

Prostatype® RT-qPCR Kit

Bruksanvisningen måste läsas noga innan användning och följas i detalj för att tillförlitliga resultat ska erhållas.



IFU 0018, revidering 7, januari 2021, Prostatype Genomics AB
(www.prostatypegenomics.com/technical-documents)



CM-01-001



Prostatype Genomics AB
Industrivägen 19
17148 Solna
Sverige

Innehåll	
1.	Namn och avsedd användning 3
2.	Sammanfattning och förklaring 3
3.	Testprinciper 3
4.	Material som medföljer 5
4.1.	Innehåll 5
4.2.	Säkerhetsinformation 5
5.	Förvaring och stabilitet 5
6.	Material som behövs men inte medföljer 6
6.1.	Allmän laboratorieutrustning 6
6.2.	Förbrukningsartiklar och reagenser för allmänt laboratoriebruk 6
6.3.	Särskild utrustning och förbrukningsartiklar som behövs 6
6.4.	Installationskrav 7
7.	Försiktighetsåtgärder och säkerhet 7
7.1.	Försiktighetsåtgärder i laboratoriet 7
7.2.	Mikrobiologiska och infektiösa egenskaper 7
8.	Testprocedur 7
8.1.	Konfiguration av LightCycler® 480 Instrument 8
8.2.	Prostate® RT-qPCR-konfiguration 11
8.3.	Analysinställningar på LightCycler® 480 Instrument 15
8.4.	Validitet för Prostate® RT-qPCR-körningar 18
8.5.	Validitet för individuella brunnar med patientprover 19
9.	Dataanalys för patientprover 19
10.	Kvalitetskontroll 20
10.1.	Externa kontroller 20
10.2.	Internkontroller 20
11.	Begränsningar för proceduren 20
12.	Testegenskaper 20
12.1.	RNA-input 20
12.2.	Linjäritet/precision/kvantifieringsgräns 20
12.3.	Detektionsgräns 21
12.4.	Relativ sensitivitet 21
12.5.	LoB (blankgräns) 22
12.6.	Reproducerbarhet 22
12.7.	Interferens 22
13.	Symbolförklaringar 23
14.	Referenser 24
15.	Kontaktinformation 24

1. Namn och avsedd användning

Prostatype® RT-qPCR Kit är ett test baserat på kvantitativ enstegs-PCR med omvänd transkription (RT-qPCR) som är avsett för bedömning av mRNA-uttrycksnivåerna hos de tre generna IGFBP3, F3 och VGLL3 relaterat till uttrycksnivån hos genen GAPDH i total-RNA extraherat från formalinfixerad och paraffininbäddad (FFPE) human prostatavävnad (tagen med nålbiopsi) som innehåller cancerceller.

Resultatet från Prostatype® RT-qPCR Kit kan användas av sjukvårdspersonal tillsammans med andra parametrar som används vid prognos för prostatacancer samt för att bedöma aggressiviteten av prostatacancer.

2. Sammanfattning och förklaring

Prostatype RT-qPCR Kit är ett 4-plex enstegs-RT-qPCR-kit som är specialutformat för mätning av uttrycksnivåerna hos de tre humana biomarkörgenerna IGFBP3 (insulinliknande tillväxtfaktorbindande protein 3), F3 (koaguleringsfaktor III (tromboplastin, vävnadsfaktor)) och VGLL3 (rudimentärlik 3), normaliserade till uttrycksnivån för genen GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfat-dehydrogenas) i RNA som extraherats från formalinfixerade och paraffininbäddade (FFPE) vävnadsprover från human prostatacancer. Genuttryckssignaturen för IGFBP3, F3 och VGLL3 har visats kunna bedöma överlevnad för patienter med prostatacancer vid tidpunkten för diagnosen [1]. Den identifierades och utvärderades i en svensk kohort med 189 patienter med prostatacancer som diagnostiserades mellan 1986 och 2001. Uppföljningsdata om överlevnad för patienterna var i princip fullständiga. Genuttryckssignaturen visade sig vara tillräcklig för att kunna kategorisera patienterna i subtyperna högrisk, intermediär risk och lågrisk [1]. Genuttryckssignaturen undersöktes ytterligare och en avsevärd förbättring av prediktion för överlevnad vid prostatacancer kunde verifieras vid komplettering med kliniska data som erhållits med hjälp av formalinfixerade och paraffininbäddade (FFPE) prostatavävnadsprover (tagna med nålbiopsi) i en ny kohort med svenska deltagare [2].

Prostatype RT-qPCR Kit utvärderar uttrycksnivåerna för tre biomarkörger i vävnadsprover från prostatacancer. En tämligen hög procentandel cancerepitelceller rekommenderas, och för att uppnå optimala resultat rekommenderar vi att mer än 50% av vävnaden utgörs av cancerepitelceller [2]. De cancerösa prostataepitelcellerna rapporteras bidra till de prognostiska värdena för de tre biomarkörgenerna oberoende av sina patologiska Gleason-mönster. Detta indikerar att gensignaturen kan återspegla underliggande patogena mekanismer hos prostatacancer. [2] Den här upptäckten ger ytterligare stöd för hypotesen om en underliggande "stemness" vid initiering och progression av prostatacancer [1,2]. En patolog ska bedöma vilken mängd vävnad som behövs för att få en tillräckligt stark signal, och en detaljerad beskrivning av procedureerna för provtagning finns i bruksanvisningen för produkten Prostatype Test System.

För att generera en prognos mäter Prostatype RT-qPCR Kit uttrycksnivåerna för de tre biomarkörgenerna och använder dem tillsammans med aktuella kliniska parametrar och med programmet CPMA (Classification of Prostatic Malignancy Algorithm). Genom att använda information om överlevnadstid och utförda behandlingar som hämtas från en omfattande anonymiserad patientdatabas med referensfall är det möjligt för sjukvårdspersonalen att ge prognoser för sjukdomen med bättre noggrannhet än tidigare. Dessutom kan P-Score bedöma sannolikheten för att ha drabbats av aggressiv prostatacancer individuellt för varje enskild patient, baserat på hans kliniska och genetiska profil.

3. Testprinciper

Prostatype® RT-qPCR är utformat som ett enstegs-RT-qPCR-kit. I kitet ingår alla reagenser som behövs för att utföra omvänd transkription (RT), amplifiering och detektion av mRNA med kvantitativ realtids-polymeraskedjereaktion (PCR) i en 4-plex-reaktionsmix. Varje analys genomförs som en reaktion i triplikat. Reagenserna är färdiga för användning och det behövs inga ytterligare reagenser för att utföra RT-qPCR-reaktionen.

mRNA:t som extraheras från FFPE-vävnad genomgår omvänd transkription in vitro till cDNA med hjälp av primers som är sekvensspecifika för de tre målgenerna IGFBP3, F3 och VGLL3 samt för referensgenen GAPDH. Det cDNA som genereras från de fyra generna amplificeras därefter och detekteras med samma sekvensspecifika primers. Individuella dubbelmärkta hydrolysprober (TaqMan®) används för den genspecifika detektionen av ampliferingen. De fyra hydrolysproberna märks med individuella fluorescerande färger vilket möjliggör oberoende detektion och kvantifiering av de fyra generna i en enskild reaktionsbrunn. Varje prob som binder till ett cDNA-mål hydrolyseras under ampliferingen av målet. Det leder till olika fluorescenssignaler för specifika våglängder som detekteras av LightCycler® 480 Instrument i dedikerade optiska kanaler.

I varje PCR-cykel förstärks fluorescenssignalerna och mäts i realtid. Den cykel där en individuell fluorescensnivå korsar en definierad tröskel kallas för korsningspunkt (Cp). Cp-värdet beror på den initiala koncentrationen för det mål som finns i provet: Ju mer mål-RNA som förekommer i det testade mRNA-provet, desto lägre blir Cp-värdet. Prostatype® RT-qPCR Kit mäter uttrycksnivåerna hos de tre målgenerna IGFBP3, F3 och VGLL3 relaterat till uttrycksnivån hos genen GAPDH. Det möjliggör relativ kvantifiering oberoende av input-mängden total-mRNA. Den relativa uttrycksnivån representeras av det så kallade Delta Cp-värdet och beräknas på följande sätt: $\Delta Cp (\text{målg}) = Cp (\text{målg}) - Cp (\text{GAPDH})$.

Referensgenen GAPDH fungerar dessutom som en intern kontroll för att utvärdera provets validitet och integritet och för att säkerställa att en tillräckligt stor mängd total-mRNA används. Prostatype® RT-qPCR Kit är utformat för att användas med LightCycler® 480-II eller LightCycler® 480-I.

4. Material som medföljer

Prostatype® RT-qPCR Kit innehåller tillräckligt mycket reagenser för att utföra uttrycksanalys av upp till 16 patientprover plus två kontroller.

OBS: Körs testet i en enda körning, så kan 16 patientprover analyseras; om testet delas upp i två separata körningar, så kan 14 patientprover analyseras; om testet delas upp i tre separata körningar, så kan 12 patientprover testas.

4.1. Innehåll

Tabell 1: Innehåll i Prostatype® RT-qPCR Kit.

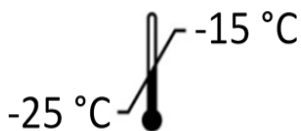
Reagens	Behållare	Volym
Prostatype Master	1 flaska	> 860 µl
Prostatype Manganese	1 flaska	1 ml
Prostatype Positive Control	1 flaska	> 65 µl
Prostatype Negative Control	1 flaska	> 65 µl

4.2. Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock och engångshandskar när du arbetar med kemikalier. Prostatype® RT-qPCR Kit innehåller inga farliga ämnen. Mer information finns på motsvarande materialsäkerhetsblad (MSDS) på vår webbplats ((www.prostatypegenomics.com/technical-documents)).

5. Förvaring och stabilitet

Reagenserna som ingår i Prostatype® RT-qPCR Kit är stabila fram till utgångsdatumet om de förvaras och hanteras enligt instruktionerna. Använd inte material som har passerat utgångsdatumet. Blanda inte komponenter från olika Prostatype® RT-qPCR Kit-loter.



Förvara alla komponenter i Prostatype® RT-qPCR Kit i –25 till –15 °C direkt vid mottagandet.

Varje komponent i Prostatype® RT-qPCR Kit kan tinas och frysas igen två gånger.

6. Material som behövs men inte medföljer

6.1. Allmän laboratorieutrustning

Följande allmänna laboratorieutrustning behövs för att kunna använda Prostatype® RT-qPCR Kit. All laboratorieutrustning måste installeras, kalibreras, användas och underhållas enligt tillverkarens rekommendationer.

- Vortexblandare (t.ex. VWR International, katalognr 444-1372 eller motsvarande)
- Pipetter med justerbar volym i följande intervall: 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1 000 µl (t.ex. Eppendorf Reference®, pipett med justerbar volym, Eppendorf, katalognr 4910 000.018, 4910 000.042 och 4910 000.069 eller motsvarande)
- Repetitionspipett eller dispenserare med kapacitet för upprepad dispensering av volymer i ett justerbart intervall (t.ex. Eppendorf Multipette® plus, Eppendorf, katalognr 4981 000.019 eller motsvarande)
- Bordscentrifug med rotor för 1,5/2,0 ml-rör (t.ex. Centrifuge 5417 R, Eppendorf, katalognr 5407 000.317 med rotor F-45-30-11, Eppendorf, katalognr 5490 015.002 eller motsvarande)
- Plattcentrifug med kapacitet för PCR-plattor (t.ex. Centrifuge 4-16, Qiagen, katalognr 81320 och 81031 eller motsvarande)
- Värmeblock med skakfunktion (z.B. Eppendorf ThermoMixer® C, katalognr 13527550, eller motsvarande)
-

6.2. Förbrukningsartiklar och reagenser för allmänt laboratoriebruk

- 2,0 ml-mikrorör med rund botten och med vidhängande PP-lock (t.ex. Sarstedt SafeSeal, katalognr 72.695.400 eller Eppendorf Safe-Lock™, katalognr 0030 120.094 eller motsvarande)
- Pipettspetsar med aerosolbarriär, t.ex. ep Dualfilter T.I.P.S.®, Eppendorf:
 - 0,1–10 µl, katalognr 0030 077.504 eller motsvarande
 - 2–100 µl, katalognr 0030 077.547 eller motsvarande
 - 50–1 000 µl, katalognr 0030 077.571 eller motsvarande
- Spetsar för repetitionspipetter, t.ex. Combitips plus®, Eppendorf:
 - 0,5 µl, katalognr 0030 069.226 eller motsvarande
- Applikator för att skapa en säker försegling mellan en mikroplatta och en självhäftande film (t.ex. LightCycler® 480 Sealing Foil Applicator, Roche, katalognr 04706170001)
- DNA-dekontamineringsreagens (t.ex. DNA AWAY®, VWR, katalognr 732-2353 eller motsvarande)
- RNase-dekontamineringsreagens (t.ex. RNase AWAY®, VWR, katalognr 732-2351 eller motsvarande)

6.3. Särskild utrustning och förbrukningsartiklar som behövs

Följande särskilda utrustning och förbrukningsartiklar behövs för att kunna använda Prostatype® RT-qPCR Kit, och kan inte ersättas av några andra produkter.

- LightCycler® 480 Instrument I med 96 brunnar och värmeblock (Roche, katalognr 05015278001) eller LightCycler® 480 Instrument II med 96 brunnar och värmeblock (Roche, katalognr 05015278001) och med programversion 1.5.x
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 med förslutningsfolie (Roche, katalognr 04729692001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche, katalognr 04729757001)

6.4. Installationskrav

Installation, kalibrering, verifiering av prestanda och underhåll av Roche LightCycler® 480 Instrument måste utföras enligt tillverkarens instruktioner.

7. Försiktighetsåtgärder och säkerhet

7.1. Försiktighetsåtgärder i laboratoriet

Denna procedur är endast avsedd för professionellt laboratoriebruk där det förutsätts att användaren har kunskaper om RNA-hantering och Realtids-PCR-analyser.

Att följa god laboratorie sed är av helt avgörande betydelse för att minimera risken för korskontaminering mellan prover under och efter RNA-extraktionen och reningsproceduren.

Undvik mikrobiell kontaminering av reagens när portioner tas från reagensflaskor. Se till att RNaser inte kommer i kontakt med prover och kontroller under testproceduren. Använd alltid laboratorierock och engångshandskar. Använd helst ett arbetsområde som är avsett enbart för RNA-testning. Dessutom måste alla ytor, material och all utrustning behandlas med ett RNase-dekontamineringsreagens (t.ex. RNase AWAY®) innan Prostatype® RT-qPCR Kit används.

Användning av sterila pipettspetsar med aerosolbarriär rekommenderas för att förhindra korskontaminering av patientprover.

För att förhindra kontaminering från amplikoner som genererats vid tidigare PCR rekommenderar vi att aktiviteterna innan PCR (t.ex. RNA-extraktion och -rening, PCR-konfiguration) och efter PCR (t.ex. Realtids-PCR) utförs strikt separerat. Vi rekommenderar dessutom att använda PCR-plattor kasseras med en metod som gör att ingen PCR-produkt kan exponeras. Till exempel ska använda PCR-plattor placeras i en förslutningsbar plastpåse eller motsvarande omedelbart efter att de tagits bort från PCR-instrumentet. Förslut sedan påsen och släng den i en särskild avfallsbehållare. Förvara aldrig en använd PCR-platta utanför PCR-instrumentet. Öppna aldrig en använd PCR-platta. Dessutom kan alla ytor, material och all utrustning behandlas med ett DNA-dekontamineringsreagens (t.ex. DNA AWAY®) innan Prostatype® RT-qPCR Kit används.

Preparering av Prostatype® RT-qPCR ska göras i rumstemperatur (15–25 °C).

7.2. Mikrobiologiska och infektiösa egenskaper

Produkten innehåller inga infektiösa substanser eller agens som kan orsaka sjukdomar hos människor eller djur.

8. Testprocedur

Obs. Innan testproceduren påbörjas ska RNA-extraktion från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) vävnad utföras. Följande i handeln tillgängliga RNA-extraktionskit rekommenderas: Maxwell® 16 LEV RNA FFPE Purification Kit (Promega, katalog no. AS-1260). RNA-extraktion utförs halvautomatisk och måste utföras enligt tillverkarens instruktioner, med följande ändringar:

- 1) Efter tillsättning av mineralolja utförs inkubationssteget (80°C i 2 min) på ett värmeblock med skakfunktion (1200 rpm).
- 2) Vävnadsdigestion: Inkubationsstegen (56°C i 15 min och 80°C i 1 timme) utförs på ett värmeblock med skakfunktion (650 rpm).

Obs. Prostatype® RT-qPCR Kit har validerats för att kunna generera ett Cp (GAPDH) på ≤ 28 med omkring 95% möjlighet genom att använda prover som samlats in enligt följande kriterier: 1)

Ofärgade FFPE-vävnadssnitt tagna med nålbiopsi. 2) Snitten hade en tjocklek på 10 µm. 3) Det minsta tumörområdet som användes var 30 mm² med ett tumörinnehåll på >50% (1/2).

För prover med ett tumörområde mellan 15 mm² och 30 mm² med 50% cancerceller är det ändå meningsfullt att utföra RNA-extraktionen och Prostatype® RT-qPCR-testet, eftersom sannolikheten att erhålla ett Cp (GAPDH) på ≤ 28 från de här proverna är >90%. För prover med ett tumörområde på <15mm² med 50% cancerceller är sannolikheten att erhålla ett Cp(GAPDH) värde på ≤ 28 ungefär 80%. Prover med <5mm² tumörområde är icke-lämpliga för analys med Prostatype RT-qPCR kit.

8.1. Konfiguration av LightCycler® 480 Instrument

En färgkompensationsfil måste sparas på LightCycler® 480 Instrument innan testet Prostatype® RT-qPCR utförs. Allmän information om hur färgkompensation utförs finns i användarhandboken till LightCycler® 480 Instrument. De reagenser som behövs för att utföra en färgkompensationsanalys för Prostatype® RT-qPCR Kit (Prostatype® RT-qPCR-färgkompensationsplatta, ref: CM-C001) kan köpas från Prostatype Genomics AB.

8.1.1. Spara ett nytt detektionsformat på LightCycler® 480 Instrument I

Obs. I det här avsnittet beskrivs konfiguration med ett LightCycler® 480 Instrument I. Konfiguration med ett LightCycler® 480 Instrument II beskrivs nedan.

När du kör Prostatype® RT-qPCR för första gången på ett LightCycler® 480 Instrument I måste du först konfigurera ett nytt detektionsformat enligt Bild 1.

- Starta programmet (version 1.5.x).
- Klicka på "Open Tools".
- Klicka på "Detection Formats" i fönstret Tools.
- Klicka på "New" och ange ett namn för detektionsformatet, t.ex. "Prostatype-kanaler".
- Markera kryssrutorna för samtliga följande filterkombinationer:
 - Filterkombination 1: 523–568
 - Filterkombination 2: 558–610
 - Filterkombination 3: 483–533
 - Filterkombination 4: 615–670
- Ändra namn på filterkombinationerna enligt följande:
 - 523–568: GAPDH
 - 558–610: IGFBP3
 - 483–533: F3
 - 615–670: VGLL3
- Ändra filterinställningar för alla kombinationer enligt följande:
 - Melt Factor: 1
 - Quant Factor: 10
 - Max Integration Time (Sec): 2

Filter Combination Selection							Selected Filter Combination List					
Emission							Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
E x c i t a t i o n	500	533	568	610	640	670	523	568	GAPDH	1	10	2
	450	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	558	610	IGFBP3	1	10	2
	483	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	483	533	F3	1	10	2
	523	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	615	670	VGLL3	1	10	2
	558	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
615	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							

Bild 1: Filterkombination för Prostatype® RT-qPCR Kit på LightCycler® 480 Instrument I.

8.1.2. Spara ett nytt detektionsformat på LightCycler® 480 Instrument II

Obs. I det här avsnittet beskrivs konfiguration med ett LightCycler® 480 Instrument II. Konfiguration med ett LightCycler® 480 Instrument I beskrivs ovan.

När du kör Prostatype® RT-qPCR för första gången på ett LightCycler® 480 Instrument II måste du först konfigurera ett nytt detektionsformat enligt Bild 2.

- Starta programmet (version 1.5.x).
- Klicka på "Open Tools".
- Klicka på "Detection Formats" i fönstret Tools.
- Klicka på "New" och ange ett namn för detektionsformatet, t.ex. "Prostatype-kanaler".
- Markera kryssrutorna för samtliga följande filterkombinationer:
 - Filterkombination 1: 533–580
 - Filterkombination 2: 533–640
 - Filterkombination 3: 465–510
 - Filterkombination 4: 618–660
- Ändra namn på filterkombinationerna enligt följande:
 - 533–580: GAPDH
 - 533–640: IGFBP3
 - 465–510: F3
 - 618–660: VGLL3
- Ändra filterinställningar för alla kombinationer enligt följande:
 - Melt Factor: 1
 - Quant Factor: 10
 - Max Integration Time (Sec): 2

Filter Combination Selection							Selected Filter Combination List					
Emission							Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
E	488	510	580	610	640	660	533	580	GAPDH	1	10	2
x	440	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	618	660	VGLL3	1	10	2
c							465	510	F3	1	10	2
i	465	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	533	640	IGFBP3	1	10	2
t	498	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
a	533	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>						
i	618	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>						
o												
n												

Bild 2: Filterkombination för Prostatype® RT-qPCR på LightCycler® 480 Instrument II.

8.2. Prostatype® RT-qPCR-konfiguration

Prostatype® RT-qPCR Kit innehåller tillräckligt många reagenser för att testa upp till 16 patientprover plus två kontroller. Varje RNA-prov (patient-RNA-prov, Prostatype Positive Control eller Prostatype Negative Control) måste testas tre gånger. Prostatype Positive Control och Prostatype Negative Control måste ingå tre gånger i varje individuell körning.

Obs. För att uppnå optimal användning av reagenserna i Prostatype® RT-qPCR Kit måste proverna indelas i batcher. Om proverna testas individuellt förbrukas mer reagens, vilket leder till att färre prover kan testas med Prostatype® RT-qPCR Kit.

Obs. De medföljande reagenserna räcker till upp till tre individuella PCR-körningar. Förvara reagenserna i -25 till -15 °C mellan PCR-körningar.

Obs. En kort centrifugering av mikrorören måste utföras i flera moment i den här bruksanvisningen för att ta bort droppar från locket eller för att samla upp kvarvarande vätska. Vi rekommenderar centrifugering med en bordscentrifug i 10–20 s med $1\ 000 \pm 150$ RCF.

Obs. Försiktig vortexning av rör och behållare måste utföras i flera moment i den här bruksanvisningen för att säkerställa en homogen blandning av vätskan. Vi rekommenderar att du använder en vortexblandare som är inställd på medelhög hastighet i 15 till 20 s. Detta steg är mycket viktigt för att blanda reagenserna ordentligt och för att uppnå tillförlitliga resultat.

Obs. Om testet delas upp i två separata körningar, så kan 14 patientprover analyseras; om testet delas upp i tre separata körningar, så kan 12 patientprover testas.

Viktigt: En färgkompensation måste utföras innan det första Prostatype® RT-qPCR-testet. Det måste finnas en individuell färgkompensationsfil för alla LightCycler® 480 Instrument där Prostatype® RT-qPCR-testet utförs. Allmän information om hur en färgkompensationsfil skapas finns i användarhandboken till LightCycler® 480 Instrument.

8.2.1. Upptining av komponenterna

Tina ett rör med Prostatype Master, Prostatype Manganese, Prostatype Positive Control och Prostatype Negative Control i rumstemperatur (15 – 25 °C) i **25 till 35 min.**

Obs. Vortexa reagenserna 4 x 15 – 20 s innan du påbörjar beredningen av Master Mix.

8.2.2. Beredning av Master Mix

Obs. Se till att PCR-prepareringstiden (från beredning av Mastermix till start av PCR-plattan) inte överskrider **90 min.**

Obs. En Prostatype Positive Control och en Prostatype Negative Control måste ingå i varje individuell körning.

Obs. Varje RNA-prov (patient-RNA-prov, Prostatype Positive Control eller Prostatype Negative Control) måste testas tre gånger.

- Vortexa försiktigt Prostatype Master-röret och Prostatype Manganese-röret. Centrifugera kort.
- Överför de volymer Prostatype Master och Prostatype Manganese som motsvarar det antal prover som ska testas (antalet patientprover + 2 kontroller) enligt Tabell 2 i ett 2,0 ml-reaktionsrör.
- Blanda Master Mix genom att vortexa försiktigt.
- Centrifugera Master Mix kort för att ta bort droppar från locket.

Obs. Förvara inte Master Mix, utan använd det omedelbart. Frys oanvänd Prostatype Master och Prostatype Manganese igen direkt efter användning. Alla komponenter i Prostatype® RT-qPCR Kit kan frysas och tinas två gånger.

Tabell 2: Beredning av Master Mix.

Antal prover	Antal brunnar i PCR-plattan	Volym Prostatype Master	Volym Prostatype Manganese
16 prover (+2 kontroller)	54 brunnar	823,0 µl	84,2 µl
15 prover (+2 kontroller)	51 brunnar	777,3 µl	79,5 µl
14 prover (+2 kontroller)	48 brunnar	731,6 µl	74,8 µl
13 prover (+2 kontroller)	45 brunnar	685,8 µl	70,2 µl
12 prover (+2 kontroller)	42 brunnar	640,1 µl	65,5 µl
11 prover (+2 kontroller)	39 brunnar	594,4 µl	60,8 µl
10 prover (+2 kontroller)	36 brunnar	548,7 µl	56,1 µl
9 prover (+2 kontroller)	33 brunnar	503,0 µl	51,4 µl
8 prover (+2 kontroller)	30 brunnar	457,2 µl	46,8 µl
7 prover (+2 kontroller)	27 brunnar	411,5 µl	42,1 µl
6 prover (+2 kontroller)	24 brunnar	365,8 µl	37,4 µl
5 prover (+2 kontroller)	21 brunnar	320,1 µl	32,7 µl
4 prover (+2 kontroller)	18 brunnar	274,3 µl	28,1 µl
3 prover (+2 kontroller)	15 brunnar	228,6 µl	23,4 µl
2 prover (+2 kontroller)	12 brunnar	182,9 µl	18,7 µl
1 prov (+2 kontroller)	9 brunnar	137,2 µl	14,0 µl

8.2.3. Preparering av platta

Obs. Om ett större antal prover ska testas rekommenderas en repetitionspipett/dispenserare för upprepad dispensering av Master Mix.

Organisera PCR-plattan på följande sätt. En plattlayout enligt Tabell 3 rekommenderas.

- Överför 15 µl Master Mix till var och en av de utvalda brunnarna på en LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 Reaction Plate.
- Vortexa försiktigt patient-RNA-proverna, Prostatype Positive Control och Prostatype Negative Control. Centrifugera kort.
- Tillsätt 5 µl av patient-RNA-proverna, Prostatype Positive Control och Prostatype Negative Control i respektive brunnar på PCR-plattan.
- Säkerställ att alla prover testas tre gånger.
- Försegla PCR-plattan med LightCycler® 480 Sealing Foil.
- Centrifugera PCR-plattan med en plattcentrifug i 2 min i 2000 ± 100 RCF.
- Börja körningen av PCR-plattan inom **30 min** efter att prepareringen av plattan har slutförts.

Obs. Frys oanvänd Prostatype Positive Control och Prostatype Negative Control igen direkt efter användning. Alla komponenter i Prostatype® RT-qPCR Kit kan frysas och tinas två gånger.

Tabell 3: Rekommenderad plattlayout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	PC	PC	NC	NC	NC	S1	S1	S1	S2	S2	S2
B	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6
C	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S10	S10	S10
D	S11	S11	S11	S12	S12	S12	S13	S13	S13	S14	S14	S14
E	S15	S15	S15	S16	S16	S16						
F												
G												
H												

PC: Prostatype Positive Control, NC: Prostatype Negative Control, S: patientprov

8.2.4. Laddning av platta

Obs: Börja körningen av PCR-plattan inom 30 min efter att prepareringen av plattan har slutförts.

Obs: Vi rekommenderar att du sparar en körningsmall med de definierade cyklingsinställningarna i LightCycler® 480 Software.

- Starta programmet (version 1.5.x).
- Skapa en ny analys genom att klicka på "New Experiment".
- Ladda den specificerade körningsmallfilen eller definiera den aktuella analysen enligt parametrarna för PCR-programmet som anges i Tabell 4 och Bild 3 nedan.
- Välj detektionsformat enligt konfigurationen i 8.1.1 eller 8.1.2 (t.ex. "Prostatype-kanaler").
- Klicka på "Subset Editor" och generera en provundergrupp inklusive alla använda brunnar enligt beskrivningen i handboken till LightCycler 480® Instrument.
- Ange unika providentifikatorer för alla tre replikaten av respektive prov.
- Spara analyskonfigurationen med ett unikt namn.
- Öppna brickan.
- Placera PCR-plattan i ramen (position A1 ska vara i det övre vänstra hörnet) och kontrollera att plattan sitter rätt i ramen. Stäng brickan.
- Klicka på "Start Run" för att starta körningen.

Tabell 4: Standard-PCR-program för LightCycler® 480 Instrument.

Programparameter	RT-steg	Cyklning		Nedkylning
Analysis Mode	Inget	Kvantifieringsläge		Ingen
Cycles	1	40		1
Segment	1	1	2	1
Target [°C]	63	92	60	40
Hold [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:40	00:00:10
Ramp Rate [°C/s]*	1,6	1,6	1,6	1,6
Acquisition Mode	Inget	Ingen	Enkel	Ingen

* Välj det detektionsformat som du skapade i avsnitt 8.1; aktivera filterkombinationerna för GAPDH, IGFBP3, F3 och VGLL3 och ställ in "Reaction Volume" på "20".

Programs								
Program Name	Cycles	Analysis Mode						
RT-step	1	None						
cycling	40	Quantification						
cooling	1	None						
Temperature Targets								
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	
63	None	00:20:00	1,6		0	0	0	
cycling Temperature Targets								
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	
92	None	00:00:05	1,6		0	0	0	
60	Single	00:00:40	1,6		0	0	0	
cooling Temperature Targets								
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)	
40	None	00:00:10	1,6		0	0	0	

Bild 3: Skärmbild från LightCycler® 480 Software v1.5 där körningsprotokollet för Prostatype® RT-qPCR Kit visas. A: Information om RT-steget. B: Information om cyklingssteget. C: Information om kylningssteget.

8.3. Analysinställningar på LightCycler® 480 Instrument

8.3.1. Allmänt

För en tillförlitlig kvantifiering ska korsningspunkten ("Cp") för en amplifieringskurva med tröskeln lokaliseras i den tidiga exponentiella fasen av en PCR-analys (exponentiell fas = rakt segment på en PCR-kurva när den visas på en logaritmisk skala).

Du kan behöva justera tröskelnivån för att tillförlitliga Cp-värden ska garanteras. För att göra det kan den horisontella tröskellinjen i amplifieringsdiagrammet justeras manuellt enligt följande regler (se Bild 4 nedan):

1. Tröskeln ska korsa PCR-kurvorna under den tidiga exponentiella fasen.
2. Tröskeln ska lokaliseras ovanför baslinjen för PCR-kurvorna.
3. Tröskeln ska ligga inom en definierad övre/lägre gräns för "STD Multiplier" enligt specifikationen för varje individuell gen i avsnitt 8.3.2.

Varje amplifieringssignal ska kontrolleras visuellt avseende oregelbunden amplifiering. Signaler som korsar tröskeln på grund av inkonsekventa datapunkter (brustoppar) eller linjär kurvform ska inte utvärderas. Vid oregelbunden amplifiering måste den aktuella brunnen uteslutas från analysen genom att du tar bort markeringen vid "Include" i provtabellen.

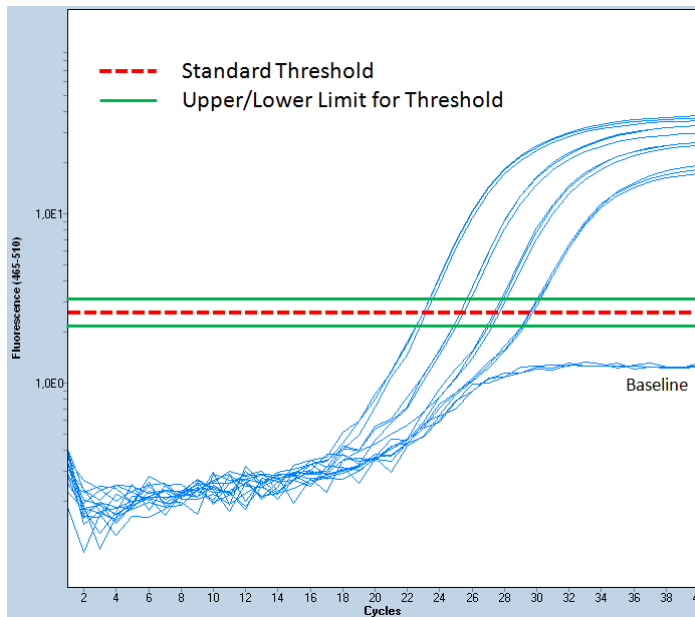


Bild 4: Skärmbild av amplifieringskurvor vid användning av LightCycler® 480 Instrument (logaritmisk skala). Den röda streckade linjen visar tröskeln när standardvärdena för "STD Multiplier" används enligt anvisningarna i avsnitt 8.3.2. Tröskeln kan justeras inom den indikerade övre och nedre gränsen om det behövs.

8.3.2. Analysprocedur

Obs. Utför endast dataanalys på använda brunnar genom att generera en motsvarande provundergrupp enligt beskrivningen i handboken till LightCycler® 480 Instrument.

- När körningen har slutförts klickar du på "Analysis" i LightCycler® 480 Basic Software Module-fältet, vilket gör att fönstret "Analysis Overview" öppnas.
- Välj "Abs Quant/Fit Points".
- I fönstret "Create new analysis" väljer du den aktuella undergrupp som innehåller alla använda brunnar och bekräftar sedan.
- Aktivera färgkompensation genom att klicka på pilknappen bredvid "Color Comp (Off)" och sedan klicka på "In Use" och välja aktuell färgkompensationsfil.
- Ställ in "First Cycle" på "1" och "Last Cycle" på "40".
- Ställ in bakgrunden (klicka på den blåa "Background"-knappen) på "6–11" genom att ställa in "Min Offset" på "5" och "Max Offset" på "10" i fönstret "Cycle Range".

GAPDH:

- Aktivera den motsvarande filterkombinationen för GAPDH:
 - LightCycler® 480 I: "Filter Comb 523 – 568"
 - LightCycler® 480 II: "Filter Comb 533 – 580"
- Ställ in brusbandet på "Noise Band (STD Mult)" och ställ in "STD Multiplier" manuellt på "50.0" i fönstret "Noise Band".
- Om det behövs kan du justera tröskelnivån manuellt enligt reglerna i avsnitt 8.3.1. Kontrollera att "STD Multiplier"-värdet som visas är mellan **40.0** och **60.0**.
- Kontrollera att tröskelvärdet i fönstret "Analysis" är lika stort som Noise Band-värdet.
- Kontrollera att antalet Fit Points är "2".
- Klicka på "Calculate".
- GAPDH-korsningspunkten ("Cp") för varje prov visas i provtabellen.
- Exportera Cp-värdena genom att högerklicka i provtabellen. Välj "Export". Spara filen med analysnamnet som ska innehålla gennamnet "GAPDH".

IGFBP3:

- Aktivera den motsvarande filterkombinationen för IGFBP3:
 - LightCycler® 480 I: "Filter Comb 558 – 610"
 - LightCycler® 480 II: "Filter Comb 533 – 640"
- Behåll samtliga inställningar enligt den tidigare justeringen med ett undantag:
- Ställ in STD Multiplier-värdet manuellt på **"35.0"** i fönstret "Noise Band".
- Om det behövs kan du justera tröskelnivån manuellt enligt reglerna i avsnitt 8.3.1. Kontrollera att "STD Multiplier"-värdet som visas är mellan **28.0** och **42.0**.
- Kontrollera att tröskelvärdet i fönstret "Analysis" är lika stort som Noise Band-värdet.
- Kontrollera att antalet Fit Points är "2".
- Klicka på "Calculate".
- IGFBP3-korsningspunkten ("Cp") för varje prov visas i provtabellen.
- Exportera Cp-värdena genom att högerklicka i provtabellen. Välj "Export". Spara filen med analysnamnet som ska innehålla gennamnet "IGFBP3".

F3:

- Aktivera den motsvarande filterkombinationen för F3:
 - LightCycler® 480 I: "Filter Comb 483 – 533"
 - LightCycler® 480 II: "Filter Comb 465 – 510"
- Behåll samtliga inställningar enligt den tidigare justeringen med ett undantag:
- Ställ in STD Multiplier-värdet manuellt på **"80.0"** i fönstret "Noise Band".
- Om det behövs kan du justera tröskelnivån manuellt enligt reglerna i avsnitt 8.3.1. Kontrollera att "STD Multiplier"-värdet som visas är mellan **64.0** och **96.0**.
- Kontrollera att tröskelvärdet i fönstret "Analysis" är lika stort som Noise Band-värdet.
- Kontrollera att antalet Fit Points är "2".
- Klicka på "Calculate".
- F3-korsningspunkten ("Cp") för varje prov visas i provtabellen.
- Exportera Cp-värdena genom att högerklicka i provtabellen. Välj "Export". Spara filen med analysnamnet som ska innehålla gennamnet "F3".

VGLL3:

- Aktivera den motsvarande filterkombinationen för VGLL3:
 - LightCycler® 480 I: "Filter Comb 615 – 670"
 - LightCycler® 480 II: "Filter Comb 618 – 660"
- Behåll samtliga inställningar enligt den tidigare justeringen med ett undantag:
- Ställ in STD Multiplier-värdet manuellt på **"27.5"** i fönstret "Noise Band".
- Om det behövs kan du justera tröskelnivån manuellt enligt reglerna i avsnitt 8.3.1. Kontrollera att "STD Multiplier"-värdet som visas är mellan **22.0** och **33.0**.
- Kontrollera att tröskelvärdet i fönstret "Analysis" är lika stort som Noise Band-värdet.
- Kontrollera att antalet Fit Points är "2".
- Klicka på "Calculate".
- VGLL3-korsningspunkten ("Cp") för varje prov visas i provtabellen.
- Exportera Cp-värdena genom att högerklicka i provtabellen. Välj "Export". Spara filen med analysnamnet som ska innehålla gennamnet "VGLL3".

8.4. Validitet för Prostatype® RT-qPCR-körningar

Prostatype® RT-qPCR-körningen anses vara giltig om kriterierna som fastställts för Prostatype Positive Control och Prostatype Negative Control i tabellerna nedan har uppfyllts.

Om antingen Prostatype Positive Control eller Prostatype Negative Control (eller båda) är ogiltig(a) kan data för patientproverna inte tolkas. Alla patientprover som ingår i körningen måste testas om.

Obs. Använd Cp- och Delta Cp-medianvärdena för de tre replikaten som erhållits från varje prov med hjälp av beräkningarna nedan. Medianvärdet avser värdet i mitten när alla värden ordnas från det lägsta till det högsta (se exempel i Tabell 9 på sidan 20). Om endast två värden är tillgängliga används medelvärdet av dessa två värden. Tre PCR-replikater måste utföras och utvärderas för antingen kontrollerna eller patientproverna. Om en oregelbunden kurva förekommer kan ett av de tre resultaten utelämnas, men det måste finnas två replikater kvar för utvärdering.

8.4.1. Utvärdering av Prostatype Positive Control

- Kontrollera om resultat för minst två PCR-replikater för Positive Control är tillgängliga.
- Om inget Cp-värde rapporteras för en gen använder du numret "38" som ett "simulerat Cp" för att kunna beräkna ett Delta Cp-värde.
- Identifiera median-Cp-värdet för GAPDH.
- Kontrollera om validitetsgränsen för GAPDH uppfylls.

Tabell 5: GAPDH Cp-validitetsgräns för Prostatype Positive Control.

Gen	Cp-validitetsgräns
GAPDH	$20,00 \leq \text{median-Cp} \leq 22,00$

- Beräkna Delta Cp-värdena för IGFBP3, F3 och VGLL3 för varje brunn enligt följande formel:

$$\text{Delta Cp [gen]} = \text{Cp - värde [gen]} - \text{Cp - värde [GAPDH]}$$

(där genen är IGFBP3, F3 eller VGLL3)

- Identifiera Delta Cp-medianvärdena för IGFBP3, F3 och VGLL3.
- Kontrollera om validitetsgränserna för IGFBP3, F3 och VGLL3 är uppfyllda:

Tabell 6: Delta Cp-validitetsgränser för Prostatype Positive Control.

Gen	Delta Cp-validitetsgränser
IGFBP3	$1,90 \leq \text{median-Delta Cp} \leq 3,90$
F3	$0,90 \leq \text{median-Delta Cp} \leq 2,90$
VGLL3	$2,80 \leq \text{median-Delta Cp} \leq 4,80$

8.4.2. Utvärdering av Prostatype Negative Control

- Kontrollera om resultat för minst två PCR-replikat för Negative Control är tillgängliga.
- Identifiera median-Cp-värdet för GAPDH.
- Kontrollera om validitetsgränserna för Prostatype Negative Control är uppfyllda:

Tabell 7: Validitetsgränser för Prostatype Negative Control.

Gen	Cp-validitetsgränser
GAPDH	$29,00 \leq \text{median-Cp} \leq 31,00$
IGFBP3, F3, VGLL3	Cp saknas

8.5. Validitet för individuella brunnar med patientprover

Endast om de externa kontrollerna är giltiga enligt avsnitt 8.4 kan resultaten för den interna kontrollen för varje brunn med patientprov utvärderas. En individuell brunn är giltig om kriteriet för den interna kontrollen som fastställts i Tabell 8 uppfylls.

- Kontrollera om validitetsgränsen för de enskilda brunnar med patientprov uppfylls:

Tabell 8: Validitetsgräns för patientprover.

Gen	Cp-validitetsgräns
GAPDH	Median-Cp $\leq 28,00$

- Säkerställ att minst två brunnar med patientprov uppfyller det här kriteriet.

Om brunnen med patientprov överskrider validitetsgränsen kan inte data för denna brunn med patientprov tolkas. Minst två giltiga brunnar med patientprov krävs för ytterligare dataanalys. I annat fall är resultatet för patientprovet ogiltigt och patientprovet måste då testas om.

9. Dataanalys för patientprover

Om alla krav som beskrivs i avsnitt 8.4 och 8.5 är uppfyllda kan resultaten för individuella prover beräknas och rapporteras. mRNA-uttrycksnivåerna för de tre generna IGFBP3, F3 och VGLL3, relaterat till uttrycksnivån hos genen GAPDH, indikeras av Delta Cp-medianvärdet som fastställs enligt beskrivningen nedan. I Tabell 9 visas ett exempel på hur Delta Cp-medianvärdet beräknas för en gen.

- Beräkna Delta Cp-värdena för IGFBP3, F3 och VGLL3 för varje brunn enligt följande formel:

$$\text{Delta Cp [gen]} = \text{Cp - värde [gen]} - \text{Cp - värde [GAPDH]}$$

(där genen är IGFBP3, F3 eller VGLL3)

- Om inget Cp-värde rapporteras uttrycktes genen nedanför detektionsgränsen. Använd siffran "38" som ett "simulerat Cp-värde" för att kunna beräkna ett Delta Cp-värde.
- Identifiera Delta Cp-medianvärdena för IGFBP3, F3 och VGLL3.

Tabell 9: Exempel för beräkningen av Delta Cp-medianvärdet för VGLL3 för ett prov. En liknande beräkning måste utföras för generna F3 och IGFBP3.

PCR-replikat	Cp-värde GAPDH	Cp-värde VGLL3	Beräknat Delta Cp	Median-Delta Cp VGLL3
Brunn 1	20,25	25,36	$\Delta Cp_1 = 25,36 - 20,25 = 5,11$	Median {5,11; 4,99; 18,02} = 5,11
Brunn 2	20,15	25,14	$\Delta Cp_2 = 25,14 - 20,15 = 4,99$	
Brunn 3	19,98	Cp saknas	$\Delta Cp_3 = 38 - 19,98 = 18,02$	

10. Kvalitetskontroll

10.1. Externa kontroller

Prostatype® RT-qPCR Kit innehåller Prostatype Positive Control och Prostatype Negative Control. De här kontrollerna måste ingå tre gånger i varje individuell PCR-körning för att validitet för testresultaten ska kunna garanteras. Materialet som medföljer räcker till att utföra tre individuella PCR-körningar. Värdena för Prostatype Positive Control och Negative Control måste ligga inom validitetsgränserna (se Tabell 5 eller Tabell 6 eller Tabell 7). Om en kontroll är utanför sitt specificerade intervall är de associerade testresultaten ogiltiga. De får då inte rapporteras och testningen måste göras om.

10.2. Internkontroller

För varje patientprov bestäms uttrycksnivån för referensgenen GAPDH. Den används för att utvärdera provets validitet och integritet. GAPDH-nivån måste ligga över ett specifikt värde för att en stabil mätning av målgenerna ska kunna garanteras (se Tabell 8). Dessutom används den interna kontrollen för att verifiera att tillräckligt mycket amplifieringsbart RNA extraherades under RNA-extraktionssteget.

11. Begränsningar för proceduren

Produkten är endast avsedd att användas av personal med erfarenhet av arbete inom molekylärbiologiteknik, framför allt realtids-PCR. Allmänna rekommendationer om laboratoriets organisation och procedurer ska följas för att förhindra DNA-kontamination.

Alla resultat från Prostatype® RT-qPCR Kit måste utvärderas tillsammans med patientens kliniska historik och annan tillgänglig information.

12. Testegenskaper

12.1. RNA-input

Kompatibiliteten för Prostatype® RT-qPCR Kit med användning av total-RNA extraherat från paraffinbäddad (FFPE) human prostatavävnad (tagen med nålbiopsi) som input validerades genom att bedöma 16 individuella kliniska prover. Total-RNA extraherades från ofärgade prostatavävnadsprover (tagna med nålbiopsi) som innehöll minst 50% cancerceller. Proverna samlades in enligt följande kriterier: område ≥ 30 mm², tjocklek 10 μ m. RNA-extraktionskitet som rekommenderas i avsnitt 8 användes. Resultaten för Prostatype® RT-qPCR Kit var giltiga för ca. 95% av proverna.

12.2. Linjäritet/precision/kvantifieringsgräns

Linjäriteten utvärderades genom att testa en spädningsserie med syntetiskt mål-RNA som omfattade ett intervall från $2,5 \times 10^6$ till 38 molekyler/ μ l. I testningen ingick tre olika Prostatype® RT-qPCR Kit-loter. För GAPDH- och F3-analysen omfattar det linjära området koncentrationerna från $2,5 \times 10^6$ till 38 kopior/ μ l. För

IGFBP3 anges linjäriteten ned till 153 kopior/ μl , och för VGLL3 ned till 305 kopior/ μl . Analyserna uppvisar linjäritet med en regressionskoefficient $R^2 > 0,99$ (se Bild 5) inom det rapporterade området. Lutningar har observerats mellan $-3,12$ och $-3,29$ för det linjära området. Standardavvikelsen (SD) och variationskoefficienten (CV) beräknades inom det definierade området för linjäritet. Störst SD på 0,4 Cp detekterades för IGFBP3 vid en koncentration på 153 kopior/ μl och för VGLL3 vid en koncentration på 305 kopior/ μl . Störst CV var 1,6 % för VGLL3 vid en koncentration på $3,9 \times 10^4$ kopior/ μl . Kvantifieringsgränsen för Prostatype® RT-qPCR representeras av den lägre nivån i det linjära området för respektive analys som anges ovan.

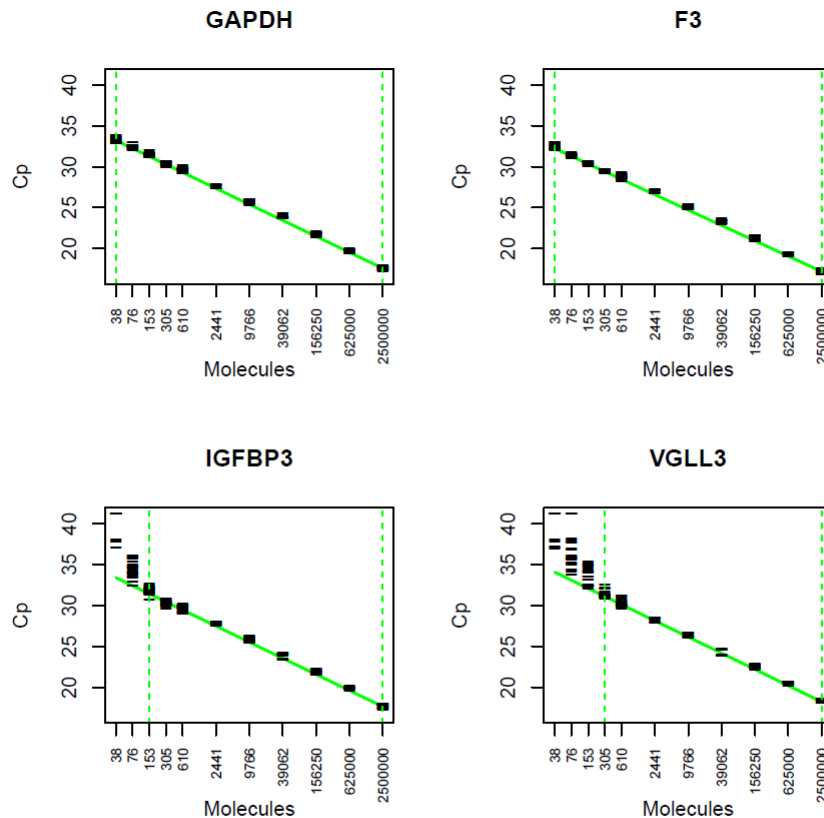


Bild 5: Linjäritet för de fyra generna som ingår i Prostatype® RT-qPCR. De observerade Cp-värdena (svarta linjer) är inprickade för de 11 testade målkoncentrationerna i intervallet från 38 till $2,5 \times 10^6$ molekyler per μl . Varje målkoncentration bedömdes med minst 15 PCR-replikat. Den anpassade linjära regressionen visas med en heldragen grön linje.

12.3. Detektionsgräns

Detektionsgränsen utvärderades genom upprepad analys av syntetiskt mål-RNA som omfattade ett intervall från $2,5 \times 10^6$ till 38 molekyler/ μl . De fyra lägsta målkoncentrationerna kördes i 24 replikat där tre olika Prostatype® RT-qPCR Kit-loter ingick. De lägsta koncentrationerna som uppvisade amplifieringskurvor för alla replikat (100 % detektion) var: GAPDH: 38 kopior/ μl , F3: 38 kopior/ μl , IGFBP3: 76 kopior/ μl , VGLL3: 153 kopior/ μl .

12.4. Relativ sensitivitet

Den relativa sensitiviteten utvärderades genom att testa prover som innehöll olika proportioner IGFBP3-, F3- och VGLL3-mål i en lika stor mängd GAPDH-bakgrund. Följande prover testades i 6 replikat per prov med olika Prostatype® RT-qPCR Kit-loter: 800 kopior/ μl , 400 kopior/ μl och 200 kopior/ μl av IGFBP3-, F3- och VGLL3-mål i en lika stor mängd GAPDH-bakgrund med $4,0 \times 10^4$ kopior/ μl , vilket resulterade i proportionerna 1:50, 1:100 och 1:200. För var och en av de fyra analyserna uppvisade samtliga replikat

av proverna (18 PCR-brunnar) en amplifieringskurva (100 % detektion), vilket bekräftade en relativ sensitivitet för de tre målanalyserna på under 1 %.

12.5. LoB (blankgräns)

Tjugoen (21) PCR-brunnar som inte innehöll några RNA-mål testades med olika loter av Prostatype® RT-qPCR Kit för att utvärdera blankgränsen. De tre målgenerna (IGFBP3, F3 och VGLL3) uppvisade ingen amplifieringskurva för någon av de 21 brunnarna. Därför motsvarar blankgränsen det maximalt observerbara Cp-värdet för 38 av de här generna. För GAPDH uppvisade 16 av de 21 PCR-brunnarna en amplifieringskurva med Cp-värden mellan 35,2 och 38,0. Blankgränsen för GAPDH uppskattades med hjälp av 95 %-kvantilen och motsvarar ett Cp-värde på 35,2.

12.6. Reproducerbarhet

Reproducerbarheten bedömdes med hjälp av upprepade testning av alikvoter från åtta RNA-pooler extraherat från formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) human prostatavävnad (tagen med nålbiopsi) som innehåller cancerceller. Testningen utfördes av fyra användare på tre olika testlaboratorier i Europa. På varje testställe preparerades 12 enskilda PCR-plattor som omfattade tre olika loter av Prostatype® RT-qPCR Kit. Resultatet av utvärderingen beskrivs i

Tabell 10.










Tabell 10: Resultat för test av reproducerbarhet. Medel-Cp-värdet och den relaterade standardavvikelsen (SD) och variationskoefficienten (CV) visas för de fyra generna. Alla åtta RNA-pooler mättes i 36 oberoende PCR-körningar.

RNA-prov	GAPDH			F3			VGLL3			IGFBP3		
	Medel Cp-värde	SD (Cp)	CV (%)	Medel Cp-värde	SD (Cp)	CV (%)	Medel Cp-värde	SD (Cp)	CV (%)	Medel Cp-värde	SD (Cp)	CV (%)
Pool 1	23,9	0,150	0,626	26,2	0,295	1,126	26,4	0,316	1,198	27,2	0,327	1,205
Pool 2	25,4	0,189	0,742	27,6	0,302	1,096	28,4	0,388	1,366	27,6	0,315	1,140
Pool 3	24,4	0,208	0,856	26,2	0,307	1,172	28,9	0,474	1,639	26,5	0,292	1,100
Pool 4	24,6	0,267	1,086	25,6	0,288	1,122	28,1	0,459	1,632	26,5	0,299	1,131
Pool 5	23,4	0,203	0,867	25,3	0,300	1,184	27,1	0,357	1,318	25,4	0,258	1,019
Pool 6	24,2	0,181	0,749	26,5	0,299	1,126	29,5	0,609	1,060	26,4	0,265	1,002
Pool 7	24,0	0,165	0,685	26,2	0,277	1,059	28,8	0,457	1,586	26,1	0,297	1,141
Pool 8	23,6	0,186	0,791	25,1	0,228	0,909	28,2	0,408	1,447	25,7	0,296	1,154

12.7. Interferens

Alikvoter från tre RNA-pooler med och utan tillsatta potentiellt interfererande substanser bearbetades. Ingen interferens observerades med förhöjda nivåer av hematoxylin/eosin (HE, 0,01 % v/v), xylol/xylol (0,01 % v/v), DNase I (0,06 U/μl), humant genomiskt DNA (20 ng/μl), guanidiniumklorid (5 mM), etanol (1 % v/v) och EDTA (1 mM).

13. Symbolförklaringar

	Se bruksanvisningen
	Katalognummer
	Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik
	Lotnummer
	Utgångsdatum
	Tillverkare
	Temperaturbegränsning
	Innehåller tillräckligt med material för <n> tester
	Streckkod

14. Referenser

1. Peng Z, Skoog L, Hellborg H, Jonstam G, Wingmo IL, et al. (2014) An expression signature at diagnosis to estimate prostate cancer patients' overall survival. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 17: 81-90.
2. Peng Z, Andersson K, Lindholm J, Bodin I, Pramana S, et al. (2014) Operator dependent choice of prostate cancer biopsy has limited impact on a gene signature analysis for the highly expressed genes IGFBP3 and F3 in prostate cancer epithelial cells. *PLoS One* 9: e109610.
3. Peng Z, Andersson K, Lindholm J, Dethlefsen O, Pramana S, et al (2016) Improving the prediction of prostate cancer overall survival by supplementing readily available clinical data with gene expression levels of IGFBP3 and F3 in formalin-fixed paraffin embedded core needle biopsy material. *PLoS One* 11: e0145545.

15. Kontaktinformation

Prostatype® RT-qPCR Kit tillverkas av:

Prostatype Genomics AB
Industrivägen 19
17148 Solna
Sverige

Om du vill ha mer information eller behöver produktsupport ber vi dig kontakta oss via e-post på adressen info@prostatypegenomics.com eller ringa oss på nummer +46 (0)8-20 87 00.