsreaktivitet förekommer mellan mutationsreaktioner. Exempelvis kan analysen V600E/Ec ge ett positivt resultat om en V600D-mutation förekommer, analysen V600E/Ec kan ge ett positivt resultat om en V600K-mutation förekommer och analysen V600K kan ge ett positivt resultat om en komplex V600E-mutation förekommer. Mutationens status kan dock särskiljas med hjälp av tabell 16.

Korsreaktivitet beror på att ARMS-primern detekterar andra mutationer med liknande sekvens. Om en andra mutationsanalys ger ett positivt svar är detta troligen korsreaktivitet. Dubbla mutationer har observerats, men är ovanliga.

Därför kan i sällsynta fall kombinationer av positiva resultat som inte finns med i tabell 16 detekteras. Provet kan ändå klassificeras som "BRAF-mutation detekterad". På grund av korsreaktivitet kan dock en viss mutation inte särskiljas. Därför bör provet endast klassificeras som "BRAF-mutation detekterad".

Om en eller flera av mutationsreaktionerna är ogiltiga men en eller flera är positiva kan provet fortfarande klassificeras som "BRAF-mutation detekterad", eftersom en mutation förekommer. Den specifika mutation som rapporteras kan emellertid vara felaktig och kan vara ett resultat av korsreaktivitet. Därför bör provet endast klassificeras som "BRAF-mutation detekterad".

Bilaga II: Installation av *therascreen* BRAF Assay Package

therascreen BRAF RGQ PCR-kitet är avsett för användning med instrumentet Rotor-Gene Q MDx med en rotor med 72 brunnar. *therascreen* BRAF Assay Package kan laddas ned från den motsvarande produktsidan för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet på adressen www.qiagen.com. Nedladdningsinformationen finns i sektionen "Product Resources" [Produktresurser] på fliken "Supplementary Protocols" [Tilläggsprotokoll]. Assay Package-programvaran kan även beställas på CD (QIAGEN, kat.nr 9023820).

I analyspaketet ingår "*therascreen* BRAF CE Sample Assessment Locked Template" och "*therascreen* BRAF CE Mutation Analysis Locked Template".

Obs: *therascreen* BRAF Assay Package är endast kompatibelt med programmet Rotor-Gene Q version 2.3. Se till att rätt version av programmet Rotor-Gene Q är installerat innan du fortsätter med installationen av *therascreen* BRAF Assay Package. Om ditt Rotor-Gene Q MDx-instrument levererades med en tidigare programversion kan du enkelt uppgradera genom att ladda ned version 2.3 av programmet Rotor-Gene Q MDx från produktsidan för www.qiagen.com. Det nya programmet finns i motsvarande "Product Resources"-sektion [Produktresurser] på fliken "Operating Software" [Operativ programvara].

Procedur (nedladdning)

1. Ladda ned *therascreen* BRAF RGQ Assay Package CE från den motsvarande produktsidan för *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet på adressen www.qiagen.com.
2. Öppna den nedladdade zip-filen genom att dubbelklicka på filen och packa upp den.
3. Starta installationen genom att dubbelklicka på den upppackade filen `therascreen_BRAF_Assay_Package_3.1.1.exe`.

Procedur (CD)

1. Beställ *therascreen* BRAF RGQ Assay Package CE CD från QIAGEN (QIAGEN, kat.nr 9023820) som finns tillgängligt separat.
2. Sätt in CD:n i CD-enheten på den bärbara dator som är ansluten till instrumentet Rotor-Gene Q.
3. Starta installationen genom att dubbelklicka på filen `therascreen_BRAF_Assay_Package_3.1.1.exe` om CD:n laddas automatiskt, eller leta upp filen med hjälp av filhanteraren på den anslutna datorn.

4. Installationsguiden startar. Klicka på "Next" [Nästa] för att fortsätta (bild 41).

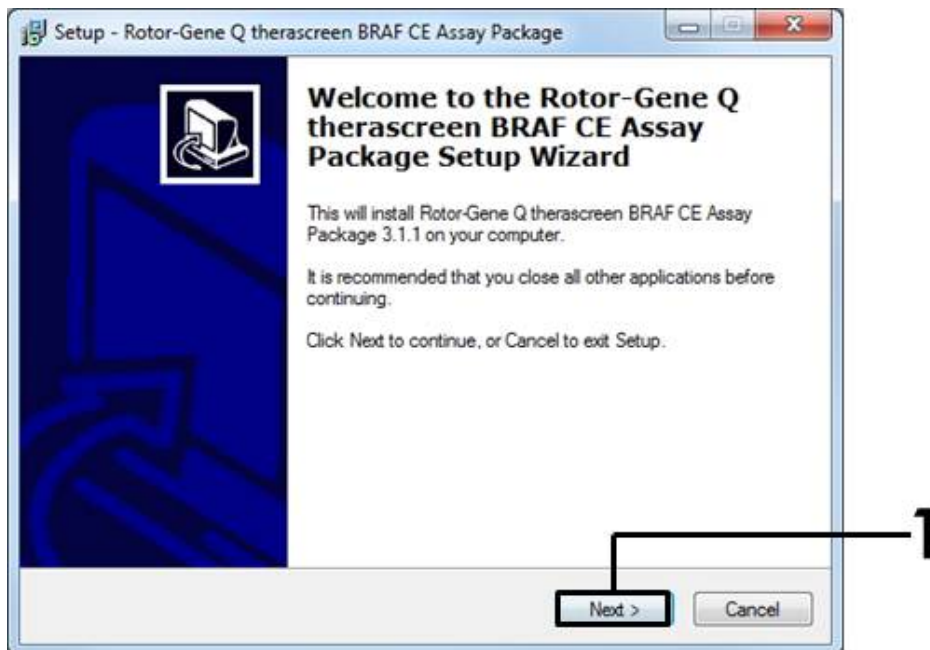


Bild 41. Dialogrutan "Setup" [Installera]. (1 = knappen "Next" [Nästa].)

5. Läs licensavtalet i dialogrutan "License Agreement" [Licensavtal] och godkänn avtalet genom att markera "I accept the agreement" [Jag godkänner avtalet]. Klicka på "Next" [Nästa] för att fortsätta (bild 42).

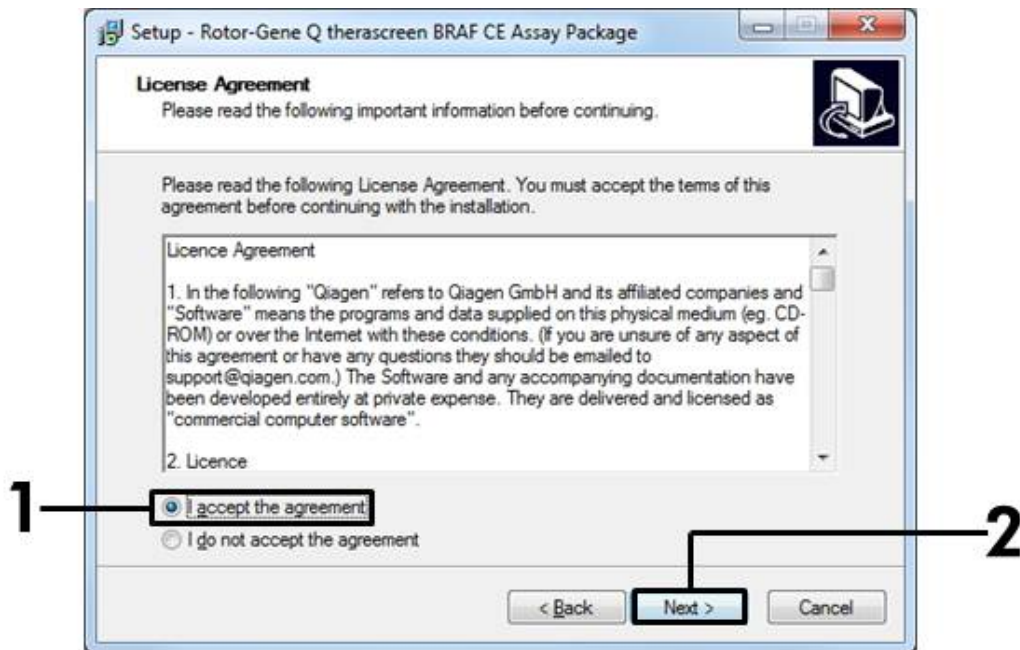


Bild 42. Dialogrutan "License Agreement" [Licensavtal]. (1 = acceptera-knapp, 2 = knappen "Next" [Nästa].)

6. Installationen startar automatiskt och när den är slutförd visas en sista "Setup"-dialogruta [Installera]. Klicka på "Finish" [Avsluta] för att avsluta installationsguiden (bild 43).



Bild 43. Slutföra installationsguiden. (1 = knappen "Finish" [Avsluta].)

7. Starta om datorn. Genvägar till både "therascreen BRAF CE Sample Assessment Locked Template" och "therascreen BRAF CE Mutation Analysis Locked Template" skapas automatiskt på skrivbordet.

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800-22-44-6000 eller kontakta någon av QIAGENs tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>therascreen</i> BRAF RGQ PCR Kit (24)	För 24 reaktioner: kontrollanalys, 4 mutationsanalyser, positiv kontroll, <i>Taq</i> DNA-polymeras, vatten för NTC och vatten för spädning av prov	870211
Rotor-Gene Q och andra tillbehör		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Realtids-PCR-cykler och HRM-analys- instrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning ingår ej	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Realtids-PCR-cykler och HRM-analys- instrument (High Resolution Melt) med 5 kanaler (grön, gul, orange, röd, blodröd) plus HRM-kanal, bärbar dator, programvara, tillbehör, 1 års garanti på delar och arbete, installation och utbildning	9002033
<i>therascreen</i> BRAF Assay Package CD	CD med <i>therascreen</i> BRAF CE Sample Assessment Locked Template och <i>therascreen</i> BRAF CE Mutation Analysis Locked Template	9023820
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiumblock för manuellt iordningställande av reaktioner med en enkanals-pipett i 72 x 0,1 ml-rör	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 remsor med 4 rör med lock för 1 000 reaktioner	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 remsor med 4 rör med lock för 10 000 reaktioner	981106

Produkt	Innehåll	Kat.nr
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit – för rening av genomiskt DNA från paraffinbäddad vävnad		
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	För 50 DNA-beredningar: 50 QIAamp MinElute®-kolonner, proteinas K, buffertar, uppsamlingsrör (2 ml)	56404

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

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

Ska inte användas vid bestämning av risk för utveckling av endometrios.

Avtal om begränsad licens

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet godkänner följande villkor:

1. *therascreen* BRAF RGQ PCR-kitet får endast användas i enlighet med *handboken till theascreen BRAF RGQ PCR-kitet* och endast med de komponenter som finns i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i *handboken till theascreen BRAF RGQ PCR-kitet* och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
3. Kiten och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsägar sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kiten godkänner att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer beskrivna ovan. QIAGEN kan kräva att detta avtal om begränsad licens upprätthålls i domstol, och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, som uppstår vid försök att bestrida detta avtal om begränsad licens eller någon av de immateriella rättigheter som avser kiten och/eller någon av deras komponenter.

Uppdaterade licensvillkor finns på www.qiagen.com.

HB-1273-005 © 2016 QIAGEN, med ensamrätt.

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

