

2017. gada marts

AdnaTest ProstateCancerSelect un ProstateCancerDetect rokasgrāmata



12 (kataloga numurs 395432)



12 (kataloga numurs 396432)

Audzēja šūnu bagātināšanai, kas iegūtas no nesadalītām prostatas vēža pacientu asinīm,
un ar prostatas vēzi saistītas gēnu ekspresijas noteikšanai bagātinātās audzēja šūnās
Lietošanai *in vitro* diagnostikā
1. versija

IVD

CE

REF

395432 (AdnaTest ProstateCancerSelect)
396432 (AdnaTest ProstateCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R1 MAT

1106692LV



Saturs

Paredzētais lietojums	4
Kopsavilkums un skaidrojums	4
Procedūras princips	5
AdnaTest ProstateCancerSelect	5
AdnaTest ProstateCancerDetect	6
Nodrošinātie materiāli	7
Komplekta sastāvdaļas	7
Nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti	8
AdnaTest ProstateCancerSelect	9
AdnaTest ProstateCancerDetect	9
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	10
Informācija par drošību	10
Informācija par lietošanu	11
Patenti	11
Reaģentu glabāšana un rīcība ar tiem	11
Uzglabāšana	11
Rīcība	12
Rīcība ar paraugiem un to glabāšana	12
Paraugu sagatavošana	12
Protokols: Audzēja šūnu bagātināšana, izmantojot AdnaTest ProstateCancerSelect	14
Protokols: Ar gēnu ekspresiju saistīta prostatas vēža noteikšana bagātinātās audzēja šūnās, izmantojot AdnaTest ProstateCancerDetect	18

Protokols: Vairāku amplikonu un viena amplikona PCR.....	23
Rezultātu interpretācija.....	26
Fragmenta analīze bioanalizatorā Agilent 2100	26
Problēmu novēršanas ieteikumi	30
Kvalitātes kontrole	30
Ierobežojumi.....	30
Darbības raksturojums	31
Atgūšana.....	31
Specifiskums	31
Atkārtojamība	32
Precizitāte	32
Traucējošas vielas	33
Traucējoši apstākļi	34
Klīniskie pētījumi	35
Atsauce	35
Saīsinājumi.....	36
Simboli.....	37
Informācija pasūtīšanai.....	38

Paredzētais lietojums

AdnaTest ProstateCancerSelect ir *in vitro* diagnostikas metode, kas paredzēta cirkulējošu audzēja šūnu, kas iegūtas no prostatas vēža pacientu stabilizētiem nesadalītu asiņu paraugiem, imūnķīmiskai bagātināšanai, izmantojot epitēlija un ar audzējiem saistītu antigēnu kombināciju.

AdnaTest ProstateCancerDetect ir *in vitro* diagnostikas tests, kas paredzēts audzēja šūnu ekspresijas profilu analīzei ar atgriezenisko transkriptāzi un vairāku amplikonu PCR, kā arī tam sekojošu PCR produktu optiskā blīvuma analīzi, izmantojot automatizētu kapilāru elektroforēzi bioanalizatorā Agilent® 2100.

AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect nav paredzēts skrīningam, un to nedrīkst izmantot kā diagnostikas testu, lai apstiprinātu prostatas vēzi.

Šis produkts ir paredzēts izmantošanai tikai profesionāliem lietotājiem, piemēram, tehniķiem un ārstiem, kas apmācīti lietot molekulāri bioloģiskās metodes.

Kopsavilkums un skaidrojums

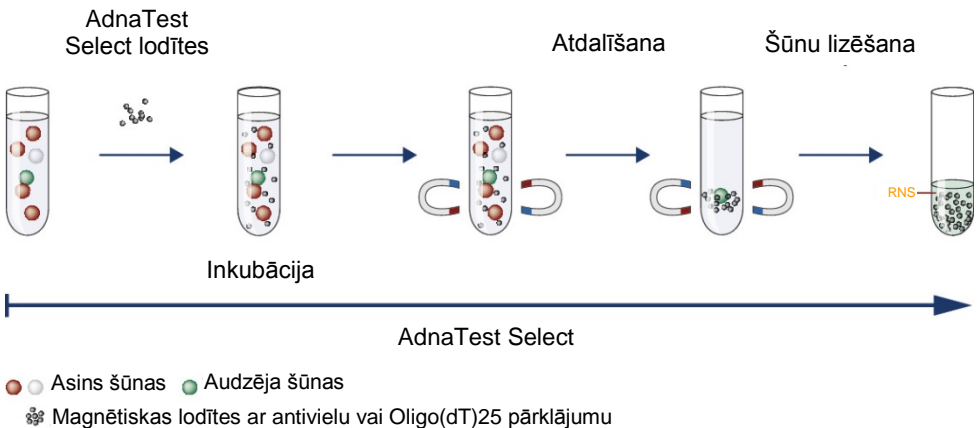
AdnaTest ProstateCancerSelect ļauj veikt imūnmagnētisku audzēja šūnu bagātināšanu, izmantojot epitēlija un ar audzējiem saistītus antigēnus. AdnaTest ProstateCancerDetect izmanto ar prostatas vēzi saistītas gēnu ekspresijas analīzei imūnmagnētiski bagātinātās audzēja šūnās, izmantojot atgriezenisko transkriptāzi un PCR.

Procedūras princips

AdnaTest ProstateCancerSelect

Epitēlija un ar audzējiem saistīto antigēnu antivielas tiek konjugētas pie magnētiskām lodītēm, lai varētu marķēt audzēja šūnas nesadalītās asinīs. Marķētās šūnas tiek ekstrahētas, izmantojot magnētisko daļiņu koncentratoru (AdnaMag-L un AdnaMag-S), un pēc tam lizētas (1. attēls).

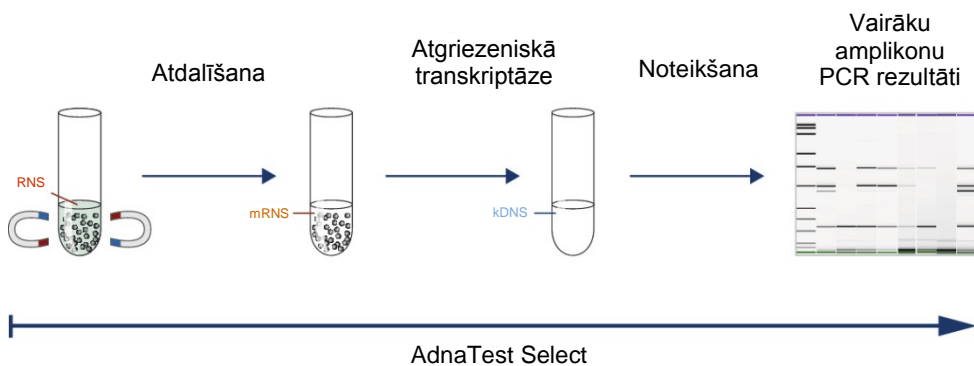
Šūnu lizāts tiek izmantots turpmākai analīzei ar AdnaTest ProstateCancerDetect.



1. attēls. AdnaTest ProstateCancerSelect: imūnmagnētisko šūnu atlase, izmantojot ar vairākiem audzējiem saistītas antivielas. Pirmajā posmā tiek bagātinātas asins CTC (AdnaTest Select). To panāk, izmantojot ar antivielām pārklātas magnētiskas daļiņas (lodītes). Tiek lietotas vairākas antivielas, kas ar augstu specifiskumu un afinitāti sasaistās ar attiecīgajām vēža šūnām. Bagātinātajām šūnām veic līzi un pēc tam vairākas reizes attīra, lai iegūtu mRNS.

AdnaTest ProstateCancerDetect

AdnaTest ProstateCancerDetect satur Oligo (dT)₂₅ lodītes, lai izolētu mRNS no iepriekš bagātinātu audzēja šūnu lizāta. Atgriezeniskās transkriptāzes rezultātā rodas kDNS, ko pēc tam izmanto kā šablonu audzēja šūnu noteikšanai un raksturošanai ar vairāku amplikonu PCR. Ar AdnaTest PrimerMix ProstateDetect var palielināt trīs ar audzēju saistītus antigēnus un vienu kontrolgēnu. Ar AdnaTest PrimerMix AR-Detect var palielināt androgēna receptoru (AR).



● Asins šūnas ● Audzēja šūnas

⊞ Magnētiskas lodītes ar antivielu vai Oligo(dT)₂₅ pārklājumu

2. attēls. AdnaTest ProstateCancerDetect: dažādi vairāku amplikonu PCR audzēju marķieri, kas saistīti ar vēzi. Otrajā posmā bagātinātās šūnas pārbauda, izmantojot RT-PCR, kas paredzēts ar audzējiem saistītiem ekspresijas modeļiem. Ar atgriezenisko transkriptāzi mRNS virknes pārvērš kDNS. Tad var palielināt vairākus saistītos audzēju marķierus, izmantojot vairāku amplikonu PCR, kā arī tos vizualizēt.

Abi AdnaTest PrimerMix ģenerē šādus fragmentus:

PrimerMix ProstateDetect

- PSMA: 449 bp
- PSA: 357 bp
- EGFR: 163 bp
- Akfīns: 120 bp (iekšējā PCR kontrole)

PrimerMix AR-Detect

- AR: 440 bp

Piezīme. Fragmentu lielums var nedaudz atšķirties. Pārliecinieties, ka izmantojat AdnaTest Positive Controls noteikto signālu piešķīrei.

Nodrošinātie materiāli

Komplekta sastāvdaļas

AdnaTest ProstateCancerSelect			
Testu skaits			12
Kataloga numurs			395432
Noņemšanas stobriņi	Collection Tubes (Noņemšanas stobriņi) (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 × 5
Noņemšanas stobriņi	Collection Tubes (Noņemšanas stobriņi) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Sarkanā krāsā	ProstateSelect Beads (ProstateSelect lodītes)	PSB	1,2 ml
Sarkanā krāsā	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (AdnaTest līzes/fiksācijas buferšķīdums)	LBB	2 × 1,2 ml
	Rokasgrāmata		1

AdnaTest ProstateCancerDetect			
Kataloga nr.	396432		
Testu skaits	12		
AdnaTest RNS reaģenti			1. kaste
Sarkanā krāsā	AdnaTest līzes/fiksācijas buferšķīdums	LBB	2 ml
Oranžā krāsā	Oligo (dT)25 lodītes	OdT	280 µl
Baltā krāsā	RNS attīrīšanas buferšķīdums A	BA	4 ml
Baltā krāsā	RNS attīrīšanas buferšķīdums B	BB	4 ml
Violetā krāsā	Tris-HCL buferšķīdums	TB	2 ml
AdnaTest ProstateCancerDetect			2. kaste
Zilā krāsā	AdnaTest PrimerMix ProstateDetect	PMP	144 µl
Oranžā krāsā	AdnaTest Positive Control Prostate (C+)	CONTROL +	40 µl
Dzeltenā krāsā	AdnaTest PrimerMix AR-Detect	PMA	144 µl
Sārtā krāsā	AdnaTest Positive Control AR (C+)	CONTROL +	40 µl
	Rokasgrāmata		1

AdnaTest ProstateCancerDetect reaģentu daudzums ir pietiekams, lai analizētu 6 PCR kontroles un 12 asins paraugus.

Nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (Safety Data Sheets, SDS), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

AdnaTest ProstateCancerSelect

Iekārtas

- Stobriņu rotators 15 ml un 1,5 ml stobriņiem (piem., ELMI Ltd., kat. Nr. IMIX-03)
- Magnētisko daļiņu koncentratori
 - AdnaMag-L (kat. Nr. 399921)
 - AdnaMag-S (kat. Nr. 399911)

Materiāls

- AdnaTube Tubes (AdnaTube stobriņi) (kat. Nr. 399932), ja strādājat ar BD Vacutainer® ACD-A stobriņiem
- Sterilas 10 ml stikla vai plastmasas pipetes un pipetētājs bez RNāzes
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterili 1,5 ml reakciju stobriņi bez RNāzes) (piem., Sarstedt, kat. Nr. 72.690)
- Pipetes un pipešu uzgaļi bez RNāzes ar aerosola barjeru, piemēroti 100–1000 µl pipetēšanai

Reāģenti

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Fosfāta sāls buferšķīdums (PBS), pH 7,0–7,3) (piem., Fisher, kat. Nr. VX14190169, D–PBS)

AdnaTest ProstateCancerDetect

Iekārtas

- Stobriņu rotators 1,5 ml stobriņiem (piem., ELMI Ltd., kat. Nr. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (Magnētisko daļiņu koncentrators AdnaMag-S) (kat. Nr. 399911)
- Termālais bloks vai ūdens vanna (65 °C)

- Termālais amplifikators ar apsildāmu vāku un karsēšanas ātrumu 2 °C/sek.
- Bioanalizators Agilent 2100 (Agilent Technologies)

Materiāls

- Sterili 0,2 ml PCR stobriņi ar plānām sienīņām bez RNāzes
- Sterili 1,5 ml reakciju stobriņi bez RNāzes (piem., Sarstedt, kat. Nr. 72.690)
- Pipetes un pipešu uzgaļi bez RNāzes ar aerosola barjeru, piemēroti 1–200 µl pipetēšanai

Reāģenti

- Sensiscript® RT Kit (Sensiscript RT komplekts) (QIAGEN, kat. Nr. 205211, 50 reakcijas)
 - **Piezīme.** Sensiscript RT komplekts (kat. Nr.205211) ir piemērots tikai 25 paraugiem, jo katrai reakcijai ir nepieciešams divkārtšs apjoms.
- Recombinant RNasin, RNase-inhibitor, 2500 U (Rekombinēts RNAsin, RNāzes inhibitors, 2500 V) (Promega, kat. Nr. N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (HotStarTaq® Master Mix komplekts) (QIAGEN, kat. Nr. 203443, 250 V)
- Drupināts ledus

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai *in vitro* diagnostikā

Informācija par drošību

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, lūdzu, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (safety data sheets, SDS). Tās ērtā un kompaktā

PDF formātā ir pieejamas vietnē www.qiagen.com/safety, kur katram QIAGEN komplektam un tā sastāvdaļām var atrast, apskatīt un izdrukāt SDS.

Izmetiet paraugu un testu atkritumus atbilstoši vietējiem drošības noteikumiem.

Informācija par lietošanu

Šie testi ir jāveic speciālistam, kas pārzina molekulāri bioloģiskās metodes.

Patenti

AdnaTest ProstateCancerDetect ir nepieciešama Hoffmann-La Roche AG, Basel licence. AdnaTest ProstateCancerDetect iegāde nesniedz lietotājam atļauju veikt PCR bez licences.

Reaģentu glabāšana un rīcība ar tiem

Uzglabāšana

AdnaTest ProstateCancer piegādā trīs kastēs. AdnaTest ProstateCancerSelect (kat. Nr. 395432) un AdnaTest RNS reaģentu 1. kaste (1. kaste, kat. Nr. 396432) jāglabā 2–8 °C temperatūrā. Sastāvdaļas nedrīkst izmantot pēc derīguma termiņa beigām.

AdnaTest ProstateCancerDetect 2. kasti (2. kaste, kat. Nr. 396432), kas satur AdnaTest PrimerMixes un AdnaTest Positive Controls, jāglabā atsevišķi –30 līdz –15 °C temperatūrā. Lai novērstu iespējamu piesārņošanu un atkārtotas temperatūras izmaiņas, dozējiet praimera maisījumu. Sastāvdaļas nedrīkst izmantot pēc derīguma termiņa beigām.

Rīcība

- ProstateSelect lodītes satur konservantu nātrija azīdu. Nātrija azīds ir citotoksisks, tāpēc pirms lodīšu izmantošanas no tā ir jāatbrīvojas (skatiet "Protokols: Audzēja šūnu bagātināšana, izmantojot AdnaTest ProstateCancerSelect" 14. lpp.).
- Visas sastāvdaļas un papildu reaģenti, ko nodrošina citi piegādātāji, jāuzglabā atbilstoši šo piegādātāju norādījumiem. Ievērojiet attiecīgo ražotāju informāciju par drošību.
- Izmantojiet aizsargcimdus, lai nepieļautu kontamināciju ar DNS, RNS un RNāzi.
- Dozējiet ProstateSelect lodītes, lai nepieļautu kontamināciju.
- Tests ir jāveic norādītajā secībā, un tam ir jāatbilst visām minētajām specifiskajām attiecībām uz inkubācijas laiku un inkubācijas temperatūru.
- Ja šūnu bagātināšanas laikā notiek atlases lodīšu aglutinācija, izmetiet paraugus.
- Ja iespējams, apstrādājiet paraugus (tostarp veicot atgriezenisko transkriptāzi un pēc tās arī analizējot palielinātos PCR produktus) dažādās telpās, lai nepieļautu savstarpēju kontamināciju.
- Rezultātu kvalitāti var negatīvi ietekmēt citu piegādātāju, nevis ieteikto produktu izmantošana.
- Ievērojiet laboratorijas drošības un higiēnas noteikumus (piemēram, uzvelciet laboratorijas halātu, aizsargbrilles un cimdus).

Rīcība ar paraugiem un to glabāšana

Paraugu sagatavošana

- Asins paraugi ir jāpaņem pirms ārstniecisko vielu lietošanas. Neizmantojiet AdnaTest ProstateCancerSelect ātrāk nekā 7 dienas pēc pēdējās ārstnieciskās procedūras!
- Asins parauga noņemšana: ja paraugu transportēšanas laiks ir mazāks nekā 4 stundas, izmantojiet stobriņus, kas kā antikoagulantu satur EDTA (piem., S

Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [kat. Nr. 01.1605.001]), lai paņemtu vismaz 7,5 ml nesadalītu asiņu.

- Ja paraugu transportēšanas laiks ir garāks nekā 4 stundas, izmantojiet BD Vacutainer ACD-A stobriņus (Becton Dickinson GmbH, kat. Nr. 366645 [ES]; 364606 [ASV]), lai paņemtu vismaz 8,5 ml nesadalītu asiņu. Pirms tālākas apstrādes ar AdnaTest, 5 ml ACD-A asiņu jāpārnes AdnaTube parauga stobriņā, kat. Nr. 399932.
- Asinis nekavējoties jānovieto glabāšanai 4–8 °C temperatūrā.
- Paraugi ir jāapstrādā pēc iespējas ātrāk, bet ne vēlāk kā 4 stundu laikā pēc asins paņemšanas, ja izmantojat standarta EDTA stobriņus, vai 30 stundu laikā, ja izmantojat BD Vacutainer paņemšanas stobriņus kopā ar AdnaTube.
- Asins paraugs nedrīkst būt hemolizēts.

Protokols: Audzēja šūnu bagātināšana, izmantojot AdnaTest ProstateCancerSelect

Svarīga informācija pirms darba sākšanas.

- Pirms procedūras izlasiet “Brīdinājumi un piesardzības pasākumi” (10. lpp.), “Reāģentu glabāšana un rīcība ar tiem” (11. lpp.) un “Rīcība ar paraugiem un to glabāšana” (12. lpp.).
- Pirms izmantošanas ProstateSelect lodītes ir jāskalo, lai atbrīvotos no nātrija azīda, kā aprakstīts tālāk sadaļā “A procedūra: ProstateSelect lodīšu sagatavošana”.
- Lūdzu, izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml noņemšanas stobriņus tikai norādītajai protokola darbībai.

Pirms darba sākšanas jāveic šādas darbības

- Pārlicinieties, ka AdnaTest līzes/fiksācijas buferšķīdums ir sasniedzis istabas temperatūru. Ja ir vērojamas nogulsnes, ļaujiet reaģentam sasniegt istabas temperatūru un sajauciet to, līdz nogulsnes ir pilnībā izšķīdušas.

A procedūra: ProstateSelect lodīšu sagatavošana

1. Rūpīgi resuspendējiet ProstateSelect lodītes ar pipetēšanas metodi; nesaskaliniet!
2. Aprēķiniet ProstateSelect lodīšu apjomu, kas nepieciešams visu paraugu apstrādei (100 µl katram paraugam) un pārnesiet aprēķināto daudzumu 1,5 ml reakciju stobriņā (nav iekļauts komplektā).

Ja apstrādājamo paraugu skaits pārsniedz 10, izmantojiet papildu 1,5 ml reakciju stobriņus (nav iekļauti komplektā).

3. Ievietojiet stobriņu iekārtā AdnaMag-S.
4. Pēc 1 minūtes noņemiet supernatantu ar pipeti.

Piezīme. Noņemot supernatantu, nepieskarieties lodītēm!

5. Skalošanas darbības:

- 5a. Izņemiet magnētisko slīdni no iekārtas AdnaMag-S.
 - 5b. Pievienojiet 1 ml PBS un resuspendējiet lodītes, veicot atkārtotu pipetēšanu.
 - 5c. Ievietojiet magnētisko slīdni iekārtā AdnaMag-S.
 - 5d. Pēc 1 minūtes pilnībā noņemiet supernatantu ar pipeti.
 - 5e. Atkārtojiet 5a. līdz 5d. darbību divas reizes (kopumā jāveic trīs skalošanas).
6. Izņemiet stobriņu no iekārtas AdnaMag-S un resuspendējiet lodītes PBS, līdz tiek sasniegts sākotnējais tilpums (100 µl katram paraugam). Turpiniet ar "B procedūra: audzēja šūnu atlase", skatīt tālāk tekstā.

B procedūra: audzēja šūnu atlase

1. Izmantojot standarta EDTA stobriņus, ar pipeti pārnesiet 5 ml asins parauga 15 ml paņemšanas stobriņos.
Izmantojot ACD-A asinis BD Vacutainer ACD-A stobriņā, pārnesiet 5 ml asins AdnaTube.
Piezīme. AdnaTube ir jālieto obligāti, izmantojot BD Vacutainer ACD-A stobriņus.
2. Rūpīgi resuspendējiet ProstateSelect lodītes (sagatavotas A procedūras 6. darbībā), izmantojot pipetēšanu, un pievienojiet 100 µl šo lodīšu katram asins paraugam.
3. Lēni rotējiet stobriņus (apmēram 5 apgr./min.) 30 minūtes istabas temperatūrā ierīcē, kurā ir iespējama gan sasvēršana, gan rotēšana.
4. Ievietojiet stobriņus iekārtā AdnaMag-L, neizmantojot magnētisko slīdni. Sašūpojiet AdnaMag-L lejup, lai atbrīvotu vāciņā iekļērušās asins lāses.
5. Ievietojiet magnētisko slīdni un inkubējiet stobriņus iekārtā AdnaMag-L 3 minūtes istabas temperatūrā.
6. Ar 10 ml pipeti pilnībā noņemiet visu asins supernatantu, nepieskaroties lodītēm.
Piezīme. Noņemot supernatantu, nepieskarieties lodītēm!

7. Skalošanas darbības:

- 7a. Izņemiet magnētisko slīdņi no iekārtas AdnaMag-L.
- 7b. Pievienojiet 5 ml PBS. Noslēdziet stobriņus un saudzīgi 5 reizes pakratiet AdnaMag-L virzienā uz priekšu un atpakaļ, lai resuspendētu magnētiskās lodītes/šūnu kompleksus.
- 7c. Divas reizes sašūpojiēt ar stobriņiem papildīto AdnaMag-L lejup, lai atbrīvotu vāciņā iekērušās lāses.
- 7d. Ievietojiet magnētisko slīdņi iekārtā AdnaMag-L un 1 minūti inkubējiēt istabas temperatūrā.
- 7e. Noņemiēt visu supernatantu, izmantojiēt pipeti.
- 7f. Atkārtojiēt 7a. līdz 7e. darbību divas reizes (kopumā jāveic trīs skalošanas).

8. Izņemiet magnētisko slīdņi no iekārtas AdnaMag-L.

9. Resuspendējiēt magnētisko lodīšu/šūnu kompleksus 1 ml PBS un pārnesiēt katru paraugu jaunā 1,5 ml reakciju stobriņā (nav iekļauti komplektā).

10. Ievietojiēt reakciju stobriņus iekārtā AdnaMag-S, kurā atrodas magnētiskais slīdņis.

Piezīme. Iekārtas AdnaMag-S magnētisko slīdņi var ievietot divējādi. Vienmēr ievietojiēt slīdņi tā, lai baltā plastmasas plēve būtu vērsta uz priekšu, lai pārliecinātos, ka magnēti atrodas blakus reakciju stobriņiem.

11. Pēc 1 minūtes noņemiēt pilnīgi visu supernatantu, izmantojiēt pipeti, lai optimizētu turpmāku šūnu līzi.

12. Izņemiet magnētisko slīdņi no iekārtas AdnaMag-S.

13. Pievienojiēt katram reakciju stobriņam 200 μl AdnaTest līzes/fiksācijas buferšķīduma (buferšķīdumam jāļauj sasniegt istabas temperatūra). Resuspendējiēt, vismaz piecas reizes izmantojiēt pipeti.

14. Ievietojiēt magnētisko slīdņi iekārtā AdnaMag-S un inkubējiēt 1 minūti.

15. Pārnesiēt supernatantu (šūnu lizātu) jaunās 1,5 ml reakciju stobriņos (iekļauti komplektā).

16. Izmetiet stobriņus, kuros ir lodītes.

17. Uzreiz veiciet mRNS izolēšanu (skatīt "Protokols: Ar gēnu ekspresiju saistīta prostatas vēža noteikšana bagātinātās audzēja šūnās, izmantojot AdnaTest ProstateCancerDetect" 18. lpp.) vai uzglabājiet šūnu lizātus $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā ne vairāk kā 2 nedēļas.

Protokols: Ar gēnu ekspresiju saistīta prostatas vēža noteikšana bagātinātās audzēja šūnās, izmantojot AdnaTest ProstateCancerDetect

Svarīga informācija pirms darba sākšanas.

- Pirms procedūras izlasiet “Brīdinājumi un piesardzības pasākumi” (10. lpp.) un “Reaģentu glabāšana un rīcība ar tiem” (11. lpp.).
- A līdz C procedūra apraksta mRNS izolēšanu un atgriezenisko transkriptāzi
- Lūdzu, izmantojiet komplektā iekļautos 1,5 ml noņemšanas stobriņus tikai norādītajai protokola darbībai.

Pirms darba sākšanas jāveic šādas darbības

- Pārlicinieties, ka AdnaTest līzes/fiksācijas buferšķīdums ir sasniedzis istabas temperatūru. Ja ir vērojamas nogulsnes, ļaujiet reaģentam sasniegt istabas temperatūru un sajauciet to, līdz nogulsnes ir pilnībā izšķīdušas.
- Ļaujiet RNS attīrīšanas buferšķīdumam A un RNS attīrīšanas buferšķīdumam B sasniegt istabas temperatūru. Novietojiet Tris-HCL buferšķīdumu uz ledus.
- Atkausējiet 10 x buferšķīdumu RT un dNTP, kas ietilpst Sensiscript RT komplektā, istabas temperatūrā. Sajauciet, saskalīnot. Īsi centrifugējiet un uzglabājiet uz ledus. Atkausējiet ūdeni, kas nesatur RNāzi (ietilpst Sensiscript RT komplektā).
- Noregulējiet termālā bloka vai ūdens vannas temperatūru uz 65 °C.

A procedūra: Oligo(dT)₂₅ lodīšu sagatavošana

1. Pirms izmantošanas rūpīgi resuspendējiet Oligo(dT)₂₅ lodītes ar pipetēšanas metodi; nesaskaliniet!
2. Aprēķiniet lodīšu apjomu, kas nepieciešams visu paraugu apstrādei (20 µl katram paraugam un vēl 10 %), un pārnesiet aprēķināto apjomu jaunā 1,5 ml reakcijas stobriņā, kas nesatur RNāzi (nav iekļauts komplektā).
3. Ievietojiet stobriņu iekārtā AdnaMag-S.
Piezīme. Iekārtas AdnaMag-S magnētisko slīdņi var ievietot divējādi. Vienmēr ievietojiet slīdņi tā, lai baltā plastmasas plēve būtu vērsta uz priekšu, lai pārliecinātos, ka magnēti atrodas blakus reakciju stobriņiem.
4. Pēc 1 minūtes noņemiet supernatantu ar pipeti.
5. Skalošanas darbības:
 - 5a. Izņemiet magnētisko slīdņi no iekārtas AdnaMag-S.
 - 5b. Pievienojiet sākotnējo AdnaTest līzes/fiksācijas buferšķīduma daudzumu (2. darbība 19. lpp.) un resuspendējiet lodītes, veicot atkārtotu pipetēšanu. Lai nepieļautu putu veidošanos, saudzīgi resuspendējiet.
 - 5c. Ievietojiet magnētisko slīdņi iekārtā AdnaMag-S.
 - 5d. Pēc 1 minūtes pilnībā noņemiet visu supernatantu.
 - 5e. Atkārtojiet 5a. līdz 5d. darbību vienu reizi (kopumā jāveic divas skalošanas).
6. Izņemiet stobriņu no iekārtas AdnaMag-S un resuspendējiet lodītes AdnaTest līzes/fiksācijas buferšķīdumā līdz sākotnējam apjomam (2. darbība 19. lpp.). Turpiniet ar "B procedūra: mRNS izolēšana".

B procedūra: mRNS izolēšana

1. Pievienojiet 20 µl Oligo(dT)₂₅ lodīšu (6. darbība, skatīt iepriekš) katrā stobriņā, kas satur šūnu lizātu (15. darbība 16. lpp.).
2. Lēni rotējiet stobriņus (apmēram 5 apgr./min.) 10 minūtes istabas temperatūrā ierīcē, kurā ir iespējama gan sasvēršana, gan rotēšana.
3. Ievietojiet stobriņus iekārtā AdnaMag-S, neizmantojot magnētisko slīdni. Sašūpojiet AdnaMag-S leju, lai atbrīvotu vāciņā iekļerušās lodītes un šķīdumu.
4. Ievietojiet magnētisko slīdni un pēc 1 minūtes noņemiet supernatantu.
5. Skalošanas darbības 1:
 - 5a. Izņemiet magnētisko slīdni no iekārtas AdnaMag-S.
 - 5b. Katrā stobriņā pievienojiet 100 µl RNS attīrīšanas buferšķīduma A un resuspendējiet lodītes, veicot atkārtotu pipetēšanu. Lai nepieļautu lodīšu zudumu, rūpīgi noskalojiet vāciņu un stobriņa sienīgas.
 - 5c. Ievietojiet magnētisko slīdni iekārtā AdnaMag-S.
 - 5d. Pēc 1 minūtes pilnībā noņemiet visu supernatantu.
 - 5e. Atkārtojiet 5a. līdz 5d. darbību vienu reizi (kopumā jāveic divas skalošanas).
6. Skalošanas darbības 2:
 - 6a. Izņemiet magnētisko slīdni no iekārtas AdnaMag-S.
 - 6b. Katrā stobriņā pievienojiet 100 µl RNS attīrīšanas buferšķīduma B. Resuspendējiet lodītes, veicot atkārtotu pipetēšanu, un pārnēsiet tās jaunos 1,5 ml reakcijas stobriņos (iekļauti komplektā).
 - 6c. Ievietojiet magnētisko slīdni iekārtā AdnaMag-S.
 - 6d. Pēc 1 minūtes pilnībā noņemiet visu supernatantu. Šis solis ir jāveic uzmanīgi (vērojiet granulu), jo lodītes var slīdēt, un tās var netīšām izvadīt.
 - 6e. Atkārtojiet 6a. līdz 6d. darbību vienu reizi tajos pašos reakcijas stobriņos (kopumā jāveic divas skalošanas).

7. Izņemiet magnētisko slīdņi no iekārtas AdnaMag-S.
8. Katrā stobriņā pievienojiet 100 µl ledusauksta Tris-HCL buferšķīduma un resuspendējiet lodītes, veicot pipetēšanu.
9. Ievietojiet magnētisko slīdņi iekārtā AdnaMag-S.
10. Pēc 1 minūtes pilnībā noņemiet visu supernatantu.
11. Izņemiet magnētisko slīdņi no iekārtas AdnaMag-S.
12. Resuspendējiet mRNS/lodīšu kompleksu 14,75 µl ūdens, kas nesatur RNāzi.
13. Pārvietojiet stobriņus uz termālo bloku vai ūdens vannu un inkubējiet 5 minūtes 65 °C temperatūrā.
14. Nekavējoties novietojiet stobriņus uz ledus un gaidiet vismaz 2 minūtes.
15. Nekavējoties uzsāciet (5 minūšu laikā) atgriezenisko transkriptāzi (C procedūra: atgriezeniskā transkriptāze, izmantojot komplektu Sensiscript RT).
Neuzglabājiet mRNS/lodīšu kompleksu!

C procedūra: atgriezeniskā transkriptāze, izmantojot komplektu Sensiscript RT

1. Sagatavojiet RT Master Mix uz ledus. RT Master Mix sagatavo atbilstoši 1. tabulā redzamajiem norādījumiem, ņemot vērā paraugu skaitu.
Aprēķinot RT Master Mix tilpumu, ir par 10 % jāpalielina apjoms, kas aprēķināts kopējam atgriezeniskās transkriptāzes reakciju skaitam. Vienmēr ir jāgatavo negatīva kontroles reakcija, nepievienojot mRNS (RT kontrole).
2. Saskaliniet RT Master Mix. Īsi centrifugējiet un ar pipeti ievietojiet 0,2 ml PCR stobriņos 5,25 µl maisījuma katrai reakcijai.
3. Uzmanīgi resuspendējiet mRNS/lodīšu kompleksus (12. darbība 21. lpp.), izmantojot pipeti. Pārnēsiet visu tilpumu 0,2 ml PCR reakciju stobriņā, kurā atrodas RT Master Mix. Rūpīgi sajauciet, atkārtoti veicot pipetēšanu.

1. tabula. Atgriezeniskās transkriptāzes reakcijas iestatne

Sastāvdaļa	Tilpums
RT Master Mix	
10x Buffer RT (10 x buferšķīdums RT)	2,0 µl
dNTP Mix (dNTP maisījums) (5 mM katra dNTP)	2,0 µl
RNase inhibitor (RNāzes inhibitors), 40 V/µl (Promega)	0,25 µl
Sensiscript Reverse Transcriptase (Sensiscript atgriezeniskā transkriptāze)	1,0 µl
Šablona RNS*	14,75 µl
mRNA/bead complex or RNase free water (mRNS/lodīšu komplekss vai ūdens bez RNāzes)	
Kopējais tilpums	20,0 µl

* Lai nodrošinātu RT kontroli, pievienojiet 14,75 µl ūdens bez RNāzes, nevis mRNS/lodīšu kompleksu. mRNS/lodīšu kompleksa tilpums var nedaudz atšķirties. Jebkurā gadījumā atgriezeniskās transkriptāzes veikšanai izmantojiet visu tilpumu!

4. kDNS tiek sintezēta termālajā amplifikatorā tālāk aprakstītajos apstākļos (2. tabula).

2. tabula. Atgriezeniskās transkriptāzes programma

Temperatūra	Laiks
37 °C	60 minūtes
93 °C	5 minūtes
4 °C	∞

5. Novietojiet reakciju stobriņus ar kDNS uz ledus vai uzglabājiet -20 °C temperatūrā ne ilgāk kā 4 nedēļas. Turpiniet ar "Protokols: Vairāku amplikonu un viena amplikona PCR" 22. lpp.

Protokols: Vairāku amplikonu un viena amplikona PCR

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Pirms procedūras izlasiet “Brīdinājumi un piesardzības pasākumi” (10. lpp.) un “Reaģentu glabāšana un rīcība ar tiem” (11. lpp.).

Pirms darba sākšanas jāveic šādas darbības

- Atkausējiet HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix ProstateDetect, AdnaTest Positive Control Prostate, AdnaTest PrimerMix AR-Detect, AdnaTest Positive Control AR un ūdeni bez RNāzes. Saskaliniet, ātri centrifugējiet un uzglabājiet uz ledu.

A procedūra: vairāku amplikonu PCR (AdnaTest ProstateDetect)

1. PCR Master Mix tiek sagatavots atbilstoši 3. tabulā redzamajiem norādījumiem, ņemot vērā paraugu skaitu.

Aprēķinot PCR Master Mix apjomu, ir papildus jāpieskaita vismaz 10 %. Ņemiet vērā, ka, izmantojot AdnaTest Positive Control Prostate, vienmēr jābūt pievienotam ūdenim bez RNāzes kā negatīvajai kontrolei, kā arī RT kontrolei.

2. Katram paraugam ievadiet 21,0 µl PCR Master Mix 0,2 ml PCR reakciju stobriņā. Resuspendējiet kDNS/Iodīšu maisījumu, izmantojot pipetēšanas metodi, un iepildiet 4,0 µl šī maisījuma katrā reakciju stobriņā.

Piezīme. Lai nodrošinātu negatīvo kontroli, kDNS vietā pievienojiet 4,0 µl ūdens bez RNāzes.

3. tabula. Vairāku amplikonu PCR sagatavošana

Sastāvdaļa	Tilpums
Vairāku amplikonu PCR Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
RNase-free water (Ūdens, kas nesatur Rnāzi)	4,5 µl
PrimerMix ProstateDetect	4,0 µl
kDNS vai RT kontrole, vai negatīvā kontrole (ūdens, kas nesatur RNāzi), vai pozitīvā kontrole (C+) katram:	4,0 µl
Kopējais tilpums	25,0 µl

3. PCR veikšanai tiek izmantots termālais amplifikators atbilstoši 4. tabulā aprakstītajai programmai. Darbiniet termālo amplifikatoru ar palielinājumu 2 °C/sekundē. PCR tiek kopā veikts 42 ciklos.

4. tabula. PCR ciklēšanas programma

	Temperatūra	Laiks
Sākotnējās aktivizēšanas darbība	95 °C	15 minūtes
3 soļu ciklēšana		
Denaturācija:	94 °C	30 sekundes
Praimeru hibridizācija:	61 °C	30 sekundes
Ekstensija:	72 °C	30 sekundes
Ciklu skaits:	42	
Galīgā ekstensija:	72 °C	10 minūtes
Atdzišana:	4 °C	∞

B procedūra: Viena amplikona PCR (AdnaTest AR-Detect)

1. PCR Master Mix tiek sagatavots atbilstoši 5. tabulā redzamajiem norādījumiem, ņemot vērā paraugu skaitu.

Aprēķinot PCR Master Mix apjomu, ir papildus jāpieskaita vismaz 10 %. Ņemiet vērā, ka, izmantojot AdnaTest Positive Control, vienmēr jābūt pievienotam ūdenim bez RNāzes kā negatīvajai kontrolei, kā arī RT kontrolei.

- Katram paraugam ievadiet 21,0 µl PCR Master Mix 0,2 ml PCR reakciju stobriņā. Resuspendējiet kDNS/lodīšu maisījumu, izmantojot pipetēšanas metodi, un iepildiet 4,0 µl šī maisījuma katrā reakciju stobriņā.

Piezīme. Lai nodrošinātu negatīvo kontroli, kDNS vietā pievienojiet 4,0 µl ūdens bez RNāzes.

5. tabula. Viena amplikona PCR sagatavošana

Sastāvdaļa	Tilpums
Viena amplikonu PCR Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
RNase-free water (Ūdens, kas nesatur Rnāzi)	4,5 µl
PrimerMix AR-Detect	4,0 µl
kDNS vai RT kontrole, vai negatīvā kontrole (ūdens, kas nesatur RNāzi), vai pozitīvā kontrole (C+) katram:	4,0 µl
Kopējais tilpums	25,0 µl

- PCR veikšanai tiek izmantots termālais amplifikators atbilstoši 6. tabulā aprakstītajai programmai. Darbiniet termālo amplifikatoru ar palielinājumu 2 °C/sekundē. PCR tiek kopā veikts 35 ciklos.

6. tabula. PCR ciklēšanas programma

	Temperatūra	Laiks
Sākotnējās aktivizēšanas darbība	95 °C	15 minūtes
3 soļu ciklēšana (35 cikli)		
Denaturācija	94 °C	30 sekundes
Praimeru hibridizācija:	60 °C	30 sekundes
Ekstensija:	72 °C	60 sekundes
Ciklu skaits:	35	
Galīgā ekstensija:	72 °C	10 minūtes
Atdzišana:	4 °C	∞

Rezultātu interpretācija

Fragmenta analīze bioanalizatorā Agilent 2100

Analīzes veikšanai izmanto bioanalizatoru Agilent 2100 (Agilent Technologies), kas atrodas uz DNA 1000 LabChip. Ievērojiet DNA 1000 LabChip® rokasgrāmatā minētās norādes un pārliedzieties, ka LabChip nav iekļuvušas lodītes. Magnētiskās lodītes, kas atrodas gelā, var izraisīt nederīgus rezultātus.

1. Palaidiet bioanalizatora programmatūru **2100 expert**. Atlasiet **Instrument** (rīks) sadaļā **Contexts** (konteksti) un tad klikšķiniet iz pogas **Assay** (tests), kas atrodas blakus **Assay Selection** (testu atlase).
2. Atlasiet **Electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy** (elektroforēze > DNA 1000 Series II.xsy). Sagatavojiet mikroshēmu un sāciet izpildi.

3. Rezultātu novērtēšanai iestatiet noteikšanas sliekšni:

- 3a. Atlasiet **Data** (dati) sadaļā **Contexts** un tad klikšķiniet uz cilnes **Assay Properties** (testa īpašības). Atlasiet **Global** (viss) un **Normal** (normāls) nolaižamajā izvēlnē labajā pusē.
- 3b. Atlasiet **Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)** (parauga iestatījumi > integrators > augstuma sliekšnis (FU)) un iestatiet šo vērtību uz **0** (noklusējuma vērtība ir **20**), lai noteiktu visus signālus.

Rezultātu analīze AdnaTest ProstateDetect

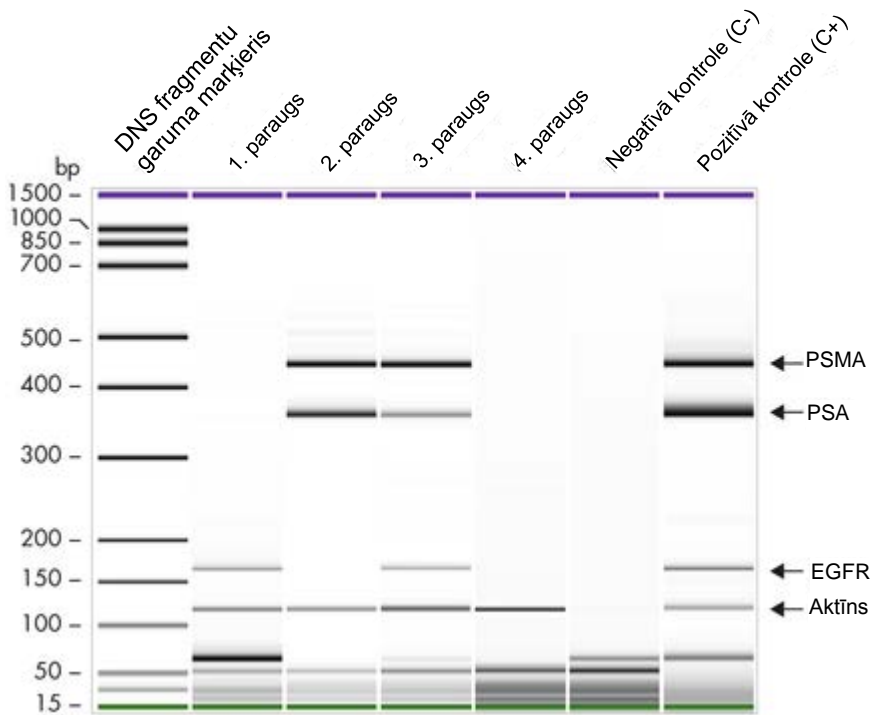
Tests tiek uzskatīts par pozitīvu, ja ir skaidri noteikts vismaz viena ar audzēju saistīta transkripta (PSMA, PSA vai EGFR) PCR fragments.

Izmantojot bioanalizatoru Agilent 2100, maksimumi ar koncentrāciju, kas ir $\geq 0,10$ ng/ μ l, ir pozitīvi (3. attēls).

Kontrolgēna aktīva fragmentam ir jābūt noteiktam visos pacientu paraugos (iekšējā PCR kontrole). Aktīva signāls nodrošina pozitīvu kontroli veiksmīgai šūnu atdalīšanai, atgriezeniskajai transkriptāzei un vairāku amplikonu PCR. Negatīvās kontroles un RT kontroles paraugos nedrīkst būt joslas ar vairāk kā 80 bāzu pāriem (primeru dimēri).

Fragments, kas ir lielāks par 900 bp, liecina par kontamināciju ar genoma DNS. Atdalīšanas process nebija veiksmīgs, un šajā gadījumā rezultāti nav derīgi.

SVARĪGI! Ja protokols netiek precīzi ievērots, var tikt iegūti nepatiesi negatīvi vai nepatiesi pozitīvi rezultāti.



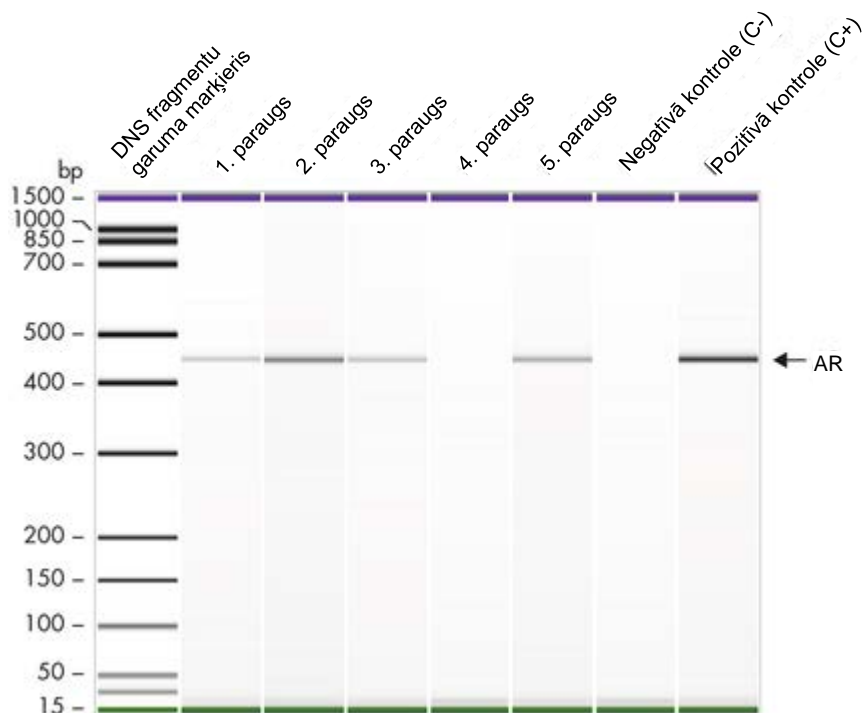
3. attēls AdnaTest ProstateCancerDetect rezultāti vairāku amplikonu PCR paraugiem, kas analizēti ar bioanalizatoru Agilent 2100. Pirmajā joslā ir attēlots DNS lieluma standarts (DNS fragmentu garuma marķieris). 1. paraugā ir pozitīvs EGFR rezultāts, 2. paraugā ir pozitīvs PSMA un PSA rezultāts, 3. paraugā ir pozitīvs PSMA, PSA un EGFR rezultāts. 4. paraugs ir negatīvs. Aktīns ir noteikts 1.–4. paraugā. PCR negatīvā (C-) un pozitīvā kontrole (C+) ir redzama divās pēdējās joslās.

Rezultātu analīze AdnaTest AR-Detect

Izmantojot bioanalizatoru Agilent 2100, maksimumi ar koncentrāciju, kas ir $\geq 0,15$ ng/ μ l AR, ir pozitīvi (4. attēls).

Kontrolgēna aktīna fragmentam ir jābūt noteiktam visos pacientu paraugos (iekšējā PCR kontrole). Aktīna signāls nodrošina pozitīvu kontroli veiksmīgai šūnu atdalīšanai, atgriezeniskajai transkriptāzei un viena amplicona PCR. Negatīvās kontroles un RT kontroles paraugos nedrīkst būt joslas ar vairāk kā 80 bāzu pāriem (primeru dimēri).

SVARĪGI! Ja protokols netiek precīzi ievērots, var tikt iegūti nepatiesi negatīvi vai nepatiesi pozitīvi rezultāti.



4. attēls. Viena amplikona PCR paraugu AdnaTest ProstateCancerDetect rezultāti. Pirmajā joslā ir attēlots DNS lieluma standarts (DNS fragmentu garuma marķieris). 1.–3. paraugā un 5. paraugā ir pozitīvs AR rezultāts. 4. paraugs ir negatīvs. PCR negatīvā (C-) un pozitīvā kontrole (C+) ir redzama divās pēdējās joslās.

Problēmu novēršanas ieteikumi

Šie problēmu novēršanas ieteikumi var būt noderīgi, risinot radušās problēmas. Vairāk informācijas skatiet arī lapā “Visbiežāk uzdotie jautājumi”, kas atrodas mūsu Tehniskā atbalsta centrā: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Tehniskā atbalsta darbinieki vienmēr labprāt atbildēs uz jūsu jautājumiem par informāciju un/vai protokoliem šajā rokasgrāmatā, vai arī paraugu un testu metodēm (kontaktinformāciju skatiet vietnē www.qiagen.com).

Kvalitātes kontrole

Saskaņā ar QIAGEN Kvalitātes vadības sistēmu, kas sertificēta atbilstoši ISO, katru AdnaTest ProstateCancerSelect un AdnaTest ProstateCancerDetect partiju pārbauda saskaņā ar iepriekš noteiktiem parametriem, lai nodrošinātu pastāvīgu preču kvalitāti.

Ierobežojumi

Visus reaģentus jāizmanto tikai *in vitro* diagnostikā.

Produktu drīkst lietot tikai īpaši apmācīta persona *in vitro* diagnostikas veikšanai.

Ir svarīgi, ka pirms sistēmas izmantošanas operators pilnībā iepazīstas ar lietošanas instrukcijām.

Lai nodrošinātu optimālus PCR rezultātus, stingri jāievēro lietošanas instrukcijas.

Pārbaudiet derīguma termiņus, ka norādīti uz kastes un visu sastāvdaļu marķējuma. Neizmantojiet sastāvdaļas pēc derīguma termiņa beigām.

Visi iegūtie diagnostikas rezultāti jāinterpretē kopā ar citiem klīniskiem konstatējumiem vai laboratoriskiem rezultātiem.

Darbības raksturojums

Atgūšana

Veselu donoru asins paraugiem tika pievienotas divas kultivētas LnCap prostatas vēža šūnas, lai noteiktu atgūšanas pakāpi, kas sasniegta, izmantojot AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect (7. tabula).

7. tabula. AdnaTest ProstateCancer atgūšanas pakāpe attiecībā uz audzēja šūnām, kas pievienotas veselu donoru asins paraugiem

	Pozitīvo rezultātu skaits	Kopējais paraugu skaits
Divas audzēja šūnas, pievienotas 5 ml asiņu parauga	38 (95 %)	40

Atgūšanas pakāpe attiecībā uz divu audzēja šūnu, kas pievienotas 5 ml veselu donoru asiņu, noteikšanu ir 95 %.

Specifiskums

Komplekts AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect tika izmantots, lai analizētu 40 veselus donorus un noteiktu nepatiesi pozitīvo rezultātu koeficientu konkrētajā nogrieznī (0,10 ng/μl fragmenta koncentrācija katram iekļautajam gēnu profilam, izņemot aktīnu).

8. tabula. Specifiskuma noteikšana

Kontrolgrupa	Kopējais paraugu skaits	Nepatiesi pozitīvo rezultātu skaits	Specifiskums (%)
Veseli donori	40	0 (0 %)	100

AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect uzrādīja 100 % specifiskumu (8. tabula).

Atkārtojamība

Divdesmit veselu donoru asins paraugiem tika pievienotas 10 LnCap prostatas vēža šūnas katram paraugam. Divi operatori izmantoja AdnaTest ProstateCancerSelect/Detect asins paraugu analizēšanai, lai noteiktu atkārtojamību. Testa iekšējā un starptestu atkārtojamība bija 100 % (9. tabula).

9. tabula. AdnaTest ProstateCancer Select/Detect atkārtojamība

Operators	Pozitīvs AdnaTest rezultāts/paraugi	Testa iekšējā atkārtojamība (%)	Starptestu atkārtojamība (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Precizitāte

Lai noteiktu precizitāti, tika apkopotas un analizētas kDNS alikvotas, izmantojot AdnaTest ProstateCancerDetect. Divi operatori analizēja 30 kDNS paraugus, ko veido 3 neatkarīgi 10 paraugu mērījumi. Testa iekšējā un starptestu precizitāte bija 100 % (10. tabula).

10. tabula. AdnaTest ProstateCancerDetect precizitāte

Operators	Pozitīvs AdnaTest rezultāts/paraugi	Testa iekšējā precizitāte (%)	Starptestu precizitāte (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Traucējošas vielas

Antikoagulanti

Paņemot un pārvadājot asinis, obligāti jāizmanto antikoagulanti. Heparīns un citrāts izraisa agregātu veidošanos pēc AdnaTest imūnmagnētisko lodīšu pievienošanas, tāpēc testam var nebūt rezultātu vai tie var būt nepatiesi. Tomēr EDTA un ACDA (citrāta/dekstrozes/adenīna šķīdums A) ir saderīgi ar AdnaTest imūnmagnētiskajām lodītēm.

Hemolīze

Hemolīzi asins paraugos (plazmas frakcija izskatās sarkana) vairākumā gadījumu izraisa neatbilstoši transportēšanas vai uzglabāšanas apstākļi. Šādi paraugi var radīt nepatiesi negatīvus rezultātus, un tie ir jāatmet.

Ķīmijterapijas preparāti, mērķa terapijas medikamenti un antihormonu režīmi

Ķīmijterapijas preparāti (taksāni, cisplatīns, oksaliplatīns, 5-FU, antraciklīns, irinotekāns u.c.) ir iedarbīgi citotoksīni un izraisa bojājumus vai strauju šūnu bojāeju asins paraugos. Tādējādi ir liela iespējamība iegūt nepatiesi negatīvus rezultātus, izmantojot AdnaTest imūnmagnētiskās lodītes. Pēc šo vielu ievadīšanas cilvēka organismam ir nepieciešamas 5–7 dienas, lai veiktu to detoksificēšanu (11. tabula). Šajā laikā ņemtos asins paraugus nedrīkst izmantot darbā ar AdnaTest imūnmagnētiskajām lodītēm.

11. tabula. Ķīmijterapijas preparātu pussabrukšanas laiks

Medikaments	Pussabrukšanas laiks	Atsauce
5-Fluorouracil	Līdz 20 minūtēm	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetaxel	Līdz 11,1 stundai	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cis-platinum	Līdz 30 minūtēm	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Carbo-platinum	Līdz 5,9 stundām	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paclitaxel	Apmēram 25,4 stundas	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Līdzvērtīgi piesardzības pasākumi ir ieteicami arī gadījumā, ja tiek izmantoti mērķa terapijas režīmi, piemēram, antivielas (Herceptin®, bevacizumabs, cetuksimabs u.c.), tirozīna kināzes blokētāji (olaparibs, Iressa®, Erbitux®, lapatinibs u.c.) un antihormonu medikamenti (tamoksifēns, abiraterons, enzalutamīds u.c.), ja tie ir lietoti kā atsevišķs medikaments vai kombinācijā ar ķīmijterapijas preparātiem.

Klīniskajos izmēģinājumos, kuros demonstrēta tādu cirkulējošo audzēja šūnu (circulating tumor cells — CTC) prognozējošā vērtība, kas identificētas un raksturotas, izmantojot AdnaTest imūnmagnētiskās lodītes, nav novērota negatīva ķīmijterapijas preparātu, mērķa terapiju vai antihormonālu terapiju ietekme, ja pēc medikamentu lietošanas tiek ievērots nogaidīšanas periods — vismaz 7 dienas. Turklāt izplatītāko vienlaicīgi lietoto medikamentu (aspirīna, ibuprofēna, aprepitanta, steroīdu u.c) negatīvā ietekme ir maz ticama, lai gan tā tiek kontrolēta.

Traucējoši apstākļi

Asinsrece

Klīnisko izmēģinājumu kontekstā ir novērota asinsrece pēc inkubācijas ar AdnaTest imūnmagnētiskajām lodītēm — visbiežāk tas notiek asins paraugos, kas iegūti no pacientiem vēlīnā slimības stadijā. AdnaTest darbplūsmas gaitā ir grūti apstrādāt asins paraugus, kuros novērojama asinsrece, jo tajos ir palielināta viskozitāte un ir apgrūtināta pipetes izmantošana. Šādos asins paraugos ir arī nepieņemami liels kontaminējošu leikocītu skaits, kas izraisa nepatiesi pozitīvus rezultātus. Šādi paraugi ir jāatmet.

Labdabīga organiska saslimšana un hroniskas iekaisuma saslimšanas

Labdabīga organiskas saslimšana un hronisks iekaisums, piemēram, artrīts, labdabīga prostatas hiperplāzija (BPH), Krona slimība u.c. neizraisa nepatiesi pozitīvus AdnaTest rezultātus.

Akūta alerģija

Akūtu alerģisku saslimšanu gadījumā pēc CTC bagātināšanas ar AdnaTest imūnmagnētisko lodīšu palīdzību rodas palielināts daudzums kontaminējošo leukocītu. Šī iemesla dēļ nevar pilnīgi izslēgt nepatiesi pozitīvus rezultātus.

Klīniskie pētījumi

Tika novēroti 12 pacienti ar metastātisku, pret kastrāciju rezistentu prostatas vēzi (castrate-resistant prostate cancer — CRPC) docetaksela terapijas laikā. Pirmais paraugs tika analizēts sākotnējā stadijā un vēl divus paraugus analizēja apsekošanas laikā.

Pētot AR aktivizāciju, tika skaidri pierādīts, ka AR aktivizācija un deaktivizācija izteikti korelē ar CTC skaita samazināšanās ātrumu terapijas rezultātā. Tomēr terapijas laikā CTC pozitivitātes koeficients samazinājās no 70 % sākotnēji līdz ~ 35 % apsekošanas laikā, un AR pozitīvāte samazinājās no 55 % līdz ~11 %. Terapijas rezultātā ārstēšana ar docetakselu vairāk ietekmē AR pozitīvos CTC apakšklonus nekā AR negatīvos CTC. Šie rezultāti labi korelē ar Darshan et al. 2011. gada pētījumu, kurā tika novērota AR kodola transportēšanas un signalizēšanas bloķēšana, ko izraisīja taksāns.

Šie rezultāti liecina par specifisku un sensitīvu CTC noteikšanu prostatas vēža klīniskajos paraugos, kā arī ar terapijas mērķiem saistīto ģenētisko profilu novērtēšanu.

Atsauce

Darshan, M.S. et al. (2011) Taxane-Induced Blockade to Nuclear Accumulation of the Androgen Receptor Predicts Clinical Responses in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2011 Sep 15; **71(18)**: 6019–6029. Publicēts tiešsaistē 2011. gada 28. jūlijā, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1417.

Saīsinājumi

AdnaMag-L	Magnētisko daļiņu koncentrators (liels)
AdnaMag-S	Magnētisko daļiņu koncentrators (mazs)
AR	Androgēna receptors
bp	Bāzu pāri
C+	Pozitīva kontrole
C-	Negatīva kontrole
kDNS	Komplementāra dezoksiribonukleīnskābe
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe
dNTP	Dezoksinukleotīda trifosfāti
EGFR	Epidermas augšanas faktora receptors
kb	kilobāzes
mRNS	Matrices ribonukleīnskābe
PCR	Polimerāzes ķēdes reakcija
PSA	Prostatas specifiskais antigēns
PSMA	Prostatas specifiskais membrānas antigēns
RNāze	Ribonukleāze
apgr./min.	Apgrīzieni minūtē
RT	Atgriezeniskā transkriptāze

Simboli



Satur reaģentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> testu veikšanai



Izlietot līdz



Temperatūras ierobežojumi



Kataloga numurs



Skatīt lietošanas norādījumus



Ražotājs



In vitro diagnostikas medicīnas ierīce



Materiāla numurs



Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs (GTIN)

Informācija pasūtīšanai

Prece	Saturs	Kat. Nr.
AdnaTest ProstateCancerSelect	CTC izolēšanai un sekojošai mRNS ekstrācijai no nesadalītām cilvēka asinīm 12 paraugiem	395432
AdnaTest ProstateCancerDetect	RT-PCR komplekts ar prostatas vēzi saistītas gēnu ekspresijas noteikšanai bagātinātās audzēja šūnās	396432
Saistītās preces		
AdnaTubes	12 paraugu stobriņi ar EDTA. Izmantot tikai ar stabilizētām asinīm, kas paņemtas uzņēmuma BD A-CDA asins ņemšanas stobriņos	399932
AdnaMag-L	8 stobriņiem, 15 ml.	399921
AdnaMag-S	8 stobriņiem, 1,5 ml.	399911
Sensiscrypt RT Kit (50)	50 atgriezeniskās transkriptāzes reakcijām:* Sensiscrypt atgriezeniskā transkriptāze, 150 µl 10 x buferšķīdums RT, 100 µl dNTP maisījums (satur 5 mM katra dNTP), 1,1 ml ūdens bez RNāzes	205211
HotStarTaq Master Mix komplekts (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (satur 250 vienības HotStarTaq DNS polimerāzes, PCR buferšķīdumu ar 3 mM MgCl ₂ , 400 µM katra dNTP) un 2 x 1,7 ml ūdens bez RNāzes	203443

* Sensiscrypt RT komplekts (50) ir piemērots tikai 25 paraugiem, izmantojot AdnaTest ProstateCancerDetect, jo katrai reakcijai ir nepieciešams divkārsšs apjoms.

Jaunāko informāciju par licencēšanu un preču juridiskās atrunas skatiet attiecīgā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja instrukcijā. QIAGEN komplektu lietotāja rokasgrāmatas un lietotāja instrukcijas ir pieejamas www.qiagen.com, kā arī tās var pieprasīt QIAGEN tehniskā atbalsta centros vai pie vietējiem preču izplatītājiem.

Ierobežots licences līgums AdnaTest ProstateCancerSelect un AdnaTest ProstateCancerDetect

Šīs preces izmantošana liecina par katra preces pircēja un tās lietotāja piekrišanu šādiem nosacījumiem:

1. Šo preci drīkst lietot tikai saskaņā ar protokoliem, kas nodrošināti kopā ar preci, un šo rokasgrāmatu, un to drīkst lietot tikai kopā ar sastāvdaļām, kas ietvertas šajā komplektā. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā ietvertās sastāvdaļas izmantotu kopā ar jebkādam sastāvdaļām, kas nav ietvertas šajā komplektā, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti kopā ar preci piegādātajos protokolos un šajā rokasgrāmatā, kā arī papildu protokolos, kas pieejami tīmekļa vietnē www.qiagen.com. Dažus no šiem papildu protokoliem QIAGEN lietotāji nodrošina QIAGEN lietotājiem. Šie protokoli nav rūpīgi testēti vai optimizēti uzņēmumā QIAGEN. Uzņēmums QIAGEN nedz apliecina, nedz garantē, ka tie nepārkāpj trešo personu tiesības.
2. Uzņēmums QIAGEN negarantē, ka šis komplekts un/vai tā lietošana neaizskar trešo personu tiesības, ja vien tas nav nepārprotami norādīts.
3. Šis komplekts un tā sastāvdaļas ir licencētas vienreizējai lietošanai un nevar tikt izmantotas atkārtoti, atjaunotas vai pārdotas tālāk.
4. Uzņēmums QIAGEN īpaši atsakās no jebkādas citas tiešas vai netiešas atļaujas, kas nav skaidri norādīta.
5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neaļaut citiem veikt jebkādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām. Uzņēmums QIAGEN var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā sastāvdaļām.

Jaunākos licences nosacījumus skatiet vietnē www.qiagen.com.

Preču zīmes: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTag®, Sensiscript® (QIAGEN grupa); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., Eli Lilly and Company pilnībā piederošs meitasuzņēmums); Herceptin® (Genentech, Inc.); IRESSA® (AstraZeneca grupa) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2396-001 © 2017 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Pasūtišana www.qiagen.com/shop | Tehniskais atbalsts support.qiagen.com | Tīmekļa vietne www.qiagen.com