

März 2017

Handbuch zum AdnaTest OvarianCancerSelect und OvarianCancerDetect



12 (Katalognummer 395442)



12 (Katalognummer 396442)

Zur Anreicherung von Tumorzellen aus dem Vollblut von Patienten mit Ovarialkarzinom und zum Nachweis von Ovarialkarzinom-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen
Für in-vitro-diagnostische Anwendungen
Version 1



395442 (AdnaTest OvarianCancerSelect)
396442 (AdnaTest OvarianCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,
DEUTSCHLAND



1106498DE

Sample to Insight



Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erläuterung	4
Verfahrensprinzip	5
AdnaTest OvarianCancerSelect	5
AdnaTest OvarianCancerDetect	5
Mitgelieferte Materialien.....	7
Kit-Inhalt	7
Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien	9
AdnaTest OvarianCancerSelect.....	9
AdnaTest OvarianCancerDetect	10
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	11
Sicherheitshinweise.....	11
Informationen zur Anwendung	11
Patente.....	11
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	12
Lagerung.....	12
Handhabung	12
Lagerung und Handhabung der Proben.....	13
Probenvorbereitung	13
Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest OvarianCancerSelect.....	15
Protokoll: Nachweis von Ovarialkarzinom-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest OvarianCancerDetect	18

Protokoll: Multiplex- und Duplex-PCR	23
Interpretation der Ergebnisse	26
Fragmentanalyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer	26
Hilfe zur Fehlerbehebung	30
Qualitätskontrolle	30
Anwendungseinschränkungen	30
Leistungsmerkmale	31
Wiederfindung	31
Spezifität	32
Reproduzierbarkeit	32
Präzision	33
Störsubstanzen	33
Störende Umstände	35
Klinische Studien	35
Abkürzungen	36
Symbole	37
Bestellinformationen	38

Verwendungszweck

Der AdnaTest OvarianCancerSelect ist eine Methode der In-vitro-Diagnostik zur immunochemischen Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus antikoagulierten Vollblutproben von Patienten mit Ovarialkarzinom über eine Kombination von epithelialen und tumorassoziierten Antigenen.

Der AdnaTest OvarianCancerDetect ist ein Test für die In-vitro-Diagnostik zur Analyse der Expressionsprofile von Tumorzellen durch reverse Transkription und Multiplex-PCR mit anschließender densitometrischer Analyse der PCR-Produkte mittels automatisierter Kapillarelektrophorese unter Verwendung des Agilent® 2100 Bioanalyzer.

Der AdnaTest OvarianCancerDetect ist nicht für Screening-Zwecke vorgesehen und darf nicht als diagnostischer Test zur Bestätigung des Vorhandenseins eines Ovarialkarzinoms verwendet werden.

Das Produkt darf nur von sachkundigen Personen, z. B. technischen Angestellten und Ärzten, die in der Anwendung molekularbiologischer Techniken geschult sind, verwendet werden.

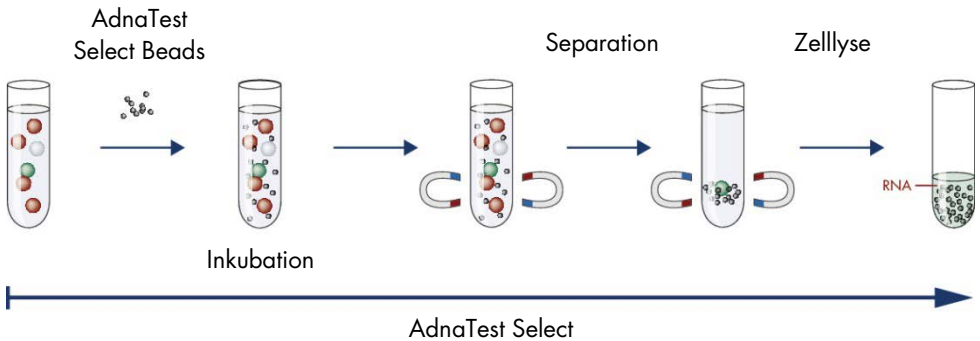
Zusammenfassung und Erläuterung

Der AdnaTest OvarianCancerSelect ermöglicht die immunomagnetische Anreicherung von Tumorzellen über epitheliale und tumorassoziierte Antigene. Der AdnaTest OvarianCancerDetect dient der Analyse von Ovarialkarzinom-assoziiierter Genexpression in immunomagnetisch angereicherten Tumorzellen durch reverse Transkription und PCR.

Verfahrensprinzip

AdnaTest OvarianCancerSelect

Antikörper gegen epitheliale und tumorassoziierte Antigene werden zur Markierung von Tumorzellen in Vollblut mit Magnetpartikeln (Beads) konjugiert. Die markierten Zellen werden mit einem Magnetpartikelkonzentrator (AdnaMag-L und AdnaMag-S) extrahiert und anschließend lysiert (Abbildungen 1 und 2).



- Blutzellen ● Tumorzellen
- ⊛ Antikörper- oder Oligo (dT)₂₅-beschichtete magnetische Beads

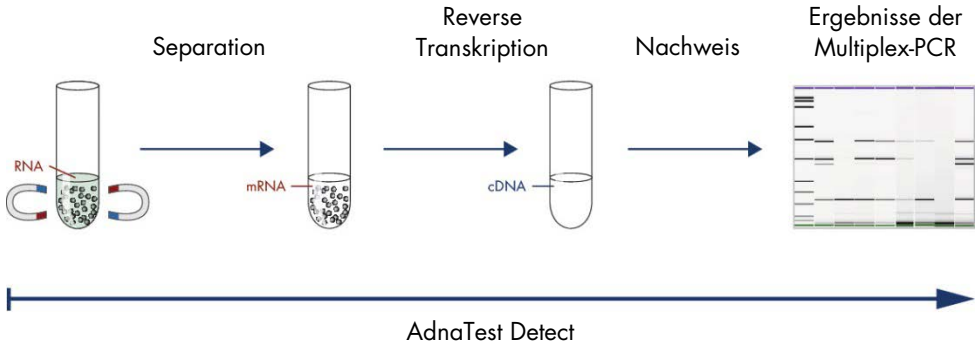
Abbildung 1. AdnaTest OvarianCancerSelect: Immunomagnetische Zellselektion mit mehreren tumorassoziierten Antikörpern.

Das Zellysate wird für die weitere Analyse mit dem AdnaTest OvarianCancerDetect verwendet.

AdnaTest OvarianCancerDetect

Der AdnaTest OvarianCancerDetect enthält Oligo (dT)₂₅-Beads zur Isolierung von mRNA aus dem Lysat der zuvor angereicherten Tumorzellen. Nach reverser Transkription wird cDNA erhalten, die anschließend als Vorlage für den Nachweis und die Charakterisierung von Tumorzellen mittels Multiplex-/Duplex-PCR dient. Das AdnaTest PrimerMix OvarianDetect

ermöglicht die Amplifizierung von drei tumorassoziierten Antigenen und einem Kontrollgen. Das AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect amplifiziert das Excision repair cross-complementing 1 (ERCC1)-Gen sowie ein Kontrollgen.



- Blutzellen ● Tumorzellen
- ⊗ Antikörper- oder Oligo (dT)25-beschichtete magnetische Beads

Abbildung 2. AdnaTest OvarianCancerDetect: Multiplex-PCR unterschiedlicher krebsassoziiierter Tumormarker. In einem zweiten Schritt werden die angereicherten Zellen mittels RT-PCR auf tumorassoziierte Expressionsmuster geprüft. Aus den mRNA-Strängen wird durch reverse Transkription cDNA hergestellt. Anschließend können mehrere assoziierte Tumormarker mittels Multiplex-PCR amplifiziert und visualisiert werden.

Die beiden Primermischungen erzeugen Fragmente folgender Größen:

PrimerMix OvarianDetect

- CA125: 432 BP
- GA733-2: 395 BP
- Muc-1: 299 BP
- Aktin: 120 BP (interne PCR-Kontrolle)

PrimerMix ERCC1-Detect

- ERCC1: 357 BP
- Aktin: 120 BP (interne PCR-Kontrolle)

Hinweis: Die Größe der Fragmente kann leicht variieren. Verwenden Sie bitte für die Zuordnung der detektierten Signale die AdnaTest Positivkontrolle Ovarian und die AdnaTest Positivkontrolle ERCC1.

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

AdnaTest OvarianCancerSelect			
Katalognummer		395442	
Anzahl Tests		12	
Entnahmeröhrchen	Collection Tubes (15 ml) Entnahmeröhrchen (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 x 5
Entnahmeröhrchen	Collection Tubes (1,5 ml) Entnahmeröhrchen (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rot	OvarianSelect Beads	OSB	1,2 ml
Rot	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lyse-/Bindungspuffer)	LBB	2 x 1,2 ml
	Handbuch		1

AdnaTest OvarianCancerDetect			
Katalognummer	396442		
Anzahl Tests	12		
AdnaTest RNA-Reagenzien	Packung 1		
Rot	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (Lyse-/Bindungspuffer)	LBB	2 ml
Orange	Oligo(dT) ₂₅ Beads	OdT	280 µl
Weiß	RNA Purification Buffer A (RNA-Reinigungspuffer A)	BA	4 ml
Weiß	RNA Purification Buffer B (RNA-Reinigungspuffer B)	BB	4 ml
Lila	Tris-HCL Buffer (Tris-HCL-Puffer)	TB	2 ml
AdnaTest OvarianCancerDetect	Packung 2		
Blau	AdnaTest PrimerMix OvarianDetect	PMO	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control (Positivkontrolle) Ovarian (C+)	CONTROL +	56 µl
Blau	AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	PME	144 µl
Orange	AdnaTest Positive Control (Positivkontrolle) ERCC1 (C+)	CONTROL +	56 µl
	Handbuch		1

Die Reagenzien des AdnaTest OvarianCancerDetect reichen für die Analyse von 6 PCR-Kontrollen und 12 Blutproben.

Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

AdnaTest OvarianCancerSelect

Ausrüstung

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (Röhrchenrotator für 15-ml- und 1,5-ml-Röhrchen) (z. B. ELMi Ltd., Kat.-Nr. IMIX-03)
- Magnetpartikel-Konzentratoren
 - AdnaMag-L (Kat.-Nr. 399921)
 - AdnaMag-S (Kat.-Nr. 399911)

Material

- AdnaTubes (Kat.-Nr. 399932) für Arbeiten mit BD Vacutainer® ACD-A-Röhrchen
- Sterile, RNase-freie 10-ml-Glas- oder Kunststoffpipetten oder Pipettor
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsröhrchen) (z. B. Sarstedt, Kat.-Nr. 72.690)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina von 100 µl bis 1000 µl

Reagenzien

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,0–7,3) (z. B. Fisher, Kat.-Nr. VX14190169, D-PBS)

AdnaTest OvarianCancerDetect

Ausrüstung

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (Röhrchenrotator für 1,5-ml-Röhrchen) (z. B. ELMI Ltd., Kat.-Nr. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (Magnetpartikel-Konzentrator AdnaMag-S) (Kat.-Nr. 399911)
- Thermoblock oder Wasserbad (50°C)
- Thermocycler mit heizbarem Deckel und einer Heizrate von 2 °C/Sekunde.
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Material

- Sterile, RNase-freie dünnwandige 0,2-ml-PCR-Röhrchen
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (Sterile, RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsröhrchen) (z. B. Sarstedt, Kat.-Nr. 72.690)
- Pipetten und RNase-freie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zum Pipettieren von Volumina von 1 µl bis 200 µl

Reagenzien

- Sensiscript® RT Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 205211, 50 Reaktionen)
 - **Hinweis:** Das Sensiscript RT Kit (Kat.-Nr. 205211) reicht nur für 25 Proben, weil für jede Reaktion das doppelte Volumen erforderlich ist.
- Rekombinantes RNasin, RNase-Inhibitor, 2,500 U (Promega, Kat.-Nr. N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (QIAGEN, Kat.-Nr. 203443, 250 U)
- Zerstoßenes Eis

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (SDS) entnehmen. Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

Proben- und Testabfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Informationen zur Anwendung

Diese Tests dürfen nur von Fachpersonal, das molekularbiologische Techniken beherrscht, durchgeführt werden.

Patente

AdnaTest OvarianCancerDetect erfordert Lizenzen der Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel. Der Kauf des AdnaTest OvarianCancerDetect berechtigt den Nutzer nicht, die PCR ohne Lizenz durchzuführen.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Lagerung

Das System AdnaTest OvarianCancer wird in drei Packungen geliefert. Der AdnaTest OvarianCancerSelect (Kat.-Nr. 395442) und die AdnaTest RNA Reagent Packung 1 (Packung 1 von Kat.-Nr. 396442) müssen bei 2–8 °C gelagert werden. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Die AdnaTest OvarianCancerDetect Packung 2 (Packung 2 von Kat.-Nr. 396442) mit den AdnaTest Primermischungen und AdnaTest Positivkontrollen müssen separat bei -30 bis -15 °C gelagert werden. Aliquotieren Sie die Primermischung, um eine mögliche Kontamination und wiederholte Temperaturveränderungen zu vermeiden. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Handhabung

- OvarianSelect Beads enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid ist zytotoxisch und muss daher vor der Benutzung der Beads entfernt werden. (Siehe „Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest OvarianCancerSelect“ auf Seite 15.)
- Alle Komponenten und weiteren Reagenzien anderer Lieferanten sind den jeweiligen Anweisungen entsprechend zu lagern. Es gelten die Sicherheitshinweise des jeweiligen Herstellers.
- Tragen Sie Schutzhandschuhe, um Kontaminationen durch DNA, RNA und RNasen zu vermeiden.
- Aliquotieren Sie die OvarianSelect Beads, um eine Kontamination zu vermeiden.

- Bei der Durchführung des Tests müssen die Arbeitsschritte in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt und alle angegebenen Spezifikationen in Bezug auf Inkubationszeiten und -temperaturen eingehalten werden.
- Proben, in denen die zur Selektion verwendeten Beads während der Zellanreicherung agglutinieren, sind zu verwerfen.
- Die Probenverarbeitung, einschließlich reverser Transkription und anschließender Analyse der amplifizierten PCR-Produkte, wenn möglich, in unterschiedlichen Räumen durchführen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Die Verwendung von Produkten anderer Hersteller als den hier genannten kann die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Die Sicherheits- und Hygienevorschriften des Labors (z. B. das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille, Schutzhandschuhen) sind einzuhalten.

Lagerung und Handhabung der Proben

Probenvorbereitung

- Blutproben müssen vor der Anwendung therapeutischer Wirkstoffe entnommen werden. Der AdnaTest OvarianCancerSelect darf frühestens 7 Tage nach der letzten therapeutischen Intervention angewendet werden!
- Blutentnahme: Wenn zum Probentransport weniger als 4 Stunden benötigt werden, Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans (z. B. S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [Kat.-Nr. 01.1605.001]) verwenden und mindestens 7,5 ml Vollblut entnehmen.
- Wenn zum Probentransport mehr als 4 Stunden benötigt werden, BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Kat.-Nr. 366645 [EU]; 364606 [US]) verwenden und mindestens 8,5 ml Vollblut entnehmen. Vor der weiteren Verarbeitung mit dem AdnaTest müssen 5 ml ACD-A-Blut in ein AdnaTube, Kat.-Nr. 399932, überführt werden.
- Blut muss sofort bei 4 °C aufbewahrt werden.

-
- Proben sind so rasch wie möglich zu verarbeiten, jedoch nicht mehr als 4 Stunden nach der Blutentnahme bei Verwendung von Standard-EDTA-Röhrchen oder innerhalb von 30 Stunden bei Verwendung von BD Vacutainer Blutentnahmeröhrchen in Kombination mit AdnaTubes.
 - Die Blutproben dürfen nicht hämolysiert werden.

Protokoll: Anreicherung von Tumorzellen mit dem AdnaTest OvarianCancerSelect

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeitsschritte die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 11), „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 12) und „Lagerung und Handhabung der Proben“ (auf Seite 13).
- Vor der Verwendung der OvarianSelect Beads müssen diese, wie nachfolgend in Abschnitt „Verfahren A: Vorbereitung der OvarianSelect Beads“ beschrieben, gewaschen werden, um Natriumazid zu entfernen.
- Verwenden Sie bitte die mitgelieferten 1,5-ml-Entnahmeröhrchen nur für den angegebenen Arbeitsschritt im Protokoll.

Vorbereitende Schritte

- Sicherstellen, dass der AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf Raumtemperatur erwärmt ist. Falls ein Präzipitat erkennbar ist, die Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen und mischen, bis das Präzipitat vollständig gelöst ist.

Verfahren A: Vorbereitung der OvarianSelect Beads

1. Die OvarianSelect Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren; nicht vortexen!
2. Das Volumen der OvarianSelect Beads, das für die Verarbeitung aller Proben erforderlich ist (100 µl pro Probe) berechnen und das berechnete Volumen in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.

Wenn mehr als 10 Proben verarbeitet werden, zusätzliche 1,5-ml-Reaktionsröhrchen verwenden.

3. Das Röhrchen in den AdnaMag-S stellen.

4. Den Überstand nach 1 Minute mit einer Pipette entfernen.

Hinweis: Bei der Entfernung des Überstandes dürfen die Partikel nicht berührt werden!

5. Waschschritte:

5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.

5b. 1 ml PBS hinzufügen und die Partikel durch wiederholtes Pipettieren resuspendieren.

5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.

5d. Den Überstand nach 1 Minute vollständig mit einer Pipette entfernen.

5e. Die Schritte 5a bis 5d zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschschritte).

6. Das Röhrchen aus dem AdnaMag-S herausnehmen und die Beads in PBS auf das ursprüngliche Volumen (100 µl pro Probe) resuspendieren. Mit „Verfahren B: Selektion von Tumorzellen“ fortfahren unten.

Verfahren B: Selektion von Tumorzellen

1. Bei Verwendung von Standard-EDTA-Röhrchen 5 ml einer Blutprobe in ein 15-ml-Entnahmeröhrchen (mitgeliefert) pipettieren.

Bei Verwendung von ACD-A-Blut in einem BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen 5 ml Blut in ein AdnaTube überführen.

Hinweis: AdnaTubes sind bei Verwendung von BD Vacutainer ACD-A-Röhrchen obligatorisch.

2. Die (in Schritt 6 von Verfahren A vorbereiteten) OvarianSelect Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren und jeder Blutprobe 100 µl dieser Beads zusetzen.

3. Die Röhrchen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Gerät, das sowohl Drehen als auch Neigung ermöglicht, langsam (bei etwa 5 rpm) drehen lassen.

4. Die Röhrchen in den AdnaMag-L ohne den Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des AdnaMag-L am Deckel verbliebene Blutropfen ablösen.

5. Den Magnetschieber einsetzen und die Röhrchen 3 Minuten lang bei Raumtemperatur im AdnaMag-L inkubieren.

6. Den Blutüberstand mit einer 10-ml-Pipette vollständig entfernen, ohne die Beads zu berühren.

Hinweis: Bei der Entfernung des Überstandes dürfen die Partikel nicht berührt werden!

7. Waschschritte:

- 7a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-L herausnehmen.
 - 7b. 5 ml PBS hinzufügen. Die Röhrchen schließen und den AdnaMag-L 5 Mal vorsichtig hin und her schwenken, um die Magnetpartikel/Zellkomplexe zu resuspendieren.
 - 7c. Den AdnaMag-L mit den Röhrchen abwärtsschwingen, um am Deckel verbliebene Tropfen abzulösen.
 - 7d. Den Magnetschieber in den AdnaMag-L einsetzen und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren.
 - 7e. Den Überstand mit einer Pipette vollständig entfernen.
 - 7f. Die Schritte 7a bis 7e zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschschritte).
8. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-L herausnehmen.
9. Die Magnetpartikel/Zellkomplexe in 1 ml PBS resuspendieren und jede Probe in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.
10. Die Reaktionsröhrchen in den AdnaMag-S mit eingeschobenem Magnetschieber stellen.
- Hinweis:** Der Magnetschieber des AdnaMag-S kann in zwei unterschiedlichen Positionen eingesetzt werden. Den Magnetschieber immer mit nach vorn gerichteter weißer Kunststoffolie einsetzen, damit sich die Magnete nahe an den Reaktionsröhrchen befinden.
11. Den Überstand nach 1 Minute vollständig mit einer Pipette entfernen, um die anschließende Zellyse zu optimieren.
12. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
13. Jedem Reaktionsröhrchen 200 µl AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer (auf Raumtemperatur erwärmt) zusetzen. Durch mindestens fünfmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
14. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen und für 1 Minute inkubieren.
15. Jeden einzelnen Überstand (Zellysate) in ein neues 1,5-ml-Reaktionsröhrchen überführen.
16. Die Röhrchen mit den Beads verwerfen.
17. Umgehend mit der mRNA-Isolierung fortfahren (siehe „Protokoll: Nachweis von Ovarialkarzinom-assoziierten Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest OvarianCancerDetect“, auf Seite 18) oder die Zellysate bei -20 °C nicht länger als 2 Wochen lang lagern.

Protokoll: Nachweis von Ovarialkarzinom-assoziierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen mit dem AdnaTest OvarianCancerDetect

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 11) und „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 12).
- Die Isolierung von mRNA und die reverse Transkription sind in Verfahren A bis C beschrieben.
- Verwenden Sie bitte die mitgelieferten 1,5-ml-Entnahmeröhrchen nur für den angegebenen Arbeitsschritt im Protokoll.

Vorbereitende Schritte

- Sicherstellen, dass der AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf Raumtemperatur erwärmt ist. Falls ein Präzipitat erkennbar ist, die Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmen und mischen, bis das Präzipitat vollständig gelöst ist.
- RNA-Reinigungspuffer A und RNA-Reinigungspuffer B auf Raumtemperatur erwärmen. Tris-HCL-Puffer auf Eis stellen.
- Den 10x Puffer RT und die dNTPs aus dem Sensiscript RT Kit bei Raumtemperatur auftauen lassen. Auf dem Vortexmischer mischen. Kurz zentrifugieren und auf Eis stellen. RNase-freies Wasser (Bestandteil des Sensiscript RT Kits) auftauen lassen.
- Einen Thermoblock oder ein Wasserbad auf 50 °C vorheizen.

Verfahren A: Vorbereitung der Oligo(dT)₂₅ Beads

1. Die Oligo(dT)₂₅ Beads durch Pipettieren vollständig resuspendieren. Nicht vortexen!
2. Das für die Verarbeitung aller Proben erforderliche Bead-Volumen (20 µl pro Probe plus 10 %) berechnen und das berechnete Volumen in ein RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (nicht mitgeliefert) überführen.
3. Das Röhrchen in den AdnaMag-S stellen.
Hinweis: Der Magnetschieber des AdnaMag-S kann in zwei unterschiedlichen Positionen eingesetzt werden. Den Magnetschieber immer mit nach vorn gerichteter weißer Kunststoffolie einsetzen, damit sich die Magnete nahe an den Reaktionsröhrchen befinden.
4. Den Überstand nach 1 Minute mit einer Pipette entfernen.
5. Waschschritte:
 - 5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
 - 5b. Das ursprüngliche Volumen (Schritt 2 auf Seite 19) AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer hinzufügen und die Beads durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren. Vorsichtig resuspendieren, um Schaumbildung zu vermeiden.
 - 5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
 - 5d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
 - 5e. Die Schritte 5a bis 5d einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
6. Das Röhrchen aus dem AdnaMag-S herausnehmen und die Beads in AdnaTest Lyse-/Bindungspuffer auf das ursprüngliche Volumen resuspendieren (Schritt 2 auf Seite 19). Mit „Verfahren B: mRNA-Isolierung“ fortfahren.

Verfahren B: mRNA-Isolierung

1. 20 µl Oligo(dT)₂₅ Beads (Schritt 6, oben) in jedes Röhrchen mit Zelllysate geben (Schritt 15 auf Seite 17).
2. Die Röhrchen 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Gerät, das sowohl Drehen als auch Neigung ermöglicht, langsam (bei etwa 5 rpm) drehen lassen.
3. Die Röhrchen in den AdnaMag-S stellen ohne den Magnetschieber stellen. Durch Abwärtsschwingen des AdnaMag-S am Deckel verbliebene Beads und Flüssigkeit ablösen.

4. Den Magnetschieber einsetzen und den Überstand nach 1 Minute entfernen.
5. Waschschritte 1:
 - 5a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
 - 5b. Jedem Röhrchen 100 µl RNA-Reinigungspuffer A zusetzen und die Beads durch mehrmaliges Pipettieren resuspendieren. Um einen Verlust an Beads zu verhindern, den Deckel und die Röhrchenwand gründlich spülen.
 - 5c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
 - 5d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
 - 5e. Die Schritte 5a bis 5d einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
6. Waschschritte 2
 - 6a. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
 - 6b. Jedem Röhrchen 100 µl RNA-Reinigungspuffer B zusetzen. Die Beads durch Pipettieren resuspendieren und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsröhrchen (mitgeliefert) überführen.
 - 6c. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
 - 6d. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen. Bei diesem Schritt ist Vorsicht geboten (das Pellet im Auge behalten), da die Beads abrutschen und versehentlich mit entfernt werden können.
 - 6e. Die Schritte 6a bis 6d in denselben Reaktionsröhrchen einmal wiederholen (insgesamt zwei Waschschritte).
7. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
8. Jedem Röhrchen 100 µl eiskalten Tris-HCL-Puffer zusetzen und die Beads durch Pipettieren resuspendieren.
9. Den Magnetschieber in den AdnaMag-S einsetzen.
10. Nach 1 Minute den Überstand vollständig entfernen.
11. Den Magnetschieber aus dem AdnaMag-S herausnehmen.
12. Den mRNA/Bead-Komplex in 29,5 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren.
13. Die Röhrchen in einen Thermoblock oder in ein Wasserbad überführen und 5 Minuten lang bei 50 °C inkubieren.
14. Die Röhrchen sofort mindestens 2 Minuten lang auf Eis stellen.

15. Umgehend (innerhalb von 5 Minuten) mit der reversen Transkription fortfahren (Verfahren C: Reverse Transkription mit dem Sensiscript RT Kit).

Der mRNA/Bead-Komplex darf nicht gelagert werden!

Verfahren C: Reverse Transkription mit dem Sensiscript RT Kit

1. Den RT Master Mix auf Eis vorbereiten. Die Herstellung des RT Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 1.

Das Volumen des RT Master Mix sollte 10 % größer als das Volumen sein, das für die Gesamtzahl der Reaktionen mit reverser Transkription berechnet wurde. Es muss stets ein Reaktionsansatz ohne Zugabe von mRNA als Negativkontrolle (RT-Kontrolle) vorbereitet werden.

2. Den RT Master Mix vortexen. Kurz zentrifugieren und 10,5 µl pro Reaktion in 0,2-ml-PCR-Röhrchen pipettieren.

3. Die mRNA/Bead-Komplexe (Schritt 10 auf Seite 20) vorsichtig mit einer Pipette resuspendieren. Das gesamte Volumen in das 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen mit dem RT Master Mix überführen. Durch wiederholtes Pipettieren gründlich mischen.

Tabelle 1. Reverse Transkription – Reaktionsschema

Komponente	Volumen
RT Master Mix	
10x Puffer RT	4,0 µl
dNTP Mix (jeweils 5 mM dNTP)	4,0 µl
RNase-Inhibitor, 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript Reverse Transkriptase	2,0 µl
RNA-Vorlage*	29,5 µl
mRNA/Bead-Komplex oder RNase-freies Wasser	
Gesamtvolumen	40,0 µl

* Als RT-Kontrolle 29,5 µl RNase-freies Wasser anstelle des mRNA/Bead-Komplexes hinzufügen. Das Volumen des mRNA/Bead-Komplexes kann leicht variieren. Verwenden Sie stets das gesamte Volumen für die Reverse-Transkription-Reaktion.

4. Die cDNA-Synthese erfolgt in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Reverse Transkription – Programm

Schritt	Dauer	Temperatur
Reverse Transkription	60 Minuten	37 °C
Denaturierung	5 Minuten	93 °C
Abkühlung	∞	4 °C

5. Die Reaktionsröhrchen mit der cDNA auf Eis stellen oder maximal 4 Wochen lang bei -20 °C lagern.

6. Mit „Protokoll: Multiplex- und Duplex-PCR“ auf Seite 23 fortfahren.

Protokoll: Multiplex- und Duplex-PCR

Wichtiger Hinweis, der vor der Durchführung zu beachten ist

- Lesen Sie vor Beginn der Arbeit die Abschnitte „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 11) und „Lagerung und Handhabung der Reagenzien“ (auf Seite 12).

Vorbereitende Schritte

- HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), AdnaTest PrimerMix OvarianDetect, AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect, AdnaTest Positivkontrolle Ovarian, AdnaTest Positivkontrolle ERCC1 und RNase-freies Wasser auftauen. Vortexen, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen.

Verfahren A: Multiplex-PCR (AdnaTest OvarianDetect)

1. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 3.

Das Volumen des PCR Master Mix sollte mindestens 10 % größer sein als das berechnete, für die Probenzahl erforderliche Volumen. Es müssen stets eine AdnaTest Positivkontrolle Ovarian, RNase-freies Wasser als Negativkontrolle und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.

2. Pro Ansatz 42,0 µl des PCR Master Mix in ein 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen pipettieren. Die cDNA/Bead-Mischung durch Pipettieren resuspendieren und 8,0 µl davon in jedes Reaktionsröhrchen geben.

Hinweis: Als Negativkontrolle 8,0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzufügen.

Tabelle 3. Vorbereitung der Multiplex-PCR

Komponente	Volumen
Multiplex PCR Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
RNase-freies Wasser	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix OvarianDetect	4,0 µl
cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder AdnaTest Positivkontrolle Ovarian, jeweils:	8,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

3. Für die PCR wird ein Thermocycler gemäß dem in Tabelle 4 beschriebenen Programm verwendet. Für den Thermocycler eine Heizrate von 2 °C/Sekunde auswählen. Die Durchführung der PCR umfasst insgesamt 37 Zyklen.

Tabelle 4. Programm der PCR-Zyklen

Schritt	Dauer	Temperatur
Anfänglicher Aktivierungsschritt	15 Minuten	95 °C
3-Schritt-Zyklus		
Denaturierung	30 Sekunden	94 °C
Annealing	30 Sekunden	58 °C
Verlängerung	30 Sekunden	72 °C
Abschließende Verlängerung	10 Minuten	72 °C
Abkühlung	∞	12 °C

Verfahren B: Duplex-PCR (AdnaTest ERCC1-Detect)

1. Die Herstellung des PCR Master Mix für die entsprechende Anzahl an Proben erfolgt gemäß Tabelle 5.

Das Volumen des Master Mix sollte mindestens 10 % größer sein als das berechnete, für die Probenzahl erforderliche Volumen. Es müssen stets eine AdnaTest Positivkontrolle ERCC1, RNase-freies Wasser als Negativkontrolle und die RT-Kontrolle mitgeführt werden.

2. Pro Ansatz 42,0 µl des Master Mix in ein 0,2-ml-PCR-Reaktionsröhrchen pipettieren.
Die cDNA/Bead-Mischung durch Pipettieren resuspendieren und 8,0 µl davon in jedes Reaktionsröhrchen geben.

Hinweis: Als Negativkontrolle 8,0 µl RNase-freies Wasser anstelle von cDNA hinzufügen.

Tabelle 5. Vorbereitung der Duplex-PCR

Komponente	Volumen
Duplex PCR Master Mix	
HotStarTaq Master Mix	25,0 µl
RNase-freies Wasser	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ERCC1-Detect	4,0 µl
cDNA oder RT-Kontrolle oder Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) oder AdnaTest Positivkontrolle ERCC1, jeweils:	8,0 µl
Gesamtvolumen	50,0 µl

3. Für die PCR wird ein Thermocycler gemäß dem in Tabelle 6 beschriebenen Programm verwendet. Für den Thermocycler eine Heizrate von 2 °C/Sekunde auswählen. Die Durchführung der PCR umfasst insgesamt 35 Zyklen.

Tabelle 6. Programm der PCR-Zyklen

Schritt	Dauer	Temperatur
Anfänglicher Aktivierungsschritt	15 Minuten	95 °C
3-Schritt-Zyklus		
Denaturierung	30 Sekunden	94 °C
Annealing	30 Sekunden	60 °C
Verlängerung	60 Sekunden	72 °C
Abschließende Verlängerung	10 Minuten	72 °C
Abkühlung	∞	12 °C

Interpretation der Ergebnisse

Fragmentanalyse mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker

Die Analyse erfolgt mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker (Agilent Technologies) auf einem DNA 1000 LabChip®. Befolgen Sie die Anleitungen im Handbuch des DNA 1000 LabChip und stellen Sie sicher, dass keine Beads in den Chip gelangen. Im Gel befindliche Magnetpartikel können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

1. Die Bioanalytiker-Software „2100 expert“ starten. Wählen Sie unter **Contexts Instrument** und klicken Sie auf die Schaltfläche **Assay** neben **Assay Selection**.
2. Wählen Sie **Electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy**. Bereiten Sie den Chip vor und starten Sie den Lauf.
3. Stellen Sie für die Auswertung der Ergebnisse die Detektionsgrenze wie folgt ein:
 - 3a. Wählen Sie unter **Contexts Data** und klicken Sie anschließend auf die Registerkarte **Assay Properties**. Wählen Sie im Drop-down-Menü auf der rechten Seite **Global** und **Normal**.
 - 3b. Wählen Sie **Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)** und setzen Sie diesen Wert auf **0** (der vorgegebene Wert ist **20**), um alle Signale zu erfassen.

Analyse der mit dem AdnaTest OvarianDetect erhaltenen Ergebnisse

Der Test wird positiv gewertet, wenn ein PCR-Fragment mindestens eines Tumor-assoziierten Transkripts (GA733-2, Muc-1 oder CA125) eindeutig nachgewiesen wird.

Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalytiker sind Peaks mit einer Konzentration von $\geq 0,15 \text{ ng}/\mu\text{l}$ positiv (Abbildung 3).

Das Fragment des Kontrollgens Aktin muss in allen getesteten Proben nachweisbar sein (interne PCR-Kontrolle). Ein Aktin-Signal stellt eine Positivkontrolle für eine erfolgreiche Zellseparation, reverse Transkription und Multiplex-PCR dar. Die Negativkontrolle und RT-Kontrollproben dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

Ein Fragment mit einer Größe von mehr als 1000 BP deutet auf eine Kontamination mit genomischer DNA hin, was auf Probleme bei der Zellseparation hindeutet. In diesem Fall sind die Ergebnisse ungültig.

WICHTIG: Wird das Protokoll nicht ganz genau befolgt, kann dies zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.

Wenn Sie Unterstützung bei der Interpretation von Ergebnissen benötigen, hilft Ihnen unser Support-Team gerne weiter.

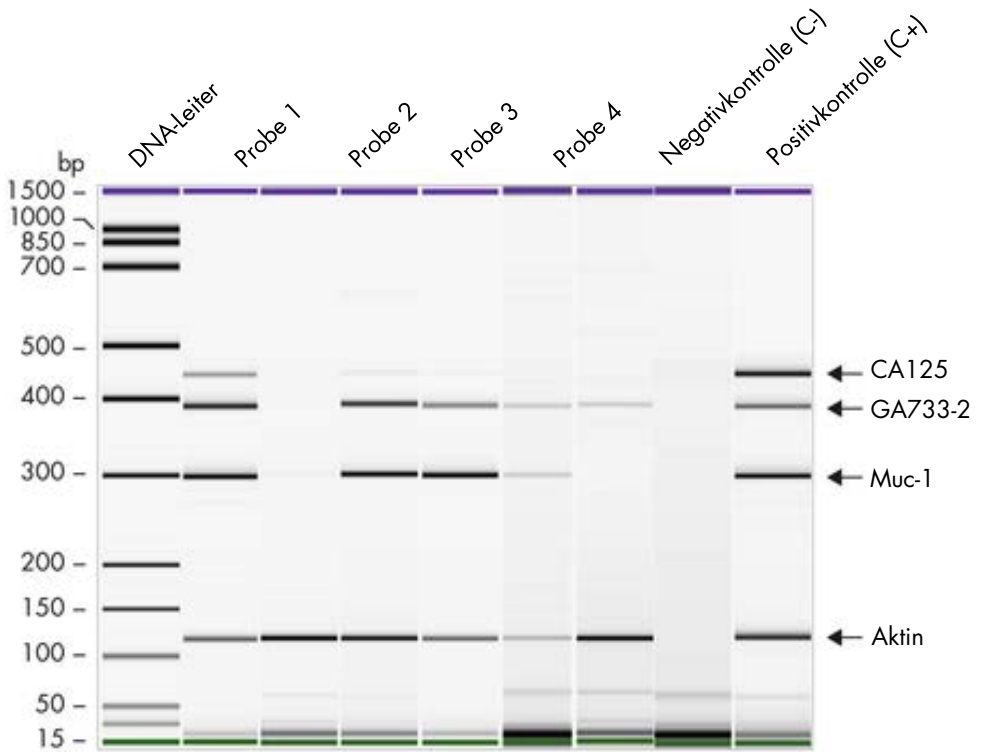


Abbildung 3. Ergebnisse des AdnaTest OvarianCancerDetect für mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer analysierte Multiplex-PCR-Proben. Die erste Spur zeigt den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Probe 1 ist positiv auf GA733-2, Muc-1 und CA125; die Proben 3, 4 und 5 sind positiv auf GA733-2 und Muc-1; Probe 6 ist positiv auf GA733-2. Probe 2 ist negativ. Aktin ist in den Proben 1 bis 6 nachweisbar. Die PCR-Negativkontrolle und die Positivkontrolle sind in den beiden letzten Spuren zu sehen.

Analyse der Ergebnisse des AdnaTest ERCC1-Detect

Bei Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzer sind Peaks mit einer Konzentration von $\geq 0,2$ ng/ μ l positiv auf ERCC1 (Abbildung 4).

Das Fragment des Kontrollgens Aktin muss in allen getesteten Proben nachweisbar sein (interne PCR-Kontrolle). Ein Aktin-Signal stellt eine Positivkontrolle für eine erfolgreiche Zellseparation,

reverse Transkription und Duplex-PCR dar. Die Negativkontrolle und die RT-Kontrollproben dürfen keine Banden enthalten, die größer sind als 80 Basenpaare (Primerdimere).

WICHTIG: Wird das Protokoll nicht ganz genau befolgt, kann dies zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.

Wenn Sie Unterstützung bei der Interpretation von Ergebnissen benötigen, hilft Ihnen unser Support-Team gerne weiter.

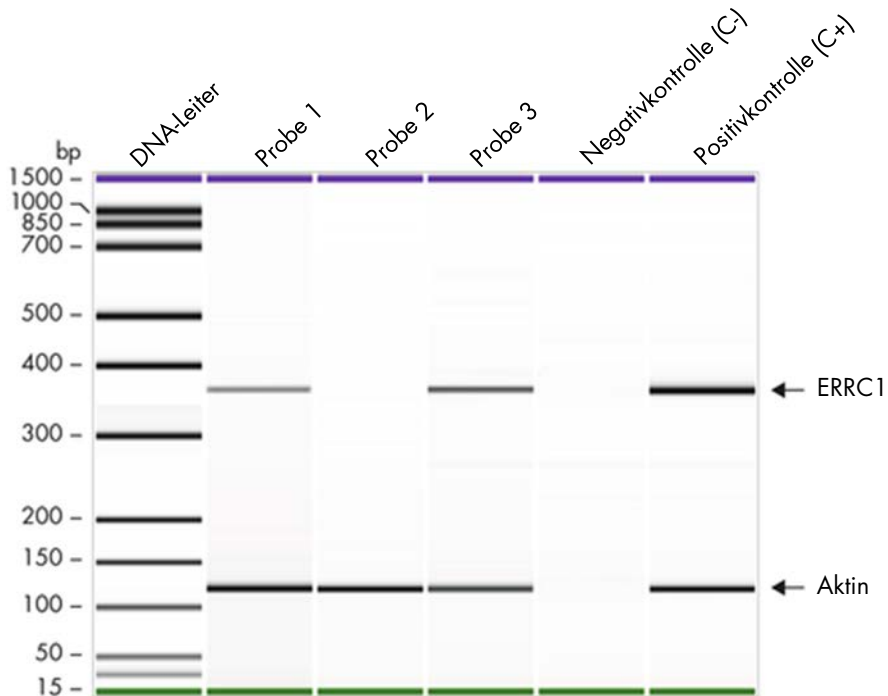


Abbildung 4. Ergebnisse des AdnaTest OvarianCancerDetect für Duplex-PCR-Proben. Die erste Spur zeigt den DNA-Größenstandard (DNA-Leiter). Proben 1 bis 3 sind positiv auf ERCC1. Probe 2 ist negativ. Aktin ist in den Proben 1 bis 3 nachweisbar. Die PCR-Negativkontrolle und die Positivkontrolle (ERCC1) sind in den beiden letzten Spuren zu sehen.

Hilfe zur Fehlerbehebung

Informationen dazu finden Sie auf der Seite „Frequently Asked Questions“ unseres technischen Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Darüber hinaus stehen die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler beim QIAGEN Technischen Service unterstützend zur Seite, falls Sie Fragen zu den Informationen und/oder Protokollen in diesem Handbuch oder zu den für die Proben und Tests verwendeten Methoden haben sollten (Kontaktinformationen siehe unter www.qiagen.com).

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge von AdnaTest OvarianCancerSelect und AdnaTest OvarianCancerDetect nach festgelegten Prüfkriterien kontrolliert, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Anwendungseinschränkungen

Alle Reagenzien dürfen ausschließlich zur In-vitro-Diagnostik verwendet werden.

Die Anwendung darf nur durch Personal erfolgen, das speziell in In-vitro-Diagnostik-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

Der Bediener muss die Gebrauchsanleitung vor der Anwendung des Systems sorgfältig durchlesen.

Zur Gewährleistung optimaler PCR-Ergebnisse muss die Gebrauchsanleitung genau befolgt werden.

Die Verfallsdaten, die auf den Packungen und Etiketten aller Komponenten aufgedruckt sind, sind zu überprüfen. Die Komponenten dürfen nur bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Alle diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.

Leistungsmerkmale

Wiederfindung

Blutproben von gesunden Spendern wurden mit zwei und 5 kultivierten Igrov1-Ovarialkarzinomzellen versetzt (gespikt), um die mit dem AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect erzielten Wiederfindungsraten zu ermitteln (Tabelle 7).

Tabelle 7. AdnaTest OvarianCancer – Wiederfindungsrate von Tumorzellen, die Blutproben gesunder Spender zugesetzt wurden

	Gesamtzahl der Proben	Anzahl Positivproben	Wiederfindung
Zusatz von zwei Tumorzellen zu 5 ml Blut	20	18	90 %
Zusatz von fünf Tumorzellen zu 5 ml Blut	20	20	100 %

Die Wiederfindungsrate für den Nachweis von 2 Tumorzellen, die 5 ml Blut von gesunden Spendern zugesetzt wurden, beträgt 90 %. Die Wiederfindungsrate für den Nachweis von 5 Zellen, die 5 ml Blut von gesunden Spendern zugesetzt wurden, beträgt 100 %.

Spezifität

Mithilfe des AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect wurden 20 gesunde Spender analysiert, um die Rate falsch positiver Ergebnisse bei dem vorgegebenen Schwellenwert (Konzentration von 0,15 ng/µl Fragment für jedes untersuchte Genprofil, mit Ausnahme von Aktin) zu ermitteln. Der AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect zeigte eine Spezifität von 95 % (Tabelle 8).

Tabelle 8. Bestimmung der Spezifität

Kontrollen	Gesamtzahl der Proben	Anzahl falsch positiver Proben	Spezifität (%)
Gesunde Spender	20	1 (5 %)	95

Reproduzierbarkeit

Zwanzig Blutproben von gesunden Spendern wurden mit 10 Igrov1-Ovarialkarzinomzellen pro Probe versetzt. Die Blutproben wurden zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von zwei Bedienern mit dem AdnaTest OvarianCancerSelect/Detect analysiert. Die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit betragen 100 % (Tabelle 9).

Tabelle 9. Reproduzierbarkeit des AdnaTest OvarianCancer Select/Detect

Bediener	Positive AdnaTest-Ergebnisse/Proben	Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (%)	Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden Aliquots von cDNA gepoolt und mit dem AdnaTest OvarianCancerDetect analysiert. Zwei Bediener führten jeweils 3 unabhängige Messungen von 10 cDNA-Proben durch, d. h. insgesamt 30 Messungen. Die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Präzision betragen 100 % (Tabelle 10).

Tabelle 10. Genauigkeit des AdnaTest OvarianCancerDetect

Bediener	Positive AdnaTest-Ergebnisse/Proben	Intra-Assay-Reproduzierbarkeit (%)	Inter-Assay-Reproduzierbarkeit (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Störsubstanzen

Antikoagulantien

Die Entnahme und der Transport von Blut erfordern die Verwendung von Antikoagulantien. Heparin und Citrat führen jedoch nach Zugabe der immunomagnetischen Beads von AdnaTests zur Bildung von Aggregaten, was dazu führen kann, dass keine oder fehlerhafte Testergebnisse erhalten werden. EDTA und ACDA (Citrat/Dextrose/Adeninlösung A) sind hingegen mit den immunomagnetischen Beads von AdnaTests kompatibel.

Hämolyse

Eine Hämolyse in Blutproben (rot erscheinende Plasmafraktion) ist in den meisten Fällen auf unsachgemäße Transport- oder Lagerungsbedingungen zurückzuführen. Derartige Proben können falsch negative Ergebnisse liefern und sind zu verwerfen.

Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien und Antihormontherapien

Chemotherapeutika (Taxane, Cisplatin, Oxaliplatin, 5-FU, Anthracyclin, Irinotecan usw.) sind starke Zytotoxine, deren Anwesenheit in Blutproben zu Zellschädigungen oder schnellem Zelltod führen. Daher besteht bei Verwendung der immunomagnetischen Beads von AdnaTests eine hohe Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse. Nach der Verabreichung dieser Wirkstoffe benötigt der menschliche Körper für deren Entgiftung etwa 5 bis 7 Tage (Tabelle 11). Für Blutproben, die während dieses Zeitraums entnommen werden, dürfen keine immunomagnetischen Beads von AdnaTests verwendet werden.

Tabelle 11. Halbwertszeiten von Chemotherapeutika

Wirkstoff	Halbwertszeit	Literatur
5-Fluouracil	Bis zu 20 Minuten	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetaxel	Bis zu 11,1 Stunden	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cis-Platin	Bis zu 30 Minuten	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Carboplatin	Bis zu 5,9 Stunden	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paclitaxel	Ungefähr 25,4 Stunden	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Die gleiche Vorsichtsmaßnahme wird auch für zielgerichtete Therapieregime wie Antikörper (Herceptin®, Bevacizumab, Cetuximab etc.), Tyrosinkinaseblocker (Olaparib, Iressa®, Erbitux®, Lapatinib usw.) und Antihormontherapien (Tamoxifen, Abirateron, Enzalutamid usw.) empfohlen, wenn diese als Einzelwirkstoffe oder in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht werden.

In klinischen Studien zum Nachweis des prognostischen Werts von zirkulierenden Tumorzellen (CTC), die mit immunomagnetischen Beads von AdnaTests identifiziert und charakterisiert wurden, wurden keine Störungen durch Chemotherapeutika, zielgerichtete Therapien oder Antihormontherapien beobachtet, vorausgesetzt die Wartezeit von mindestens 7 Tagen nach der Verabreichung der Therapie wurde eingehalten. Darüber hinaus wird auf eine mögliche, jedoch nicht wahrscheinliche Beeinträchtigung durch häufig verwendete Begleitmedikationen (Aspirin, Ibuprofen, Aprepitant, Steroide usw.) geachtet.

Störende Umstände

Blutgerinnung

Im Zusammenhang mit klinischen Studien kam es nach der Inkubation mit den immunomagnetischen Beads des AdnaTest zur Blutgerinnung, und zwar am häufigsten bei Patienten in einem späten Krankheitsstadium. Blutproben, in denen Blutgerinnung erkennbar ist, sind während des AdnaTest-Arbeitsablaufs aufgrund der erhöhten Viskosität schwierig zu verarbeiten und schwer zu pipettieren. Diese Proben enthalten ebenfalls eine inakzeptabel hohe Zahl kontaminierter Leukozyten, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. Derartige Proben sind zu verwerfen.

Benigne organische und chronisch-entzündliche Erkrankungen

Eine benigne organische Erkrankung und chronische Entzündung wie z. B. Arthritis, benigne Hyperplasie der Ovarien, Morbus Crohn usw. führen nicht zu falsch positiven AdnaTest-Ergebnissen.

Akute Allergie

Bei akuten allergischen Reaktionen ist die Zahl kontaminierter Leukozyten nach der CTC-Anreicherung mit den immunomagnetischen Beads von AdnaTests erhöht. Daher können falsch positive Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Klinische Studien

Die AdnaTests OvarianCancerSelect/Detect wurden in einer klinischen Studie verwendet, deren Ergebnisse im Oktober 2014 in *Clinical Chemistry* publiziert wurden. Dieses Ovarialkarzinom-Testkit verwendet mit anti-EpCAM und anti-MUC1 markierte magnetische Beads zur CTC-Anreicherung, auf die eine Analyse der Überexpression von EpCAM, MUC1, CA125 und ERCC1 mittels RT-PCR folgt. In dieser Studie standen bei der Primärdiagnose Blutproben von 147 Patienten zur Verfügung. CTC wurden bei 14 % der Patienten nachgewiesen und stellten einen relevanten Prognosefaktor für das Gesamtüberleben dar (OS; $p = 0,041$). Darüber hinaus

korrelierten ERCC1-positive CTC, die bei 8 % der Patienten nachgewiesen wurden, signifikant mit dem krankheitsfreien Überleben (disease-free survival; DFS: $p = 0,009$) und dem Gesamtüberleben (OS: $p = 0,026$). Diese Studie belegte vor allem eindeutig, dass ERCC1-positive CTC ein unabhängiger Prädiktor der Resistenz gegen platinbasierte Therapieschemata sind ($p = 0,01$). Überraschenderweise wurde diese Korrelation nur für die mittels AdnaTest vorgenommene molekulare CTC-Charakterisierung, jedoch nicht für die immunhistochemische (IHC) Gewebefärbung unter Verwendung des 8F1-Antikörpers, der gewöhnlich für den Nachweis von ERCC1 in Geweben verwendet wird, nachgewiesen.

Literatur

Kuhlmann, J.D. et al. (2014) ERCC1-Positive Tumor Cells in the Blood of Ovarian Cancer Patients as a Predictive Biomarker for Platinum Resistance. *Clin. Chem.* **60**, 1282–9.

Abkürzungen

AdnaMag-L	Magnetpartikel-Konzentrator (-groß)
AdnaMag-S	Magnetpartikel-Konzentrator (-klein)
BP	Basenpaare
C+	Positivkontrolle
C-	Negativkontrolle
CA125	Krebsantigen 125
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ERCC1	Excision repair cross-complementing 1
GA733-2	Gastrointestinaltumor-assoziiertes Antigen 733-2
kb	Kilobasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Muc-1	Muc-1-Gen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription

Symbole



Kit enthält Reagenzien für <N> Tests.



Verwendbar bis



Zulässiger Temperaturbereich



Katalognummer



Gebrauchsanweisung beachten



Hersteller



In-vitro-Diagnostikum



Materialnummer



Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
AdnaTest OvarianCancerSelect	Zur Isolierung von CTC und anschließender Extraktion von mRNA aus humanem Vollblut für 12 Zubereitungen	395442
AdnaTest OvarianCancerDetect	RT-PCR-Kit zum Nachweis von Ovarialkarzinom-assoziiierter Genexpression in angereicherten Tumorzellen	396442
Verwandte Produkte		
AdnaTube	12 Probenröhrchen mit EDTA. Nur mit antikoaguliertem Blut verwenden, das in A-CDA-Blutentnahmeröhrchen von BD entnommen wurde	399932
AdnaMag-L	Für 8 Röhrchen, 15 ml	399921
AdnaMag-S	Für 8 Röhrchen, 1,5 ml	399911
Sensiscrypt RT Kit (50)	Für 50 Reverse-Transkription-Reaktionen: * Sensiscrypt Reverse Transkriptase, 150 µl 10x Puffer RT, 100 µl dNTP Mix (enthält 5 mM von jedem dNTP), 1,1 ml RNase-freies Wasser	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	3 x 0,85 ml HotStarTaq Master Mix (enthält 250 Einheiten HotStarTaq DNA Polymerase, PCR-Puffer mit 3 mM MgCl ₂ und 400 µM von jedem dNTP) und 2 x 1,7 ml RNase-freies Wasser	203443

* Das Sensiscrypt RT Kit (50) reicht bei Verwendung des AdnaTest OvarianCancerDetect nur für 25 Proben, weil für jede Reaktion das doppelte Volumen erforderlich ist.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN Kits finden Sie im Internet unter www.qiagen.com oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für AdnaTest OvarianCancerSelect und AdnaTest OvarianCancerDetect

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Nutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Kit mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Kits gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Kits gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten Protokollen sowie zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Kit und/oder die mit diesem Kit durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Kit und seine Komponenten sind für den einmaligen Gebrauch lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, aufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Nutzer des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, HotStarTaq®, Sensiscript® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC, eine hundertprozentige Tochtergesellschaft von 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-2344-001 © 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com