

Marts 2017

# AdnaTest ColonCancerSelect og ColonCancerDetect- håndbog



12 (katalognr. 395422)



12 (katalognr. 396422)

Til berigelse af tumorceller fra fuldblod fra coloncancerpatienter og påvisning af coloncancerassocieret genekspression i berigede tumorceller  
Til in vitro-diagnostisk brug  
Version 1



395422 (AdnaTest ColonCancerSelect)  
396422 (AdnaTest ColonCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
TYSKLAND

---

R1 **MAT**

1106497DA

# Indhold

Tilsvaret anvendelse .....	5
Opsummering og forklaring .....	5
Funktionsprincip .....	6
AdnaTest ColonCancerSelect .....	6
AdnaTest ColonCancerDetect .....	6
Leverede materialer.....	8
Kit-indhold .....	8
Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt.....	9
AdnaTest ColonCancerSelect.....	10
AdnaTest ColonCancerDetect .....	10
Advarsler og forholdsregler.....	11
Sikkerhedsinformationer .....	11
Oplysninger om anvendelse .....	12
Patenter.....	12
Opbevaring og håndtering af reagenser .....	12
Opbevaringsforhold .....	12
Behandling .....	13
Håndtering og opbevaring af prøver.....	13
Prøveforberedelse.....	13
Protokol: Berigelse af tumorceller ved hjælp af AdnaTest ColonCancerSelect .....	15
Protokol: Påvisning af coloncancerassocieret genekspression i berigede tumorceller ved anvendelse af AdnaTest ColonCancerDetect .....	18

---

Protokol: Multiplex PCR .....	22
Fortolkning af resultater .....	24
Fragmentanalyse på Agilent 2100 Bioanalyser .....	24
Fejlfindingsvejledning .....	26
Kvalitetskontrol .....	26
Begrænsninger .....	26
Ydelsesegenskaber .....	27
Genvinding .....	27
Specificitet .....	27
Reproducerbarhed .....	28
Præcision .....	28
Interfererende stoffer .....	29
Interfererende forhold .....	30
Kliniske undersøgelser .....	31
Reference .....	31
Forkortelser .....	31
Symboler .....	32
Bestillingsinformation .....	33

---

## Tilsigtet anvendelse

AdnaTest ColonCancerSelect er en in vitro-diagnostisk metode, der er beregnet til immunokemisk berigelse af cirkulerende tumorceller fra antikoagulerede fuldblodsprøver fra coloncancerpatienter via en kombination af epitel- and tumorassocierede antigener.

AdnaTest ColonCancerDetect er en in vitro-diagnostisk analyse, der er beregnet til analyse af ekspressionsprofiler af tumorceller ved revers transkription og multiplex PCR og efterfølgende densitometrisk analyse af PCR-produkter ved automatiseret kapillærelektroforese ved hjælp af Agilent® 2100 Bioanalyser.

AdnaTest ColonCancerSelect/Detect er hverken beregnet til screeningsformål eller til anvendelse som en diagnostisk test til bekræftelse af forekomst af coloncancer.

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, såsom laboratorieteknikere og læger, der er uddannet i molekylærbiologisk teknik.

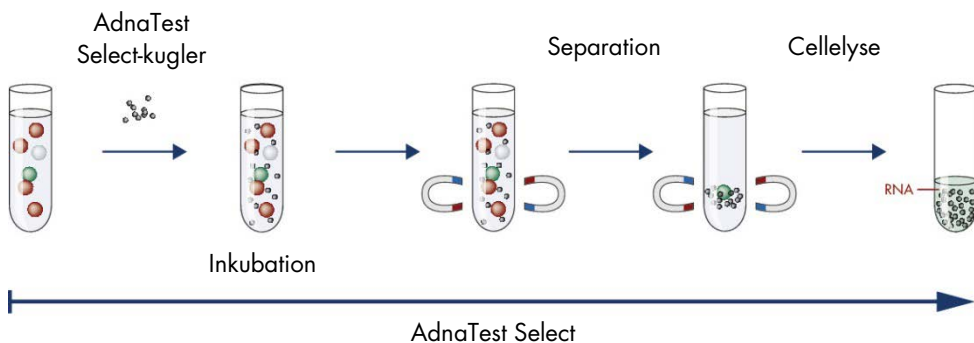
## Opsummering og forklaring

AdnaTest ColonCancerSelect muliggør immunomagnetisk berigelse af tumorceller via epitel- og tumorassocierede antigener. AdnaTest ColonCancerDetect anvendes til analyse af coloncancerassocieret genekspression i immunomagnetiskberigede tumorceller ved revers transkription og PCR.

# Funktionsprincip

## AdnaTest ColonCancerSelect

Antistoffer mod epitel- og tumorassocierede antigener er konjureret til magnetiske kugler til mærkning af tumorceller i fuldblod. Mærkede celler ekstraheres af en magnetisk partikkelkoncentrator (AdnaMag-L og AdnaMag-S) og lyses efterfølgende (figur 1 og 2).



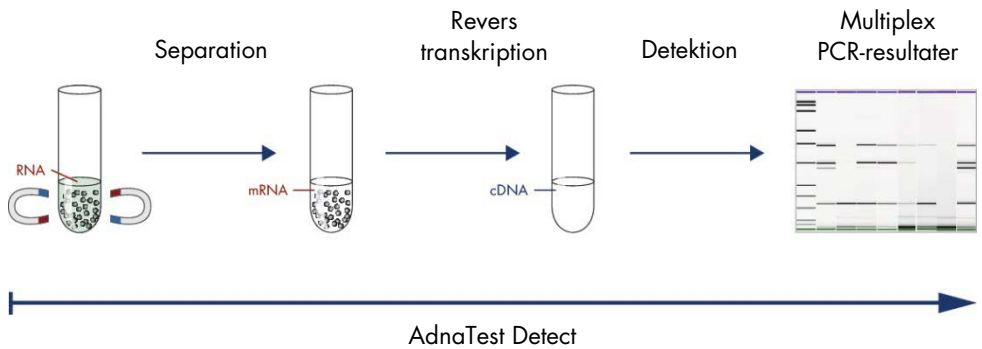
- Blodceller ● Tumorceller
- ⊕ Antistof- eller Oligo (dT)<sub>25</sub>-dækkede magnetiske kugler

**Figur 1. AdnaTest ColonCancerSelect: Immunomagnetisk cellevalg med mange tumorassocierede antistoffer.**

Cellelysatet anvendes til yderligere analyse med AdnaTest ColonCancerDetect.

## AdnaTest ColonCancerDetect

AdnaTest ColonCancerDetect indeholder Oligo (dT)<sub>25</sub>-kugler til isolering af mRNA fra lysatet af præberigede tumorceller. Revers transkription resulterer i cDNA, som efterfølgende anvendes som skabelon for påvisning af tumorceller og karakteristisk via multiplex PCR. AdnaTest PrimerMix ColonDetect muliggør amplifikation af tre tumorassocierede antigener og et kontrolgen.



- Blodceller ● Tumorceller
- ⊗ Antistof- eller Oligo (dT)25-dækkede magnetiske kugler

**Figur 2. AdnaTest ColonCancerDetect: Multiplex PCR af forskellige cancerassocierede tumormarkører.** I et andet trin undersøges de berigede celler af RT-PCR for tumorassocierede ekspressionsmønstre. mRNA-strengene er revers transkriberet i cDNA. Efterfølgende kan adskillige associerede tumormarkører forstærkes ved hjælp af multiplex PCR og visualiseres.

Primerne genererer fragmenter af følgende størrelser:

- GA733-2: 395 bp
- CEA: 231 bp
- EGFR: 163 bp
- Aktin: 120 bp (intern PCR-kontrol)

**Bemærk:** Fragmentstørrelser kan variere lidt. Anvend AdnaTest Positive Control Colon til tildeling af de påviste signaler.

# Leverede materialer

## Kit-indhold

<b>AdnaTest ColonCancerSelect</b>			
<b>Katalognummer</b>		<b>395422</b>	
<b>Antal tests</b>		<b>12</b>	
Collection Tubes (prøvetagningsrør)	Collection Tubes (prøvetagningsrør) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Collection Tubes (prøvetagningsrør)	Collection Tubes (prøvetagningsrør) (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rød	ColonSelect Beads (ColonSelect-kugler)	CSB	1,2 ml
Rød	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (AdnaTest-lyse-/bindingsbuffer)	LBB	2 x 1,2 ml
	Håndbog		1



<b>AdnaTest ColonCancerDetect</b>			
<b>Katalognummer</b>	<b>396422</b>		
<b>Antal tests</b>	<b>12</b>		
<b>AdnaTest RNA-reagenser</b>			
<b>Æske 1</b>			
Rød	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (AdnaTest-lyse-/bindingsbuffer)	LBB	2 ml
Orange	Oligo(dT) <sub>25</sub> -kugler	OdT	280 µl
Hvid	RNA Purification Buffer A (RNA-oprensningbuffer A)	BA	4ml
Hvid	RNA Purification Buffer B (RNA-oprensningbuffer B)	BB	4ml
Lilla	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-buffer)	TB	2 ml
<b>AdnaTest ColonCancerDetect</b>			
<b>Æske 2</b>			
Blå	AdnaTest PrimerMix ColonDetect	PMC	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control Colon (C+)	<b>CONTROL +</b>	56 µl
	Håndbog		1

AdnaTest ColonCancerDetect-reagenser er tilstrækkelige til at analysere 6 PCR-kontroller og 12 blodprøver.

## Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets – SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

## AdnaTest ColonCancerSelect

### Udstyr

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (Rørrotator til 15 ml og 1,5 ml rør) (f.eks. ELMI Ltd., katalognr. IMIX-03)
- Magnetiske partikkelkoncentratorer
  - AdnaMag-L (katalognr. 399921)
  - AdnaMag-S (katalognr. 399911)

### Materiale

- AdnaTube (AdnaTube-rør, katalognr. 399932) ved arbejde med BD Vacutainer® ACD-A-rør
- Sterile, RNase-fri 10 ml glas- eller plastpipetter og pipette
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-fri 1,5 ml reaktionsrør) (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.690)
- Pipetter og RNase-frie pipettespidser med aerosolbarrierer, som passer til pipetteringsvolumener fra 100 µl til 1.000 µl

### Reagenser

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Phosphatbufferet saltvand (PBS), pH 7,0–7,3) (f.eks. Fisher, katalognr. VX14190169, D-PBS)

## AdnaTest ColonCancerDetect

### Udstyr

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (Rørrotator til 1,5 ml rør) (f.eks. ELMI Ltd., katalognr. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (Magnetisk partikkelkoncentrator AdnaMag-S) (katalognr. 399911)

- Termisk blok eller vandbad (50 °C)
- Termocykler med et opvarmet låg og en opvarmningshastighed på 2 °C/sek.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

## Materiale

- Sterile, RNase-fri tyndvæggede 0,2 ml PCR-rør
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-fri 1,5 ml reaktionsrør) (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.690)
- Pipetter og RNase-frie pipettespidser med aerosolbarrierer, som passer til pipetteringsvolumener fra 1 µl til 200 µl

## Reagenser

- Sensiscript® RT-kit (QIAGEN, katalognr. 205211, 50 reaktioner)
  - **Bemærk:** Sensiscript RT-kittet (katalognr. 205211) er kun tilstrækkeligt til 25 prøver, fordi den dobbelte volumen er påkrævet til hver reaktion.
- Rekombinant RNasin, RNase-hæmmer, 2,500 E (Promega, katalognr. N2511)
- HotStarTaq®-masterblandingskit (QIAGEN, katalognr. 203443, 250 U)
- Knust is

# Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk brug

## Sikkerhedsinformationer

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (safety data sheets – SDS'er). Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format

---

på adressen [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og hver kitkomponent.

Kassér prøve- og analyseaffald i henhold til de lokale sikkerhedsbestemmelser.

## Oplysninger om anvendelse

Disse tests skal udføres af personale med erfaring i molekylærbiologiske teknikker.

## Patenter

AdnaTest ColonCancerDetect kræver licenser fra Hoffmann-La Roche AG, Basel. Købet af AdnaTest ColonCancerDetect giver ikke brugeren tilladelse til at udføre PCR uden licens.

# Opbevaring og håndtering af reagenser

## Opbevaringsforhold

AdnaTest ColonCancer System leveres i tre æsker. AdnaTest ColonCancerSelect (katalognr. 395422) og AdnaTest RNA-reagensæske 1 (æske 1 af katalognr. 396422) skal opbevares ved 2-8 °C. Komponenterne må ikke anvendes efter udløbsdatoen.

AdnaTest ColonCancerDetect æske 2 (æske 2 af katalognr. 396422) indeholdende AdnaTest PrimerMix ColonDetect og AdnaTest Positive Control Colon skal opbevares separat ved -30 til -15 °C. Afmål primerblandingen for at forhindre kontamination og gentagne temperaturændringer. Komponenterne må ikke anvendes efter udløbsdatoen.

---

## Behandling

- ColonSelect-kugler indeholder natriumazid som konserveringsmiddel. Natriumazid er cytotoxisk og skal derfor fjernes, før kuglerne anvendes. (Se "Protokol: Berigelse af tumorceller ved hjælp af AdnaTest ColonCancerSelect", side 15.)
- Alle komponenter og yderligere reagenser, der leveres af andre leverandører, skal opbevares i henhold til deres instruktioner. Følg altid den respektive producents sikkerhedsanvisninger.
- Bær beskyttelseshandsker for at undgå kontaminering med DNA, RNA og RNaser.
- Afmål ColonSelect-kuglerne for at undgå kontaminering.
- Testen skal udføres i den angivne sekvens og overholde alle specifikationer, der er anført med hensyn til inkubationstider og inkubationstemperaturer.
- Bortskaf prøverne, hvis valgekuglerne agglutinerer under celleberigelse.
- Udfør prøvebehandling, herunder revers transkription og efterfølgende analyse af forstærkede PCR-produkter i forskellige rum, hvis det er muligt, for at undgå krydskontaminering.
- Brugen af produkter fra andre leverandører end de foreslåede kan påvirke resultaterne negativt.
- Overhold altid laboratoriets sikkerheds- og hygiejnebestemmelser (f.eks. laboratoriekitler, beskyttelsesbriller og handsker).

## Håndtering og opbevaring af prøver

### Prøveforberedelse

- Der skal tages blodprøver før anvendelse af terapeutiske stoffer. Anvend ikke AdnaTest ColonCancerSelect tidligere end 7 dage efter den sidste terapeutiske intervention!

- 
- Blodprøvetagning: Anvend rør med EDTA som antikoagulans (f.eks. S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [katalognr. 01.1605.001]) til at prøvetage mindst 7,5 ml fuldblod, hvis prøvetransporten er under 4 timer.
  - Anvend BD Vacutainer ACD-A-rør (Becton Dickinson GmbH, katalognr. 366645 [EU]; 364606 [US]) til at prøvetage mindst 8,5 ml fuldblod, hvis prøvetransporten er længere end 4 timer. Før yderligere behandling med AdnaTest skal der overføres 5 ml ACD-A blod til et AdnaTube, katalognr. 399932.
  - Blodet skal omgående opbevares ved 4 °C.
  - Prøver skal behandles så hurtigt som muligt, men ikke senere end 4 timer efter blodprøvetagning ved anvendelse af EDTA-standardrør eller indenfor 30 timer ved brug af BD Vacutainer-blodprøvetagningsrør sammen med AdnaTubes.
  - Blodprøven må ikke hæmolyseres.

# Protokol: Berigelse af tumorceller ved hjælp af AdnaTest ColonCancerSelect

## Vigtige anvisninger før start

- Læs "Advarsler og forholdsregler" (side 11), "Opbevaring og håndtering af reagenser" (side 12) og "Håndtering og opbevaring af prøver" (side 13), før proceduren påbegyndes.
- Det er nødvendigt at fjerne natriumazid ved at vaske ColonSelect-kuglerne før brug som beskrevet herunder i "Procedure A: Klargøring af ColonSelect-kuglerne".
- Anvend kun de medfølgende 1,5 ml prøvetagningsrør til det angivne protokoltrin.

## Ting, der skal gøres før start

- Sørg for, at AdnaTest-lyse-/bindingsbufferen er ækvilibreret til stuetemperatur. Hvis der observeres bundfald, ækvilibreres reagentet til stuetemperatur og blandes, til bundfaldet er helt opløst.

## Procedure A: Klargøring af ColonSelect-kuglerne

1. Resuspender ColonSelect-kuglerne grundigt ved at pipettere. Undlad at vortexe!
2. Beregn den mængde ColonSelect-kugler, der er påkrævet til alle prøver, der skal behandles (100 µl pr. prøve), og overfør den beregnede mængde til et 1,5 ml reaktionsrør (medfølger ikke).

Anvend yderligere 1,5 ml reaktionsrør, hvis der behandles mere end 10 prøver.

3. Anbring røret i AdnaMag-S.
4. Efter 1 minut fjernes supernatanten med en pipette.

**Bemærk:** Berør ikke kuglerne, når supernatanten fjernes!

5. Vasketrin:

5a. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-S.

- 5b. Tilsæt 1 ml PBS, og resuspender kuglerne ved gentagen pipettering.
  - 5c. Anbring magnetskyderen i AdnaMag-S.
  - 5d. Efter 1 minut fjernes supernatanten helt med en pipette.
  - 5e. Gentag trin 5a til 5d to gange (tre vaske i alt).
6. Fjern røret fra AdnaMag-S, og resuspender kuglerne i PBS til den oprindelige mængde (100 µl pr. prøve). Fortsæt med "Procedure B: Valg af tumorceller", nedenfor.

### Procedure B: Valg af tumorceller

1. Pipetter 5 ml af en blodprøve ned i et 15 ml prøvetagningsrør ved anvendelse af EDTA-standardrør (medfølger).  
Overfør 5 ml blod ned i et AdnaTube ved anvendelse af ACD-A-blod i et BD Vacutainer ACD-A-rør.  
**Bemærk:** AdnaTubes er obligatoriske ved anvendelse af BD Vacutainer ACD-A-rør.
2. Resuspender ColonSelect-kuglerne grundigt (forberedt i trin 6, procedure A) ved at pipettere og tilsætte 100 µl af disse kugler i hver blodprøve.
3. Roter rørene langsomt (ca. 5 rpm) i 30 minutter ved stuetemperatur på en enhed, der muliggør både hældning og rotation.
4. Anbring rørene i AdnaMag-L uden magnetskyderen. Sving AdnaMag-L nedad for at frigøre bloddråber, der er fanget i hættten.
5. Indsæt magnetskyderen, og inkuber rørene i AdnaMag-L i 3 minutter ved stuetemperatur.
6. Fjern blodsupernatanten helt med en 10 ml pipette uden at røre kuglerne.  
**Bemærk:** Berør ikke kuglerne, når supernatanten fjernes!
7. Vasketrin:
  - 7a. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-L.
  - 7b. Tilsæt 5 ml PBS. Luk rørene, og ryst AdnaMag-L forsigtigt frem og tilbage 5 gange for at resuspendere de magnetiske kugle-/cellekomplekser.
  - 7c. Sving AdnaMag-L med rørene nedad to gange for at frigøre dråber, som sidder fast i hættten.
  - 7d. Placer magnetskyderen i AdnaMag-L, og inkuber i 1 minut ved stuetemperatur.



- 
- 7e. Fjern supernatanten helt med en pipette.
- 7f. Gentag trin 7a til 7e to gange (tre vaske i alt).
8. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-L.
9. Resuspender de magnetiske kugle-/cellekomplekser i 1 ml PBS, og overfør hver prøve til et 1,5 ml reaktionsrør (medfølger ikke).
10. Placer reaktionsrørene i AdnaMag-S med en indsat magnetskyder.
- Bemærk:** Magnetskyderen til AdnaMag-S kan indsættes i to positioner. Indsæt altid skyderen med hvide plastikfilm fremadvendt for at sikre, at magneterne er tæt på reaktionsrørene.
11. Efter 1 minut fjernes supernatanten helt med en pipette for at optimere følgende cellelyse.
12. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-S.
13. Tilsæt 200 µl lyse-/bindingsbuffer (ækvilibreret til stuetemperatur) til hvert reaktionsrør. Resuspender ved at pipettere mindst fem gange.
14. Indsæt magnetskyderen i AdnaMag-S, og inkuber i 1 minut.
15. Overfør hver supernatant (cellelysat) til et nyt 1,5 ml reaktionsrør.
16. Bortskaf rørene med kuglerne.
17. Fortsæt omgående med mRNA-isolation (se "Protokol: Påvisning af coloncancerassocieret genekspression i berigede tumorceller ved anvendelse af AdnaTest ColonCancerDetect", side 18), eller opbevar cellelysaterne ved -20 °C i højst 2 uger.

# Protokol: Påvisning af coloncancerassocieret genekspression i berigede tumorceller ved anvendelse af AdnaTest ColonCancerDetect

## Vigtige anvisninger før start

- Læs "Advarsler og forholdsregler" (side 11) og "Opbevaring og håndtering af reagenser" (side 12), før proceduren påbegyndes.
- Procedurene A til C beskriver isolationen af mRNA og revers transkription.
- Anvend kun de medfølgende 1,5 ml prøvetagningsrør til det angivne protokoltrin.

## Ting, der skal gøres før start

- Sørg for, at AdnaTest-lyse-/bindingsbufferen er ækvilibreret til stuetemperatur. Hvis der observeres bundfald, ækvilibreres reagentet til stuetemperatur og blandes, til bundfaldet er helt opløst.
- Ækvilibrer RNA-oprensingsbuffer A og RNA-oprensingsbuffer B til stuetemperatur. Anbring Tris-HCL-buffer på is.
- Optø 10x Buffer RT og dNTPs fra Sensiscript RT-kittet ved stuetemperatur. Bland ved at vortexe. Centrifuger kortvarigt, og opbevar på is. Optø RNase-frit vand (del af Sensiscript RT-kittet).
- Juster en termisk blok eller et vandbad til 50 °C.

## Procedure A: Klargøring af Oligo(dT)<sub>25</sub>-kugler

1. Resuspender Oligo(dT)<sub>25</sub>-kuglerne grundigt ved at pipettere. Undlad at vortexe!
2. Beregn den mængde kugler, der er påkrævet til alle prøver, der skal behandles (20 µl pr. prøve plus 10 %), og overfør den beregnede mængde til et RNase-frit 1,5 ml reaktionsrør (medfølger ikke).

3. Anbring røret i AdnaMag-S.

**Bemærk:** Magnetskyderen til AdnaMag-S kan indsættes i to positioner. Indsæt altid skyderen med hvide plastikfilm fremadvendt for at sikre, at magneterne er tæt på reaktionsrørene.

4. Efter 1 minut fjernes supernatanten med en pipette.

5. Vasketrin:

5a. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-S.

5b. Tilsæt den oprindelige mængde (trin 2, side 18) AdnaTest-lyse-/bindingsbuffer, og resuspender kuglerne ved gentagen pipettering. Resuspender forsigtigt for at undgå skumdannelse.

5c. Indsæt magnetskyderen i AdnaMag-S.

5d. Efter 1 minut fjernes supernatanten helt.

5e. Gentag trin 5a til 5d en gang (to vaske i alt).

6. Fjern røret fra AdnaMag-S, og resuspender kuglerne i AdnaTest-lyse-/bindingsbuffer til den oprindelige mængde (trin 2, side 18). Fortsæt med "Procedure B: mRNA-isolation".

### Procedure B: mRNA-isolation

1. Tilsæt 20 µl Oligo(dT)<sub>25</sub>-kugler (trin 6 ovenfor ovenfor) til hvert rør med cellelysats (trin 15, side 17).

2. Roter rørene langsomt (ca. 5 rpm) i 10 minutter ved stuetemperatur på en enhed, der muliggør både hældning og rotation.

3. Anbring rørene i AdnaMag-S uden magnetskyderen. Sving AdnaMag-S nedad for at frigøre kugler og væske, der er fanget i hættten.

4. Indsæt magnetskyderen, og fjern supernatanten efter 1 minut.

5. Vasketrin 1:

5a. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-S.

5b. Tilsæt 100 µl RNA-oprensningsbuffer A til hvert rør, og resuspender kuglerne ved gentagen pipettering. Skyl låget og glasvæggen grundigt for at undgå tab af kugler.

5c. Indsæt magnetskyderen i AdnaMag-S.

- 5d. Efter 1 minut fjernes supernatanten helt.
- 5e. Gentag trin 5a til 5d en gang (to vaske i alt).
6. Vasketrin 2
- 6a. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-S.
- 6b. Tilsæt 100 µl RNA-oprensningsbuffer B til hvert rør. Resuspender kuglerne ved pipettering, og overfør dem til nye 1,5 ml reaktionsrør (medfølger).
- 6c. Indsæt magnetskyderen i AdnaMag-S.
- 6d. Efter 1 minut fjernes supernatanten helt. Dette trin skal udføres forsigtigt (hold øje med pelleten), da kuglerne kan rulle og blive fjernet ved et uheld.
- 6e. Gentag trin 6a til 6d en gang i de samme reaktionsrør (to vaske i alt).
7. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-S.
8. Tilsæt 100 µl iskold Tris-HCL-buffer til hvert rør, og resuspender kuglerne ved pipettering.
9. Indsæt magnetskyderen i AdnaMag-S.
10. Efter 1 minut fjernes supernatanten helt.
11. Fjern magnetskyderen fra AdnaMag-S.
12. Resuspender mRNA-/kuglekomplekset i 29,5 µl RNase-frit vand.
13. Overfør rørene til en termisk blok eller et vandbad, og inkuber i 5 minutter ved 50 °C.
14. Anbring med det samme rørene på is i mindst 2 minutter.
15. Fortsæt omgående (inden for 5 minutter) med revers transkription (Procedure C: Revers transkription ved hjælp af Sensiscript RT-kittet.).
- Opbevar ikke mRNA-/kuglekomplekset!

#### Procedure C: Revers transkription ved hjælp af Sensiscript RT-kittet.

1. Klargør RT Master Mix på is. RT Master Mix klargøres som vist i tabel 1 i overensstemmelse med antallet af prøver.
- Mængden af RT-masterblandingen skal være 10 % større end beregnet for det samlede antal revers-transkriptionsreaktioner. Der skal altid klargøres en negativ kontrolreaktion uden tilsætning af mRNA (RT-kontrol).

2. Vortex RT Master Mix. Centrifuger kortvarigt, og pipetter 10,5 µl for hver reaktion ned i 0,2 ml PCR-rør.
3. Resuspender forsigtigt mRNA-/kuglekomplekserne (trin 10, side 20) med en pipette. Overfør den samlede mængde til 0,2 ml PCR-reaktionsrøret med RT Master Mix. Bland grundigt ved gentagen pipettering.

**Tabel 1. Opsætning af revers-transkriptionsreaktion**

Komponent	Volumen
<b>RT-masterblanding</b>	
10× Buffer RT	4,0 µl
dNTP-blanding (5 mM hver dNTP)	4,0 µl
RNase-hæmmer, 40 E/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript revers transkriptase	2,0 µl
<b>Skabelon RNA*</b>	29,5 µl
mRNA-/kuglekompleks eller RNase-frit vand	
<b>Samlet mængde</b>	<b>40,0 µl</b>

\* Som RT-kontrol tilsættes 29,5 µl RNase-frit vand i stedet for mRNA-/kuglekompleks. Mængden af mRNA-/kuglekompleks kan variere lidt. Anvend altid den samlede mængde heraf ved revers-transkriptionsreaktionen.

4. cDNA syntetiseres i en termocykler under følgende forhold (tabel 2).

**Tabel 2. Program for revers transkription**

Trin	Tid	Temperatur
Revers transkription	60 minutter	37 °C
Denaturering	5 minutter	93 °C
Afkøling	∞	4 °C

5. Anbring reaktionsrørene sammen med cDNA på is, eller opbevar dem ved -20 °C i maksimalt 4 uger.
6. Fortsæt med "Protokol: Multiplex PCR", side 22.

---

# Protokol: Multiplex PCR

## Vigtigt punkt før start

- Læs "Advarsler og forholdsregler" (side 11) og "Opbevaring og håndtering af reagenser" (side 12), før proceduren påbegyndes.

## Ting, der skal gøres før start

- Optø HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest Positive Control Colon, AdnaTest PrimerMix ColonDetect og RNase-frit vand. Vortex, centrifuger hurtigt, og opbevar på is.

## Procedure

1. PCR Master Mix klargøres som vist i tabel 3 i overensstemmelse med antallet af prøver. Mængden af PCR Master Mix bør være mindst 10 % større end det udregnede krav på baggrund af prøveantallet. Bemærk, at der altid skal være inkluderet en AdnaTest Positive Control Colon, RNase-frit vand som negativ kontrol, samt at RT-kontrollen altid skal inkluderes.
2. For hver klargøring dispenseres 42,0 µl PCR Master Mix i 0,2 ml PCR-reaktionsrør. Resuspender cDNA-/kugleblandingens ved pipettering, og tilsæt 8,0 µl af denne til hvert reaktionsrør.

**Bemærk:** Som negativ kontrol tilsættes 8,0 µl RNase-frit vand i stedet for cDNA.

**Tabel 3. Klargøring af multiplex PCR**

Komponent	Volumen
<b>Multiplex PCR-masterblanding</b>	
HotStarTaq-masterblanding	25,0 µl
RNase-frit vand	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ColonDetect	4,0 µl
cDNA eller RT-kontrol eller Negativ kontrol (RNase-frit vand) eller AdnaTest Positive Control Colon, hver:	8,0 µl
<b>Samlet mængde</b>	<b>50,0 µl</b>

3. Der anvendes en termocykler til PCR ifølge programmet, der er beskrevet i tabel 4.

Kør termocycleren med en ramp på 2 °C/sekund. PCR'en udføres med i alt 38 cyklusser.

**Tabel 4. PCR-cyklusprogram**

Trin	Tid	Temperatur
<b>Første aktiveringstrin</b>	15 minutter	95 °C
<b>3-trinscyklus</b>		
Denaturering	45 sekunder	94 °C
Afhærdning	45 sekunder	58 °C
Udvidelse	45 sekunder	72 °C
<b>Endelig udvidelse</b>	10 minutter	72 °C
<b>Afkøling</b>	∞	4 °C

# Fortolkning af resultater

## Fragmentanalyse på Agilent 2100 Bioanalyzer

Der udføres analyse med Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) på en DNA 1000 LabChip®. Følg instruktionerne i DNA 1000 LabChip-brugervejledningen, og sørg for, at ingen kugler overføres i LabChip. Magnetiske kugler i gelen kan forårsage forkerte resultater.

1. Start Bioanalyzer-softwaren "2100 expert". Vælg **Instrument** under **Contexts** (kontekster), og klik derefter på knappen **Assay** (analyse) ud for **Assay Selection** (valg af analyse)
2. Vælg **Electrophoresis (elektroforese) > DNA 1000 Series II.xsy**. Forbered chippen, og start kørslen.
3. Indstil en tærskel for påvisning til evaluering af resultaterne.
  - 3a. Vælg **Data** under **Contexts**, og klik derefter på fanen **Assay Properties** (analyseegenskaber). Vælg **Global** og **Normal** på rullemenuen til højre.
  - 3b. Vælg **Sample Setpoints (indstillingspunkter for prøve) > Integrator > height threshold (FU) (højdetærskel (FU))**, og indstil denne værdi til **0** (standardværdien er **20**) for at påvise alle signaler.

## Analyse af resultaterne

Testen anses for at være positiv, hvis et PCR-fragment på mindst ét tumorassocieret transkript klart kan påvises.

Ved anvendelse af Agilent 2100 Bioanalyzer er spidser med en koncentration på  $\geq 0,10$  ng/ $\mu$ l positive (figur 3).

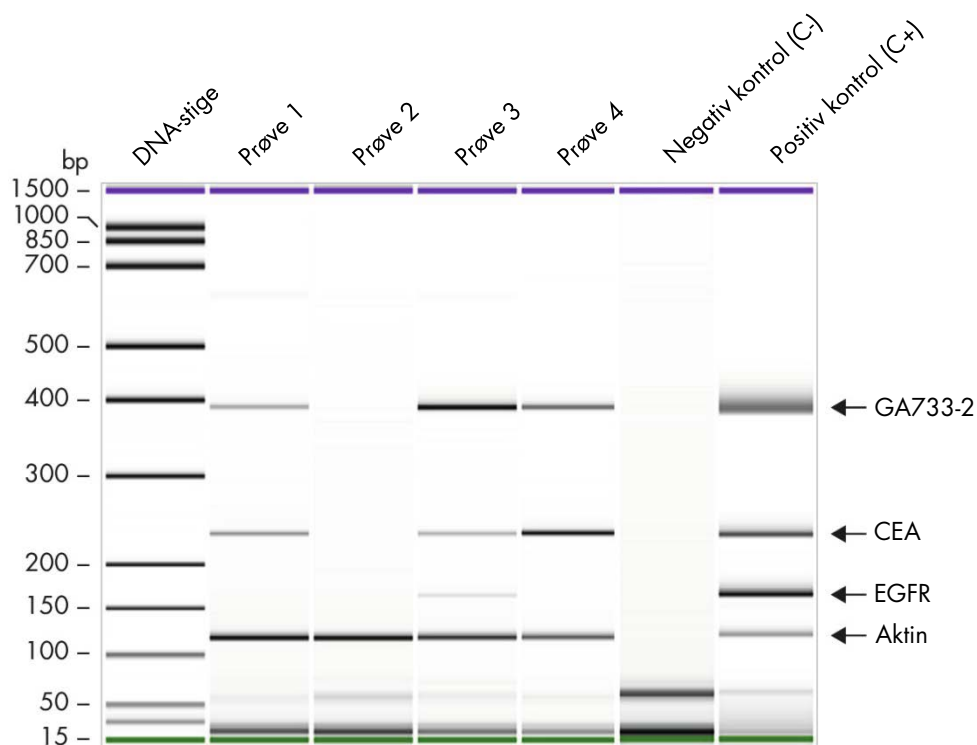
Fragmentet af kontrolgenet aktin skal kunne påvises i alle prøver (intern PCR-kontrol). Et aktin-signal giver en positiv kontrol til en vellykket celleseparation, revers transkriptase og multiplex PCR. Negative kontrol- og RT-kontrolprøver må ikke vise bånd, som er større end 80 basepar (primer-dimere).



Et fragment større end 900 bp indikerer kontamination med genomisk DNA, hvilket antyder, at der opstod problemer under celleseparationen. I så fald er resultaterne ugyldige.

**VIGTIGT: Hvis protokollen ikke følges nøje, kan dette resultere i falske negative eller falske positive resultater.**

Kontakt vores supportafdeling, hvis der er behov for hjælp til fortolkning af resultaterne.



**Figur 3. AdnaTest ColonCancerDetect-resultater af prøver, der er analyseret med en Agilent 2100 Bioanalyser.**

Den første bane viser standarden for DNA'ens størrelse (DNA-stige). Prøve 1 og 4 er positive for GA733-2 og CEA. Prøve 2 er negativ. Prøve 3 er positiv for GA733-2, CEA og EGFR. Aktin påvises i prøve 1 til 4. PCR-negativ kontrol (C-) og -positiv kontrol (C+) vises i de sidste to baner.

---

## Fejlfindingsvejledning

Se også siden Frequently Asked Questions (ofte stillede spørgsmål) hos vores tekniske supportcenter: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Derudover svarer personalet fra QIAGENs tekniske service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og/eller protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: Besøg [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af AdnaTest ColonCancerSelect og AdnaTest ColonCancerDetect efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

## Begrænsninger

Alle reagenser kan kun anvendes til in vitro-diagnostik.

Produktet må kun anvendes af personale, som er specielt instrueret og uddannet i in vitro-diagnostiske procedurer.

Det er vigtigt, at operatøren læser brugervejledningen grundigt, inden systemet tages i brug.

Det er nødvendigt nøje at følge brugervejledningen for at opnå optimale PCR-resultater.

Kontroller udløbsdatoerne, der er trykt på æsken og etiketterne til alle komponenter. Anvend ikke komponenterne efter udløbsdatoen.

De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund.

## Ydelsesegenskaber

### Genvinding

Der blev tilsat to og ti dyrkede T84-coloncancerceller til blodprøver fra raske donorer til bestemmelse af genindvindingsrater opnået med AdnaTest ColonCancerSelect/Detect (tabel 5).

**Tabel 5. AdnaTest ColonCancer-genindvindingsraten for tumorceller tilsat i blodprøver fra raske donorer**

	Samlet antal prøver	Antal positive	Genvinding
To tumorceller, som blev tilsat i 5 ml blod	63	48	76 %
Ti tumorceller, som blev tilsat i 5 ml blod	41	41	100 %

Genindvindingsraten er 76 % for påvisning af 2 tumorceller, som blev tilsat i 5 ml blod fra raske donorer. Påvisningen af 10 celler, som er tilsat i 5 ml blod fra raske donorer, er 100 %.

### Specificitet

AdnaTest ColonCancerSelect/Detect blev anvendt til at analysere 106 raske donorer til bestemmelse af raten af falske positiver ved den givne cut-off (0,15 ng/ $\mu$ l fragmentkoncentration for hver inkluderet genprofil, undtagen for aktin).

**Tabel 6. Bestemmelse af specifikationen**

Kontroller	Samlet antal prøver	Antal falske positiver	Specificitet (%)
Raske donorer	106	2 (2 %)	98

AdnaTest ColonCancerSelect/Detect udviste en specificitet på 98 % (tabel 6).

## Reproducerbarhed

Tyve blodprøver fra raske donorer fik tilsat 10 T84-coloncancerceller pr. prøve. Blodprøverne blev analyseret af to operatører med AdnaTest ColonCancerSelect/Detect for at bestemme reproducerbarheden. Inden for samme analyse og mellem analyserne var reproducerbarheden på 100 % (tabel 7).

**Tabel 7. Reproducerbarhed af AdnaTest ColonCancer Select/Detect**

<b>Operatør</b>	<b>Positive AdnaTest-resultater/prøver</b>	<b>Reproducerbarhed inden for samme analyse (%)</b>	<b>Reproducerbarhed mellem analyser (%)</b>
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

## Præcision

For at bestemme præcisionen blev alikvoter af cDNA poolen og analyseret med AdnaTest ColonCancerDetect. To operatører analyserede 30 cDNA prøver, bestående af 3 selvstændige målinger af 10 prøver. Inden for samme analyse og mellem analyserne var præcisionen på 100 % (tabel 8).

**Tabel 8. Præcision af AdnaTest ColonCancerDetect**

<b>Operatør</b>	<b>Positive AdnaTest-resultater/prøver</b>	<b>Præcision inden for samme analyse (%)</b>	<b>Præcision mellem analyser (%)</b>
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

---

## Interfererende stoffer

### Antikoagulanter

Anvendelse af antikoagulanter er obligatorisk ved blodprøvetagning og transport af blod. Heparin og citrat fører imidlertid til aggregatdannelse efter tilsætning af AdnaTest immunomagnetiske kugler, som kan resultere i manglende eller falske testresultater. EDTA og ACDA (citrat-/dextrose-/adeninopløsningA) er kompatible med AdnaTest immunomagnetiske kugler.

### Hæmolyse

Hæmolyse i blodprøver (plasmafraktion forekommer rød) skyldes i de fleste tilfælde forkerte transport- eller opbevaringsforhold. Sådanne prøver kan give falsk negative resultater og skal bortskaffes.

### Kemoterapeutika, målrettet behandlingsmedicin og antihormonelle regimener

Kemoterapeutika (taxaner, cisplatin, oxaliplatin, 5-FU, antracyclin, irinotecan osv.) er potente cytotoxiner og kan forårsage skader eller hurtig celledød i en blodprøve. Dette resulterer i en høj sandsynlighed for falsk negative resultater ved anvendelse af AdnaTest immunomagnetiske kugler. Efter administration af disse stoffer har menneskekroppen brug for ca. 5-7 dage til afgiftning (tabel 9). Blodprøver, der er taget i dette tidsrum, må ikke anvendes med AdnaTest immunomagnetiske kugler.

**Table 9. Halveringstider for kemoterapeutika**

Lægemiddel	Halveringstid	Reference
5-Fluoracil	Op til 20 minutter	<a href="http://www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html">www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html</a>
Docetaxel	Op til 11,1 time	<a href="http://www.drugs.com/pro/docetaxel.html">www.drugs.com/pro/docetaxel.html</a>
Cis-platinum	Op til 30 minutter	<a href="http://www.drugs.com/pro/cisplatin.html">www.drugs.com/pro/cisplatin.html</a>
Carboplatin	Op til 5,9 time	<a href="http://www.drugs.com/pro/carboplatin.html">www.drugs.com/pro/carboplatin.html</a>
Paclitaxel	Ca. 25,4 timer	<a href="http://www.drugs.com/pro/paclitaxel.html">www.drugs.com/pro/paclitaxel.html</a>

Den samme forholdsregel anbefales også for målrettede terapiregimener som f.eks. antistoffer (Herceptin®, bevacizumab, cetuximab osv.), tyrosinkinaseblokkere (olaparib, Iressa®, Erbitux®, lapatinib osv.) og antihormonelle lægemidler (tamoxifen, abirateron, enzalutamid osv.) administreret som et enkelt lægemiddel eller i kombination med kemoterapeutika.

I kliniske forsøg, der påviste den prognostiske værdi af cirkulerende tumorceller (CTC) identificeret og karakteriseret med AdnaTest immunomagnetiske kugler, blev der ikke observeret negativ interferens af kemoterapeutika. målrettede terapier eller antihormonelle terapier, forudsat at ventetiden på mindst 7 dage efter administration af lægemidlet blev overholdt. Ydermere er en negativ påvirkning fra almindelige samtidige medicinske behandlinger (aspirin, ibuprofen, aprepitant, steroider osv.) usandsynlig, men monitoreres.

## Interfererende forhold

### Blodkoagulation

I konteksten af kliniske forsøg observerede vi blodkoagulation efter inkubation med AdnaTest immunomagnetiske kugler – hyppigst i blodprøver fra patienter i et sent sygdomsstadie. Blodprøver, der udviser koagulation, er vanskelige at behandle under AdnaTest-arbejdsgangen på grund af forøget viskositet, og de er vanskelige at pipettere. De indeholder også et uacceptabelt højt antal kontaminerende leukocytter, som fører til falske positive resultater. Sådanne blodprøver skal bortskaffes.

## Godartet organisk sygdom og kroniske inflammatoriske tilstande

Godartet organisk sygdom og kronisk inflammation, som f.eks. arthritis, godartet prostatisk hyperplasi (BPH), Crohns sygdom osv., fører ikke til falske positive AdnaTest-resultater.

## Akut allergi

I forbindelse med akutte allergiske tilstande er der et øget antal kontaminerende leukocytter efter CTC-berigelse med AdnaTest immunomagnetiske kugler. Derfor kan falske positive resultater ikke helt udelukkes.

## Kliniske undersøgelser

Blodprøverne blev indsamlet fra 18 patienter og analyseret med metastatisk coloncancer før terapi samt i terapiens tidlige stadier for at muliggøre sammenligning af de kliniske CT-data (taget 3 måneder efter terapistart) med AdnaTest-resultaterne. Den overordnede CTC-positivitet før behandling var på 67 % (12/18). Ud af disse 12 patienter responderede 4 ikke på terapien, 2 stabiliseredes, og 6 responderede (delvis remission). CTC fandtes hos 75 % af ikke-responderterne men forsvandt under den tidlige fase af behandlingen hos 100 % i gruppen af respondenter. Disse resultater indikerer, at CTC-analysen i metastatisk coloncancer er en tidlig indikator for respons på terapien. (Lankiewicz et al. 2008).

## Reference

Lankiewicz, S., Zimmermann, S., Hollmann, C., Hillemann, T., and Greten, T.F. (2008): Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **2**, 349–55.

## Forkortelser

AdnaMag-L

Magnetisk partikelkoncentrator (-stor)

AdnaMag-S	Magnetisk partikelkoncentrator (-lille)
bp	Basepar
C+	Positiv kontrol
C-	Negativ kontrol
cDNA	Komplementær deoxyribonukleinsyre
CEA	Carcinoembryonic antigen
DNA	Deoxyribonukleinsyre
dNTPs	Deoxynukleotidtriphosphater
EGFR	Epidermal vækstfaktorreceptor
GA733-2	Gastrointestinal tumorassocieret antigen 733-2
kb	kilobaser
mRNA	Messenger-ribonukleinsyre
PCR	Polymerasekædereaktion (Polymerase chain reaction)
RNase	Ribonuklease
rpm	Omdrejninger pr. minut
RT	Revers transkription

## Symboler



<N>

Indeholder tilstrækkelige reagenser til <N> test



Anvendes inden



Temperaturbegrænsning



Katalognummer



Se de informationer, der er angivet i håndbogen



Producent



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Materialenummer



Globalt handelsvarenummer



# Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
AdnaTest ColonCancerSelect	Til isolation af CTC'er og efterfølgende ekstraktion af mRNA fra humant fuldblod for 12 præparater	395422
AdnaTest ColonCancerDetect	RT-PCR-kit til påvisning af coloncancerassocieret genekspression i berigede tumorceller	396422
<b>Relaterede produkter</b>		
AdnaTube	12 prøverør med EDTA. Må kun anvendes med antikoaguleret blod, der er indsamlet i A-CDA-blodprøvetagningsrør fra BD	399932
AdnaMag-L	Til 8 rør, 15 ml	399921
AdnaMag-S	Til 8 rør, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT-kit (50)	Til 50 revers-transkriptionsreaktioner:* Sensiscript revers transkriptase, 150 µl 10x buffer RT, 100 µl dNTP-blanding (indeholder 5 mM hvert dNTP), 1,1 ml RNase-frit vand	205211
HotStarTaq-masterblandingskit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq-masterblanding (indeholder 250 enheder HotStarTaq DNA-polymerase, PCR-buffer med 3 mM MgCl <sub>2</sub> og 400 µM af hvert dNTP) og 2 x 1,7 ml RNase-frit vand	203443

\* Sensiscript RT-kittet (50) er kun tilstrækkeligt til 25 prøver ved anvendelse af AdnaTest ColonCancerDetect, fordi den dobbelte volumen er påkrævet til hver reaktion.

Opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser kan findes i den aktuelle håndbog eller brugervejledning til QIAGEN-kittet. QIAGEN kit-håndbøger og brugervejledninger kan findes på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) eller kan rekvireres fra QIAGENS tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

#### **Begrænset licensaftale for AdnaTest ColonCancerSelect og AdnaTest ColonCancerDetect**

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i kittet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette kit med komponenter, der ikke er inkluderet i dette kit, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette kit, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette kit og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, gendannes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af kittet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og retsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med kittet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes i [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscript® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., et helejet datterselskab under Eli Lilly and Company); Herceptin® (Genentech, Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG and Co.); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2343-001 © 2017 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

---

Denne side er med vilje tom

---

Bestilling [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Teknisk support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Websted [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)