

Prostatype® Test System

Bitte lesen Sie vor Benutzung des Prostatype® Test Systems diese Gebrauchsanleitung aufmerksam durch und befolgen Sie die Instruktionen genau, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.



Revision 5, November 2017, Chundsell Medicals AB (www.chundsell.com/ifu)



CM-02-001



Chundsell Medicals AB
Industrivägen 19
SE-17148 Solna, Schweden

Inhaltverzeichnis	
1. Name und Verwendungszweck	3
2. Zusammenfassung und Erklärung	3
3. Grundlagen des Verfahrens	4
3.1. Prostatype® RT-qPCR Kit	4
3.2. Classification of Prostatic Malignancy Algorithm (CPMA)	5
4. Materialien	5
5. Anleitung für die Vorbereitung der Gewebeproben für die Analyse mit dem Prostatype® Test System	5
5.1. Schneiden der FFPE Gewebelöcke	5
5.2. Markieren und Quantifizieren des Tumorgewebes	6
5.3. Abschaben der Krebszellen (Scraping)	6
6. RNA-Extraktion aus Gewebeproben	7
7. Gebrauchsanleitung für das Prostatype® RT-qPCR Kit	7
8. Leistungsmerkmale des Prostatype® RT-qPCR Kits	7
8.1. Ausführliche Leistungsmerkmale	8
9. Gebrauchsanleitung für die CPMA-Datenbanksuche	8
9.1. Durchführung einer CPMA-Datenbanksuche	8
9.2. Korrekturfunktion (Correction enabling codes)	9
9.3. Sicherung der Daten	9
9.4. CPMA Instandhaltung	9
10. Beschränkungen, Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise	9
11. Erklärung der verwendeten Piktogramme	11
12. Referenzen	11
13. Kontakt	12

1. Name und Verwendungszweck

Das Prostatype® Test System (PrTS) ist dafür vorgesehen, Unterstützung bei der prognostischen Beurteilung frisch mit Prostatakarzinom diagnostizierter Patienten zu leisten. Mithilfe eines RT-qPCR Tests, klinischen Daten und einem Algorithmus, stellt PrTS eine Entscheidungshilfe bei der Behandlungswahl dar. Das PrTS besteht aus zwei Teilen:

1. Prostatype® RT-qPCR Kit: ein Test, der für die Analyse von Gesamt-RNA aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) humanen Prostatakarzinom (PCa)-Kern-Nadelbiopsien entwickelt wurde. Nach der RNA-Extraktion werden Reagenzien zugegeben, um vier Gene (ein Referenzgen und drei krebsbezogene Gene) zu amplifizieren.
2. Algorithmus zur Klassifizierung von Prostatakrebsmalignität (Classification of Prostatic Malignancy Algorithm; CPMA): eine Software, die einen Algorithmus enthält, der ähnliche (Referenz-)Patienten identifiziert und deren Überlebensdauer anzeigt. Damit bietet die Software Unterstützung bei der personalisierten Behandlungswahl für jeden individuellen Prostatakrebspatienten. Die Software berechnet zudem den P-Score: ein mathematisches Model, das basierend auf den genetischen und klinischen Parametern eines Patienten, die Aggressivität des Prostatakarzinoms abschätzt.

Das PrTS ist für den folgenden Verwendungszweck vorgesehen: Das PrTS enthält das Prostatype® RT-qPCR Kit und die Software CPMA. Das Prostatype® RT-qPCR Kit wird dazu verwendet, einen One-Step quantitative Reverse-Transkription-PCR (RT qPCR)-Test durchzuführen. Dadurch können die mRNA Expressionsniveaus der drei Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 in Relation zum Expressionsniveau des Gens GAPDH in RNA, die aus FFPE-Gewebe humaner Prostatakarzinom-Kernnadelbiopsien isoliert wurde, bestimmt werden. Die Expressionswerte werden zusammen mit anderen klinischen Parametern in die Software CPMA eingegeben. Das Ergebnis der CPMA-Datenbanksuche wird im Prostatype® Test System-Report dargestellt, in dem die drei ähnlichsten Referenzpatienten, die vom Algorithmus in der Referenzdatenbank identifiziert wurden, aufgeführt sind. Zudem wird ein numerischer Score (P-Score) berechnet, der die Wahrscheinlichkeit von aggressivem Prostatakrebs individuell für jeden Patienten abschätzt. Der Prostatype® Test System-Report kann von Ärzten und medizinischem Fachpersonal – zusammen mit anderen gängigen Parametern – als Hilfsmittel bei der Erstellung einer Prognose für Prostatakrebspatienten verwendet werden.

2. Zusammenfassung und Erklärung

Das Prostatype® Test System enthält (1) das Prostatype® RT-qPCR Kit und (2) die Software CPMA. Auf Grundlage eines Vergleichs von genetischen und klinischen Daten eines frisch mit Prostatakrebs diagnostizierten Patienten, durchsucht der CPMA eine Datenbank von authentischen Referenzpatienten und identifiziert die drei ähnlichsten Referenzfälle. Zudem werden Überlebensdauer und Behandlung dieser drei Referenzpatienten angezeigt. Mit dem P-Score kann zudem die Aggressivität des Prostatakarzinoms abgeschätzt werden. Diese Information kann zusammen mit anderen Parametern als Hilfsmittel bei der Erstellung einer Prognose verwendet werden. Dadurch zielt das PrTS darauf ab, Ärzte und Prostatakrebspatienten bei der Behandlungswahl zu unterstützen.

Das Prostatype® RT-qPCR Kit ist ein One-Step 4-Plex RT-qPCR-Assay. Der Test wurde speziell zur Quantifizierung der Genexpression dreier humaner Biomarker-Gene IGFBP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3), F3 (Coagulation Factor III (Thromboplastin, Tissue Factor)) und VGLL3 (Vestigial-like family member 3) entwickelt, die aus humanen Prostatakarzinom-FFPE-Gewebeproben extrahiert und auf das Expressionsniveau des GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase)-Gens normalisiert werden. Das Genexpressionsprofil wurde in einer schwedischen Kohorte mit 189 PCa-Patienten charakterisiert, bei denen die Erkrankung zwischen 1986 und 2001 diagnostiziert wurde. Bei dieser Kohorte wurden fast vollständige Follow-up-Daten zum Gesamtüberleben erfasst. Es hat sich gezeigt, dass sich die Patienten durch die Bestimmung des Genexpressionsprofils in die Subtypen „hohes Risiko“, „mäßiges Risiko“ und „geringes Risiko“ einstufen ließen (1). Weitere Untersuchungen und Verifizierungen

zeigten außerdem, dass die Vorhersagegenauigkeit im Hinblick auf das Gesamtüberleben bei PCa erhöht wird, wenn das Genexpressionsprofil ergänzend zu den übrigen gängigen klinischen Parametern mit einbezogen wird (2).

Das Prostatype® RT-qPCR Kit evaluiert die Gen-Expressionsniveaus dreier Biomarker in PCa-Gewebeproben. Das Gewebe sollte einen angemessen hohen Anteil an Krebsepithelzellen aufweisen, d.h. um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollte die jeweilige Gewebeprobe zu mindestens 50% aus Krebsepithelzellen bestehen (2). Die Expressionsniveaus der drei Biomarker in kanzerösen Epithelzellen der Prostata ist unabhängig vom pathologischen Gleason-Score. Dies deutet darauf hin, dass das Genprofil die zugrundeliegenden patho-genetischen Mechanismen von PCa reflektiert (2). Diese Studie unterstützt zudem die Hypothese einer zugrundeliegenden „Stammzellartigkeit“ („stemness“) bei der Entstehung und Progression von PCa (1,2). Es empfiehlt sich, das bei der Analyse eingesetzte Gewebe vorab durch einen Pathologen bewerten zu lassen. Dadurch soll gewährleistet werden, dass ausreichend Probenmaterial vorhanden ist, um ein aussagekräftiges Testergebnis zu erhalten.

Die mit dem Prostatype® RT-qPCR Kit gemessenen Expressionsniveaus der drei Biomarker-Gene werden zusammen mit den übrigen gängigen klinischen Parametern in die eigenständigen Software CPMA (Classification of Prostatic Malignancy Algorithm) eingegeben. Basierend auf diesen Daten führt die Software eine Ähnlichkeitssuche in der Referenzdatenbank durch. Diese umfassende, anonymisierte Patientendatenbank enthält genetische und klinische Daten historischer Referenzfälle. Der Algorithmus identifiziert die drei ähnlichsten Referenzpatienten und zeigt ihre Überlebensdauer sowie die Behandlung, die sie erhalten haben, an. Die Software basiert auf einem k-Nearest Neighbors (kNN) Algorithmus und ist durch Benutzername und Passwort geschützt, wodurch unzulässiger Zugriff auf die Datenbank verhindert wird.

3. Grundlagen des Verfahrens

3.1. Prostatype® RT-qPCR Kit

Das Prostatype® RT-qPCR Kit wurde als ein One-Step RT-qPCR Test konzipiert. Das Kit enthält alle Reagenzien zur Durchführung der reversen Transkription (RT), Amplifikation und Detektion von mRNA anhand einer quantitativen real-time Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem 4-Plex Reaktionsmix. Die Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert und zur Durchführung der RT-qPCR werden ausser den im Kit enthaltenen keine weiteren Reagenzien benötigt.

Die aus den FFPE-Gewebeproben extrahierte mRNA wird mit Hilfe sequenzspezifischer Primer für die drei Ziel-Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 sowie für das Referenzgen GAPDH *in vitro* in cDNA revers transkribiert. Im Anschluss erfolgt die Amplifikation und Detektion der so erhaltenen cDNA für die vier Gene, wobei dieselben sequenzspezifischen Primer zum Einsatz kommen. Für den genspezifischen Nachweis der Amplifikation werden individuelle, doppelt markierte Hydrolyse-Sonden (Taqman®) verwendet. Die vier Hydrolyse-Sonden sind mit individuellen Fluoreszenzfarbstoffen sowie Fluoreszenzquenchern versehen. Die Quencher verhindern die Detektion des Fluoreszenzsignals. Während der Amplifikation der Ziel-DNA wird jede Sonde, die an ein cDNA-Ziel bindet, durch die Exonucleasefunktion der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dadurch wird der Quencher räumlich vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt. Hierdurch entstehen unterschiedliche Fluoreszenzsignale in spezifischen Wellenlängen, die vom LightCycler® 480-II oder -I in den jeweiligen optischen Kanälen erkannt werden und somit die unabhängige Detektion und Quantifizierung der vier Gene in einem einzigen Reaktionswell ermöglichen.

In jedem PCR-Zyklus verstärken sich die Fluoreszenzsignale weiter und werden in Echtzeit (real-time) gemessen. Der Zyklus, in dem ein einzelnes Fluoreszenzsignal einen vordefinierten Schwellenwert überschreitet, wird als Crossing Point (Cp) bezeichnet. Der Cp-Wert hängt von der anfänglichen Konzentration des Ziel-Gens in der Probe ab: Je mehr Ziel-Gen in der getesteten mRNA-Probe vorliegt,

desto geringer ist der Cp-Wert. Das Prostatype® RT-qPCR Kit misst das Expressionsniveau der drei Ziel-Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 in Relation zum Expressionsniveau des GAPDH-Gens. Dies ermöglicht eine relative Quantifizierung unabhängig von der Inputmenge der Gesamt-mRNA. Die relative Expression wird durch den so genannten „Delta Cp-Wert“ angegeben und wie folgt berechnet:

$\Delta \text{Cp (Ziel-Gen)} = \text{Cp (Ziel-Gen)} - \text{Cp (GAPDH)}$.

Das Referenzgen GAPDH dient darüber hinaus als interne Kontrolle für die Evaluierung der Probenvalidität und –integrität und zur Überprüfung, ob ausreichend Gesamt-mRNA eingesetzt wurde.

3.2. Classification of Prostatic Malignancy Algorithm (CPMA)

Die Software CPMA wurde gemäß den Richtlinien ISO13485 und IEC 62304:2006/AMD1:2015 entwickelt. Das Programm kombiniert die genetische Information, die mit dem Prostatype® RT-qPCR Kit erhalten wurde, mit klinischen Parametern und kann so Ärzten bei der Erstellung einer Prognose behilflich sein. Diese Information soll Ärzte dabei unterstützen, eine Patienten-spezifische, relevante Behandlungswahl zu treffen.

Die Software vergleicht die Daten des neuen Patienten mit jedem einzelnen historischen Patienten in der Referenzdatenbank und identifiziert die drei Referenzpatienten, die dem neuen Patienten am ähnlichsten sind. Dem Ergebnis liegen also authentische, anonymisierte Patientendaten zu Grunde. Der CPMA basiert auf einem kNN-Algorithmus für Ähnlichkeitssuchen und transformiert, skaliert und gewichtet die jeweiligen Parameter, sodass ein optimales Ergebnis erzielt wird.

4. Materialien

Informationen zum Lieferumfang des Prostatype® RT-qPCR Kits sowie eine ausführliche Liste der Materialien die für das Prostatype® Test System benötigt werden, stehen in der **Gebrauchsanleitung des Prostatype®-RT-qPCR Kits** zur Verfügung (3). Der Prostatype® RT-qPCR Test wurde zur Verwendung in Kombination mit dem LightCycler® 480-II oder LightCycler® 480-I konzipiert. Bei der Installation, Kalibration, Leistungsverifizierung und Wartung des Roche LightCycler® 480 müssen die Anweisungen des Herstellers befolgt werden.

5. Anleitung für die Vorbereitung der Gewebeproben für die Analyse mit dem Prostatype® Test System

Das Prostatype® Test System wurde zur Verwendung von RNA, die aus humanen Prostatakarzinom-FFPE-Gewebeproben isoliert wurde, als Eingangsmaterial konzipiert. Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen, sind hohe Qualität und Integrität der RNA unbedingt erforderlich. Angemessene Probenaufbereitung des Biopsiematerials vor Beginn der RNA-Extraktion ist äußerst wichtig und beinhaltet folgende Schritte:

5.1. Schneiden der FFPE Gewebelöcke

Gemäß der in konventionellen, histopathologischen Protokollen beschriebenen Vorgehensweise werden aus den FFPE Gewebelöcken separate Schnitte angefertigt. Folgende Abweichungen von konventionellen Standardprotokollen sind zu beachten:

- DNase/RNase-freies Wasser sollte verwendet werden.
- Nach dem Trocknen des Gewebeschnittes wird der Paraffin-Schmelzschnitt weggelassen.

HINWEIS: Die verwendeten FFPE-Gewebelöcke sollten nicht älter als 11 Jahre sein.

HINWEIS: Gewebe, das in ungepuffertes Formalin eingebettet wurde, sollte nicht verwendet werden, da keine verlässlichen Ergebnisse erzielt werden können.

Folgende Schnitte werden angefertigt:

- 1 Gewebeschnitt von 5 µm Dicke: Dieser Schnitt wird zur Färbung mit Hematoxylin und Eosin (H&E) verwendet. Die Färbung wird gemäß eines Standardprotokolls durchgeführt.
- 9 sequentielle Gewebeschnitte von 10 µm Dicke: Diese Schnitte werden nicht gefärbt und werden zur RNA-Extraktion verwendet.

HINWEIS: Beim Transfer der Schnitte auf Objektträger sind DNase/RNase-Kontaminationen zu vermeiden!

5.2. Markieren und Quantifizieren des Tumorgewebes

Um das Tumorgewebe auf dem H&E-gefärbten Schnitt zu markieren, kann entweder ein traditionelles Mikroskop oder ein digitaler Scanner (z.B. iScan Coreo, Ventana Medical Systems, Inc.) verwendet werden.

HINWEIS: Dieser Schritt sollte von einem Pathologen oder von Fachpersonal mit äquivalenter Ausbildung durchgeführt werden, um Fehler beim Markieren des Tumorgewebes zu vermeiden.

HINWEIS: Die markierte Tumorfläche sollte zwischen 10 – 30 mm² groß sein. Wenn die Fläche manuell (d.h. mithilfe eines traditionellen Mikroskops) markiert wird, sollte ein 1,5 – 4,5 mm langer Bereich auf bis zu neun Schnitten markiert werden, um zu vermeiden, dass die Menge des gewonnenen Gewebes die Spezifikationen unterschreitet.

HINWEIS: Um gute Ergebnisse zu erzielen sollte die markierte Fläche mindestens zu 50% aus Krebszellen bestehen.

Mit einem konventionellen Mikroskop:

- Markieren Sie die Tumorfläche auf dem H&E-gefärbten Gewebeschnitt.
- Messen und berechnen Sie die Tumorfläche.

Mit einem digitalen Scanner:

- Scannen Sie die Bilder in 20-facher Vergrößerung.
- Markieren und berechnen Sie die Tumorfläche mithilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (z.B. Image Viewer, Ventana Medical Systems, Inc.).
- Übertragen Sie mithilfe eines Mikroskops die markierte Tumorfläche von dem gescannten Bild auf den H&E-gefärbten Gewebeschnitt.

Die so erhaltenen Proben dienen im folgenden Schritt als Schablone.

5.3. Abschaben der Krebszellen (Scraping)

In diesem Schritt werden der H&E-gefärbte Gewebeschnitt und die ungefärbten Schnitte als Eingangsmaterial verwendet. Zudem werden ein Einmalskalpell sowie ein DNase/RNase-freies 1,5 – 2,0 mL Reaktionsgefäß benötigt.

- Überlappen Sie den H&E-gefärbten Schnitt mit einem ungefärbten Gewebeschnitt.
- Identifizieren Sie die Tumorfläche, indem Sie den H&E-gefärbten Schnitt als Schablone verwenden und markieren Sie diese vorsichtig auf dem ungefärbten Schnitt mithilfe des Skalpells.

- Schaben Sie das Tumorgewebe mit dem Skalpell ab und sammeln Sie das gewonnene Gewebe in einem Reaktionsgefäß.
HINWEIS: Hierbei sollte sehr sorgfältig und mit hoher Präzision vorgegangen werden. Der Vorgang erfordert etwas Übung, um den optimalen Winkel beim Halten des Skalpells zu finden, der es erlaubt, das Gewebe zusammenhängend abzuschaben.
HINWEIS: Für jede neue Probe ist ein neues Einmalskalpell und ein frisches Reaktionsgefäß zu verwenden.
HINWEIS: Um optimale Testergebnisse zu erzielen, wird empfohlen 30 mm² Gewebe, das mindestens zu 50% aus Krebszellen besteht, abzuschaben. Um ausreichend Gewebe zu gewinnen, können Tumorproben von einer oder mehreren Biopsien desselben Patienten kombiniert werden.

6. RNA-Extraktion aus Gewebeproben

Um RNA aus dem gewonnenen Tumorgewebe zu extrahieren, empfehlen wir die Verwendung des Maxwell® 16 LEV RNA FFPE Purification Kit (Promega, Bestellnr. AS1260). Dabei ist den Anweisungen des Herstellers zu folgen, mit folgenden Ausnahmen:

- 1) Nach der Zugabe von Mineralöl wird der Inkubationsschritt bei 80°C für 2 min unter Schütteln bei 1200 rpm durchgeführt.
- 2) Verdau des Gewebes: Die Inkubationsschritte bei 56°C für 15 min sowie bei 80°C für 1 Stunde werden unter Schütteln bei 650 rpm durchgeführt.
- 3) Die extrahierte RNA soll noch am selben Tag mit dem Prostatype® RT-qPCR Kit analysiert werden.

7. Gebrauchsanleitung für das Prostatype® RT-qPCR Kit

Detaillierte Anweisungen für die Verwendung des Prostatype® RT-qPCR Kits sowie Anleitungen zur Auswertung der erhaltenen Rohdaten können der **Gebrauchsanleitung des Prostatype® RT-qPCR Kits** entnommen werden (3). Zusammenfassend wird die aus den FFPE-Proben extrahierte RNA als Eingangsmaterial für den Prostatype® RT-qPCR Test verwendet. Zusammen mit einer Prostatype® Positiv- und einer Negativkontrolle können bis zu 16 Patientenproben gleichzeitig getestet werden. Jede Patientenprobe und Kontrolle ist in Triplikaten zu testen. Die ΔC_p -Werte sowie Median- ΔC_p -Werte werden wie in der **Gebrauchsanleitung des Prostatype® RT-qPCR Kits** beschrieben, berechnet. Da die Auswertung des Tests anstelle von Mittelwerten auf der Bestimmung von Median- ΔC_p -Werten beruht, ist die Handhabung von Ausreißern im Zusammenhang mit dem Prostatype® RT-qPCR Kit irrelevant.

Hinweis: Wird das Kit für einen einzelnen Testlauf verwendet, können 16 Patientenproben getestet werden; wird das Kit für zwei getrennte Testläufe verwendet, können 14 Patientenproben getestet werden; bei Aufteilung in drei getrennte Testläufe können 12 Patientenproben getestet werden.

8. Leistungsmerkmale des Prostatype® RT-qPCR Kits

Das Prostatype® RT-qPCR Kit wurde validiert um mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 95% C_p (GAPDH)- Werte ≤ 28 zu generieren, wenn bei der Auswahl der Proben folgende Kriterien berücksichtigt werden:

- Es werden ungefärbte FFPE Gewebeschnitte von humanen Prostatakarzinom-Kernnadelbiopsien verwendet.
- Die Dicke der Gewebeschnitte beträgt 10 μm .
- Die Tumorfläche beträgt mindestens 30 mm² und der Krebszellenanteil beträgt $>50\%$.

Liegt die Tumorfläche zwischen $\geq 10 \text{ mm}^2$ und $< 30 \text{ mm}^2$ und besteht zu 2/3 aus Krebszellen, ist es dennoch empfehlenswert, mit der RNA Extraktion und dem Prostatype® RT-qPCR Test fortzufahren. Die Wahrscheinlichkeit, dass Cp (GAPDH)-Werte ≤ 28 generiert werden, liegt in diesen Fällen bei $< 80\%$. Bei Proben mit einer Tumorfläche $< 10\%$ und einem Krebszellenanteil von 2/3 liegt die Wahrscheinlichkeit, Cp (GAPDH)-Werte ≤ 28 zu erhalten, lediglich bei etwa 55%.

8.1. Ausführliche Leistungsmerkmale

Für ausführliche Informationen zu Quantifikationsgrenze, Detektionsgrenze, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit, Interferenzen und Relativer Sensitivität verweisen wir auf *Abschnitt 12* in der **Gebrauchsanleitung des Prostatype® RT-qPCR Kits**.

9. Gebrauchsanleitung für die CPMA-Datenbanksuche

Nach Erhalt der Cp-Werte für die vier Gene mithilfe des Prostatype® RT-qPCR Kits, werten Sie die Daten gemäß der Beschreibung in der **Gebrauchsanleitung des Prostatype® RT-qPCR Kits** aus und berechnen die Median- Δ Cp-Werte für die drei Gene IGFBP3, F3 und VGLL3 (3). Im nächsten Schritt wird eine Ähnlichkeitssuche auf Grundlage der Genexpressionswerte in Kombination mit klinischen Parametern durchgeführt. Das Ergebnis kann zur Erstellung einer Prognose hinzugezogen werden. Diese Ähnlichkeitssuche basiert auf der Software CPMA, die in der Referenzdatenbank nach den drei ähnlichsten Referenzpatienten sucht. Als Ergebnis wird die Spanne der Gesamtüberlebensdauer dieser drei Referenzpatienten angezeigt.

9.1. Durchführung einer CPMA-Datenbanksuche

Um die Datenbanksuche vorzunehmen, müssen folgende Schritte durchgeführt werden:

- Starten Sie das Programm durch Doppelklicken auf das CPMA-Software-Symbol.
- Mit Ihrem Benutzernamen und Passwort, das Sie von Chundsell Medicals AB erhalten haben, können Sie sich in die Software einloggen.
- Um die Daten eines neuen Patienten einzugeben, klicken Sie auf **New patient** in der oberen linken Ecke und geben Sie die Patienten-ID in das erscheinende Eingabefenster ein.
- Geben Sie die folgenden, numerischen Werte in die entsprechenden Textfelder ein: Gleason-Score, primäres Gleason-Muster, Tumorstadium, PSA-Wert, Alter bei Diagnose, Median- Δ Cp IGFBP3, Median- Δ Cp F3 und Median- Δ Cp VGLL3.
- Falls erwünscht, geben Sie Informationen bezüglich der Behandlungsmethode oder sonstige Anmerkungen in das dafür vorgesehene „Comment“-Textfeld ein.
- Geben Sie einen gültigen Kit-Code in das „Kit id“-Textfeld ein.
HINWEIS: Jedes Prostatype® RT-qPCR Kit liefert einen Kit-Code, der für 16 individuelle Proben verwendet werden kann.
- Wählen Sie dann **OK**. Sie werden nun dazu aufgefordert, die eingegebenen Informationen mit Ihrem CPMA-Benutzernamen und –Passwort zu bestätigen.

Um die Daten eines Patienten in der Liste einzusehen, führen Sie die folgenden Schritte durch:

- Wählen Sie den Patienteneintrag mittels Doppelklick auf die entsprechende Patienten-ID oder indem Sie auf **View patient** in der unteren linken Ecke klicken, aus.

HINWEIS: Das Ergebnis hängt von der Qualität und Korrektheit der eingegebenen Daten ab. Die Eingabe fehlerhafter Daten kann zum Erhalt ungenauer prognostischer Information führen.

HINWEIS: Um die Zustimmung/Ablehnung zu unterzeichnen sind entsprechende Benutzerrechte erforderlich.

- Schließen Sie das Fenster und geben Sie weitere Patientendaten ein oder sehen Sie andere Patienten entsprechend der oben aufgeführten Anweisungen ein.

HINWEIS: Falls inkorrekte Patientendaten eingegeben wurden, kann die in *Abschnitt 9.2.* beschriebene Funktion „correction enabling codes“ benutzt werden.

9.2. Korrekturfunktion (Correction enabling codes)

Falls fehlerhafte Daten in CPMA eingegeben wurden, gibt es die Korrekturfunktion *correction enabling code* (*korrektionsbefähigenden Code*), um diese zu berichtigen. Um diese Funktion zu nutzen, muss ein solcher Code bei Chundsell Medicals AB angefordert werden.

Um eine Berichtigung vorzunehmen gehen Sie folgendermaßen vor:

- Mit Ihrem Benutzernamen und Passwort können Sie sich in die Software einloggen.
- Wählen Sie unter **Tools** die Funktion **Correction enabling code**.
- Klicken Sie auf das entsprechende Feld und notieren Sie den aus drei Buchstaben bestehenden Code.
- Senden Sie diesen Code sowie das Datum, an dem Sie die Patientendaten ändern wollen, an info@chundsell.com.
- Sie erhalten daraufhin einen neuen Code, um die Korrekturfunktion zu entsperren.
- Geben Sie den erhaltenen Code an dem von Ihnen gewählten Datum ein, um die Korrekturfunktion zu nutzen.
HINWEIS: Der Code ist nur an dem von Ihnen gewählten Datum gültig und es kann nur ein Patienteneintrag je Code geändert werden kann.
- Wählen Sie den entsprechenden Patienten aus und klicken Sie auf **Set patient obsolete** in der oberen linken Ecke, um die bisherigen Einträge als ungültig zu erklären.
- Erstellen Sie einen neuen Eintrag, indem Sie die korrekten Patientendaten eingeben.
- Unterschreiben Sie diese Änderung mit Ihrem Benutzernamen und Passwort.

Der zuvor inkorrekt eingegebene Patient ist nun als hinfällig (obsolete) markiert. Die neuen Patientendaten können wie in *Abschnitt 9.1.* beschrieben, mit den drei ähnlichsten Referenzpatienten verglichen.

HINWEIS: Es wird empfohlen, sich direkt nach der Nutzung von CPMA auszuloggen und das Programm zu schließen, um unerlaubtes Benutzen der Software zu vermeiden.

9.3. Sicherung der Daten

Es wird empfohlen, die Patientendaten regelmäßig auf einem sicheren Datenträger zu speichern.

- Lokalisieren Sie den Ordner, der die verschlüsselten Datenbankdateien enthält (*.cpma). Standardmäßig finden Sie diesen Ordner unter:
“[root:]/ProgramData/ChundsellMedicalsAB/CPMA”.
- Kopieren Sie den Ordner auf den gewünschten Datenträger, z.B. eine sicher verwahrte und passwortgeschützte externe Festplatte.

9.4. CPMA Instandhaltung

Es ist keine Wartung nötig, um CPMA funktionsfähig zu halten.

10. Beschränkungen, Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise










Tragen Sie stets einen Laborkittel und Einweg-Laborhandschuhe, wenn Sie das Prostatype® RT-qPCR Kit verwenden, um sich selbst zu schützen sowie um Kontamination der Reagenzien und Proben zu vermeiden. Diese Maßnahmen sind auch während der Probenvorbereitung (Scraping) einzuhalten.

Das Prostatype® RT-qPCR Kit enthält keine gefährlichen oder gesundheitsgefährdenden Bestandteile. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS), die Sie auf unserer Website http://chundsell.com/msds_deutsch/ einsehen und herunterladen können.

Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen ist es *unabdinglich* die Anweisungen in dieser Gebrauchsanleitung zu befolgen. Ein Nichteinhalten dieser Richtlinien kann zur Generierung fälschlicher oder ungültiger Daten führen sowie dazu, dass keine Testergebnisse erzielt werden.

- Das Testverfahren darf nur in professionellen Laboren von Personen durchgeführt werden, die mit der Handhabung von RNA und der Durchführung von real-time PCR-Assays vertraut sind.
- Die Einhaltung der Regeln zur Guten Laborpraxis ist äußerst wichtig, um das Risiko der Kreuzkontamination zwischen den Proben während und nach der RNA-Extraktion sowie während der Probenaufreinigung zu minimieren.
- Vermeiden Sie bakterielle Kontamination der Reagenzien, wenn Sie den Reagenzienflaschen die Aliquote entnehmen.
- Um DNA-Kontamination zu vermeiden, sollten allgemeine Empfehlungen zur Organisation und Ablauf von Laborarbeit eingehalten werden.
- Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination der Patientenproben wird die Verwendung steriler Pipettenspitzen mit Aerosolsperre empfohlen.
- Vor dem Gebrauch des Prostatype® RT-qPCR Kits müssen sämtliche Oberflächen, Materialien und Ausrüstungsgegenstände/Geräte mit einem DNA- und RNase-Dekontaminationsreagenz behandelt werden (z.B. DNA AWAY®, RNase AWAY®).
- Idealerweise sollten RNA-Tests ausschließlich an einem speziell dafür vorgesehenen Ort im Labor durchgeführt werden.
- Die Proben, die mit dem Prostatype® Test System analysiert werden sollen, sind von einem Pathologen oder von Fachpersonal mit äquivalenter Ausbildung auszuwählen.
- Das Prostatype® Test System verwendet Proben, die aus ungefärbten, 10 µm dicken FFPE-Gewebeschnitten von Prostatakarzinom-Kernnadelbiopsien gewonnen wurden, als Eingangsmaterial.
- Für optimale Ergebnisse werden 30 mm² Eingangsgewebe mit mindestens 50% Krebszellenanteil benötigt.
- Die extrahierte RNA ist noch am selben Tag mit dem Prostatype® RT-qPCR Test zu analysieren und sollte nicht gelagert werden.
- Für jede qPCR-Reaktion sind die Prostatype® Positiv- und Negativkontrolle auf derselben Platte zu testen.
- Alle Patientenproben sowie die Prostatype® Positiv- und Negativkontrolle sind in Triplikaten zu analysieren.
- Das Prostatype® RT-qPCR Kit sollte ausschließlich von ausgebildetem Laborpersonal verwendet werden, das gemäß der entsprechenden Richtlinien von Chundsell Medicals AB ausgebildet und zertifiziert wurde (4)
- Die Vorbereitung der Prostatype® RT-qPCR sollte bei Zimmertemperatur erfolgen (15 – 25 °C).
- Die Rohdaten (Cp Werte) müssen gemäß der Anweisungen in der **Gebrauchsanleitung des Prostatype® RT-qPCR Kits** ausgewertet werden, um die Validität des Tests zu überprüfen und um Δ Cp-Werte und Median- Δ Cp-Werte zu generieren.
- Der Prostatype® RT-qPCR Test wurde für einen Roche LightCycler® 480-II oder einen Roche LightCycler® 480-I konzipiert.
- Zur Vermeidung einer Kontamination durch Amplifikate aus früheren PCR-Läufen empfehlen wir die strikte Trennung zwischen den Aktivitäten vor (z.B. RNA-Extraktion, Reinigung, PCR-Vorbereitung) und nach der PCR (z.B. real-time-PCR). Weiterhin empfehlen wir, benutzte PCR-Platten so zu entsorgen, dass keine PCR-Produkte freigesetzt werden können; z.B. sollten die PCR-Platten sofort nach ihrer Entnahme aus dem PCR-Gerät in einen wiederverschließbaren Plastikbeutel (oder eine gleichwertige Verpackung) gegeben werden, dann sollte der Beutel in einen speziell dafür vorgesehenen Abfallbehälter gegeben werden. Lagern Sie niemals eine benutzte PCR-Platte außerhalb des PCR-Geräts. Öffnen Sie auch niemals eine benutzte PCR-Platte.

11. Erklärung der verwendeten Piktogramme

	Bitte lesen Sie die Gebrauchsinformation
	Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum
	Chargennummer
	Verfallsdatum
	Hersteller
	Temperaturbegrenzung
	Ausreichend für <n> Tests
	Barcode

12. Referenzen

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

4. Prostatype® RT-qPCR Kit Instructions for Use. Chundsell Medicals. 2017
5. 501008x: Training Material Prostatype Test System. Chundsell Medicals. 2016

13. Kontakt

Hersteller des Prostatype® Test Systems ist:

Chundsell Medicals AB
Industrivägen 19
SE-17148 Solna
Schweden

Wenn Sie weitere Informationen und technischen Support benötigen, schreiben Sie uns bitte eine E-Mail an info@chundsell.com oder rufen Sie uns unter der Telefonnummer +46 (0)8-20 87 00 an.