



Návod k použití

# Epi proColon 2.0 CE

Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)

Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)

Epi proColon Control Kit (M5-02-003)

Před použitím si pozorně prostudujte návod a řiďte se jeho pokyny, abyste dosáhli požadovaných výsledků.



IFU 0009CZ, rev 6, copyright©, září 2014, Epigenomics AG



M5-02-001, M5-02-002, M5-02-003



Epigenomics AG, Geneststr.5

10829 Berlin, Germany

epigenomics

## 1. Název a účel použití

Epi proColon 2.0 CE je kvalitativní esej pro detekci metylované a bisulfidicky konvertované DNA genu Septin9 ze vzorků lidské plazmy. Přítomnost metylovaného genu Septin9 je asociována s přítomností kolorektálního karcinomu a může pomoci při jeho detekci.

Epi proColon 2.0 CE se skládá z Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) a Epi proColon Control Kit (M5-02-003).

## 2. Shrnutí a vysvětlení

Epi proColon 2.0 CE je *in vitro* esej na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR) pro kvalitativní stanovení metylované DNA genu Septin9 izolované z 3.5 ml plazmy pacienta. Cytozinová residua v oblasti v2 genu Septin9 jsou metylována ve tkáni s kolorektálním karcinomem (CRC), ale nikoliv ve zdravé sliznici tračniku. Tato aberantní metylace může být specificky amplifikována z DNA přítomné v krevním řečišti. Detekce CRC metylované DNA biomarkeru Septin9 v plazmě byla demonstrována řadou kontrolních studií u CRC pacientů a kolonoskopicky ověřených negativních kontrolních pacientů<sup>1-3</sup>. Krevní test Epi proColon 2.0 CE nabízí pacientům, kteří v současné době odmítají skríninkovou kolonoskopii, přijatelnou neinvazivní alternativu skríninkového testu na CRC.

## 3. Principy testu

Epi proColon 2.0 CE je dvoustupňová metoda. V prvním kroku je izolace a purifikace DNA z plazmy, následována bisulfidickou konverzí kitem Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001). Ve druhém kroku je pak bisulfidicky konvertovaná DNA (bisDNA) amplifikována v duplexní PCR soupravou Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002). Souprava detekuje jak metylovanou DNA genu Septin9, tak i DNA genu aktin B (ACTB), který slouží jako vnitřní kontrola kvality DNA. Kontrolní DNA, které jsou součástí soupravy Epi proColon Control Kit (M5-02-003) je nutno zahrnout jako pozitivní a negativní kontrolu při každém experimentu.

Izolace DNA z plazmy pacienta je založená na přítomnosti volně cirkulující DNA a jejím navázání na magnetické částice, které jsou pak z plazmy odseparovány. Zbývající nečistoty jsou pak z magnetických částic odstraněny během promývacích kroků. V elučním kroku je pak purifikovaná DNA odstraněna z magnetických částic elučním pufrem. Získaná DNA je pak podrobena chemické reakci, která specificky mění nemetylovaná cytozinová residua v DNA. Bisulfidická konverze je používána jako jedna z metod při analýze metylace DNA. Konverze je založena na nukleofilní adici bisulfidového iontu na cytozinový nukleotid a následnou deaminační reakci, která vede ke vzniku uracil sulfonátu, zatímco metylovaný cytozin (5-metyl cytozin) nepodléhá deaminační reakci a zůstává nezměněn.

Blokátory a sondy používané v následné PCR reakci rozlišují mezi metylovanými a nemetylovanými sekvencemi. Epi proColon 2.0 CE detekuje bisDNA sekvence obsahující metylovaná CpG místa uvnitř v2 oblasti genu Septin9 a celkovou bisDNA oblasti genu ACTB. Oblast genu Septin9 se skládá z oblastí chudých na CpG dinukleotidy. Přidaný blokátor specifický pro konvertované nemetylované sekvence způsobí, že jsou preferenčně amplifikovány metylované sekvence. Fluorescenčně značená sonda specifická pro metylovaný Septin9 používaná v reakci je zodpovědná za exkluzivní identifikaci metylovaných sekvencí během PCR reakce.

## 4. Složení kitu

### 4.1. Obsah

Tabulka 1: Obsah Epi proColon Plasma Quick kitu

Reagencie	Nádoby	Objem	Skladovací teplota
Epi proColon Lysis Binding Buffer	1 láhev	125 ml	15°C až 30°C
Epi proColon Wash A Concentrate	1 láhev	60 ml	15°C až 30°C
Epi proColon Magnetic Beads	1 láhev	4 ml	15°C až 30°C
Epi proColon Wash B Concentrate	1 láhev	7 ml	15°C až 30°C
Epi proColon Elution Buffer	1 zkumavka	6 ml	15°C až 30°C
Epi proColon Bisulfite Solution	4 zkumavky	1.9 ml každá zkumavka	15°C až 30°C
Epi proColon Protection Buffer	1 láhev	1 ml	15°C až 30°C

Tabulka 2: Obsah Epi proColon Sensitive PCR Kitu

Reagencie	Nádoby	Objem	Skladovací teplota
Epi proColon PCR Mix	2 zkumavky	810 µl každá	-25°C až -15°C
Epi proColon Polymerase	1 zkumavka	85 µl	-25°C až -15°C

Tabulka 3: Obsah Epi proColon Control Kitu

Reagencie	Nádoby	Objem	Skladovací teplota
Epi proColon Negative Control	6 zkumavek	3.65 ml každá zkumavka	-25°C až -15°C
Epi proColon Positive Control	6 zkumavek	3.65 ml každá zkumavka	-25°C až -15°C

### 4.2. Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi noste vždy laboratorní plášť a jednorázové rukavice. Kontaminované povrchy vyčistěte vodou. Více informací naleznete v bezpečnostním listu (MSDS) dostupném na našich webových stránkách (<http://www.epiprocolon.com/en/e-support-library/safety-data-sheets.html>).

**Epi proColon Lysis Binding Buffer a Epi proColon Wash A Concentrate:** obsahují TRITON X-100 a Guanidinium thiocyanate.

**H-věty:** H302: Škodlivý při požití. H312: škodlivý při styku s kůží. H318: Způsobuje vážné poškození očí. H332: Škodlivý při vdechování. H412: Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky; EUH032: Kontakt s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn.

**P-věty:** P261: Zamezte vdechování aerosolů; P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí; P301 + P312: Při požití: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P302 + P352: Při styku s kůží: Omyjte velkým množstvím mýdla a vody; P305 + P351 + P338: Při zasažení očí: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.



NEBEZPEČNÝ

**Epi proColon Bisulfite Solution:** obsahuje vodný roztok disulfidu amonného ([Ammonium acid sulfite](#))



**H-věty:** H319: Způsobuje těžké poškození očí. EUH031: Kontakt s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn.

NEBEZPEČÍ

**P- věty:** P264: Po manipulaci důkladně omyjte ruce; P271: Používejte pouze venku nebo v dobře větraných prostorách.; P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.; P305+351+338: Při zasažení očí: opatrně proplachujte vodou po dobu několika minut. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Pokračujte ve vyplachování; P312: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

**Epi proColon Protection Buffer:** obsahuje 6-hydroxy-2,5,7,8- tetrametylchroman-2-karboxylovou kyselinu, Tetrahydrofur-furylalkohol.

**H- věty:** H302: Škodlivý při požití. H315: Způsobuje podráždění kůže. H319: Způsobuje vážné podráždění očí. H319: Způsobuje těžké poškození očí. H360Df: Může poškodit nenarozené dítě. Podezřelý z poškozování fertility. H335: Může způsobit podráždění dýchání.



NEBEZPEČÍ

**P-věty:** P101: Je-li nutná lékařská pomoc, mějte obal od produktu nebo etiketu na dosah ruky. P102: Uchovávejte mimo dosah dětí. P201: Použijte speciální instrukce před použitím. P271: Používejte jen v dobře větratelných prostorách. P305 + P351 + P338: Při zasažení očí: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. P308+P313: Při expozici nebo v případě obav: Vyhledejte lékařskou pomoc / ošetření. P405: Skladujte uzamčené.

Epi proColon Wash B Concentrate, Epi proColon Elution Buffer, Epi proColon Magnetic Beads, Epi proColon PCR Mix, Epi proColon Polymerase, Epi proColon Positive Control, a Epi proColon Negative Control nejsou zdraví škodlivé.

## 5. Skladování a stabilita

Reagencie, které jsou součástí souprav Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) a Epi proColon Control Kit (M5-02-003) jsou při správné manipulaci stabilní až do data expirace. Nepoužívejte po vypršení expirace. Nemíchejte komponenty s různým číslem šarže.

### 5.1. Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)

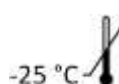
Skladujte všechny komponenty Epi proColon Plasma Quick Kit při teplotě 15 to 30 °C.



Epi proColon Bisulfite Solution je citlivý na kontakt s kyslíkem. Používejte pouze neotevřené zkumavky Epi proColon Bisulfite Solution. Použité zkumavky odstraňte!

Rekonstituované roztoky Epi proColon Wash A Buffer a Epi proColon Wash B Buffer skladujte při teplotě 15 až 30 °C po dobu maximálně 6 týdnů.

## 5.2. Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)



Epi proColon PCR Mix a Epi proColon Polymerase skladujte při teplotě -25 až -15 °C.

Každou zkumavku Epi proColon PCR Mix lze rozmrazit a opět zmrazit pouze jednou. Po prvním použití skladujte všechny reagenty při teplotě -25 až -15 °C po dobu maximálně 6 týdnů.

## 5.3. Epi proColon Control Kit (M5-02-003)



Epi proColon Control Kit skladujte při teplotě -25 až -15 °C.

## 6. Potřebné vybavení, které není součástí kitu

### 6.1. Běžné laboratorní vybavení

Následující běžné laboratorní vybavení je třeba pro provedení Epi proColon 2.0 CE testu. Veškeré laboratorní vybavení musí být instalováno, kalibrováno, používáno a udržováno v souladu doporučeními výrobce.

Doporučené vybavení	Navržené vybavení
Stojánek na 15 ml a 2 ml zkumavky	VWR International, kat. č. 211-0200, nebo ekvivalentní
Rotátor	VWR International, kat. č. 445-2102; Carl Roth GmbH + Co. KG, kat. č. Y549.1, nebo ekvivalentní
Vortex	VWR International, kat. č. 444-1372, nebo ekvivalentní
Termotřepačka na 2 ml zkumavky	Thermomixer®, Eppendorf, kat. č. 5382 000.015, se suchým vyhřívaným blokem na 2 ml zkumavky, Eppendorf, kat. č. 5362 000.035, nebo ekvivalentní
Pipety s nastavitelnými objemy následujících rozmezí 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf Reference®, Pipeta s nastavitelným objemem, Eppendorf, kat. č. 4910 000.042 a 4910 000.069, nebo ekvivalentní
Dávkovací pipeta schopná opakovaně dávkovat objemy v nastavitelném rozmezí	Eppendorf Multipette® plus, Eppendorf, kat. č. 4982 000.012, nebo HandyStep® electronic, Brand, kat. č. 705000/705001, nebo ekvivalentní
Stolní centrifuga s rotorem na 1.5/2.0 ml zkumavky	Centrifuga 5418, Eppendorf, kat. č. 5418 000.017 s rotorem F-45-30-11, Eppendorf, kat. č. 5490 015.002, nebo ekvivalentní
Více kanálová pipeta	Eppendorf Research® plus 8-Channel, 10 - 100 µl, Eppendorf, kat. č. 3122 000.035, nebo ekvivalentní
Centrifuga na PCR destičky	Centrifuge 5804 R, Eppendorf, kat. č. 5804 000.013, s rotorem A-2-DWP, Eppendorf, kat. číslo: 5804 740.009, nebo ekvivalentní
100 ml odměrný válec	Carl Roth, kat. č. C177.2, nebo ekvivalentní)

50 ml serologická pipeta	Fisher Scientific, kat. č. 11889181 , nebo ekvivalentní
--------------------------	---

## 6.2. Běžné laboratorní reagentie a spotřební materiál

Spotřební materiál a reagentie	Doporučený spotřební materiál a reagentie
Ethanol absolutní (pro molekulární biologii, $\geq 99.5\%$ )	Merck KGaA, kat. č. 1.08543.0250, nebo ekvivalentní
15 ml polypropylénové centrifugační zkumavky s kónickým dnem, PP/sterilní	Sarstedt Safeseal, kat. č. 72.695.400 nebo Eppendorf Safe-Lock™, kat. číslo: 0030 120.094, nebo ekvivalentní
2.0 ml micro zkumavky s oválným dnem a s připojeným PP víčkem s těsnícím mechanismem	Sarstedt SafeSeal, kat. č. 72.695.400 nebo Eppendorf Safe-Lock™, kat. č. 0030 120.094, nebo ekvivalentní
Pipetovací špičky s aerosolovou bariérou	ep Dualfilter T.I.P.S.®, Eppendorf <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 – 100 <math>\mu</math>l, kat. číslo: 0030 077.547, nebo ekvivalentní</li> <li>• 50 – 1 000 <math>\mu</math>l, kat. číslo: 0030 077.571, nebo ekvivalentní</li> </ul>
Špičky pro opakovací pipety s objemy 0.5 ml, 1 ml, 10 ml, 25 ml	Combitips plus®, Eppendorf <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.5 ml, kat. č. 0030 089.421, nebo ekvivalentní</li> <li>• 1 ml, kat. č. 0030 089.430, nebo ekvivalentní</li> <li>• 10 ml, kat. č. 0030 089.464, nebo ekvivalentní</li> <li>• 25 ml, kat. č. 0030 089.472, nebo ekvivalentní</li> </ul>
Jednorázové transferové pipety, nesterilní v sadě, délka 15 cm (asi 6 palců), průměr kmene 5 mm, kapacita cca 5 ml	VWR Disposable Transfer Pipettes with Reference Lines Non-sterile, kat. č. 612-4520, nebo ekvivalentní
Jednorázové transferové pipety, nesterilní v sadě, délka 22.5 cm (asi 9 palců), průměr kmene 5 mm, kapacita cca 5 ml	disposable transfer pipette, graduated, Carl Roth, kat. č. EA61.1, nebo ekvivalentní
96 jamková destička pro skladování DNA	MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, 0.1 ml , Applied Biosystems (Life Technologies Co.), kat. č. 4346906, nebo ekvivalentní
Adhezivní film nebo fólie pro skladování DNA destičky	VWR Thermalseal PCR Sealing Film, kat. č. 391-1254 nebo Eppendorf Storage Foil (self-adhesive), kat. č. 0030 127.889, nebo ekvivalentní
Applikátor na utěsnění fólie k destičce	MicroAmp® Adhesive Film Applicator, Applied Biosystems, kat. č. 4333183
Uzavíratelné plastové pytle 10 x 15 cm , pro likvidaci použitých PCR destiček	Carl Roth, kat. č. P279.2, nebo ekvivalentní
Kryozkumavky, 5 ml, stojící samotné	VWR, kat. č. 479-1218, nebo ekvivalentní
Zkumavky na odběr krve	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BD Vacutainer® K2EDTA 10 ml Blood Collection Tubes (Becton Dickinson, kat. č.367525) nebo</li> <li>• S-Monovette® 9 ml K3E (Sarstedt kat. č. 02.1066.001) nebo</li> <li>• S-Monovette® 8.5 ml CPDA (Sarstedt kat. č. 01.1610.001)</li> </ul>

### 6.3. Požadované speciální vybavení a spotřební materiál

Následující speciální vybavení a spotřební materiál je třeba pro provedení Epi proColon 2.0 CE testu a nemůže být nahrazeno jiným vybavením.

Používáme-li pro Epi proColon 2.0 CE test PCR přístroje Applied Biosystems 7500 Fast or 7500 Fast Dx

- Applied Biosystems 7500 Fast Dx Real-Time PCR přístroj s Sequence Detection Software v1.4 21 CFR Part 11 Module (Life Technologies Co., kat. č. 4406984 or 4406985) nebo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR přístroj (Life Technologies Co., kat. č. 4351106 or 4351107) s Sequence Detection Software v1.4 21 CFR Part 11 Module (Life Technologies Co., kat. č. 4377355)
- MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 20 destiček, kat. č. 4346906; 200 destiček, kat. č. 4366932)
- MicroAmp® 96- & 384-Well Optical Adhesive Film (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 25 listů, kat. č. 4360954 nebo 100 listů, kat. č. 4311971)

Používáme-li pro Epi proColon 2.0 CE test přístroje Roche LightCycler 480 instruments I and II:

- LightCycler 480 přístroj I s blokem na 96-jamek (Roche, kat. č. 05015278001) a Software verze 1.5.x or
- LightCycler 480 přístroj II s blokem na 96-jamek (Roche, kat. č. 05015278001) a Software verze 1.5.x
- LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (bílá destička) with sealing foils (Roche, kat. č. 04729692001)
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche, kat. č. 04729757001)

Další požadované vybavení, kompatibilní se všemi Real-Time PCR přístroji:

- Magnetický Separátor: DynaMag™-15 magnet (Invitrogen, kat. č. 123.01D).
- Magnetický Separátor: DynaMag™-2 magnet (Invitrogen, kat. č. 123.21D).

### 6.4. Požadavky na instalaci

Instalace, kalibrace, validace a servis Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR Instrument, Applied Biosystems 7500 Fast PCR, Roche LightCycler 480 I nebo II přístrojů musí být prováděn v souladu s pokyny výrobce.

Poznámka: U přístrojů Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR and Applied Biosystems 7500 Fast PCR je povinnost provádět každý měsíc kalibraci barev FAM™, JOE™, TAMRA™.

## 7. Varování a preventivní opatření

### 7.1. Laboratorní preventivní opatření

V souladu se zásadami dobré laboratorní praxe je minimalizovat riziko vzájemné kontaminace mezi vzorky během a po izolaci DNA, bisulfidové konverzi a purifikačních kroků.

Zamezte vnesení nukleáz do vzorků během izolace DNA. Pro zamezení vzájemné kontaminace mezi vzorky pacientů doporučujeme používat jednorázové pipety a špičky. Tento protokol je pro použití v profesionální laboratoři a vyžaduje znalost metod izolace DNA a real-time PCR.

K zamezení kontaminace amplikony z předešlých PCR doporučujeme striktní oddělení pre-PCR (izolace a purifikace DNA z plazmy, příprava PCR reakce) od post-PCR činností (např. real-time PCR). Dále doporučujeme likvidovat použité PCR destičky tak, aby nedošlo k uvolnění PCR produktu, například použitá PCR destička by měla být

umístěna do uzavíratelného plastového pytle okamžitě po vyjmutí z PCR přístroje, pytel okamžitě uzavřen a umístěn do příslušné odpadové nádoby. Nikdy neskladujte použitou PCR destičku vně PCR přístroje. Nikdy neotvírejte použitou PCR destičku.

## 7.2. Mikrobiologické a infekční prohlášení

Produkt neobsahuje žádné infekční látky nebo činidla způsobující onemocnění u lidí nebo zvířat.

Se vzorky lidské krve a plazmy by mělo být nakládáno jako s potenciálně infekčními a používány bezpečné laboratorní postupy buď v souladu s nařízením 2000/54/EC (Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích) na ochranu pracovníků před nebezpečím expozice biologickým agens, nebo příslušné jiné bezpečnostní postupy.

## 8. Odběr a manipulace se vzorkem

### 8.1. Odběr a skladování krve

Odběr a skladování krve může být prováděn za následujících podmínek:

- Pro odebranou krev použijte Vacutainer® K<sub>2</sub>EDTA **10 ml** zkumavku nebo S-Monovette® **9 ml** Potassium-EDTA. Při odběru krve se držte pokynů výrobce. Krev by měla být zpracována okamžitě. Krev může být skladována nejdéle 24 hodin při teplotě 2 až 8 °C před izolací plazmy. Vzorek krve nezamrazujte.
- Alternativně mohou být pro odběr krve použity 8.5 ml zkumavky S-Monovette® CPDA. Při odběru krve se držte pokynů výrobce. Krev by měla být zpracována okamžitě. Krev může být ve zkumavce S-Monovette® 8.5 ml CPDA skladována nejdéle 72 hodin při teplotě 15 to 25 °C 48 hodin. Vzorek krve nezamrazujte.

### 8.2. Příprava a skladování vzorku plazmy

- Vyřaďte u centrifugy funkci brzdění, abyste zamezili porušení vrstvy buněk.
- Zcentrifugujte krev v odběrové zkumavce po dobu 12 minut při 1350 ± 150 rcf. Pro převod otáček za minutu (rpm) na rcf použijte návod k použití pro centrifugu.
- Vyjměte odběrovou zkumavku z centrifugy.
- K přenosu plazmy z odběrové zkumavky do 15 ml polypropylénové centrifugační zkumavky s kónickým dnem, použijte čisté jednorázové 15 cm pipety.
- Zcentrifugujte plazmu v 15 ml centrifugační zkumavce po dobu 12 minut při 1350 ±150 rcf .
- Pomocí čisté extra dlouhé (22.5 cm) jednorázové pipety, nebo sérologické pipety přeneste 3.5 ml plazmy do označené kryozkumavky nebo centrifugační zkumavky.
- Vzorky plazmy mohou být skladovány 4 týdny při teplotě -15 to -25 °C.
- Při použití 10 ml zkumavek Vacutainer® K<sub>2</sub>EDTA může být plazma skladována až 18 hodin při teplotě 2 až 8 °C.

**Poznámka:** Dávejte pozor, abyste nenarušili nebo nepřenesli vrstvu leukocytů a trombocytů (bílé krvinky) usazené nad vrstvou červených krvinek v odběrové zkumavce po prvním odstředění, nebo ty, které jsou usazeny na dně kónické centrifugační zkumavky po druhém odstředění.



## 9. Pracovní postup

Dávkovací pipeta je doporučena pro opakované dávkování následujících reagens: Epi proColon Lysis Binding Buffer, Epi proColon Magnetic Bead Suspension, ethanolu v kroku 9.2.3., Epi proColon Wash A Buffer, Epi proColon Wash B Buffer, Epi proColon Elution Buffer, Epi proColon Bisulfite Solution, Epi proColon Protection Buffer a PCR Master Mix. Dále, důrazně doporučujeme použít rotátor na principu ferrisova kola nebo podobné zařízení, a pipetovat izolovanou a bisulfidicky přeměněnou DNA přesnými pipetami.

### 9.1. Příprava pracovních roztoků

#### 9.1.1. Příprava Epi proColon Wash A Buffer

- Přidejte 60.0 ml absolutního Ethanolu (pro molekulární biologii,  $\geq 99.5\%$ ) k Epi proColon Wash A Concentrate pomocí odměrného válce nebo sérologické pipety.
- Zavřete víčko, důkladně promíchejte převrácením lahvičky 5x tak, abyste zabránili vytvoření bublin. Označte lahvičku datem ředění a zaškrtněte příslušně vyznačené místo „Ethanol added“.
- Rekonstituuovaný Epi proColon Wash A Buffer skladujte při teplotě 15 až 30 °C po dobu maximálně 6 týdnů.

#### 9.1.2. Příprava Epi proColon Wash B Buffer

- Přidejte 40.0 ml absolutního Ethanolu (pro molekulární biologii,  $\geq 99.5\%$ ) k Epi proColon Wash B Concentrate pomocí odměrného válce nebo sérologické pipety.
- Zavřete víčko, důkladně promíchejte převrácením lahvičky 5x tak, abyste zabránili vytvoření bublin. Označte lahvičku datem ředění a zaškrtněte příslušně vyznačené místo „Ethanol added“.

Rekonstituuovaný Epi proColon Wash B Buffer skladujte při teplotě 15 až 30 °C po dobu maximálně 6 týdnů.

### 9.2. Izolace DNA z plazmy pacienta a bisulfidická konverze

Epi proColon 2.0 CE obsahuje dostatečné množství reagensů na analýzu 32 vzorků, včetně kontrol. V každém samostatném experimentu musí být zahrnuta jedna Epi proColon Positivní kontrola jedna Epi proColon negativní kontrola. Jelikož máte 4 samostatné zkumavky s Epi proColon Bisulfite Solution, doporučujeme provést maximálně 4 nezávislé experimenty (např. 4 experimenty po 8 vzorcích).

**Poznámka:** Krátká centrifugace mikrozkuvek (označená jako „zkumavky krátce stočíme“) je vyžadována v několika krocích tohoto návodu, k odstranění kapek z víčka nebo k odstranění zbývající kapaliny. Doporučuje se centrifugovat po dobu 10 - 20 sekund při  $1,000 \pm 150$  rcf ve stolní centrifuze. Vyhněte se silnější centrifugaci, abyste zabránili shlukování magnetických částic v příslušných krocích.

**Poznámka:** Vortexování zkumavek a nádob je vyžadováno v několika krocích tohoto návodu, abyste získali homogenní promíchání kapaliny. Doporučujeme vortexovat při střední rychlosti po doby 5 až 10 sekund.

#### 9.2.1. Rozmražení plazmy a Epi proColon pozitivní a negativní kontroly

- Rozmrazujte jednu Epi proColon pozitivní a jednu Epi proColon negativní kontrolu po dobu asi 30 minut při teplotě 15 až 30 °C.

- Používáme-li zmrazenou plazmu, rozmrazujeme vzorek po dobu asi 30 minut při teplotě 15 až 30 °C. •  
Začněte lyzovat do 60 minut po rozmražení.

### 9.2.2. Lýze

**Poznámka:** Před použitím krátce protřepejte Epi proColon Lysis Binding Buffer a vizuálně zkontrolujte přítomnost sraženin. Je-li precipitát přítomen, zahřejte Epi proColon Lysis Binding Buffer ve vodní lázni při 37 °C nebo v rukou a jemně třepejte, až je sraženina kompletně rozpuštěna. Před použitím vytemperujte Epi proColon Lysis Binding Buffer na pokojovou teplotu.

- Do označené 15 ml centrifugační zkumavky přidejte:
  - 3.5 ml vzorku plazmy, nebo Epi proColon pozitivní kontrolu, nebo Epi proColon negativní kontrolu
  - 3.5 ml Epi proColon Lysis Binding Buffer
- Zkumavku zavřete a vortexujte.
- Inkubujte zkumavku na stole při 15 až 30 °C po dobu 10 ± 1 min.

### 9.2.3. Navázání DNA

**Poznámka:** Homogenní suspenze částic v reagentii „Epi proColon Magnetic Beads suspension“ je nezbytná pro správnou funkci. Odchytky od specifikovaného množství částic mohou vést ke špatným výsledkům. Pro zajištění správné koncentrace magnetických částic by měla být lahvička důkladně promíchána těsně před pipetováním až do okamžiku, kdy nevidíme žádný sediment na dně lahvičky. Zajistěte též homogenní suspenzi mezi pipetovacími kroky.

- Do 15 ml centrifugační zkumavky přidejte v následujícím pořadí:
  - 90 µl Epi proColon Magnetic Beads (čerstvě rozmíchaných)
  - 2.5 ml of absolutního ethanolu (pro molekulární biologii, ≥99.5 %)
- Zkumavku zavřete a míchejte převrácením zkumavky 5 - 6 krát.
- Vložte 15 ml zkumavku do rotátoru.
  - Míchejte při pokojové teplotě po dobu 45 ± 5 min. střední rychlostí (cca. 10 - 20 rpm). Rotátor nastavte na úhel cca. 35 - 45 stupňů.

**Poznámka:** Před začátkem promývání nastavte termotřepačku na 80 ± 2 °C pro pozdější použití v elučním kroku a bisulfidické konverzi.

### 9.2.4. Promývání DNA

**Poznámka:** Před započetím promývání nastavte thermoshaker na 80 ± 2 °C pro pozdější použití v krocích eluce a bisulfidické konverze.

- Vložte 15 ml zkumavku do DynaMag™-15 magnetického stojánku na 5 – 10 minut

**Poznámka:** Pokud se magnetické kuličky nepřichytí na stěnu zkumavky po tomto kroku, inkubujte zkumavku při teplotě 56 ° C po dobu 10 min (např. ve vodní lázni) a zkumavku vložte zpět do Dynamag™ -15 magnetického stojánu na 5 – 10 min.

- Opatrně vylijte supernatant. Dbejte, abyste neodstranili magnetické částice.
- Zkumavky vyndejte z magnetického stojánu.
- Přidejte 1.5 ml Epi proColon Wash A Buffer.
- Kompletně rozsuspendujte magnetické částice vortexem.
- Pomocí extra dlouhé (22.5 cm) jednorázové pipety přeneste magnetické částice do označené 2.0 mikrozukavky.
- Vložte jednorázovou transferovou pipetu zpět do 15 ml zkumavky, abyste sebrali zbylé magnetické částice a přeneste je do 2.0 ml mikrozukavky.
- Vložte zkumavku do DynaMag™-2 magnetického stojánu na 4 min.
- Pomocí 15 cm jednorázové transferové pipety odeberte tolik pufry kolik můžete zatímco je zkumavka v magnetickém stojánu DynaMag™-2. Dejte pozor, abyste neodstranili magnetické částice.
- Zkumavku krátce stočte.
- Vložte 2.0 ml mikrozukavku do DynaMag™-2 magnetického stojánu na 4 min.
- Pomocí 10 - 100 µl pipety odeberte tolik zbylého pufry, kolik můžete, zatímco je zkumavka v magnetickém stojánu.

#### 9.2.5. Eluce

- Přemístěte mikrozukavku do nemagnetického stojánu.
- Promíchejte Epi proColon Elution Buffer otočením v ruce.
- Přidejte 100 µl Epi proColon Elution Buffer do každé zkumavky.
- Zkumavky zavřete.
- Rozsuspendujte magnetické částice vortexováním.
- Vložte mikrozukavku do termotřepačky nastavené na 1,000 ± 100 rpm a inkubujte na 80 ± 2 °C po dobu 10 ± 1 minut.
- Zkumavku krátce stočte.
- Vložte 2.0 ml mikrozukavku do DynaMag™-2 magnetického stojánu na 4 min.
- Zatímco se zkumavka v magnetickém stojánu, přeneste kompletní eluát (~100 µl roztoku DNA) do čisté 2.0 ml mikrozukavky.

- Odstraňte 2 ml mikrozkušavku s magnetickými částicemi.
- **Nastavte termotřepačku na teplotu  $23 \pm 2$  °C a nastavte druhou termotřepačku, nebo suchý blok či inkubátor (bez třepání) na  $80 \pm 2$  °C pro pozdější použití**

### 9.2.6. Skladování izolované DNA

**Poznámka:** Není-li izolovaná DNA ihned použita, skladujte jí při teplotě 2 až 8 °C po dobu maximálně 24 hodin. Izolovanou DNA nezamrazujte.

### 9.2.7. Bisulfidická konverze

**Poznámka:** Epi proColon Bisulfite Solution je citlivý na kontakt s kyslíkem. Používejte jen neotevřené zkumavky Epi proColon Bisulfite Solution. Jakýkoliv zbytek roztoku neskladujte, ale odstraňte! Skladovat Epi proColon Bisulfite Solution lze jen tak, že roztok přepipetujeme do menší zkumavky tak, aby zkumavka byla plná po okraj a poté ji pevně uzavřeme.

- Do 2.0 ml mikrozkušavek s eluovanou DNA (~100 µl roztoku DNA) přidejte následující reagenty přesně v tomto pořadí:
  - 150 µl Epi proColon Bisulfite Solution
  - 25 µl Epi proColon Protection Buffer
- Zkušavku uzavřete a promíchejte bisulfidickou reakci vortexováním
- Zkušavku krátce stočte.
- Vložte zkušavku do termotřepačky nebo inkubátoru bez třepání a inkubujte  $45 \pm 5$  minut na  $80 \pm 2$  °C bez třepání.
- Po uplynutí  $45 \pm 5$  minut neprodleně vyjměte zkušavku z termotřepačky.

**Poznámka:** V tomto kroku nelze DNA zamrazit, je nutné okamžitě přečistit následujícím postupem.

### 9.2.8. Navázání DNA

**Note:** Homogenní suspenze částic v reagentii „Epi proColon Magnetic Beads suspension“ je nezbytná pro správnou funkci. Odchylky od specifikovaného množství částic mohou vést ke špatným výsledkům. Pro zajištění správné koncentrace magnetických částic by měla být lahvička důkladně promíchána těsně před pipetováním, až do okamžiku, kdy nevidíme žádný sediment na dně lahvičky. Zajistěte též homogenní suspenzi mezi pipetovacími kroky.

- Krátce zcentrifugujte 2.0 ml mikrozkušavku s bisulfidickou reakcí.
- Přidejte do mikrozkušavky následující komponenty:
  - 1000 µl Epi proColon Wash A Buffer
  - 20 µl Epi proColon Magnetic Beads (čerstvě rozmíchané).
- Promíchejte vortexováním.

- Počkejte až termotřepačka dosáhne teploty  $23 \pm 2$  °C.
- Vložte mikrozkušavku do termotřepačky a inkubujte s třepáním  $1000 \pm 100$  rpm po dobu  $45 \pm 5$  minut při  $23 \pm 2$  °C.
- Zkušavku krátce stočte.
- Vložte zkušavku do magnetického stojánu DynaMag™-2 na 4 minuty.
- Pomocí 15 cm jednorázové transferové pipety odeberte tolik pufru, kolik můžete, zatímco je zkušavka v magnetickém stojánu DynaMag™-2. Dejte pozor, abyste neodstranili magnetické částice.

#### **9.2.9. První promytí**

- Přendejte vzorky do nemagnetického stojánu a přidejte:
  - 800 µl Epi proColon Wash A Buffer.
- Rozsuspendujte vortexováním.
- Zkušavku krátce stočte.
- Vložte zkušavky do magnetického stojánu DynaMag™-2 na 4 minuty.
- Pomocí 15 cm jednorázové transferové pipety odeberte tolik pufru kolik můžete, zatímco je zkušavka v magnetickém stojánu DynaMag™-2. Dejte pozor, abyste neodstranili magnetické částice.

#### **9.2.10. Druhé promytí**

- Přendejte vzorky do nemagnetického stojánu a přidejte:
  - 800 µl Epi proColon Wash B Buffer.
- Rozsuspendujte vortexováním.
- Zkušavku krátce stočte.
- Vložte zkušavky do magnetického stojánu DynaMag™-2 na 4 minuty.
- Pomocí 15 cm jednorázové transferové pipety odeberte tolik pufru, kolik můžete, zatímco je zkušavka v magnetickém stojánu DynaMag™-2. Dejte pozor, abyste neodstranili magnetické částice.

#### **9.2.11. Třetí promytí**

- Přendejte vzorky do nemagnetického stojánu a přidejte:
  - 400 µl Epi proColon Wash B Buffer.

- Rozsuspendujte vortexováním.
- Zkumavku krátce stočte.
- Vložte zkumavku do magnetického stojánu DynaMag™-2 na 4 minuty.
- Pomocí 15 cm jednorázové transferové pipety odeberte tolik pufru, kolik můžete, zatímco je zkumavka v magnetickém stojánu DynaMag™-2. Dejte pozor, abyste neodstranili magnetické částice.
- Zkumavku krátce stočte.
- Vložte 2.0 ml mikrozkušavku do DynaMag™-2 magnetického stojánu na 2 min.
- Pomocí 10 - 100 µl pipety odeberte tolik zbylého pufru, kolik můžete, zatímco je zkumavka v magnetickém stojánu.

#### 9.2.12. Sušení

- **Poznámka:** Nezvyšujte teplotu nebo čas sušení. Přesušení může snížit získané množství bisDNA!
- Otevřete víčko mikrozkušavky.
- Vložte otevřenou zkumavku do termostřepačky.
- Sušte po dobu  $10 \pm 1$  minut při teplotě  $23 \pm 2$  °C bez třepání.

#### 9.2.13. Eluce

- Vložte mikrozkušavku do nemagnetického stojánu a přidejte:
  - 60 µl Epi proColon Elution Buffer.
- Zavřete zkumavku.
- Rozsuspendujte magnetické částice vortexováním.
- Inkubujte po dobu  $10 \pm 1$  minut při  $23 \pm 2$  °C v termostřepačce a třepejte rychlostí  $1000 \pm 100$  rpm.
- Zkumavku krátce stočte.
- Vložte zkumavku do magnetického stojánu DynaMag™-2 na 4 minuty.
- Přeneste kompletní eluát (~ 60 µl roztoku DNA) pomocí 10 - 100 µl referenční pipety do čistých popsaných zkumavek.

#### 9.2.14. Skladování DNA konvertované bisulfidem

Pokud nepoužijete bisulfidem konvertovanou DNA ihned, lze ji skladovat maximálně po dobu 24 hodin při teplotě 2 až 8 °C, nebo maximálně 72 hodin při teplotě -25 až -15 °C.

### 9.3. Příprava PCR

**Poznámka:** Každý vzorek bisulfidicky konvertované DNA (bisDNA) (vzorek pacienta, nebo Epi proColon pozitivní kontrola, či Epi proColon negativní kontrola) je třeba testovat ve třech reakcích.

**Poznámka:** Epi proColon Polymerázu před použitím centrifugujte po dobu 10 - 20 sekund při 1,000 ± 150 rcf na stolní centrifuze, abyste se zbavili kapek ve víčku.

### 9.3.1. Příprava PCR Master mixu

- Podle počtu vzorků a kontrol rozmrazte 1 nebo 2 Epi proColon PCR Mix zkumavky (viz. Tabulka 5).
- Epi proColon PCR Mix zkumavku(y) vortexujte 10 - 15 sekund. Zkumavku(y) krátce centrifugujte.
- Přidejte odpovídající objemy Epi proColon PCR Mix a Epi proColon Polymerázy do 2.0 ml mikrozkušavky podle toho, jak je to uvedeno v Tabulce 5.
- Promíchejte PCR Master Mix vortexováním.
- PCR Master Mix krátce centrifugujte, abyste se zbavili kapek ve víčku.

**Poznámka:** PCR Master Mix neskladujte, použijte ho okamžitě. Nepoužitý Epi proColon PCR Mix and Epi proColon Polymerase zamrazte okamžitě po použití.

**Poznámka:** Na jednu PCR reakci je třeba 16 µl Epi proColon PCR Mix a 0.8 µl Epi proColon Polymerázy (je počítáno s pipetovací chybou, takže není nutné pipetovat reakci navíc).

Tabulka 5: Příprava PCR Master Mixu se započítanou pipetovací chybou

Složka	Objem na 8 vzorků (24 PCR reakcí)	Objem na 16 vzorků (48 PCR reakcí)	Objem na 24 vzorků (72 PCR reakcí)	Objem na 32 vzorků (96 PCR reakcí)
Epi proColon PCR Mix	384 µl	768 µl	1152 µl	1536 µl
Epi proColon Polymeráza	19.2 µl	38.4 µl	57.6 µl	76.8 µl

Tabulka 6: Doporučené rozložení vzorků v PCR destičce.

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

#Epi proColon Pozitivní kontrola, §Epi proColon Negativní kontrola

**Poznámka:** Používáte-li PCR přístroje Applied Biosystems 7500 Fast PCR nebo 7500 Fast Dx PCR se softwarem SDS v1.4, následujte instrukce v sekci 10 a sekci 13.

Používáte-li PCR přístroj Roche LightCycler 480 Instrument I, následujte instrukce v sekci 11a sekci 13.

Používáte-li PCR přístroj Roche LightCycler 480 Instrument II, následujte instrukce v sekci 11a sekci 13.

## 10. PCR analýza na přístrojích Applied Biosystems 7500 Fast a 7500 Fast Dx

### 10.1. Požadavky na Software

Tento produkt byl validován při použití softwaru SDS v1.4 s modulem 21 CFR Part 11.

### 10.2. Příprava PCR destičky (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

- Připravte PCR destičku. Doporučené uspořádání vzorků je v tabulce 6.
- Přeneste 15  $\mu$ l PCR Mixu do vybraných jamek MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-jamkové destičky.
- Je-li to třeba, krátce centrifugujte destičku s bisDNA vytvořenou v části 9.2.13 po dobu 1 minuty na 1000  $\pm$  100 rcf.
- Do příslušných jamek na destičce přidejte 15  $\mu$ l roztoku bisDNA.
- Uzavřete destičku pomocí MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film.
- Destičku krátce centrifugujte 1 minutu na 1000  $\pm$  100 rcf.

**Poznámka:** Destička s PCR reakcemi může být skladována až 4 hodiny v lednici při 2 až 8 °C.

### 10.3. Vložení destičky do přístroje (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

**Poznámka:** PCR Master mix neobsahuje ROX nebo jinou referenční barvičku. Proto musí být pasivní reference nastavena na „none“.

**Poznámka:** Doporučuje se uložit templátový soubor (\*.sdt) s nastavením cyklování a analýzy.

- Spusťte Software SDS v1.4.
- Otevřete příslušný templátový soubor nebo vytvořte nový dokument.
- Klikněte na „Create New Document“.
- Definujte následující:
  - Assay: Standard Curve (Absolute Quantification)
  - Container: 96-Well Clear
  - Template: Blank Document (or select respective Epi proColon 2.0 CE Template file)



- Run Mode: Standard 7500.
- Klikněte na „Next“.
- Klikněte na „New Detector...“.
- Vytvořte novou detekci s následujícími vlastnostmi:
  - Name: Septin9
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: FAM
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Red.
- Klikněte na „Create Another“ a definujte vlastnosti:
  - Name: ACTB
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: JOE
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Green.
- Klikněte na „ok“.
- Vyberte oba detektory a klikněte na „Add >>“ abyste přiřadili detektory k dokumentu.
- Vyberte „(none)“ v rozbalovacím menu „Passive Reference“
- Klikněte na „Done“.
- Klikněte na „Setup“ a „Plate“.
- Vyberte všech 96 jamek na destičce.
- V menu vyberte „View“ a otevřete „Well Inspector“.
- Vyberte detektor „Septin9“ a „ACTB“.
- Zvolte Passive Reference nastavení na „(none)“ (viz. Obrázek 1).
- Klikněte na „Close“.
- Klikněte na „Instrument“ pro naprogramování PCR programu podle tabulky 7.
- Nastavte následující údaje:
  - Sample Volume: 30 µl,
  - Run Mode: Standard 7500,

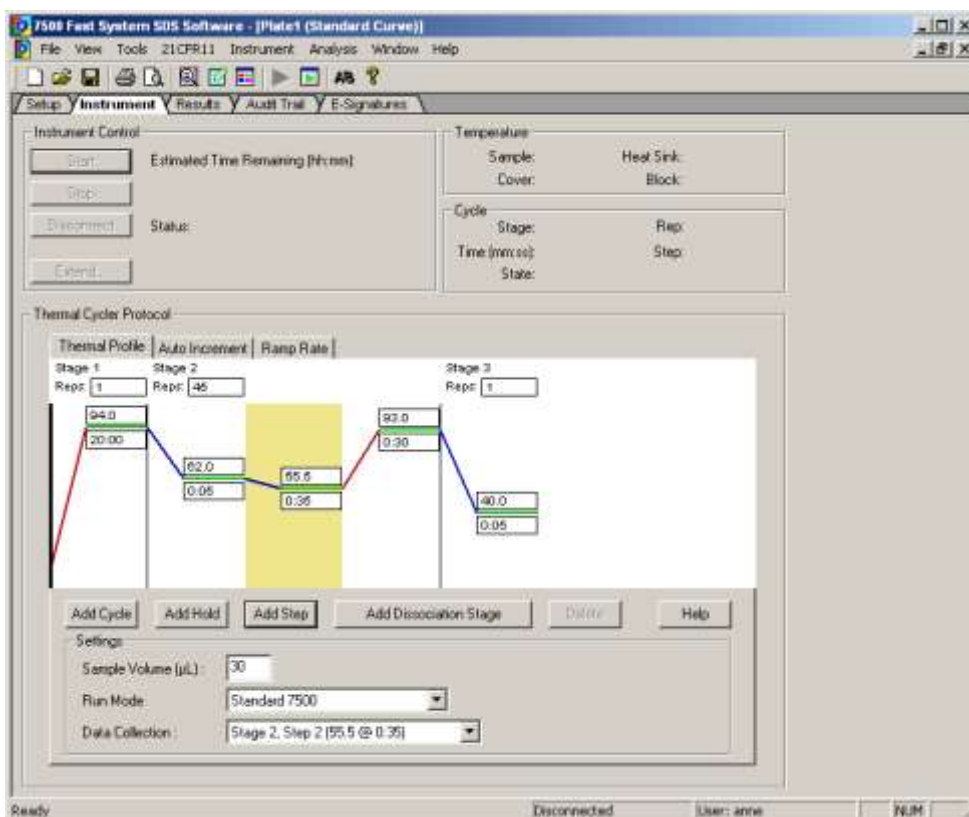
- Data Collection: Stage 2, Step 2.
- Vytvořte „Thermal Profile“ s 3 cykly.
- Vytvořte „Cyklus 2“ s třemi kroky, a „Cyklus 1“ a „Cyklus 3“ s jedním krokem.
- Zadejte počet opakování, požadovanou teplotu, a čas inkubace podle tabulky 7.
- Upravte „Ramp Rate“ podle tabulky 7.
- Nastavte „Data Collection“ na druhý krok 2 cyklu 2 (55.5 @ 0:35).
- Potvrďte PCR protokol podle tabulky 7 (viz. Obrázek 2).
- Uložte vytvořený program pod příslušným jménem.
- Otevřete zásuvku pro destičku.
- Vložte PCR destičku do rámu (police A1 je v horním levém rohu), přesvědčte se, že destička pasuje přesně do rámu. Zavřete zásuvku,
- Klikněte na „Start“, abyste spustili reakci.

Tabulka 7: Program pro Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx

Parametr	Denaturace	Cyklování			Ochlazení
Cyklus	„Cyklus 1“	„Cyklus 2“			„Cyklus 3“
Opakování	1	45			1
Krok	1	1	2	3	1
Teplota [°C]	94	62	55.5	93	40
Čas [mm:ss]	20:00	00:05	00:35	00:30	00:05
Auto Increment		0	0	0	
Rychlost rampingu [%]	40	80	80	40	80
Sběr dat	Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)				



Obrázek 1: Ukázka obrazovky SDS v1.4 softwaru po potvrzení nastavení „Well Inspector“ okna.



Obrázek 2: Ukázka obrazovky SDS v1.4 softwaru po nastavení PCR programu a detekčního módu.

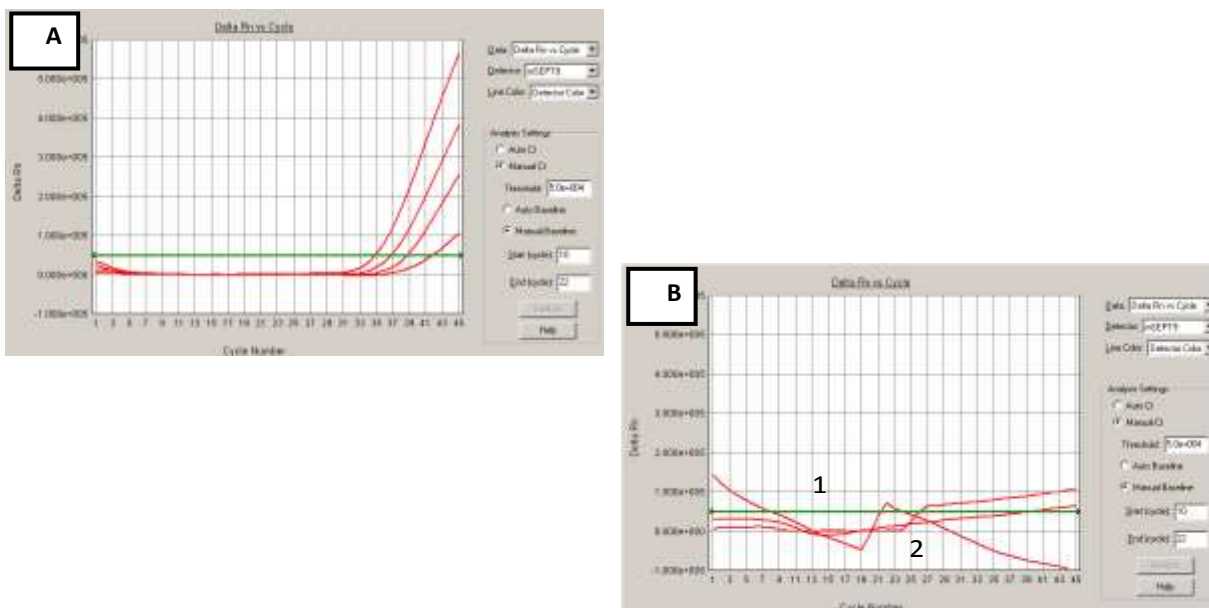
#### 10.4. Nastavení pro analýzu (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

**Poznámka:** Analyzujte PCR experimenty pouze na softwaru SDS v1.4

**Poznámka:** Neúplné runy nebo runy, které obsahují chybové hlášení nesmí být analyzovány. Run musí obsahovat fluorescenční data všech 45 cyklů. Po dokončení cyklování PCR programu klepněte na tlačítko "OK".

- Po skončení PCR programu klikněte na „ok“.
- Vyberte „Results“, pak zvolte „Amplification Plot“.
- Nastavte „Analysis Setting“ pro Septin9 detektor následovně:
  - Manual Ct, Threshold: 50000 (objeví se jako, 5.0e+004)
  - Manual baseline, Start (cycle): 10
  - Manual baseline, End (cycle): 22
- Nastavte „Analysis Setting“ pro ACTB detektor to následovně:
  - Manual Ct, Threshold: 25000 (appears as ,2.5e+004')
  - Manual baseline, Start (cycle): 10
  - Manual baseline, End (cycle): 22
- Klikněte na „Analyze“.
- Klikněte na „Save“.
- Hodnoty Ct pro Septin9 a ACTB jsou spočítány automaticky.
- Vyberte jamky pro analýzu.
- Amplifikační křivky jsou zobrazeny v poli „Amplification Plot“.
- Hodnoty Ct jsou zobrazeny v poli „Report“.

**Poznámka:** Každá amplifikační křivka by měla být vizuálně ověřena. Amplifikační křivky protínající práh (Ct) díky inkonzistentním datovým bodům (šum), nebo křivky s lineárním průběhem by měly být vyhodnoceny jako negativní. Příklady jsou uvedeny na obrázku 3.



Obrázek 3: Obrazovka s amplifikačními křivkami pro Septin9 na přístroji Applied Biosystems 7500 Fast.

A: Příklady platných pozitivních křivek. B: Příklady negativních křivek způsobených inkonzistentními datovými body (1) nebo lineární křivka (2).

### 10.5. Platnost experimentu na základě Epi proColon kontrol (Applied Biosystems 7500 Fast/ Fast Dx)

Jakýkoliv experiment (vzorky pacientů analyzované spolu s Epi proColon pozitivní a negativní kontrolou) je považován za platný, jestliže hodnoty všech tří PCR reakcí jsou v souladu s hodnotami uvedenými v tabulce 8.

Jestliže Epi proColon pozitivní nebo negativní kontrola (nebo obě) je neplatná, vzorky pacientů analyzované paralelně s kontrolami nemohou být vyhodnoceny. Test musí být pro všechny analyzované vzorky pacientů opakován.

Tabulka 8: Limity platnosti Epi proColon kontrol analyzovaných Applied Biosystems 7500 Fast / 7500 Fast Dx

Výsledek kontroly	Determinace	Septin9 výsledek	ACTB výsledek
Platná pozitivní kontrola	PCR1	Ct* ≤ 41.1	Ct* ≤ 29.8
	PCR2	Ct* ≤ 41.1	Ct* ≤ 29.8
	PCR3	Ct* ≤ 41.1	Ct* ≤ 29.8
Platná negativní kontrola	PCR1	není Ct* (není určeno)	Ct* ≤ 37.2
	PCR2		Ct* ≤ 37.2
	PCR3		Ct* ≤ 37.2

\*Cycle threshold (prahová hodnota)

## 10.6. Interpretace výsledků pro jednotlivou PCR (Applied Biosystems 7500 Fast/ Fast Dx)

Vyhodnocení jednotlivé PCR je provedeno podle tabulky 9. Indikuje-li výsledek vnitřní kontroly (ACTB) dostatečné množství DNA v jednotlivé PCR (ACTB Ct specifikovaný v tabulce 9), PCR reakce pro Septin9 určí výsledek této jednotlivé PCR (viz. Kapitola 13). Hodnota ACTB jiná než hodnota Ct uvedená v tabulce 9 znamená pro tuto jednotlivou PCR výsledek „neplatná PCR“.

Tauka 9: Interpretace výsledků pro jednotlivou PCR (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Výsledek jednotlivé PCR	Výsledek pro Septin9	Výsledek pro ACTB
Septin9 pozitivní	Ct* < 45	Ct* ≤ 32.1
Septin9 negativní	není Ct*	Ct* ≤ 32.1
Neplatný	Jakýkoliv výsledek	Ct* > 32.1 Nebo není určen

\*Cycle threshold (prahová hodnota)

## 11. Analýza na přístroji Roche LightCycler 480 Instrument I

### 11.1. Příprava PCR destičky (LightCycler 480 Instrument I)

- Připravte PCR destičku. Doporučené uspořádání vzorků je v tabulce 6.
- Přeneste 15 µl PCR Master Mix do vybraných jamek LightCycler 480 Multiwell Plate 96-jamkové destičky.
- Destičku s bisDNA vytvořenou v části 9.2.13 krátce centrifugujte po dobu 1 minuty na 1000 ± 100 rcf.
- Do příslušných jamek na destičce přidejte 15 µl roztoku bisDNA.
- Uzavřete destičku pomocí LightCycler 480 Sealing Foil.
- Destičku krátce centrifugujte 1 minutu na 1000 ± 100 rcf.

**Poznámka:** Destička s PCR reakcemi může být skladována až 4 hodiny v lednici při 2 až 8 °C.

### 11.2. Vložení destičky do přístroje (LightCycler 480 Instrument I)

**Poznámka:** Doporučuje se uložit templátový soubor (\*.ixc) s nastavením cyklování a analýzy.

- Spusťte Software verzi 1.5.x.
- Vytvořte nový experiment, klikněte na „Create New Experiment“
- Otevřete příslušný templátový soubor nebo vytvořte nový dokument podle vzoru v tabulce 10.
- Otevřete zásuvku pro destičku.

- Vložte PCR destičku do rámu (pozice A1 je v horním levém rohu), přesvědčte se, že destička pasuje přesně do rámu. Zavřete zásuvku.
- Klikněte na „Start“, abyste spustili reakci.

Table 10: Standardní PCR program pro LightCycler 480 Instrument I.

- LightCycler 480 Instrument I: zvolte „Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe“ jako detekční formát;
- aktivujte kombinaci filtru 483 – 533 nm a 523 – 568 nm
- nastavte „Reaction Volume“ na „30“.

Parametr Programu	Denaturace	Cyklování			Ochlazení
Mód analýzy	není	kvantifikace			není
Opakování	1	50			1
Segment	1	1	2	3	1
Teplota [°C]	94	62	56	93	40
Čas [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Rychlost rampingu [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Sběr dat	není	není	Single	není	není

### 11.3. Nastavení pro analýzu (LightCycler 480 Instrument I)

**Poznámka:** Uživatelé LightCycler 480 Instrument I musí zvolit Color Compensation „ON“ anahrát příslušný „Epi proColon Color Compensation“ soubor pro kombinaci „Filter Comb 483 - 533“ a „Filter Comb 523 - 568“.

**Poznámka:** analyzujte pouze použité jamky vytvořením příslušného editoru pro vzorky, který je popsán v návodu na LightCycler 480 Instrument I.

- Klikněte na „Analysis“ v LightCycler 480 základním modulu softwaru otevřením okna „Analysis Overview“.
- Zvolte „Abs Quant/Fit Points“ pro všechny vzorky.
- Aktivujte ‚Epi proColon Color Compensation‘.
- Aktivujte ‚Filter Comb 483 - 533‘.
- Nastavte „First Cycle“ na „1“ a „Last Cycle“ na „50“.
- Nastavte pozadí (klikněte na modré tlačítko „background“) na,5 - 22` nastavením „Min Offset“ na „4“ a „Max Offset“ na „21“ v okně „Cycle Range“.
- Nastavte hladinu šumu „Noise Band (Fluoresc)“ a na stavte ručně hladinu šumu na „1.6“ v okně „Noise Band“.
- Poté co vyberete „Threshold (Manual)“ v okně „Analysis“ nastavte práh na „1.6“.
- Nastavte počet „Fit Points“ na 2 v okně „Analysis“.

- Klikněte na „Calculate“.
- Septin9 Crossing Point (“CP”) je pro každý vzorek počítán automaticky a zobrazen v tabulce vzorků „Sample Table“.
- Exportujte hodnoty CP kliknutím pravým tlačítkem myši na „Sample Table“. Zvolte „Export“. Uložte do souboru s jedinečným a smysluplným jménem .
- Aktivujte „Filter Comb 523 - 568“.
- Nastavte „First Cycle“ na 1 a „Last Cycle“ na „50“.
- Nastavte pozadí (klikněte na modré tlačítko „background“) na „5 – 22“ nastavením „Min Offset“ na „4“ a Max Offset na „21“ v okně „Cycle Range“.
- Nastavte šum na „Noise Band (Fluoresc)“ a nastavte šum ručně na „0.8“ v okně „Noise Band“.
- Poté co vyberete „Threshold (Manual)“ v okně „Analysis“ nastavte práh na „0.8“.
- Nastavte počet „Fit Points“ na 2 v okně „Analysis“ window.
- Klikněte na „Calculate“.
- ACTB CP hodnoty jsou pro každý vzorek počítány automaticky a zobrazeny v tabulce vzorků „Sample Table“.
- Exportujte hodnoty CP kliknutím pravým tlačítkem myši na „Sample Table“. Zvolte „Export“. Uložte do souboru s jedinečným a smysluplným jménem .

**Poznámka:** Nastavte „Noise Band“ a „Threshold“ tak, aby byly těsně nad pozadím „background“ a aby prošly amplifikační křivkou na počátku exponenciální fáze. Amplifikační křivky bez významné exponenciální fáze by měly být vyhodnoceny jako negativní.

#### 11.4. Platnost experimentu na základě Epi proColon kontrol (LightCycler 480 Instrument I)

Jakýkoliv experiment (vzorky pacientů analyzované spolu s Epi proColon pozitivní a negativní kontrolou) je považován za platný, jestliže hodnoty všech tří PCR reakcí jsou v souladu s hodnotami uvedenými v tabulce 11.

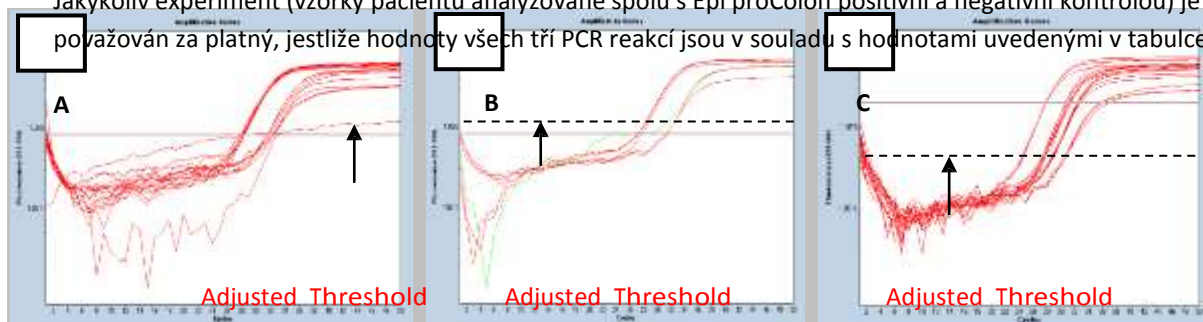


Figure 4: Ukázky amplifikačních křivek pro Septin9 při použití LightCycler 480. A: amplifikační křivka bez významné exponenciální fáze by měla být vyhodnocena jako negativní. B: Prah „Threshold“ by měl být přizpůsoben tak, aby byl těsně nad pozadím „background“. C: Prah „Threshold“ by měl být přizpůsoben tak, aby prošl amplifikační křivkou na začátku exponenciální fáze.

Jestliže Epi proColon pozitivní nebo negativní kontrola (nebo obě) je neplatná, vzorky pacientů analyzované paralelně s kontrolami nemohou být vyhodnoceny. Test musí být pro všechny analyzované vzorky pacientů opakován.



Table 11: Limity platnosti Epi proColon kontrol analyzovaných přístrojem (LightCycler 480 Instrument I)

Výsledek kontroly	Determinace	Septin9 výsledek	ACTB výsledek
Platná pozitivní kontrola	PCR1	<b>CP* ≤ 40.6</b>	CP* ≤ 29.5
	PCR2	<b>CP* ≤ 40.6</b>	CP* ≤ 29.5
	PCR3	<b>CP* ≤ 40.6</b>	CP* ≤ 29.5
Platná negativní kontrola	PCR1	<b>Bez CP* hodnoty</b>	CP* ≤ 36.5
	PCR2		CP* ≤ 36.5
	PCR3		CP* ≤ 36.5

\*Crossing Point (prahová hodnota)

### 11.5. Interpretace výsledků pro jednotlivou PCR reakci (LightCycler 480 Instrument I)

Vyhodnocení jednotlivé PCR je provedeno podle tabulky 12. Indikuje-li výsledek vnitřní kontroly (ACTB) dostatečné množství DNA v jednotlivé PCR (ACTB Ct specifikovaný v tabulce 12), PCR reakce pro Septin9 určí výsledek této jednotlivé PCR (viz. Kapitola 13). Hodnota ACTB jiná než hodnota Ct uvedená v tabulce 12 znamená pro tuto jednotlivou PCR výsledek „neplatná PCR“.

Table 12: Interpretace výsledků PCR reakce (LightCycler 480 Instrument I)

Výsledek jednotlivé PCR	Výsledek pro Septin9	Výsledek pro ACTB
Septin9 pozitivní	CP* < 50	CP* ≤ 33.1
Septin9 negativní	CP* nestanoveno	CP* ≤ 33.1
Neplatný	Jakýkoliv výsledek	CP* > 33.1

\*Crossing Point (prahová hodnota)

## 12. Analýza na přístroji Roche LightCycler 480 Instrument II

### 12.1. Příprava PCR destičky (LightCycler 480 Instrument II)

- Připravte PCR destičku. Doporučené uspořádání vzorků je v tabulce 6.

- Přeneste 15 µl PCR Master Mix do vybraných jamek LightCycler 480 Multiwell Plate 96-jamkové destičky.
- Destičku s bisDNA vytvořenou v části 9.2.13 krátce centrifugujte po dobu 1 minuty na 1000 ± 100 rcf.
- Do příslušných jamek na destičce přidejte 15 µl roztoku bisDNA . Uzavřete destičku pomocí LightCycler 480 Sealing Foil.
- Destičku krátce centrifugujte 1 minutu na 1000 ± 100 rcf.

**Poznámka:** Destička s PCR reakcemi může být skladována až 4 hodiny v lednici při 2 až 8 °C.

## 12.2. Vložení destičky do přístroje (LightCycler 480 Instrument II)

**Poznámka:** Doporučuje se uložit templátový soubor (\*.ixo) s nastavením cyklování a analýzy.

- Spusťte Software verzi 1.5.x.
- Vytvořte nový experiment, klikněte na „Create New Experiment“.
- Otevřete příslušný templátový soubor nebo vytvořte nový dokument podle vzoru v tabulce 13.
- Otevřete zásuvku pro destičku.
- Vložte PCR destičku do rámu (pozice A1 je v horním levém rohu), přesvědčte se, že destička pasuje přesně do rámu. Zavřete zásuvku.
- Klikněte na „Start“, abyste spustili reakci.

Tabulka 13: Standardní PCR program pro LightCycler 480 Instrument II.

- LightCycler 480 Instrument I: zvolte „Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe“ jako detekční formát
- aktivujte kombinaci filtru 465 – 510 nm a 533 – 580 nm
- nastavte „Reaction Volume“ na „30“.

Parametr Programu	Denaturace	Cyklování			Ochlazení
Mód analýzy	není	kvantifikace			není
Opakování	1	50			1
Segment	1	1	2	3	1
Teplota [°C]	94	62	56	93	40
Čas [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Rychlost rampingu [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Sběr dat	není	není	Single	není	není

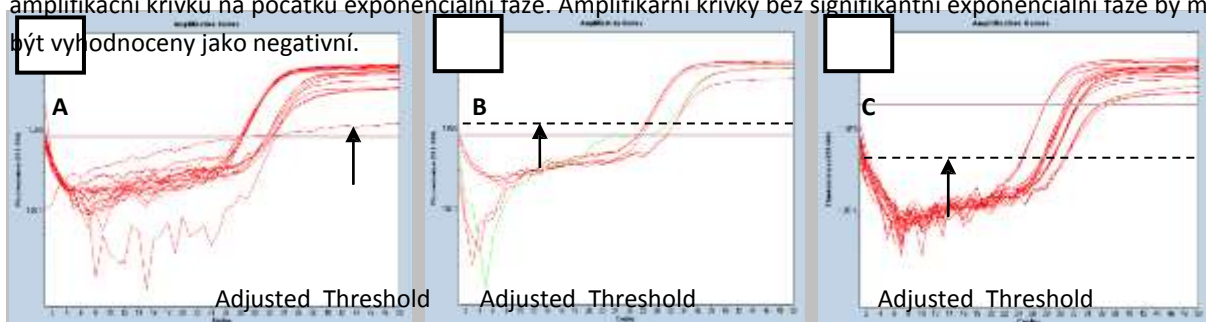
\*Pro LightCycler 480 II: vyberte „Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe“ jako detekční formát; aktivujte kombinaci filtrů 465-510 nm a 533-580 nm a nastavte Reaction volumen na „30“.

## 12.3. Nastavení pro analýzu (LightCycler 480 Instrument II)

**Poznámka:** analyzujte pouze použité jamky vytvořením příslušného editoru pro vzorky, který je popsán v návodu na LightCycler 480 Instrument II.

- Klikněte na „Analysis“ v LightCycler 480 základním modulu softwaru otevřením okna „Analysis Overview“.
- Zvolte „Abs Quant/Fit Points“ pro všechny vzorky.
- Aktivujte „Filter Comb 465 – 510“
- Nastavte „First Cycle“ na „1“ a „Last Cycle“ na „50“
- Nastavte pozadí (klikněte na modré tlačítko „background“) na „5 - 22“ nastavením „Min Offset“ na „4“ a „Max Offset“ na „21“ v okně „Cycle Range“.
- Nastavte hladinu šumu „Noise Band (Fluoresc)“ a nastavte ručně hladinu šumu na „2.0“ v okně „Noise Band“.
- Poté co vyberete „Threshold (Manual)“ v okně „Analysis“ nastavte práh na „2.0“.
- Nastavte počet „Fit Points“ na „2“ v okně „Analysis“.
- Klikněte na „Calculate“.
- Septin9 Crossing Point (“CP”) je pro každý vzorek počítán automaticky a zobrazen v tabulce vzorků „Sample Table“.
- Exportujte hodnoty CP kliknutím pravým tlačítkem myši na „Sample Table“. Zvolte „Export“. Uložte do souboru s jedinečným a smysluplným jménem .
- Aktivujte „Filter Comb 533 - 580“.
- Nastavte „First Cycle“ na „1“ a „Last Cycle“ na „50“.
- Nastavte pozadí (klikněte na modré tlačítko „background“) na „5 – 22“ nastavením „Min Offset“ na „4“ a Max Offset na „21“ v okně „Cycle Range“.
- Nastavte šum na „Noise Band (Fluoresc)“ a nastavte šum ručně na „2.0“ v okně „Noise Band“.
- Poté co vyberete „Threshold (Manual)“ v okně „Analysis“ nastavte práh na „2.0“.
- Nastavte počet „Fit Points“ na „2“ v okně „Analysis“ window.
- Klikněte na „Calculate“.
- ACTB CP hodnoty jsou pro každý vzorek počítány automaticky a zobrazeny v tabulce vzorků „Sample Table“.
- Exportujte hodnoty CP kliknutím pravým tlačítkem myši na „Sample Table“. Zvolte „Export“. Uložte do souboru s jedinečným a smysluplným jménem.

**Poznámka:** Nastavte „Noise Band“ a „Threshold“ tak, aby byly těsně nad pozadím „background“ a aby prošly amplifikační křivku na počátku exponenciální fáze. Amplifikační křivky bez signifikantní exponenciální fáze by měly být vyhodnoceny jako negativní.



Obr. 5: Ukázky amplifikačních křivek pro Septin9 při použití LightCycler 480. A: amplifikační křivka bez signifikantní exponenciální fáze by měla být vyhodnocena jako negativní. B: Práh „Threshold“ by měl být přizpůsoben tak, aby byl těsně nad pozadím „background“. C: Práh „Threshold“ by měl být přizpůsoben tak, aby proťal amplifikační křivky na začátku exponenciální fáze.

#### 12.4. Platnost experimentu na základě Epi proColon kontrol (LightCycler 480 Instrument II)

Jakýkoliv experiment (vzorky pacientů analyzované spolu s Epi proColon pozitivní a negativní kontrolou) je považován za platný, jestliže hodnoty všech tří PCR reakcí jsou v souladu s hodnotami uvedenými v tabulce 14.

Jestliže Epi proColon pozitivní nebo negativní kontrola (nebo obě) je neplatná, vzorky pacientů analyzované paralelně s kontrolami nemohou být vyhodnoceny. Test musí být pro všechny analyzované vzorky pacientů opakován.

Table 14: : Limity platnosti Epi proColon kontrol analyzovaných přístrojem (LightCycler 480 Instrument II)

Výsledek kontroly	Determinace	Septin9 výsledek	ACTB výsledek
Platná pozitivní kontrola	PCR1	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
	PCR2	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
	PCR3	CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3
Platná negativní kontrola	PCR1	CP* nestanoveno PCR3	CP* ≤ 37.1
	PCR2		CP* ≤ 37.1
	PCR3		CP* ≤ 37.1

\*Crossing Point (prahová hodnota)

#### 12.5. Interpretace výsledků pro jednotlivé PCR (LightCycler 480 Instrument II)

Vyhodnocení jednotlivé PCR je provedeno podle tabulky 15. Indikuje-li výsledek vnitřní kontroly (ACTB) dostatečné množství DNA v jednotlivé PCR (ACTB Ct specifikovaný v tabulce 15), PCR reakce pro Septin9 určí výsledek této jednotlivé PCR (viz. Kapitola 13). Hodnota ACTB jiná než hodnota Ct uvedená v tabulce 15 znamená pro tuto jednotlivou PCR výsledek „neplatná PCR“.

Table 15: Interpretace výsledků pro jednotlivé PCR (LightCycler 480 Instrument II).

Výsledek jednotlivé PCR	Výsledek pro Septin9	Výsledek pro ACTB
Septin9 pozitivní	CP* < 50	CP* ≤ 33.7
Septin9 negativní	CP* nestanoveno	CP* ≤ 33.7
Neplatný	Jakýkoliv výsledek	CP* > 33.7

\* Crossing Point (prahová hodnota)

### 13. Interpretace výsledků u vzorku od pacienta

Výsledek testu pro vzorek pacienta se interpretuje podle tabulky 16. Výsledek testu vzorku pacienta je „POZITIVNÍ“, jestliže alespoň dva ze tří PCR replikátů jsou pozitivní na Septin9. Výsledek testu vzorku pacienta je „NEGATIVNÍ“, jestliže alespoň dva ze tří PCR replikátů jsou negativní na Septin9. Ve všech dalších případech je test „NEPLATNÝ“.

Table 16: Interpretace výsledků testu Epi proColon 2.0 CE.

Výsledek testu	Pozitivní kontrola	Výsledky pro jednotlivé PCR
POZITIVNÍ	PLATNÝ	Alespoň dva test pozitivní na Septin9
NEGATIVNÍ	PLATNÝ	Alespoň dva test negativní na Septin9
NEPLATNÝ	PLATNÝ	Všechny další případy
NEPLATNÝ	NEPLATNÝ	Nelze aplikovat

### 14. Kontrola kvality

#### 14.1. Externí kontroly

Epi proColon 2.0 CE obsahuje Epi proColon pozitivní negativní kontroly (M5-02-003). Tyto kontroly musí být zahrnuty v každém testování pro sledování úspěšného provedení pracovního postupu a k zajištění validity výsledků testu. Hodnoty Epi proColon pozitivních/negativních kontrol musí ležet v rozmezí platných limitů (viz. Tabulka 8, nebo Tabulka 11, nebo Tabulka 14). Pokud se kontrola nachází mimo specifikované rozmezí, příslušné testy jsou neplatné a musí být opakovány.

Pokud laboratorní postupy kontroly kvality vyžadují čtenější použití externích kontrol k ověření výsledků testování, řiďte se jimi.

#### 14.2. Vnitřní kontroly

Vnitřní kontrola detekuje bisulfidicky konvertovanou DNA actinu B (ACTB). Tato vnitřní kontrola monitoruje kvalitu vzorku, čistotu vzorku a odpovídající koncentraci DNA vzorku.

Výsledek testu na Septin9 PCR je vázán k hodnotám Ct nebo CP value u ACTB PCR (viz. Tabulka 9, nebo Table 12, nebo Tabulka 15). Ct nebo CP hodnoty ACTB PCR mimo specifikované rozmezí znamenají neplatný výsledek jednotlivé PCR; neboť takto vysoké hodnoty jsou spojovány s velmi nízkým množstvím bisDNA nebo inhibicí PCR.

## 15. Omezení metody

- Pro použití v in vitro diagnostice.
  - Produkt byl validován pouze pro kombinaci Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002), a Epi proColon Control Kit (M5-02-003). Součásti nesmí být nahrazeny jinými DNA izolačními metodami nebo PCR kity.
  - Produkt byl validován pouze pro krevní plazmu odebranou do BD Vacutainer® K2EDTA, S-Monovette® 9 ml Potassium-EDTA a S-Monovette® 8.5 ml CPDA zkumavek. Použití jiných typů vzorku a jiných odběrových zkumavek nebylo validováno.
- Skladování krve v odběrových zkumavkách S-Monovette® CPDA při teplotě přes 25°C může vést k falešně pozitivním výsledkům.
- Výrobek mohou používat pouze osoby se zkušenostmi a tréninkem provádění PCR esejí.
  - Detekce kolorektálního karcinomu je závislá na množství cirkulující nádorové DNA ve vzorku a může být ovlivněna metodikou odběru vzorku a jeho skladováním, faktory specifickými pro pacienta (např. věk, jiné choroby), a stádiem nádoru.
  - Výsledky nejsou potvrzujícím důkazem na přítomnost nebo nepřítomnost Kolorektálního karcinomu. Jakýkoliv pozitivní výsledek Epi proColon 2.0 CE testu by měl být potvrzen kolonoskopií nebo sigmoidoskopií
  - Pozitivní výsledek testu byl pozorován u klinicky diagnostikovaných pacientů s následujícími chorobami: chronická gastritida, esophagitida, ne revmatoidní artritida, rakovina plic, prsou a prostaty.
  - Pozitivní výsledek testu byl pozorován u těhotných žen.
  - Výsledek Epi proColon 2.0 CE testu musí být ověřen v souladu s dalšími klinickými parametry.

## 16. Charakteristiky účinnosti

### 16.1. Analytická citlivost

Analytická citlivost byla validována 3 pracovníky. Každý provedl 4 nezávislé experimenty se sadou 2 x 7 vzorků na hranici detekovatelnosti (Limit of Detection, LoD) s HeLa DNA (Septin9 pozitivní) o koncentracích 0, 6, 12, 18, 25, 35 and 50 pg/ml, což dává celkem 168 testů na Septin9. Všechna stanovení na přístroji Applied Biosystems 7500 Fast Dx s SDS v1.4 byla platná. 133 z 144 LoD vzorků s Septin9 pozitivní HeLa DNA bylo pozitivních a 24 z 24 vzorků s negativní HeLa DNA bylo negativních. Odhadnutý LoD95 pro Epi proColon 2.0 CE byl determinován pomocí logistického regresního modelu na 14 pg/ml (CI 95%: 9 pg/ml - 19 pg/ml).

Podobný model byl použit pro LightCycler 480 Instrument I. Odhadovaný LoD95 byl ekvivalentní.

### 16.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla testována na 9 alikvótech lidské plazmy ošetřené EDTA. Šest vzorků plazmy bylo od pacientů diagnostikovaných na kolorektální karcinom. Tři vzorky byly os pacientů bez zřejmých potíží jako kontroly. Vše bylo provedeno v šesti opakováních třemi pracovníky za použití různých šarží jak Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), tak Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002). V 54 případech z 54 Septin9 stanovení bylo konzistentně dosaženo očekávaných výsledků (pozitivní alikvóty Septin9 pozitivní; alikvóty bez nádoru Septin9 negativní).

### **16.3. Klinická citlivost a specificita**

Klinická účinnost Epi proColon 2.0 CE byla determinována na 149 klinických vzorcích příslušně zvolených pacientů s průměrným rizikem vzniku kolorektálního karcinomu, ale bez důkazu choroby; a na 197 klinických vzorcích v designu případové studie zahrnujících: jednak vzorky u nichž byl histologicky potvrzen kolorektální karcinom pokrývající všechna stádia a vzorky z kolonoskopicky ověřených negativních jedinců bez známek choroby.

Bisulfidicky konvertovaná DNA byla připravena z plazmy izolované do jedné hodiny od odběru s použitím Vacutainer® K2EDTA Tubes (Becton Dickinson). Platná měření na Septin9 byla získána v 346 případech z 346 vzorků (100 %).

V příslušně odebrané kohortě byl pozitivní 1 ze 149 vzorků. Odhadovaná četnost falešně pozitivních vzorků v této skupině pacientů je 1 % (CI 95 %: 0 % - 4 %). Tyto hodnoty přepočítané na klinickou specifitu odpovídají hodnotě 99 % (CI 95 %: 96 % - 100 %).

V kohortě 99 testovaných jedinců v designu případové studie bez příznaků choroby (kontroly), bylo 96 jedinců negativních na Septin9, což přepočítáno na klinickou specifitu odpovídá hodnotě 97 % (CI 95 %: 91 % - 99 %), viz. Tabulka 17.

Z 98 jedinců diagnostikovaných na kolorektální karcinom, bylo 79 vzorků pozitivních na Septin9 což znamená odhadovanou klinickou senzitivitu 81 % (CI 95 %: 72 % - 87 %). V časně lokalizovaných stádiích kolorektálního karcinomu byl Epi proColon 2.0 CE test pozitivní 43 (18 stádium I, 25 stádium II) z celkového počtu 56 pacientů (77 %).

Tabulka dole sumarizuje získaná data..

Table 17. Přehled dat klinické účinnosti Epi proColon 2.0 CE

Kontroly (screeninková kohorta)

	Kontroly (případová studie)	Všechny CRC	Lokalizované CRC
Platné výsledky	149	99	98
Septin9 pozitivní	1	3	79
Septin9 negativní	148	96	19
Positivity	1%	3%	81%

CRC – kolorektální karcinom

#### 16.4. Shoda dvou Real-Time PCR přístrojů

Shodnost Epi proColon 2.0 CE na Applied Biosystems 7500 Fast Dx Systému a LightCycler 480 Instrument I byla determinována současným měřením 48 vzorků plazmy s histologicky potvrzeným kolorektálním karcinomem ve všech stádiích a 52 vzorků jedinců bez příznaků choroby verifikovaných kolonoskopií. V 93 % (93/100) všech případů generovaly oba přístroje shodné výsledky na Septin9.

#### 16.5. Interference

Nebyla pozorována žádná interference u experimentálních kontrol a reagujících i nereagujících vzorků, u nichž byly zvýšeny hladiny nemetylované genomové DNA (100 ng/ml), Bilirubinu (0.20 mg/ml), Hemoglobinu (1 mg/ml), Triglyceridů (12 mg/ml), Proteinu (Albumin z lidského séra) (120 mg/ml), Erythrocytů (0.4% v/v), K2EDTA (20 mg/ml), Cholesterolu (5 mg/ml), k. močové (0.235 mg/ml), a Glukózy (10 mg/ml).



## 17. Význam symbolů

---



Konzultujte návod k použití

---



Order Number

---



Pro použití v In Vitro Diagnostice

---



Číslo šarže

---



Datum expirace

---



Výrobce

---



Skladujte při vyznačené teplotě

---

Počet testů

---

Nepoužívejte opakovaně

---

## 18. Reference

1. deVos, T et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clinical Chemistry* 55:7, 1337-46 (2009)
2. Lofton-Day, C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clinical Chemistry* 54:2, 414-423 (2008)
3. Model, F. et al. Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. *Mol Cancer Res* 5, 153-163 (2007)
4. Eads, C.A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 8, e32 (2000)

## 19. Kontaktní Informace:

Epi proColon 2.0 CE vyrábí:

Epigenomics AG

Geneststr. 5

10829 Berlin, Germany

Pro další informace a podporu pošlete e-mail nebo volejte:

[support@products.epigenomics.com](mailto:support@products.epigenomics.com)

Phone: +49 30 24345 222

Fax: +49 30 24345 555

Zastoupení pro ČR a SR:

PentaGen s.r.o.

Rooseveltova 1609

27201 Kladno,

Česká republika

e-mail: [info@pentagen.cz](mailto:info@pentagen.cz)

Telefon : +420 602 441 331

[www.pentagen.cz](http://www.pentagen.cz)

### Poznámka pro kupujícího

Epi proColon (Epi proColon®) je registrovaná ochranná známka firmy Epigenomics AG. Všechny ostatní ochranné známky, značky a názvy obsažené v tomto dokumentu jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

LightCycler® 480 System je registrovanou obchodní značkou firmy Hoffmann-La Roche Ltd.

Applied Biosystems®, MicroAmp® System jsou registrovanými obchodními značkami firmy Life Technologies Corporation;

DynaMag™ je obchodní značkou Life Technologies Corporation.

BD Vacutainer® je registrovanou obchodní značkou Becton Dickinson Inc./Corporation.

S-Monovette® je registrovanou obchodní značkou Sarstedt AG & Co.

Thermomixer®, Research®, Reference®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S.®, Combitips plus® jsou registrovanými obchodními značkami Eppendorf AG;

Safe Lock™ je obchodní značkou Eppendorf AG.

HandyStep® je registrovanou obchodní značkou Brand GmbH + Co KG.

Koupí tohoto produktu získává kupující právo podle Roche patentu používat jej výhradně k provádění in vitro diagnostiky u lidí. Kupujícímu nevzniká žádné obecné právo na patent ani licenci firmy Roche jiného druhu, než je zde uvedeno.